
IDENTIFICACIÓN Y SENSIBILIDAD *IN VITRO* A FUNGICIDAS DEL AGENTE CAUSAL DE LA PODREDUMBRE DEL TALLO EN PLÁNTULAS DE *Eucalyptus cinerea* EN MÉRIDA, VENEZUELA

Chrystian Carrero, Luis Cedeño, Kleyra Quintero, Henry Pino y Luis Rodríguez

RESUMEN

En noviembre 2001 se detectó podredumbre en el tallo de plántulas de *Eucalyptus cinerea* producidas bajo condiciones controladas en invernadero de la Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales de la Universidad de Los Andes. La enfermedad mató 5% de las plántulas. Los síntomas iniciales se apreciaron como clorosis, flacidez y, finalmente, necrosis. Las características morfológicas de las estructuras reproductivas permitieron identificar el patógeno como *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. [teleomorfo *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel]. Los facto-

res predisponentes en el desarrollo de la enfermedad fueron alta temperatura (32°C) y alta humedad relativa (80%). Pruebas de patogenicidad confirmaron, por primera vez en Venezuela, la patogénesis entre *B. cinerea* y *E. cinerea*. Se evaluó la sensibilidad *in vitro* de *B. cinerea* a los fungicidas Benomilo, Myclobutanil, Azoxystrobin, Clorotalonil, Prochloraz y Mancozeb. La mayor sensibilidad ocurrió con Prochloraz, el cual inhibió completamente el desarrollo del hongo.

SUMMARY

On November 2001 a stem rot disease was detected on *Eucalyptus cinerea* seedlings grown under controlled conditions in a greenhouse at the Faculty of Forestry and Environmental Sciences of the Universidad de Los Andes, Merida, Venezuela. The disease killed 5% of the seedlings. Initial symptoms were appreciated as chlorosis, flabbiness and, finally, necrosis. The morphometric characteristics of reproductive structures allowed the identification of the pathogen as *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. [teleomorph of *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel]. The

predisposing factors in the disease development were high temperature (32°C) and high relative humidity (80%). Pathogenicity tests confirmed, for the first time in Venezuela, the pathogenesis between *B. cinerea* and *E. cinerea*. *In vitro* sensitivity tests were carried out to evaluate the sensitivity of *B. cinerea* to the fungicides Benomyl, Myclobutanil, Azoxystrobin, Clorotalonil, Prochloraz and Mancozeb. The highest sensitivity occurred with Prochloraz, which completely inhibited fungal growth.

Introducción

En Venezuela, la importancia de la producción de *Eucalyptus cinerea*, comúnmente llamado eucalipto dólar de plata, radica principalmente en la gran demanda de sus ramas y hojas para la preparación de arreglos florales, así como el uso de las plantas para la ornamentación de jardines. La superficie plantada en el área andina es cercana a

las 5ha, concentrándose en los estados Mérida (3ha) y Trujillo (2ha); no obstante, la mayor superficie se encuentra en el estado Miranda, totalizando para el país alrededor de 30ha.

La producción de plántulas de *E. cinerea* se ha convertido en un negocio rentable, debido principalmente, a los altos precios registrados en el mercado por los productos obtenidos de esta especie. Dife-

rentes técnicas para la propagación exitosa de la especie han sido ensayadas; sin embargo, la producción en tubetes bajo condiciones de invernadero ha resultado hasta ahora una de las más promisorias.

