

CONTROL QUIMICO DE *Sclerotium rolfsii* SACC.¹

Chemical control of *Sclerotium rolfsii* Sacc.

José Henríquez S.² y Jaime Montealegre A.²

S U M M A R Y

The degree of *in vitro* chemical control of *Sclerotium rolfsii* utilizing the fungicides carboxin + thiram, iprodione, mepronil, oxicarboxin, pencycuron, procymidone, tolclofos methyl, triadimefon, triadimenol, tridemorf and vinclozolin was determined.

The agar dilution method was employed and the effect of the fungicides was measured through the radial growth of the fungus mycelium, at 48; 72 and 120 hours after incubation at 27°C.

The fungicides pencycuron, procymidone, tridemorf and vinclozolin, did not inhibit the fungus mycelial growth, being it, for the two first ones, just like the test. Iprodione showed an initial inhibitory activity of fungistatic kind, showing a great mycelial growth at 120 hours after incubation.

The effective fungicides and its minimal inhibitory concentrations (MIC) were: carboxin + thiram 12.1 ppm a.i.; mepronil 40.5 ppm a.i.; oxicarboxin 40.3 ppm a.i.; tolclofos methyl 1.44 ppm, a.i.; triadimefon 41.7 ppm a.i. and triadimenol 36.6 ppm a.i.

The effective fungicides, evaluated at its MIC's, were only fungistatic for the sclerotia of the fungus, it was observed even increasing 10 times such concentrations.

Key words: fungicides, *Sclerotium rolfsii*, sclerotia, minimal inhibitory concentrations (MIC).

INTRODUCCION

En febrero de 1981 es detectada por primera vez en Chile la presencia de *Sclerotium rolfsii* Sacc. (Esterio y Auger, 1982). El control de este patógeno es difícil, debido a que puede atacar un gran número de plantas (Jenkins y Averre, 1986) y por los esclerocios que produce, los cuales pueden sobrevivir en el suelo por muchos años (Brown y Hendrix, 1980). No obstante, la severidad del ataque de este hongo puede ser reducida mediante prácticas culturales (Beebe, 1981), solarización (Jenkins y Averre, 1986), control químico (Punja, Grogan y Unruh, 1982 y Harrison, 1961) y control biológico (Wells, Bell y Jaworski, 1972).

En términos generales, es posible afirmar que es difícil destruir los esclerocios con fungicidas (Beebe, 1981); sin embargo, en estudios *in vitro* y de campo, se han encontrado algunos pesticidas (fungicidas,

herbicidas y fumigantes) que inhiben la germinación de los esclerocios o el crecimiento del micelio de *S. rolfsii* (Jenkins y Averre, 1986).

Entre los fungicidas que han demostrado tener un mayor efecto sobre el control de este patógeno, figuran: PCNB (Harrison, 1961; Jenkins y Averre, 1986 y Mordue, 1974), captafol (Beebe, 1981 y Brown y Hendrix, 1980); thiram (Bozarth y Tweedy, 1971 y Diomande y Beute, 1977); carboxin (Diomande y Beute, 1977 y Jenkins y Averre, 1986); oxicarboxin (Punja y otros, 1982); cycloheximida (Punja y otros, 1982) y tridemorf (Beebe, 1981).

Desde que *S. rolfsii* fuera descrito por primera vez en Chile, a la fecha, se encuentra distribuido entre la V y VII regiones del país, habiéndose encontrado atacando manzanos, claveles, remolacha, fréjoles (Montealegre y Esterio, 1989). Debido a lo anterior, y a que no existen antecedentes sobre el control de este patógeno en Chile, se realizó la siguiente investigación, cuyo objetivo fue determinar el efecto *in vitro* de los fungicidas: carboxin + thiram, iprodione, mepronil, oxicarboxin, pencycuron, procymidone, tolclofos methyl, triadimefon, triadimenol, tridemorf y vinclozolin, sobre el mencionado hongo.

¹Recepción de originales: 8 de agosto de 1990.

