



Sensibilidad del hongo (*Leptosphaeria polylepidis*) de la Keñua (*Polylepis tarapacana*) a la aplicación de fungicidas orgánicos y químicos en laboratorio

Sensitivity of the Keñua (*Polylepis tarapacana*) fungus (*Leptosphaeria polylepidis*) to the application of organic and chemical fungicides in the laboratory

Sergio Gabriel Colque Aguilar y Edwin Edgar Iquize Villca

RESUMEN:

En el laboratorio de Fitotecnia de la Facultad de Ciencias Agrarias y Veterinarias - Universidad Técnica de Oruro, bajo el convenio con la Universidad de Huelva España, se realizó el trabajo de investigación con el objetivo de realizar el control del hongo (*Leptosphaeria polylepidis*) que en los últimos años van diezmando a la población de Keñuas (*Polylepis tarapacana*) del Parque Nacional Sajama. Una vez realizada la recolección de ramas infectadas con la mencionada enfermedad en condiciones de laboratorio y en medio de cultivo PDC se procedió a realizar su identificación y posterior propagación. Una vez obtenidas las colonias estabilizadas se realizó la aplicación de los fungicidas químicos: cobrethane, dithane y sulfato de cobre en triple y quintuple dosis, y los fungicidas orgánicos: tricodamp, probiovert y fungitop en dosis recomendada y triple dosis; además de realizar los postulados de Koch para verificar la enfermedad tratada. Los resultados que se obtuvieron arrojan que para el control del hongo (*Leptosphaeria polylepidis*) el fungicida químico Cobrethane, en una triple dosis (2250 g/200 l) y quintuple dosis (3750 g/200 l) de la recomendación comercial, es efectivo para el control en un 100% a los 4 días de la aplicación. Además de que el desarrollo del hongo (*Leptosphaeria polylepidis*) en medio PDC, en principio siempre empieza el desarrollo tomando un color amarillo-veige (10YR 7/6), hasta tornarse café claro (10YR 6/6) y finalmente olivo- amarillo (2.5 y 6/8), formando los anillos concéntricos como característica única del género. Con todo lo anteriormente señalado es necesario realizarla aplicación de los fungicidas en condiciones de campo para comprobar su efectividad.

PALABRAS CLAVE:

Sensibilidad, fungicida, *Polylepis tarapacana*, *Leptosphaeria polylepidis*.

ABSTRACT:

In the laboratory of Phytotechnics of the Faculty of Agrarian and Veterinary Sciences - Technical University of Oruro, under the agreement with the University of Huelva Spain, the research work was carried out with the aim of controlling the fungus (*Leptosphaeria polylepidis*) that in recent years they have been decimating the population of Keñuas (*Polylepis tarapacana*) in the Sajama National Park. Once the branches infected with the aforementioned disease were collected under laboratory conditions and in PDC culture medium, their identification and subsequent propagation were carried out. Once the stabilized colonies were obtained, the chemical fungicides were applied: copperthane, dithane and copper sulfate in triple and five-dose, and the organic fungicides: tricodamp, probiovert and fungitop in recommended dose and triple dose; in addition to making Koch's postulates to verify the treated disease. The results obtained show that for the control of the fungus (*Leptosphaeria polylepidis*) the chemical fungicide Cobrethane, in a triple dose (2250 g / 200 l) and five times the dose (3750 g / 200 l) of the commercial recommendation, is effective for 100% control 4 days after application. In addition to the development of the fungus (*Leptosphaeria polylepidis*) in PDC medium, in principle the development always begins taking a yellow-veige color (10YR 7/6), until it turns light brown (10YR 6/6) and finally olive-yellow (2.5 and 6/8), forming the concentric rings as the unique characteristic of the genus. With all the aforementioned, it is necessary to apply the fungicides in field conditions to verify their effectiveness.