En noviembre 2001 se detectó una podredumbre en el tallo del 5% de las plántulas de *E. cinerea* producidas en un invernadero experimental de la Facultad de Ciencias

Forestales y Ambientales de la Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela, donde las condiciones del promedio de temperatura y humedad relativa eran de 32°C y 80%, respectivamente. Los síntomas iniciales fueron apreciados como clorosis, flacidez y necrosis del tallo (Figura 1), lo cual resultaba en la muerte de la plántula. Observaciones de los signos y aislamientos preliminares, permitieron identifi-

PALABRAS CLAVE / *Botrytis cinerea* / *Eucalyptus cinerea* / Podredumbre del Tallo / Fungicidas /

Recibido: 18/06/2003. Modificado: 25/09/2003. Aceptado: 16/10/2003

Chrystian Carrero. Ingeniero Agrónomo, Universidad del Zulia, Venezuela. Master en Manejo de Bosques, Universidad de Los Andes (ULA), Venezuela. Profesor Agregado, Instituto de Investigaciones Agropecuarias (IIAP), ULA. Dirección: IIAP- ULA. Mérida 5101, Venezuela. e-mail: cfcarrer@ula.ve.

Luis Cedeño. Ingeniero Agrónomo, Universidad de Oriente, Venezuela. Master en Patología Vegetal, Universidad de Georgia, EEUU. Profesor Titular, IIAP-ULA.

Kleyra Quintero. T.S.U. en Agrotecnia, Instituto Tecnológico de Ejido (IUTE), Venezuela. Asistente de Laboratorio, IIAP-ULA.

Henry Pino. T.S.U. en Agrotecnia, IUTE. Asistente de Laboratorio, IIAP-ULA.

Luis Rodríguez. Estudiante de la Escuela de Ingeniería Forestal, Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales, ULA.

Em novembro de 2001 se detectou podridão no caule de plântulas de *Eucalyptus cinerea* produzidas sob condições controladas em invernadero da Faculdade de Ciências Florestais e Ambientais da Universidade de Los Andes. A enfermidade matou 5% das plântulas. Os sintomas iniciais se apreciaram como clorosis, flacidez e, finalmente, necroses. As características morfológicas das estruturas reprodutivas permitiram identificar o patógeno como *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. [teleomorfo *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel]. Os fatores predisponentes no

desenvolvimento da enfermidade foram, alta temperatura (32°C) e alta umidade relativa (80%). Provas de patogenias confirmaram, por primeira vez na Venezuela, a patogêneses entre *B. cinerea* e *E. cinerea*. Se avaliou a sensibilidade in vitro de *B. cinerea* aos fungicidas Benomilo, Myclobutanil, Azoxystrobin, Clorotalonil, Procloraz e Mancozeb. A maior sensibilidade ocorreu com Procloraz, o qual inibiu completamente o desenvolvimento do fungo.

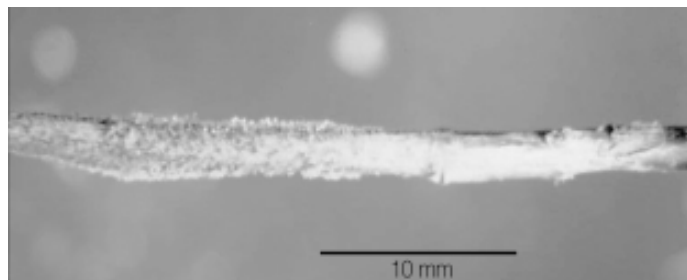


Figura 1. Podredumbre del tallo de *Eucalyptus cinerea*, causado por *Botrytis cinerea*.

car, tentativamente, como posible agente causal de la enfermedad a un hongo del género *Botrytis*.

Debido a la importancia que tiene el género *Botrytis* como causa de enfermedades en una amplia variedad de cultivos agrícolas, se han realizado numerosos estudios acerca de la identificación y epidemiología de las especies asociadas con estas patologías, así como en el control de las epifitias. Sin embargo, en especies de plantas forestales y, particularmente en eucaliptos, la información sobre enfermedades causadas por estos hongos es escasa (Mittal *et al.*, 1987).