Parte de la memoria de título presentada por el primer autor a la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad de Chile, para optar al título de Ingeniero Agrónomo.

²Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad de Chile, Casilla 1004, Santiago, Chile.

MATERIALES Y METODOS

La investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Sanidad Vegetal de la Escuela de Agronomía de la Universidad de Chile, utilizándose una cepa de *S. rolfsii* aislada de plantas de fréjol, procedentes de la localidad de Ocoa, V Región. Los fungicidas evaluados, se presentan en el Cuadro 1.

CUADRO 1. Fungicidas evaluados en el control *in vitro* de *S. rolfsii*

TABLE 1. Evaluated fungicides in the *in vitro* control of *S. rolfsii*

Nombre técnico	Nombre comercial	Formulación, %
Carboxin + thiram	Vitavax-T	37,5 PM
Iprodione	Rovral	50,0 PM
Mepronil	Basitac	75,0 PM
Oxycarboxin	Plantvax	20,0 EC
Pencycuron	Monceren	25,0 PM
Procymidone	Sumislex	50,0 PM
Tolclofos methyl	Risolex	50,0 PM
Triadimefon	Bayleton	25,0 PM
Triadimenol	Baytan	25,0 EC
Tridemorf	Calixin	83,5 LE
Vinclozolin	Ronilan	50,0 PM

Para determinar el efecto de los fungicidas sobre el micelio de *S. rolfsii*, se utilizó el método de dilución de éstos en el medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (APD), evaluándolos en las concentraciones de 0, 50, 100 y 200 ppm i.a.

Los fungicidas disueltos en APD fueron posteriormente vertidos en placas Petri, y luego de la solidificación del medio, se colocó un disco de APD de 8 mm de diámetro, con micelio de *S. rolfsii* de un cultivo de 4 a 7 días, situándolo al centro de la placa Petri, y con el micelio del hongo en contacto con el medio. Posteriormente, se incubó a 27°C, midiéndose los radios de crecimiento alcanzados por el micelio a las 48, 72 y 120 horas. Se realizaron 5 repeticiones por tratamiento y el tratamiento testigo estuvo representado por placas Petri con APD libre de fungicida.

Una vez seleccionados los fungicidas efectivos a las concentraciones antes señaladas, se procedió a determinar las correspondientes concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) para cada uno de ellos. Para tal efecto, se evaluaron en las concentraciones de 0; 2,5; 5; 10; 20; 40 y 50 ppm i.a., utilizándose la misma metodología antes descrita. Luego, se sembró micelio del hongo y se incubó a 27°C por

120 horas, midiéndose posteriormente los radios de crecimiento alcanzados por el micelio en las distintas concentraciones.

Con los valores obtenidos en cada repetición (en las observaciones originales) se realizaron análisis de regresión, ajustando a curvas polinómicas que relacionan crecimiento con concentración; de esta manera, mediante las ecuaciones correspondientes, se pudo obtener la concentración mínima en que el micelio no crece.

Finalmente, se evaluó el efecto de los fungicidas sobre los esclerocios de *S. rolfsii*. El procedimiento consistió en sumergir los esclerocios en soluciones de los fungicidas efectivos, en sus CMI por 10 minutos, las soluciones se hicieron en agua destilada estéril y se agitaron periódicamente para evitar la formación de precipitados.

Posteriormente, los esclerocios fueron trasladados a placas Petri con APD. Se pusieron 20 esclerocios por placa y se dispusieron 5 placas por tratamiento, formando un modelo de aleatorización completa. Al término de 7 días de incubación a 27°C, se determinó el porcentaje de esclerocios que lograron germinar.

RESULTADOS

Efecto de los fungicidas sobre el micelio de *Sclerotium rolfsii*

Según el efecto sobre el micelio de *S. rolfsii*, los fungicidas estudiados se pueden separar en dos grupos, aquellos en los cuales se verificó crecimiento miceliar en las tres concentraciones probadas (Cuadro 2), y aquellos en que no hubo crecimiento.

