

10

EVALUACIÓN

**DE LA SENSIBILIDAD DE PHYTOPHTHORA INFESTANS
(MONT) BARY AL FUNGICIDA OXATIPIPROLIN**

EVALUACIÓN

DE LA SENSIBILIDAD DE PHYTOPHTHORA INFESTANS (MONT) BARY AL FUNGICIDA OXATIAPIPROLIN

SENSITIVITY EVALUATION OF PHYTOPHTHORA INFESTANS (MONT) BARY TO OXATIPIPROLIN FUNGICIDE

Ricardo Hernández Pérez¹

E-mail: santaclara57@yahoo.es

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1264-7242>

Teresa de Jesús Ramírez Pedráza²

E-mail: tramirezpedrza@yahoo.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7658-1137>

Enrique Casanovas Cosío³

E-mail: ecasanovas@ucf.edu.cu

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5884-3922>

¹ Instituto Tecnológico de Zacatepec. Morelos. México.

² Lab. Agrobiagnóstico Fitolab SA de CV. Cuautla. Morelos. México.

³ Universidad de Cienfuegos "Carlos Rafael Rodríguez" Cuba.

Cita sugerida (APA, séptima edición)

Hernández Pérez, R., Ramírez Pedráza, T. J., & Casanovas Cosío, E. (2021). Evaluación de la sensibilidad de *Phytophthora infestans* (Mont) Bary al fungicida Oxatiapirolin. *Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas*, 4(3), 89-94.

RESUMEN

El manejo de cepas más agresivas de *Phytophthora infestans* es un desafío para México, por lo que se propuso como objetivo validar y monitorear la eficacia de (Oxatiapirolin), frente a la sensibilidad de micropoblaciones de aislados de campo de *P. infestans*, aplicando un protocolo con discos de hojas ajustado previamente con cinco concentraciones del fungicida a presión de 1,2 bar en un aislado severo *P. infestans* del Valle de Toluca, Estado de México. El fungicida mostró un importante efecto inhibitorio sobre un aislado mixto de *P. infestans* en condiciones in vitro, con las cinco primeras concentraciones usadas en el test (1-0,0016 ppm). A una mayor concentración del fungicida, se produjo un aumento de la sensibilidad del patógeno *P. infestans* y por tanto una menor afectación del tejido, que hasta la 5a concentración se produce una afectación menor al 25% del tejido (0-2,6 mm), comparado con el daño del testigo (13 mm) (>95 %) cuando no se aplica el fungicida. La inhibición media (EC50) es alta en la concentración aproximada de 0,00034 mgL⁻¹ del fungicida, que inhibe el 50% del crecimiento poblacional del patógeno.

Palabras clave:

Oomicetes, tizón tardío, resistencia, fitopatógeno, inhibición.

ABSTRACT

The management of aggressive strains of *Phytophthora infestans* is a challenge for Mexico, so the objective of study proposed to validate and monitor the efficacy of (Oxatiapirolin), against the sensitivity of *P. infestans* micropopulations, isolated from the field. A modified protocol with leaf discs and five concentrations of the fungicide at a pressure of 1.2 bar was tested against a severe late blight isolate from the Toluca Valley, State of Mexico. The fungicide showed an inhibitory effect on a mixed isolate of *P. infestans* under in vitro conditions, compared to the first five concentrations used in the test (1-0.0016 ppm). It was observed that at a higher concentration, there was an increase in the sensitivity of the pathogen and less damage to the tissue. After 5th concentration, less than 25% of tissue was affected (0-2.6 mm) compared with the damage in control (13 mm) (>95%), when the fungicide was not applied. The mean inhibition (EC50) is high calculated at approximately 0.00034 mgL⁻¹ of the fungicide, which inhibits 50% of the growth of the pathogen.

Keywords:

Oomycetes, late blight, resistance, phytopathogen, inhibition.

INTRODUCCIÓN

Phytophthora infestans es un agente patógeno bien conocida por causar la devastadora hambruna irlandesa de la papa a fines de la década de 1840. Esta se produjo cuando el patógeno migró por primera vez desde su centro de origen, muy probablemente centro de México o región andina, al resto del mundo (Grünwald & Flier, 2005). Desde entonces, el tizón tardío ha seguido siendo devastador en todo el mundo, causando pérdidas importantes en solanáceas (Legard, et al., 1995; Fry, et al., 2009).