Por mucho tiempo y en diferentes partes del mundo, *Botrytis* spp. han representado un obstáculo para la producción de numerosos cultivos (Rosslenbroich y Stuebler, 2000). Tradicionalmente, el control químico se ha utilizado en el combate de enfermedades causadas por estos hongos, lo cual, en algunos casos, ha inducido el desarrollo de razas resistentes a diferentes fungicidas (Ruppel *et al.*, 1980; Whiteside, 1980; Chiba y Northover, 1988; Hilber y Hilber-Bod-

mer, 1988; McGrath *et al.*, 1996).

El presente estudio tuvo como finalidad identificar, a nivel de especie, el agente causante de podredumbre en el tallo de plántulas de *E. cinerea*, así como evaluar *in vitro* su sensibilidad a seis fungicidas comerciales.

Materiales y Métodos

Aislamiento e identificación

Para los aislamientos se utilizaron plántulas de *Eucalyptus cinerea* F. J. Muell. ex Benth con síntomas de podredumbre en el tallo, colectadas de los invernaderos de la Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales de la Universidad de Los Andes en Mérida. De la interfase tejido sano - tejido enfermo, se seleccionaron fragmentos de aproximadamente 2mm² que fueron lavados por 10min con agua corriente, desinfectados superficialmente por 5min en solución 0,5% de hipoclorito de sodio, lavados varias veces en agua destilada estéril (ADE), secados con papel absorbente estéril y sembrados asepticamente en placas de agua-agar 2% acidificado a pH 6 con

ácido láctico (AAA). Las placas fueron incubadas a 25 ±2°C en oscuridad. Los cultivos emergentes se purificaron por transferencia de ápices hifales a placas de papa-dextrosa-agar (PDA; Difco). Los conidios fueron montados en formalina al 4% y observados en un microscopio Zeiss Axioplan. La identidad de la especie de *Botrytis* se estableció comparando las características morfológicas de las estructuras del patógeno aislado con las reportadas en la literatura de la especialidad (Ellis, 1971, 1976).

Pruebas de patogenicidad

Para evaluar la patogenicidad del hongo se inocularon plántulas sanas de *E. cinerea* producidas bajo condiciones de invernadero en tubetes plásticos con mezcla estéril de cascarrilla de arroz quemado, residuo de cachaza y bagazo. Veinte plántulas fueron inoculadas con una solución conidial de 4,6x10⁴ conidios/ml mediante aspersión de la parte aérea. Ocho plántulas testigos fueron tratadas con ADE solamente. El cultivo utilizado para la inoculación creció en medio PDA durante 15 días en oscuridad a 25 ±2°C. Las plántulas inoculadas se sometieron a condiciones de humedad relativa cercana al 100%, manteniéndolas cubiertas con bolsas de plástico transparente durante el transcurso de las pruebas. Se realizaron observaciones diarias del desarrollo de los síntomas, así como reaislamientos para confirmar el cumplimiento de los postulados de Koch.

Pruebas de sensibilidad a fungicidas

Se evaluó la sensibilidad del patógeno a seis fungicidas, de los cuales tres están registrados como sistémicos: Benomilo (1500ppm), Myclobutanil (200ppm) y Azoxystrobin (500ppm), y tres como protectivos: Clorotalonil (2000ppm), Mancozeb (2500ppm) y Procloraz (3000ppm). El inóculo de *Botrytis* utilizado en las pruebas de sensibilidad fue producido durante 72h en PDA, en incubadora a 25 ±2°C y total oscuridad. Discos de agar-micelio de 0,6cm de diámetro se colocaron en el centro de placas de PDA enmendado con el fungicida correspondiente. El fungicida fue incorporado al medio después que este había sido esterilizado en autoclave y antes de ser vaciado a placas plásticas desechables. Las placas fueron incubadas en oscuridad a 25 ±2°C. Se utilizaron 5 repeticiones por tratamiento y 5 testigos que contenían únicamente PDA. Las variables evaluadas fueron la tasa de crecimiento micelial y la capacidad de esporulación (Carrero y Cedeno, 2001).