KEYWORDS:

Sensitivity, fungicide, *Polylepis tarapacana*, *Leptosphaeria polylepidis*

AUTORES:

Sergio Gabriel Colque Aguilar: Universidad Técnica de Oruro. e.umsa,aa@gmail.com

Edwin Edgar Iquize Villca: Instituto Nacional de Innovación Agropecuaria y Forestal. e.iquize_v@hotmail.com

Presentado: 30/12/2019. **Aprobado:** 10/03/2020.



INTRODUCCIÓN

Los bosques de Kewiña están situados a lo largo de la Región Andina. En países como Perú y Bolivia en ciertas áreas se presentan pequeños y aislados fragmentos de bosques de *Polylepis*

spp. (Queñoales) entre altitudes de 3000 hasta 5000 msnm.

Los bosques de *Polylepis* en Bolivia, se observan en los volcanes: Sajama, Tunupa, Soniquera, Uturuncu, Tata Sabaya y Serke, con edades de estos árboles que fluctúan entre los 98

a 705 años, convirtiéndose estas entre las especies más longevas del mundo, tienen el desarrollo aproximadamente de 4.8 mm/año.

La especie *Polylepis tarapacana* en cuanto a su distribución geográfica, en Bolivia se encuentra en su mayoría, en el Parque Nacional Sajama, que según el Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (2008), tiene una extensión total de 95874 ha de las cuales más de 10000 ha están cubiertas de grandes extensiones de bosque.

Pinto & Robledo (2006), en el Parque Nacional Sajama observaron la muerte inexplicable de grandes superficies de bosque de

Polylepis tarapacana en la ladera suroeste del nevado. *Leptosphaeria polylepidis* (Ascomycota, Pleosporales) especie hasta el momento endémica del nevado y especialista de *Polylepis tarapacana* ha sido propuesta como la posible causante de la muerte de los árboles (Macía et al., 2005).

Se sabe que dicho hongo provoca malformaciones en las ramas, particularmente nudos y agallas donde desarrolla sus fructificaciones; generando posiblemente en la médula de las ramas efectos patogénicos aún no descritos. Hasta el momento no existen estudios sobre la ecología por lo cual es importante determinar la relación del hongo, ni sobre los efectos que tiene sobre su huésped.

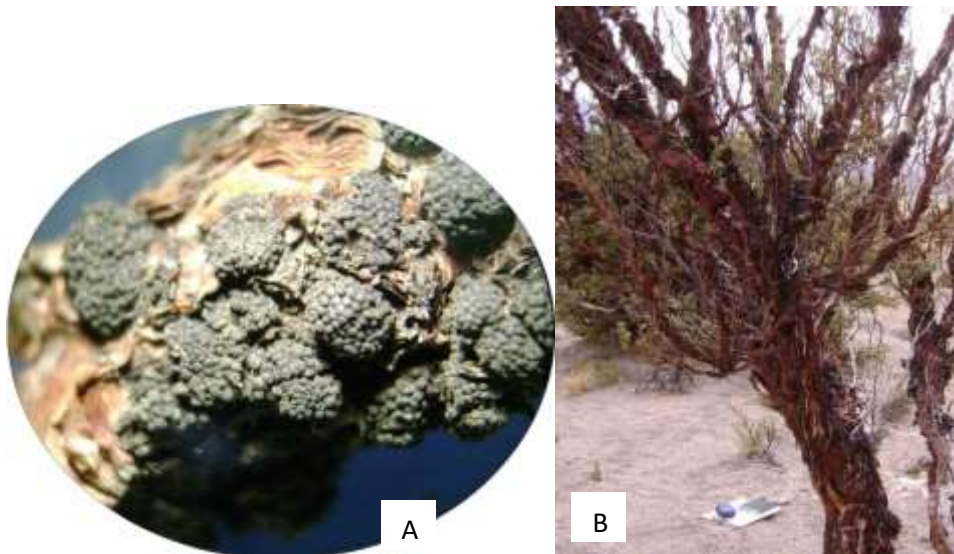


Figura 1. A: Daño macroscópico ocasionado por *Leptosphaeria polylepidis* en *Polylepis tarapacana*. B: Acercamiento de *Leptosphaeria polylepidis* (noviembre 2009).