Debido a los cambios dramáticos recientes en las poblaciones de *P. infestans*, el tizón tardío, está superando la alta resistencia de muchas variedades de papa élite. El evento más espectacular ha sido el aumento de las agresivas cepas 13-A2 y 6-A1 de *P. infestans*, que está desplazando rápidamente a otros linajes de este patógeno en Gran Bretaña, los Países Bajos y otros países de Europa occidental (Cooke, et al., 2012; Lees, et al., 2012; Li, et al., 2012), así como en India (Chowdappa, et al., 2013) y China (Li, et al., 2013).

El manejo de esta enfermedad se ha basado principalmente en la utilización de fungicidas de acción protectante y/o sistémica (Jaramillo, 2003).

Recientes evaluaciones han demostrado la presencia de mutaciones puntuales en los genes que codifican para las proteínas blanco de la acción fungicida y de secuencias específicas de nucleótidos de las regiones promotoras de dichos genes, se encuentran asociadas con la aparición de fenotipos resistentes a diversas moléculas químicas en organismos fitopatógenos (Damicone, 2004).

Pruebas realizadas con varias metodologías, como la inmersión de discos de hoja con dosis de producto comercial, han ofrecido resultados que indican altos niveles de sensibilidad de las poblaciones de *P. infestans*, a fungicidas como Curzate® M-8, Previcur®, Ridomil® Gold y Mildex® 711 WG (García, et al., 2008).

El objetivo del ensayo fue validar un protocolo modificado para el monitoreo de la nueva molécula (Oxatiapiprolin), frente a micropoblaciones de *P. infestans* procedente de campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se realizó con la participación del Laboratorio de Fitopatología de la Escuela de Estudios Superiores de Xalostoc (EESX), perteneciente a la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), en colaboración con el Laboratorio de Usos Múltiples de la Universidad Autónoma de Chapingo (UACH).

Las muestras de campo fueron recolectadas en un área comercial de papa manejados de manera convencional en el municipio de Juchitepec, Estado de México, con las siguientes coordenadas: N 19°4' 38.643" y O 98°53'

46.294" ± 5m y Latitud: 19,089668, Longitud: - 98.899581 a una altitud de 2647 msnm.

Los folíolos y tallos con síntomas fueron tomados antes de que se aplicaran los fungicidas en el mes de septiembre del 2016. Se incubaron en cajas Petri duplicadas, las que se preservaron en frío hasta su procesamiento.

Se trabajó además con un aislado de *P. infestans*, previamente obtenido de campos de papa del Valle de Toluca, Estado de México, el cual fue clasificado como **severo** por la virulencia comprobada *in vitro* frente a otros fungicidas, cedido gentilmente por el Dr. H. Lozoya y la MC. M. Cuenca del Laboratorio de Usos Múltiples (Departamento de Fitotecnia), Universidad Autónoma de Chapingo (UACH).

Este aislado, fue previamente mezclado con el aislado de campo salvaje obtenido de campo, para fortalecer su presión de selección y validar la sensibilidad frente al fungicida. Los aislados fueron mantenidos a 15 °C de día y 10 °C de noche durante 4 - 6 días con el fin de inducir la esporulación tanto en medio como en cajas Petri con agar agua.

Se utilizaron plantas de papa variedad (Alpha) adquiridas de Invernamex, procedentes de cultivo *in vitro*.

A partir de estas hojas se extrajeron discos de 18 mm de diámetro bajo condiciones asépticas, utilizando un punzón como se muestra.

Se colocaron 10 discos de hojas por lote (cada lote representó una concentración diferente del fungicida evaluado). Por tanto, cada placa Petri contenía 10 réplicas por tratamiento, por lo que cada disco constituyó la unidad experimental.

Se preparó un litro de agua desionizada + 4 g de agar-agar, disolviéndolo lentamente en una parrilla de calentamiento y una vez solubilizado, fue llevado a una autoclave en la que se esterilizó, durante 15 min a 121°C y 1,2 atmósfera de presión. El medio estéril se distribuyó en placas, bajo condiciones aséptica, aproximadamente 30 ml por placa y se dejó enfriar antes de ser usado.

Se preparó el fungicida en una solución stock a 25 ppm. Se tomó 12,5 uL de al 10%, y se ajustó el volumen con 50 mL de agua destilada (AD) a temperatura ambiente, en constante agitación. Las diluciones conformadas a partir de la solución stock (25 ppm) dieron lugar a las siete concentraciones en ppm (0,000064; 0,00032; 0,0016; 0,008; 0,04; 0,02 y 1,0) ensayadas, además de incluir un control no tratado. El fungicida fue aplicado bajo flujo laminar, empleando un asperjador (aerógrafo) manual que disponía de un compresor con salida de 1,2 bar.