Resultados y Discusión

Aislamiento e identificación

De plántulas con síntomas de podredumbre en el tallo se aisló un hongo del género *Botrytis*, el cual produjo *in situ* conidios ovales de color marrón pálido y de 11,5 x 6,9µm (10,0-12,5 x 6,5-8,0µm). Cuando el hongo fue cultivado en PDA durante 13

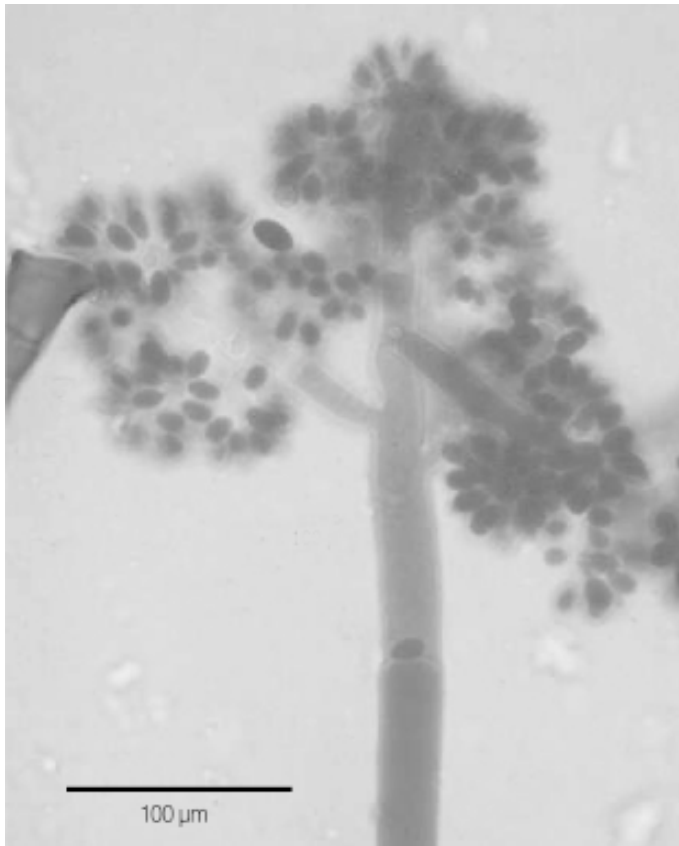


Figura 2. Conidióforos y conidios de *Botrytis cinerea* en plántulas inoculadas.

días en total oscuridad formó colonias de color blanco a blanco grisáceo y conidios (Figura 2) de $16,2 \times 8,2 \mu\text{m}$ ($12,0\text{-}21,0 \times 7,0\text{-}11,0 \mu\text{m}$). El análisis comparativo de las características morfológicas con las correspondientes a las 16 especies más importantes del género *Botrytis*, permitió identificar el hongo en estudio como *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. [teleomorfo *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel], coincidiendo con los rangos dimensionales y sus características (Mittal *et al.*, 1987; Ellis, 1971, 1976).

Desde el punto de vista del número de especies de plantas susceptibles y las dificultades para su control, *B. cinerea* es el más importante representante dentro de este género. *B. cinerea* ha sido relacionado con problemas de enfermedades en algunas especies forestales, causando principalmente podredumbre de la raíz en *Pinus banksiana* Lamb., *P. ponderosa* Laws., *P. resinosa*

Ait.; tizón y mortalidad en plántulas de *Abies* spp., *Cupressus macrocarpa* Gord., *C. Sempervirens* L., *Picea* spp., *Pinus radiata* D. Don., *P. resinosa* Ait., *P. virginiana* Will. (Mittal *et al.*, 1987) y, particularmente, en eucaliptos, en los cuales ha sido asociado con tizón en tallos, brotes y hojas jóvenes de *Eucalyptus viminalis* Labill. (Ghini y Kruner, 1981), *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Meiden (Souza y Ferreira, 1999) y *Eucalyptus* spp. (Mittal *et al.*, 1987). *Botrytis alli* Munn. Igualmente ha sido relacionado con patologías en semillas de coníferas (Mittal *et al.*, 1987).