En una evaluación preliminar realizada en noviembre de 2009 se registró 33 plantas con daño sobre 45 registrados en un transecto de 500 m, es decir el 73% de las plantas presentan ramas secas y defoliadas por la presencia del hongo presumible *Leptosphaeria polylepidis* (Figura 1), en Iquize, et al. (2009), por lo cual es necesario cuantificar la cantidad exacta de árboles afectados en todo el bosque. Por otra parte, generar alternativas para el control integral del hongo *Leptosphaeria polylepidis*.

En ese sentido el presente trabajo tiene el objetivo de determinar la sensibilidad del hongo *Leptosphaeria polylepidis* a la aplicación de fungicidas orgánicos y químicos en laboratorio, bajo el convenio de la Facultad de Ciencias Agrarias y Veterinarias - Universidad Técnica de Oruro con la Universidad de Huelva de España.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en el laboratorio de Fitopatología y Biotecnología de la Facultad de

Ciencias Agrarias y Veterinarias - Universidad Técnica de Oruro en la Ciudadela Universitaria, ubicada a 3709 msnm y en el periodo de mayo a diciembre del 2010.

El material biológico empleado fue ramas de Keñua infectadas con el hongo *Leptosphaeria polylepidis* recolectadas en el Parque Nacional Sajama y 4 plantines de keñua para los postulados de Koch.

El material y equipo en laboratorio se utilizaron un autoclave, agitador, balanza de precisión, estereoscopio, microscopio, cámara de germinación (incubadora de temperatura regulada para los hongos), campana de incubación para la prueba de los postulados de Koch, malla antiáfida, alcohol, dextrosa, carragenina, agua destilada, cajas Petri de 10 cm de diámetro en número de 75 unidades, bandejas de acero inoxidable, calibrador digital, vasos precipitados de 150, 300 y 700 ml, pipeta de 10 cc, porta objetos 1 caja, cubre objetos 1 caja, estuche quirúrgico 1 set, vinipel (alfilm), guantes quirúrgicos, barbijo, termómetro de máxima y mínima para controlar la temperatura, gotero, atomizadores, cámara fotográfica digital, planilla de control de crecimiento y una tabla Munsell para codificar los colores.

Los insumos fueron fungicidas químicos: Cobrethane, Dithane N80, Sulfato de Cobre y los fungicidas orgánicos: Tricodamp, Probiovert, Fungitop.

La recolección de la muestra se realizó después de haber hecho una evaluación preliminar para detectar el grado de ataque de la enfermedad presente en el Parque Nacional Sajama en noviembre de 2009, se procedió a realizar la recolección de ramas infectadas con el hongo *Leptosphaeria polylepidis* en los meses de mayo y junio de 2010 y realizar el trabajo de laboratorio en los meses de julio a diciembre de 2010. Se cortaron ramas de los árboles más atacados con la enfermedad y se guardaron en bolsas plásticas dentro de una caja para ser

trasladadas hasta los laboratorios de la Facultad de Agronomía.

Para el cultivo en laboratorio de los hongos fitopatógenos se preparó el medio de cultivo PDC consistente en Papa –Dextrosa – Carragenina en la concentración que se detalla en la tabla 1.

Tabla 1. Cantidad exacta de Insumos para la preparación del Medio de Cultivo (ml H₂O).

Medio	para 100	para 1000
Papa	70 ml.	200 ml.
Dextrosa	10.5 g.	30 g.
Carragenina	2.8 g.	8 g.

La inoculación del medio de cultivo fue realizada con las ramas listas utilizando el protocolo de aislamiento monospórico (Danielsen & Ames, s/f), se procediéndose a realizar la desinfección de las muestras, en primer lugar, en hipoclorito de sodio al 5% durante 3 segundos, luego se sometió a alcohol al 96% durante 3 segundos y por último en agua destilada. Ya con las ramas desinfectadas se procedió al raspaje de los órganos (agallas negras) para sacar una pequeña muestra de aproximadamente 2 a 3 mm preparadas en una caja Petri de 5 cm de diámetro, para tenerlas listas para la inoculación.