En el Cuadro 2, se puede observar que tanto para pencycuron como para procymidone, el crecimiento miceliar se presentó similar al observado en el testigo, evidenciándose, también, que en la mayor concentración de procymidone existió una disminución de crecimiento notoria a las 48 y 72 horas de medición. Al comparar ambos fungicidas con el testigo, el micelio creció en forma normal, con formación de gran cantidad de esclerocios.

Vinclozolin, en las tres concentraciones estudiadas, ejerció una notoria inhibición del crecimiento, siendo el desarrollo del micelio más denso que el testigo, formándose masas alargadas de micelio de una forma peculiar, similares a plumeros; este crecimiento fue normalmente ascendente, desde la superficie del medio de cultivo. Hubo también una formación normal de esclerocios.

CUADRO 2. Radio de crecimiento del micelio de *S. rolfsii* (cm)**TABLE 2. Growth radius of the *S. rolfsii* mycellum (cm)**

Tratamiento	Concentración			
	(ppm i.a.)	48 hr	72 hr	120 hr
Testigo	0	1,98	3,79	4,20*
Pencycuron	50	1,88	4,12	4,20*
	100	1,98	4,07	4,20*
	200	1,96	3,55	4,20*
Procymidone	50	2,30	4,07	4,20*
	100	1,77	3,62	4,20*
	200	1,10	2,81	4,20*
Tridemorf	50	0,38	0,76	1,42
	100	0,12	0,24	0,39
	200	0,00	0,01	0,05
Vinclozolin	50	0,79	1,60	3,09
	100	0,88	1,63	3,09
	200	0,98	1,87	3,35

*Radio máximo de la placa Petri.

Por otra parte, tridemorf generó una marcada inhibición del crecimiento, el que fue prácticamente nulo en la concentración más alta. El micelio se desarrolló anormalmente, siendo muy plano y denso, creciendo en forma de círculos concéntricos. Los esclerocios también se presentaron anormales, formándose algunos de tamaño muy pequeño y otros muy grandes, con respecto al testigo, no obstante, la producción de éstos, fue abundante.

Los restantes fungicidas, inhibieron completamente el crecimiento de *S. rolfsii*, en todas las concentraciones estudiadas.

Cabe señalar, que si bien iprodione, mostró ejercer una inhibición completa del crecimiento, con posterioridad, a las 120 horas de medición y en las tres concentraciones probadas, se produjo un rápido y vigoroso crecimiento del micelio del hongo con características muy similares a las observadas en el testigo. Por esta razón, este fungicida fue descartado de los ensayos posteriores, ya que dicha conducta no se obtuvo con ninguno de los restantes fungicidas.

De esta manera, y considerando los resultados obtenidos, se seleccionó en forma inmediata a aquellos fungicidas efectivos en el control del micelio de *S. rolfsii*, sin necesidad de realizar los análisis estadísticos pertinentes para tal efecto, usándose como criterio, el seleccionar aquellos fungicidas efectivos, incluso a 50 ppm de ingrediente activo.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Para el caso de tolclofos methyl, donde no hubo crecimiento a 2,5 ppm, se utilizaron, además de las concentraciones indicadas en Materiales y Métodos, 1,25; 0,625 y 0,3125 ppm i.a.; mientras que para carboxin + thiram, fue necesario probar también las concentraciones de 15 y 7,5 ppm i.a., ello con el fin de realizar un ajuste más exacto del cálculo de la CMI, debido a que con las concentraciones iniciales se obtuvieron pocos datos, pues no se registró crecimiento tanto a 40 como a 20 ppm.

En el Cuadro 3, se muestra el rango de concentraciones para cada fungicida, al cual se inhibe completamente el crecimiento del hongo.