Pruebas de patogenicidad

Todas las plantas inoculadas con *B. cinerea* desarrollaron los mismos síntomas observados en las plántulas infectadas naturalmente. Los síntomas comenzaron a manifestarse a las 48h después de

la inoculación (ddi); las plántulas presentaban lesiones cloróticas en la parte afectada del tallo, las cuales posteriormente, se tornaron de color marrón claro. Las lesiones necróticas aparecieron 7 días ddi, especialmente en las áreas cercanas al punto de inserción del pecíolo. Los testigos no manifestaron ningún síntoma durante el transcurso del estudio.

La presencia de alta humedad relativa fue determinante para el éxito de las pruebas de patogenicidad, esto lo evidencia el hecho de que el desarrollo de infección sólo se logró cuando las plantas fueron sometidas a humedad cercana al 100%. Otros investigadores también han vinculado condiciones de humedad relativa y temperaturas altas, con el desarrollo de enfermedades causadas por *B. cinerea* (Paterson *et al.*, 1988; Zhang *et al.*, 1994; Von Stovasser y Ferreira, 1997; Souza y Ferreira, 1999).

Pruebas de sensibilidad a fungicidas

Los promedios (\pm DE) de la velocidad de crecimiento micelial *in vitro* de *B. Cinerea* tratados con los diferentes fungicidas se presenta en la Figura 3. Mediante el análisis de la varianza se detectaron diferencias altamente significativas ($P < 0,01$) en la velocidad del crecimiento micelial de *B. cinerea*. La prueba de media aplicada (LSD, 5%), separó los tratamientos en 4

grupos; en el primero se ubicaron los productos más efectivos en la inhibición del crecimiento micelial, los cuales fueron (mm/día): Procloraz (0,0) y Myclobutanil (0,13); en el segundo grupo Clorotalonil (0,94) y Mancozeb (2,4), en el tercero Azoxystrobin (6,84) y Benomilo (7,22) y en el cuarto el testigo (15,58).

En lo que respecta a la inhibición de la esporulación, los tratamientos que mostraron mayor eficiencia fueron Procloraz, Clorotalonil y Benomilo, los cuales inhibieron totalmente la producción de conidios. En el tratamiento con Mancozeb ocurrió muy baja esporulación, mientras que en los correspondientes a Azoxystrobin, Myclobutanil y el testigo, la producción de conidioforos y conidios fue abundante.

De acuerdo a los resultados, Procloraz fue el fungicida al cual la cepa investigada de *B. cinerea* presentó mayor sensibilidad. Este producto inhibió totalmente el crecimiento del hongo. En líneas generales, las moléculas más nuevas como Myclobutanil y Azoxystrobin, mostraron escasa o ninguna capacidad de inhibir el crecimiento y la esporulación *in vitro* del patógeno. Los Benzimidazoles como el Benomilo son moléculas tradicionalmente utilizadas para el control de enfermedades causadas por hongos del género *Botrytis*, pero en muchos casos el hongo ha desarrollado resistencia (Ghini y Kruner, 1981; Chiba y North-

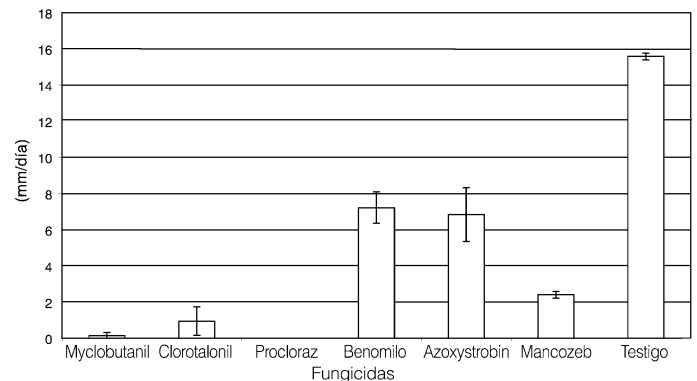


Figura 3. Velocidad promedio (mm/día) del crecimiento micelial *in vitro* de *Botrytis cinerea*, tratado con seis diferentes fungicidas. Las líneas indican la desviación estándar.