En la identificación de *Leptosphaeria* se utilizó clave de hongos (Peña, 2000), apoyándose también con fotografías del género para identificar a *Leptosphaeria*. El trabajo de identificación tomó alrededor de 2 meses de trabajo en laboratorio hasta que se pudo aislar la cepa del hongo. Posteriormente se realizó el repique correspondiente para los tratamientos.

La aplicación de los fungicidas o tratamientos, se usaron las dosis comerciales recomendadas, cada producto se preparó con agua destilada para evitar algunas posibles contaminaciones, las dosis utilizadas se detallan en la tabla 2.

Tabla 2. Dosis Recomendadas de los Fungicidas Químicos.

Fungicidas químicos	Principio activo	Dosis Recomendada	Dosis Triple	Quíntuple Dosis
Cobrethane	Mancozeb	750 g/200 l	2250 g/200 l	3750 g/200 l
Dithane NT 80 WP	Mancozeb	400 g/100 l	1200 g/100 l	2000 g/100 l
Sulfato de Cobre	Sulfato de Cobre	1000 g/10 l	3000 g/10 l	5000 g/10 l

Tabla 3. Dosis Recomendadas de los Fungicidas Orgánicos.

Fungicidas orgánicos	Principio activo	Dosis Recomendada	Dosis Triple
Tricodamp	Hongo <i>Trichoderma spp.</i>	40 g/1m ²	120 g/1m ²
Probiovert	Hongo <i>Verticillium lecanii</i>	500 cc/200 l	1500 cc/200 l
Fungitop	Caldo sulficálcico y Ácido salicílico	500 cc/200 l	1500 cc/200 l

Postulados de Koch, se hizo la prueba de los 3 postulados de Koch (González, 1989), más el cuarto postulado agregado por el Dr. Erwing Smith adaptado exclusivamente para los fitopatógenos (Herbas, 1981). Para dicha prueba se usaron 4 Keñuas (*Polylepis sp.*) adquiridos del vivero de la Facultad de Agronomía de 2 años de edad y 50 cm de altura; en 2 plantines se realizaron 3 heridas c/u con un corte medio bisel con estilete de 3 mm de diámetro, en el tallo con característica de mayor grosor y demarcadas correctamente para reconocer la herida; en los otros 2 plantines no se realizó ninguna incisión y una vez listos los 4 plantines fueron introducidos en la campana de incubación de vidrio cuya medida fue de 30 x 30 x 60 cm y fueron asperjadas con atomizadores manuales con una solución de agua destilada conteniendo las esporas puras aisladas de *Leptosphaeria polylepidis* para ser inoculadas en los plantines en condiciones favorables.

El análisis estadístico para la relación número de cajas Petri con hongos sensibles sobre la cantidad de cajas Petri aplicados con el producto, fue planteado con el modelo lineal

generalizado bajo el supuesto de distribución binomial (Montgomery 2003; Kachman, 2000), con el criterio del análisis de varianza del diseño completamente al azar (Steel y Torrie, 1992), la misma por la poca variación fue procesada con estadística descriptiva (proporciones). El análisis de regresión lineal y polinomio fue empleado para determinar el desarrollo de hongo (diámetro de colonia) durante días, empleándose 560 observaciones (Steel y Torrie, 1993).

RESULTADOS

Los colores de las colonias

Los colores de las colonias observados al comienzo del experimento, asumiendo la propuesta de Munsell (2000), variaron entre los colores rojo (10R 4/8), beige (2.5Y 7/8), café claro (10YR 6/6), café oscuro (10YR 3/3), gris (7.5YR 5/1) y verde oscuro (GLE Y1 3/5G). Una vez identificado el hongo *Leptosphaeria polylepidis* se pudo observar que la característica de la colonia fue color olivo-amarillo (2.5Y 6/8) (Figura 2).