El mismo día de la aplicación del fungicida, se prepararon las condiciones para aplicar el inóculo sobre los discos. El inóculo colectado del aislado de campo y del aislado de la (UACH) (mezcla), fue obtenido en una dilución final

con agua fría (4 °C) en la que se concentraron los esporangios. La concentración de esporangios fue estimada en cámara de Neubauer y ajustada a 20,000 esporangios /mL con agua fría (AD).

Los discos de hojas preparados en cajas Petri, fueron pulverizados bajo flujo laminar, con el inóculo del hongo (2 mL) por placa, utilizando un aspersor manual con presión regulada.

Después de la inoculación, las placas Petri se mantuvieron en la oscuridad a 15 °C durante 24 h. A continuación, se almacenaron en cámara de crecimiento a 15 °C día y 10 °C noche, 80% de humedad relativa y fotoperiodo de 12 h, a baja intensidad de luz. Después de 6 días de incubación, las placas se pusieron en la oscuridad a 15 °C durante 24 h para promover la esporulación.

La evaluación visual del daño producido por *P. infestans* sobre los discos en cada tratamiento, se realizó después de los 7 - 8 días de inoculado (DDI), auxiliándose de una lupa binocular y de las fotos tomadas y procesadas con una escala milimétrica.

A cada disco le fue asignada una categoría según una escala porcentual de 6 grados (0–5) citada por García, et al. (2008); y Hernández (2016), de avance de la necrosis o esporulación del hongo *P. infestans* sobre los discos de hojas de papa.

En el programa estadístico SAS® ver. 11 se introdujeron los datos para con el promedio de los mm de avance de la necrosis y esporulación para cada tratamiento establecer la tendencia según la ecuación de regresión con el mejor ajuste expresado por R². El cálculo de la dosis con el modelo de regresión Probit fue el más apropiado para explicar las variables independientes y su efecto probabilístico (EC 50).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 1 se registró la inhibición en milímetros del área promedio necrosada (mm promedio), producida por el avance del patógeno (*P. infestans*), después de la aplicación del fungicida a concentraciones que fueron desde 1,0 hasta 0,000064 ppm.

La curva formada con el avance de la necrosis descrita en forma ascendente, manifiesta una correspondencia entre el aumento de la concentración del fungicida y una creciente inhibición promedio del área necrosada de los discos. La inhibición del área promedio de necrosis por tratamientos se ajusta muy bien (R² = 0,9703) a una ecuación polinómica de 2º grado. Al aplicar la mayor concentración (1 ppm) de Oxatiapiprolin, no se observaron daños en el área foliar (0), mientras en el control sin

tratar se obtuvo (13) mm de necrosis promedio del área total evaluada (18 mm) por disco, evidenciándose que el protocolo funciona bajo estas condiciones (García, et al., 2008, modificada por Hernández, 2016).

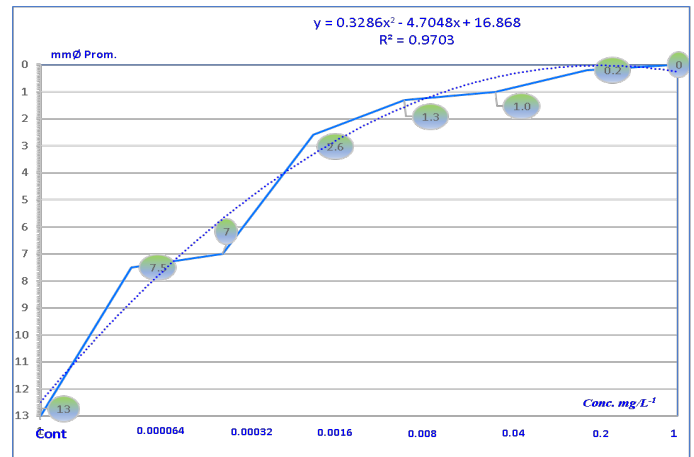


Figura 1. inhibición en milímetros de área promedio de necrosis (mm), ocasionado por el patógeno (*P. infestans*) como respuesta a los diferentes tratamientos o concentraciones del fungicida aplicados desde (1 - 0.000064 ppm), sobre los discos de hojas de papa.

Los resultados estadísticos del análisis de comparación de medias a través de Tukey muestran los tratamientos con concentraciones aplicadas del fungicida, desde 1 hasta 0.000064 ppm, producen inhibición del área tratada en los discos, que van desde (0 a ≤ 50 %) del área del disco, sin diferencias entre ellos, excepto con el control sin tratar. Esto es muy importante porque dosis muy bajas enfrentarían al patógeno a una presión de selección temprana (García, et al., 2008).