over, 1988; Hilber y Hilber-Bodmer, 1988). Los resultados obtenidos en este estudio evidencian que aunque *B. cinerea* perdió la capacidad de esporulación en el medio con Benomilo, el hongo fue capaz de desarrollar abundante crecimiento micelial.

La enfermedad que afectó y mató plántulas de *E. cinerea* es causada por el hongo *B. cinerea*. Aunque el porcentaje (5%) de muerte de las plántulas puede considerarse bajo, esta es la primera vez que, en Venezuela, se asocian ambas especies estableciendo una relación patológica. El fungicida Prochloraz inhibe eficientemente el desarrollo *in vitro* de *B. Cinerea*, pudiendo ser utilizado y evaluado en el control de la enfermedad bajo condiciones de invernadero.

REFERENCIAS

- Carrero C, Cedeño L (2001) Identificación y sensibilidad *in vitro* a fungicidas del agente causal de quema en acículas de plántulas de pino Caribe. *Rev. Forest. Venez.* 45: 15-22.
- Chiba M, Northover J (1988) Efficacy of new Benzimidazole fungicides against sensitive and Benomyl-resistance *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 78: 613-618.
- Ellis MB (1971) *Dematiaceous Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, Inglaterra. pp. 178-185.
- Ellis MB (1976) *More Dematiaceous Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, Inglaterra. pp. 149-152.
- Ghini R, Krüner TL (1981) Ocorrência de *Botrytis cinerea* a benomil em viveiro de *Eucalyptus viminalis* em três Barras, SC. *Summa phytopathol.* 13: 36.
- Hilber UW, Hilber-Bodmer M (1988) Genetic basis and monitoring of resistance of *Botryotinia fuckeliana* to anilino-pyrimidines. *Plant Dis.* 82:496-500.
- Mcgrath MT, Staniszewska H, Shishkoff N (1996) Fungicide sensitivity of *Sphaerotheca fuliginea*. *Plant Dis.* 80: 697-703.
- Mittal RK, Singh P, Wang BSP (1987) *Botrytis*: a hazard to reforestation. *Eur. J. For. Pathol.* 17:369:384.
- Paterson MJ, Sutherland JR, Tuller SE (1988) Greenhouse environment and epidemiology of grey mould of container-grown Douglas-fir seedling. *Can. J. For. Res.* 18: 974-980.
- Rosslenbroich H, Stuebler D (2000) *Botrytis cinerea* - History of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Protection* 19: 557-561.
- Ruppel EG, Jenkins AD, Burth LM (1980) Persistence of benomil-tolerant strains of *Cercospora beticola* in the absence of benomil. *Phytopathology* 70: 25-26.
- Souza MG, Ferreira FA (1999) Temperatura e tempo de água livre favora veis à infectividade de *Botrytis cinerea* em mudas de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Meiden, via inoculações. *Árvore* 23: 193-196.
- Von Stovasser ES, Ferreira FA (1997) Avaliação de fungos para o biocontrole de *Botrytis cinerea* em viveiros suspensos de eucalipto. *Árvore* 21: 147-153.
- Whiteside JO (1980) Tolerance of *Mycosphaerella citri* to benomil in Florida Citrus Groves. *Plant Dis.* 64: 300-302.
- Zhang PG, Sutton JC, Hopkin AA (1994) Evaluation of microorganisms for biocontrol of *Botrytis cinerea* in container-grown black spruce seedling. *Can. J. For. Res.* 24: 1312-1316.