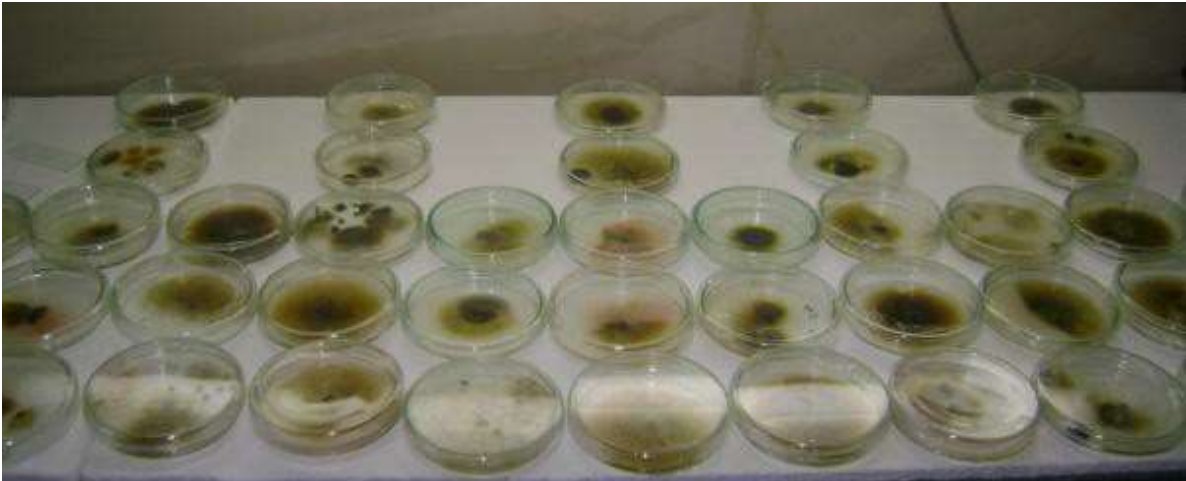


Figura 2. Variabilidad de colores de las colonias de *Leptosphaeria polylepidis*.

Desarrollo de la colonia de *Leptosphaeria polylepidis*

El desarrollo de la colonia de *Leptosphaeria polylepidis* fue precoz en condiciones de una iluminación de 24 horas equivalente a 40 watts o 2000 lux/foco a 30 cm de distancia con dos focos, teniendo un total de 4000 lux de intensidad lumínica. Las 70 unidades experimentales fueron expuestas a una temperatura constante de 20.5°C y 45% de humedad relativa ambiente. Estos aspectos

generaron un crecimiento lineal (P: 0.001) a razón de 5.17 mm/día (tabla 4 y figura 3).

Tabla 4. Análisis de regresión lineal del desarrollo del hongo.

Regresión	F	Pr > F	R ²
Lineal	10919.90	<.0001**	0.9514
Cuadrática	6122.76	<.0001**	0.9565

** Significativo a la probabilidad de 0.00.1

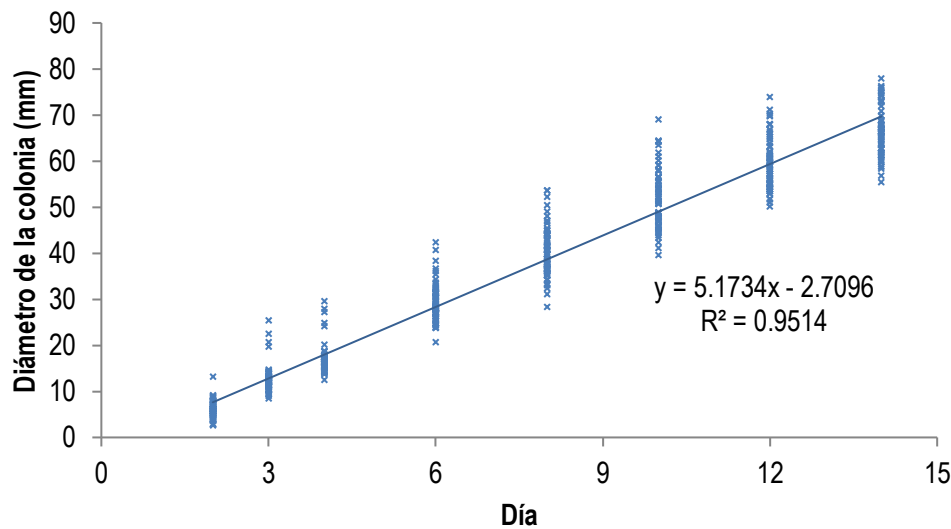


Figura 3. Dispersión del desarrollo del hongo *Leptosphaeria polylepidis* en caja Petri (mm).