CUADRO 3. Rango de concentraciones en que se encuentran las respectivas CMI y CMI obtenida de los diferentes fungicidas**TABLE 3. Concentration ranges for the observed MIC and the MIC obtained for the different fungicides**

Fungicida	Concentración (ppm i.a.)	CMI (ppm i.a.)
Carboxin + thiram	10 - 15	12,10
Mepronil	40 - 50	40,50
Oxycarboxin	40 - 50	40,30
Tolclofos methyl	1,25 - 2,50	1,44
Triadimefon	40 - 50	41,70
Triadimenol	20 - 40	36,60

Mediante análisis de regresión de los valores obtenidos en las respectivas mediciones, se procedió a ajustarlos a curvas polinómicas de tercer y cuarto grado, con las cuales se pudo obtener el punto de corte del eje de las abscisas, correspondientes al punto de mínima concentración (CMI), donde el micelio no crece (figuras 1 a 6 y Cuadro 3).

Con posterioridad, se procedió a comprobar, *in vitro*, las CMI calculadas, verificándose que ellas efectivamente inhibían en forma total el crecimiento de *S. rolfsii*.

Resalta la forma que presentan las figuras 2, 3 y 5, pues no demuestran una conducta lógica, sin embargo, debido a que se trabajó con una sola cepa de la fase asexual del hongo, la respuesta observada en cada repetición fue muy similar, de modo que cada valor de medición puntual resultó ser muy cercano al valor promedio de cada tratamiento; ésto indica que la forma observada en dichas curvas, no responde más que a la expresión

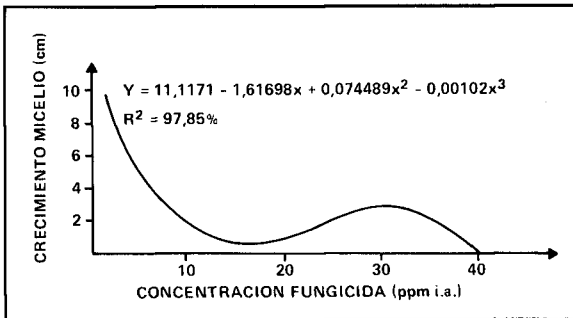


FIGURA 1. Carboxin + thiram. Ajuste a curva de tercer grado.

FIGURE 1. Carboxin + thiram. Adjustment to third degree curve.

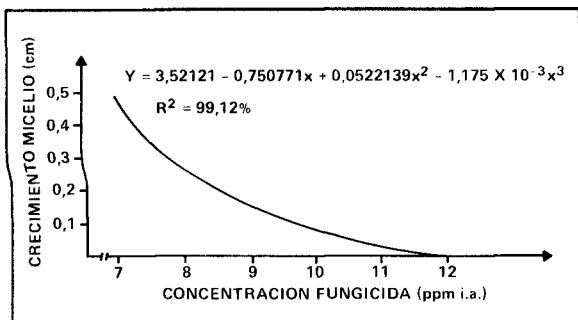


FIGURA 2. Mepronil. Ajuste a curva de tercer grado.

FIGURE 2. Mepronil. Adjustment to third degree curve.

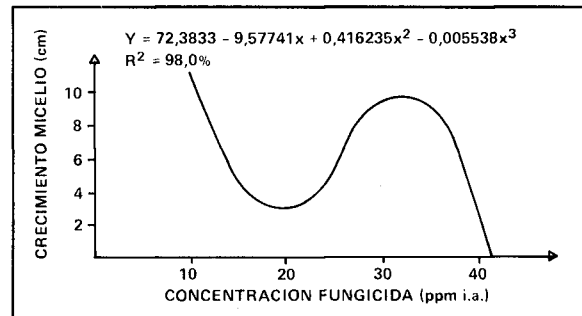


FIGURA 3. Oxicarboxin. Ajuste de tercer grado.

FIGURE 3. Oxicarboxin. Adjustment to third degree curve.