Mientras, las concentraciones inferiores a 0.0016 ppm hasta 1 ppm, logran una inhibición mayor del área (0 a < 25 %). Las concentraciones inferiores a estas llegan al 50% del área del disco afectado por el agente infeccioso. El área necrosada o con esporulación, equivalente a la escala porcentual de 6 grados (0– 5), demuestra que hasta la 5ta concentración se produce una afectación menor al 25% del tejido (0 – 2.6 mm).

Lo anterior concuerda con los resultados de sensibilidad según el crecimiento del área de avance del patógeno como sensibles (S), por ser menor al del 10% del crecimiento del testigo, según escala de Shattock (2002).

La efectividad biológica obtenida una vez aplicada la fórmula de Abbott (1995), y comprobando la protección alcanzada por los tratamientos o concentraciones del fungicida aplicado frente a la sensibilidad del patógeno (*P. infestans*), se muestra en la Figura 2.

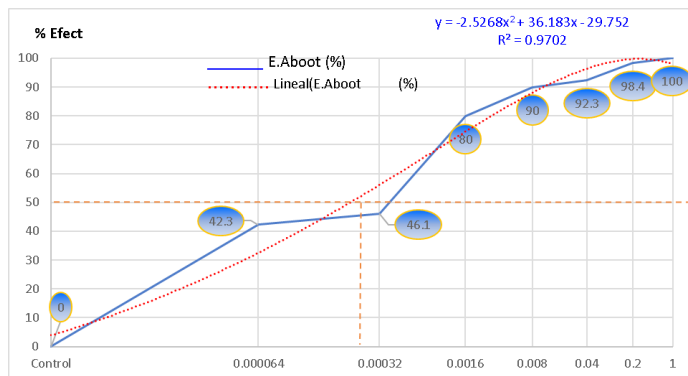


Figura 2. Efectividad biológica según Abbot y la protección alcanzada por los tratamientos o concentraciones del fungicida aplicado, frente a la sensibilidad del patógeno (*P. infestans*).

La ecuación de Regresión y el Coeficiente (R^2), confirmó el ajuste de la curva para lograr la intersección y la dosis respuesta (EC_{50}) o necrosis media en base al área evaluada. La concentración más cerca para establecer el cálculo hecho es de ($0,00032 \text{ mg L}^{-1}$) con 46,1 % de efectividad (Tabla 1). El cálculo de la dosis aplicando el modelo de regresión Probit explica la variable dependiente dicotómica, a través de las variables independientes y su impacto sobre la probabilidad. Por lo que la posibilidad de producir mortalidad del 50% de la micropoblaciones de *P. infestans* frente a Oxatiapirolin, está muy cerca de esta concentración probada. Debe tenerse en cuenta que estas evaluaciones deben repetirse periódicamente, teniendo en cuenta los resultados expuestos por otros investigadores, que ponen de manifiesto la gran plasticidad genética del oomiceto en relación a su sensibilidad frente a los fungicidas; además, cuestionan los ensayos *in vitro* de los productos a lo largo del proceso de desarrollo, ya que el control *in vitro* del patógeno, no garantiza los mismos resultados *in vivo* (Lozoya, et al., 2017).

Tabla 1. Valores de la EC_{50} del fungicida, sensibilidad de *P. infestans* evaluada sobre discos de hojas de papa a los 8 -9 DDI.

Fungicida	Ecuación Regresión	R^2	EC_{50} (mg L ⁻¹)
Oxatiapirolin	$y = -2.5268x^2 + 36.183x - 29.752$	0,9702	0,00034

Según diversos criterios la sensibilidad de los aislamientos se puede clasificar como alta cuando es ($< 1 \text{ mg L}^{-1}$) según Edgington, et al. (1971), por lo que se considera está en el rango permisible.