Tamaño de los órganos reproductores

Realizadas las comparaciones utilizando las claves de identificación, se pudo observar que

las medidas obtenidas de las muestras de trabajo coincidían con los promedios descritos por Hanlin (s/f) y Peña (2000), arrojando los datos de la tabla 5.

Tabla 5. Comparación de medidas de ascosporas y picnidios de *Leptosphaeria polylepidis* (µm).

Autor	Ascospora (espora)		Peritecio (cuerpo fructífero)	
	Ancho	Largo	Ancho	Largo
HANLIN R. s/f	-	22	65	-
PEÑA N. 2000	5 - 7	20 - 31	-	-
Observado en el estudio	7.2	18.5	58	69

En las siguientes imágenes (Figura 4) se observa todo el proceso de desarrollo de las colonias en caja Petri.

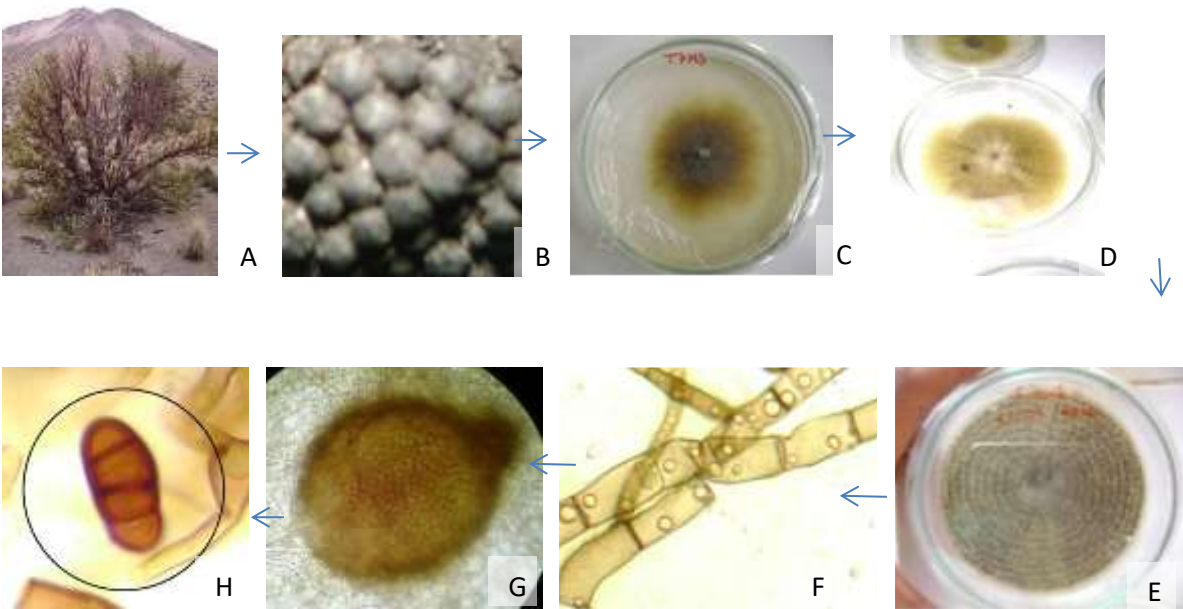


Figura 4. Órganos reproductores y desarrollo de *Leptosphaeria polylepidis* a partir de la Inoculación en medio PDC. A: Kenia *Polylepis tarapacana* con severos daños de ataque del Hongo, B: Vista microscópica del hongo en la agalla, tallo de *Polylepis tarapacana*, C,D,E: Característica de desarrollo de la colonia en medio PDC, F: Micelio tabicado visto al microscopio con 100X de aumento, G: Peritecio (cuerpo fructífero) que se desarrolla en los anillos concéntricos de la colonia y que contiene a las ascas con un tamaño de 58 x 69 µm, H: Ascospora de *Leptosphaeria polylepidis* vista al microscopio con 600X de aumento de un tamaño promedio de 7.2 x 18.5 µm.