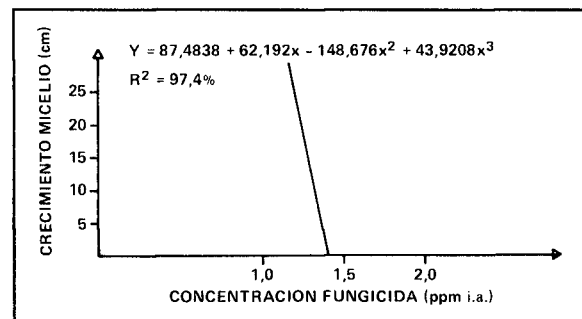


FIGURA 4. Tolclofos methyl. Ajuste a curva de tercer grado.

FIGURE 4. Tolclofos methyl. Adjustment to third degree curve.

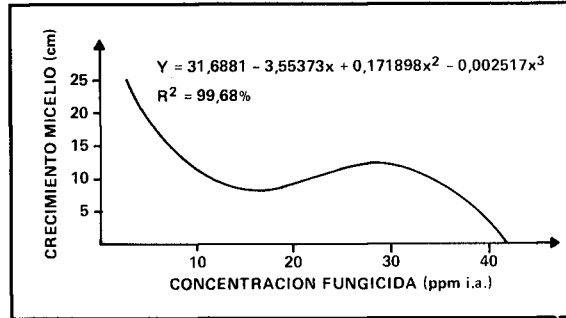


FIGURA 5. Triadimefon. Ajuste de tercer grado.

FIGURE 5. Triadimefon. Adjustment to third degree curve.

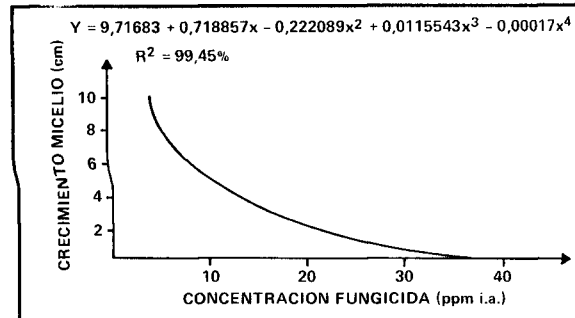


FIGURA 6. Triadimenol. Ajuste a curva de cuarto grado.

FIGURE 6. Triadimenol. Adjustment to fourth degree curve.

matemática de un fenómeno biológico, pues, naturalmente, al ir probando concentraciones mayores de los fungicidas siempre se obtuvo valores decrecientes del crecimiento del micelio.

Efecto de los fungicidas sobre los esclerocios

En este ensayo, se pudo determinar que mediante la metodología utilizada, los fungicidas evaluados no presentaron acción sobre los esclerocios de *Sclerotium rolfsii*, pues, ya a las 24 horas de incubación, luego de haberlos sumergido en las soluciones respectivas, el 100% de los esclerocios de cada tratamiento, logró germinar, generando un micelio extensivo y de características normales. Frente a estos resultados, se procedió a aumentar el tiempo de exposición de los esclerocios a las soluciones de los fungicidas, haciéndolo por 20 y 30 minutos, verificándose la misma respuesta. Ante tal situación, se decidió incrementar diez veces la CMI de los fungicidas, sin que existieran cambios con respecto a la observación original. No obstante, al colocar esclerocios en medio de cultivo con los fungicidas incluidos en sus CMI, existió un 100% de inhibición en la germinación de éstos, siendo esta inhibición de tipo fungiestática, pues al pasar los esclerocios a medios de cultivo libres de fungicida, el 100% logró germinar.

DISCUSION

De los resultados obtenidos, se puede inferir que aquellos fungicidas evaluados que actúan interfiriendo en el proceso respiratorio de los hongos, como son carboxin, mepronil y oxicarboxin, son efectivos contra *S. rolfsii*, así como también aquellos que actúan inhibiendo la síntesis de ergosterol, como triadimefon y triadimenol. Sin embargo, en el caso de tridemorf, que también presenta este último mecanismo de acción, se pudo observar que si bien mostró afectar el desarrollo del micelio de *S. rolfsii*, no resultó ser totalmente inhibitorio para su crecimiento, incluso en la concentración mayor estudiada, por lo que se podría suponer que este fungicida sería efectivo en concentraciones mayores a las probadas. Cabe señalar, que este fungicida es mencionado por Beebe (1981) como efectivo en condiciones de campo en el control de este patógeno.