CONCLUSIONES

El fungicida mostró un importante efecto inhibitorio sobre un aislado mixto de *P. infestans* en condiciones *in vitro*, con las cinco primeras concentraciones usadas en el test (1-0,0016 ppm). A una mayor concentración del fungicida, se produjo un aumento de la sensibilidad del patógeno *P. infestans* y por tanto una menor afectación del

tejido, que hasta la 5ª concentración produjo una afectación menor al 25 % del tejido (0–2,6 mm), comparado con el daño del testigo (13 mm) ($> 95 \%$) cuando no se aplica el Oxatiapirolin. La inhibición media (EC_{50}) fue alta en la concentración aproximada de $0,00034 \text{ mg L}^{-1}$, que inhibe el 50% del crecimiento poblacional del patógeno.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbot, L. (1995). The use and effects of glutaraldehyde Occup. *Health*, **47** (7), 238-239.
- Chowdappa, P., Nirmal Kumar, B. J., Madhura, S., Mohan Kumar, S. P., Myers, K. L., Fry, W. E., Squires, J. N., & Cooke, D. E. L. (2013). Emergence of 13_A2 Blue Lineage of *Phytophthora infestans* was Responsible for Severe Outbreaks of Late Blight on Tomato in South-West India. *J. Phytopathology*, **161**, 49–58.
- Cooke, D.E.L., Cano, L.M., Raffaele, S, Bain R.A., Cooke, L.R., & Etherington G.J., (2012) Genome Analyses of an Aggressive and Invasive Lineage of the Irish Potato Famine Pathogen. *PLOS Pathogens*, **8**(10).
- Damicone, J. (2004). Fungicide resistance management. http://pearl.agcomm.okstate.edu_plantdiseases/f-766.htm
- Edgington, L. V., Khew, K. L. & Barron, G. L., (1971). Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. *Phytopathology*, **61**, 42–44.
- Fry, W.E., Grünwald, N.J., Cooke, D., McLeod, A., Forbes, G.A., & Keqiang, C. (2009). Population genetics and population diversity of *Phytophthora infestans*. En, K. Lamour y S., Kamoun, *Oomycete Genetics and Genomics. Diversity, Interactions and Research Tools*. (pp. 139-164). John Wiley & Sons Inc.
- García Giovani, H., Marín, M., Jaramillo, S., & Cotes, J.M. (2008). Sensitivity to four systemic fungicides of Colombian isolates of *Phytophthora infestans*. *Agronomía Colombiana*, **26**(1), 47-57.
- Grünwald, N. J., & Flier, W.G. (2005). The biology of *Phytophthora infestans* at its center of origin. *Annual Review of Phytopathology*, **43**, 171–90.
- Hernández, P. R. (2016). Informe Técnico “Evaluación de la sensibilidad de *Phytophthora infestans* (Mont) Bary. al fungicida DPX-TAH88 330 SE. Contrato de prestación de Servicios Científico Técnico DU PONT MEXICANA, S.DE RL DE C.V.
- Jaramillo, S. (2003). Monografía sobre *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary. Medellín (Colombia). Universidad Nacional de Colombia.
- Lees, A. K., Sullivan, L., Lynott, J. S., & Cullen, D. W. (2012). Development of a quantitative real-time PCR assay for *Phytophthora infestans* and its applicability to leaf, tuber and soil samples. *Plant Pathology*, **61**(5), 867–876.

- Legard, D.E., Lee, T.Y., & Fry, W.E. (1995). Pathogenic specialization in *Phytophthora infestans*: aggressiveness on tomato. *Phytopathology*, 85, 1356–1361.
- Li, Y., van der Lee, T. A. J., Evenhuis, A., Van den Bosch, G. B. M., van Bekkum, P. J., Förch, M. G., van Gent-Pelzer, M. P. E., Van Raaij, H. M. G., Jacobsen, E., Huang S. W., Govers, F., Vleeshouwers, V. G. A. A., & Kessel, G. J. T. (2012). Population Dynamics of *Phytophthora infestans* in the Netherlands Reveals Expansion and Spread of Dominant Clonal Lineages and Virulence in Sexual Offspring. *Genes, Genomes Genetics*, 2(12), 1529-1540.
- Li, Y., van der Lee, T., Zhu, J. H., Jin, G. H., Lan, C. Z., Zhu, S. X., Zhang, R. F., Liu, B. W., Zhao, Z. J., Kessel, G., Huang, S. W. & Jacobsen, E. (2013). Population structure of *Phytophthora infestans* in China – geographic clusters and presence of the EU genotype Blue_13. *Plant Pathology*, 62, 932–942.
- Lozoya-Saldaña, H., Robledo-Esqueda, M. N., Rivas-Valencia, P., Sandoval-Islas, S., Colinas León, M. T. B., & Nava-Díaz C. (2017). Sensitivity to fungicides of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in Chapingo, Mexico. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 23(3), 175-186.
- Shattock, R. C. (2002). *Phytophthora infestans*: populations, pathogenicity and phenylamides. *Pest Management Science*, 58(9), 944-950. _