Respuesta a aplicación de los fungicidas

En la Figura 5 y Tabla 6, presenta el estado de la colonia de *Leptosphaeria polylepidis* a los 4 días de la aplicación con atomizador de los

fungicidas Cobrethane con una triple dosis de 2250 g/200 l H₂O y Dithane con una quintuple dosis de 2000 g/100 l H₂O observándose a los dos días posteriores a la aplicación el deterioro de la muestra empezando a tener una consistencia de

muestra seca y a los cuatro días se pudo constatar que las muestras de las colonias estaban muertas, el desarrollo del hongo se había detenido porque los aminoácidos y enzimas fueron

descompuestos por tener los fungicidas, iones cúpricos, presentes en la formulación los cuales alteraron su respiración llevándolos de esa forma a su muerte. (Agroterra, 2008)



Figura 5. Muerte de las colonias de *Leptosphaeria polylepidis* a los 4 días de Aplicación T1M7 Cobrethane, T2M6 Dithane.

Tabla 6. Sensibilidad del hongo *Leptosphaeria polylepidis* después de 4 días de la aplicación de los productos (%).

Tratamiento	Testigo	Dosis simple	Dosis triple	Dosis quintuple
Testigo	0	-	-	-
Fungitop	-	0	-	-
Probiovert	-	0	-	-
Tricodamp	-	0	-	-
Cobrethane	-	-	100	100
Dithane	-	-	40	80
Sulfato de cobre	-	-	40	80

Postulados de Koch

La observación fue diaria y recién en cinco semanas (33 días) se pudo observar la presencia del desarrollo de un hongo que crecía en una de las heridas de las Keñuas que en 5 días más tomó la forma característica de la agalla negra en el tallo similar a la que presentaban los árboles en el Parque Nacional Sajama.

CONCLUSIONES

El control del hongo *Leptosphaeria polylepidis* se determinó que el fungicida químico Cobrethane, a los 4 días en la dosis 2250 g/200l y 3750 g/200l es efectivo para el control en condiciones de laboratorio.

Los fungicidas orgánicos no registraron ningún tipo de control: Tricodamp, Probiovert y Fungitop con 0% de eficacia.

Con los resultados obtenidos es necesario comprobar la efectividad de los tratamientos en condiciones del bosque de Keñuas *Polylepis*

tarapacana del Parque Nacional Sajama, para poder observar el grado de control que ejercen los fungicidas.

RECOMENDACIONES

Es preciso realizar un análisis de suelo para comparar la ausencia de algún macro o micronutriente en la región, donde el ataque del hongo es demasiado fuerte con relación a los lugares donde no existe contagio, esto para determinar si la falta de algún tipo de nutriente predispone a la enfermedad, en este caso el ataque del hongo.

También es necesario catalogar si alguna de las demás especies existentes de *Polylepis* en Bolivia también presenta el ataque del mencionado hongo, o si ataca a otras especies nativas, por considerarse éste un hongo endémico.

AGRADECIMIENTOS

Al M. Sc. Ermino Barrientos Pérez por entonces Decano de Facultad de Ciencias Agrarias y Veterinarias de la Universidad Técnica de Oruro y Al Ph. D. Reyes Alejano de la Universidad de Huelva España por el apoyo con el Convenio de ambas Universidades. A Pedro Cárdenas José Camacho, Gladys Maín y Roger Copa. Y a los guías del Parque Nacional Sajama.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Agrios, GN. (1995). Fitopatología. Departamento de Fitopatología Universidad de Massachusetts, Segunda Edición. UTHEA Noriega Editores.
- Arrazola, S., Mercado, M. y Aguirre, L. (2010). Bosques de Kewiña. Bolivia Ecológica, Revista Trimestral N°57. Centro de Ecología Difusión – Fundación Simón I. Patiño. Cochabamba Bolivia. 36p.
- Argollo, J., Soliz, C. y Villalba, R. (2004). Potencialidad Dendrocronológica de *Polylepis tarapacana* en los Andes

Centrales de Bolivia. Ecología en Bolivia, 39(1): 5-24, Julio.