La respuesta presentada por iprodione, con posterioridad a las 120 horas de incubación, demuestra que este fungicida tendría una actividad inhibitoria inicial de tipo fungiestática, pues no produjo una pérdida de viabilidad del micelio, desapareciendo dicha actividad en un tiempo muy corto, probablemente, debido a una rápida degradación, aún cuando las condiciones de laboratorio permitirían una mayor duración del efecto residual que en condiciones de campo. Razón por lo cual, este fungicida fue descartado para el estudio posterior.

Al observar las concentraciones mínimas inhibitorias obtenidas, resalta la de tolclofos methyl, por ser una concentración muy baja (1,44 ppm i.a.), no obstante, resulta similar a la obtenida por Kesavan (1984), quien obtuvo una concentración mínima de 0,5 ppm i.a. de este fungicida para una cepa del mismo patógeno.

Mukhopadhyay y Thakur (1971) encontraron una completa inhibición del desarrollo de *S. rolfsii* con una concentración de 1,5 ppm i.a. del fungicida carboxin, mientras que Bozarth y Tweedy (1971), obtuvieron el mismo efecto con thiram, pero a una

concentración de 50 ppm i.a., esto podría indicar una disminución del efecto de carboxin en la mezcla, pues en ella sólo se obtuvo una CMI de 12,1 ppm i.a., ocho veces mayor a lo observado por los primeros autores. No obstante, es posible que estas diferencias puedan deberse a un diferente comportamiento de las cepas de *S. rolfsii*, o bien a las condiciones en que se realizaron las distintas investigaciones.

Uno de los problemas de mayor importancia en el control del patógeno estudiado, corresponde a la destrucción de sus esclerocios. Con los resultados obtenidos, se pudo establecer el hecho que dichos esclerocios presentan una gran capacidad para aislarse del medio, de modo que toleran la presencia de fungicidas, los cuales no penetran a su interior mientras éstos se mantienen en latencia a la espera de condiciones favorables que propicien su activación. Estos resultados estarían corroborando lo expresado por Beebe (1981), quien señala la dificultad de destruir los esclerocios por medio de fungicidas. Este último hecho, pone de manifiesto la importancia de integrar diferentes métodos de control para este patógeno, pues, mientras que el micelio puede ser controlado con fungicidas, los esclerocios presentes podrían destruirse con solarización (Jenkins y Averre, 1986) u otras medidas culturales, así como también inocular antagonistas efectivos como lo demuestran los trabajos de Wells y otros (1972) y Elad y otros (1982), quienes obtuvieron un buen control biológico en ensayos de campo con aplicaciones de *Trichoderma harzianum*, verificándose una gran actividad parasítica de este hongo sobre los esclerocios de *S. rolfsii*.

CONCLUSIONES

Solo los fungicidas: carboxin + thiram, mepronil, oxicarboxin, tolclofos methyl, triadimefon y triadimenol, fueron efectivos en el control *in vitro* del micelio de *S. rolfsii*. Estos mismos fungicidas sólo presentaron una acción fungiestática sobre los esclerocios del patógeno, incluso cuando su concentración mínima inhibitoria fue aumentada diez veces.

RESUMEN

Se determinó el grado de control químico *in vitro* sobre *Sclerotium rolfsii* de los fungicidas: carboxin + thiram, iprodione, mepronil, oxicarboxin, pencycuron, procymidone, tolclofos methyl,

triadimefon, triadimenol, tridemorf y vinclozolin, en las concentraciones de 0; 2,5; 5; 10; 20; 40; 50; 100 y 200 ppm de ingrediente activo.

Se utilizó el método de dilución de los fungicidas en Agar Papa Dextrosa y el efecto de los tratamientos fue medido a través del crecimiento radial del micelio del hongo a las 48, 72 y 120 horas después de incubarlo a 27°C.

Los fungicidas pencycuron, procymidone, tridemorf y vinclozolin, no inhibieron el crecimiento del micelio del hongo, siendo éste, para los dos primeros, similar al testigo. Iprodione mostró una actividad inhibitoria inicial de tipo fungiestática, produciéndose un gran crecimiento del micelio del hongo, luego de las 120 horas de incubación.

Los fungicidas efectivos y sus respectivas concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) fueron:

carboxin + thiram, 12,1 ppm i.a.; mepronil, 40,5 ppm i.a.; oxicarboxin, 40,3 ppm i.a.; tolclofos methyl, 1,44 ppm i.a.; triadimefon, 41,7 ppm i.a. y triadimenol, 36,6 ppm i.a.

Los fungicidas efectivos, evaluados en sus CMI, sólo presentaron acción fungiestática sobre los esclerocios del hongo, efecto que fue observado incluso al incrementar en diez veces dichas concentraciones.

Palabras claves: fungicidas, *Sclerotium rolfsii*, esclerocios, concentraciones mínimas inhibitorias (CMI).

LITERATURA CITADA

- BEEBE, S. 1981. Pudriciones radicales del frijol y su control. Cali, Colombia, CIAT. Boletín Técnico Serie 0458-06.07. 52 p.
- BROWN, E. A. and HENDRIX, F. F. 1980. Distribution and control of *Sclerotium rolfsii* on apple. *Plant Disease* 64: 205-206.
- BOZARTH, G. A. and TWEEDY, B. G. 1971. Effect of pesticides on growth and sclerotial production of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 61: 1.140-1.142.
- DIOMANDE, M. and BEUTE, M. K. 1977. Comparison of soil plate fungicide screening and field efficacy in control of *Sclerotium rolfsii* on peanuts. *Plant Disease Reporter* 61: 408-412.
- ELAD, Y., CHET, I. HENIS, Y. and HADAR, Y. 1984. Prevention with *Trichoderma harzianum* Rifai aggr. of reinfestation by *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani* Kühn of soil fumigated with methyl bromide, and improvement of disease control in tomatoes and peanuts (Summary). *Review of Plant Pathology* 63(2-3): 438.
- ESTERIO, M. y AUGER, J. 1982. Presencia de *Pellicularia rolfsii* (Curzi) West. (*Sclerotium rolfsii* Sacc.) en la zona central del país. *Simiente* 52(1-2): 32.
- HARRISON, A. K. 1961. Control of *Sclerotium rolfsii* with chemicals. *Symposium on Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 51: 124-127.
- JENKINS, S. F. and AVERRE, C. W. 1986. Problems and progress in integrated control of southern blight of vegetables. *Plant Disease* 70: 559-572.
- KESAVAN, R. 1985. *In vitro* efficacy of certain fungicides against *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*. (Summary). *Review of Plant Pathology* 64(6): 2.315.
- MONTEALEGRE, J. y ESTERIO, M. 1989. Presencia de *Sclerotium rolfsii* Sacc. en cultivos de fréjol (*P. vulgaris*) en la V Región de Chile. *Agricultura Técnica* 49: 66-68.
- MORDUE, J. E. 1974. *Corticium rolfsii*. Kew, England. C.M.I. Description of Pathogenic Fungi and Bacteria Nº 410.
- MUKHOPADHYAY, A. N. and THAKUR, R. P. 1971. Control of *Sclerotium* root rot of sugar beet with systemic fungicides. *Plant Disease Reporter* 55: 630-634.
- PUNJA, Z. K., GROGAN, R. G. and UNRUH, T. 1982. Chemical control of *Sclerotium rolfsii* on golf greens in Northern California. *Plant Disease* 66: 108-111.
- WELLS, H.D., BELL, D. K. and JAWORSKI, G. A. 1972. Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a biocontrol for *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 62: 442-447.