- Brannen, PM. & Krewer, G. (2007). Cane Blight of Blackberry. The University of Georgia – College of Agricultural & Environmental Sciences, Documento en línea Disponible en: http://www.caes.uga.edu/Publications/displayHTML.cfm?pk_id=7380 Consultado el 24/12/2010
- Danielsen, S., & Ames T. (s/f). EL Mildiú (*Peronospora farinosa*) de la Quinoa (*Chenopodium quinoa*) de la Zona Andina. Manual Práctico para el Estudio de la Enfermedad y el Patógeno. Centro Internacional de la Papa (CIP); Royal Danish Ministry of Foreign Affairs; The Royal Veterinary and Agricultural University. 38p.
- Fjeldsa, J. & Kessler, M. (2004). Conservación de la Biodiversidad de los Bosques de *Polylepis* de las Tierras Altas de Bolivia. Una contribución al manejo sustentable de los Andes. DIVA Technical Report II. Editorial FAN. Santa Cruz Bolivia. p 214.
- French, ER. & Hebert, TT. (1982). Métodos de Investigación Fitopatológica. 1ª. Reimpresión. San José, Costa Rica 290p.
- Gandarillas, A. & Ortuño, N. (2009). Compendio de Enfermedades, Insectos, Nematodos y Factores Abióticos que Afectan al Cultivo de Papa en Bolivia. Fundación PROINPA. Cochabamba – Bolivia.
- Herbas, A R. (1981). Manual de Fitopatología. Editorial Universitaria Oruro – Bolivia Depósito Legal L.P. 21/1981 444p.
- Iquize, E., Barrientos, E., y Colque, S. (2009). Determinación de la Superficie Mínima de Muestreo en el Bosque de (*Polylepis tarapacana*) en el Parque Nacional Sajama. Dato no publicado.

Munsell Color. (2000). Munsell Soil Color Charts. Revised Washable Edition. 617 Little Britain Road. New Windsor, England.

Peña, NI. (2000). Clave de los Hongos Marinos Filamentosos de la Provincia de Buenos Aires, Argentina. Darwiniana, año/vol. 38 número3-4 Instituto de Botánica Darwinion (IBODA) Buenos Aires, Argentina pp: 291-298. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/669/66938411.pdf> Consultada el 7 de julio de 2010.

Pinto, K. & Robledo, G. (2006). Estudio de las Interacciones Observadas entre la Infección de *Leptosphaeria polylepidis* y la Salud de *Polylepis tarapacana* (Rosaceae) en Bosques del Parque Nacional Sajama (Depto. Oruro, Bolivia). In: II Congreso de Ecología y Conservación de Bosques de *Polylepis*—Cusco, Perú. Libro de resúmenes. Centro de Biodiversidad y Genética, Universidad Mayor de San Simón, Cochabamba, Bolivia y American Bird Conservancy, Washington, DC, USA.

Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo. (2008). Informe Temático sobre Desarrollo Humano. La Otra Frontera. Usos Alternativos de Recursos Naturales en Bolivia. La Paz – Bolivia 509p.

Robledo, G., Urcelay, C. y Rajchemberg, M. (2000). *Phellinus tabaquilio*: Una Nueva Especie de Hongo que Degrada la Madera de *Polylepis australis*. Memoria I Congreso Internacional de Ecología y Conservación de Bosques de *Polylepis* Cochabamba – Bolivia Centro Cultural Simón I. Patiño.

Steel & Torrie. (1992). Bioestadística, Principios y Procedimientos. McGraw – Hill México D.F 635p.