

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

TRABAJO FINAL DE CARRERA

Marchitamiento o Fusariosis vascular de la lechuga. Posibles alternativas para su manejo.

ESTUDIANTE: Desantis, Nicolás Antonio

DIRECTOR: Dr. Ismael Malbrán

CODIRECTOR: Ing. Agr. Gladys A. Lori

FECHA DE ENTREGA: 9 de marzo de 2018

RESUMEN

El marchitamiento o Fusariosis vascular de la lechuga, ocasionado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* J.C. Hubb. & Gerik (*Fol*), es una de las enfermedades más importantes para el cultivo de la lechuga tanto por los daños que ocasiona como por la dificultad que presenta su manejo. Esta enfermedad es considerada económicamente muy importante y devastadora, no existiendo en la actualidad un manejo sanitario que permita disminuir su incidencia una vez instalada en el cultivo. Con el objetivo de realizar aportes al manejo integrado de esta importante enfermedad, se probó la eficacia de un grupo fungicidas para la prevención y/o el control del marchitamiento o fusariosis vascular de la lechuga. Para ello se obtuvieron aislamientos de *F. oxysporum* a partir de plantas de lechuga con síntomas de marchitamiento y se determinó su pertenencia a la forma especial *lactucae* utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Con un grupo de los aislamientos obtenidos se llevó a cabo un ensayo *in vivo* en el que se evaluaron tres fungicidas registrados para el manejo de otras enfermedades ocasionadas por diferentes hongos de suelo, incluyendo formas especiales de *F. oxysporum*, frente a *Fol*. El análisis cuantitativo y cualitativo del desempeño de los principios activos utilizados permitió concluir que los fungicidas aplicados no ejercieron un control eficaz de *Fol* en las condiciones particulares del ensayo.

Palabras claves: lechuga, *Fusarium oxysporum*, fungicida.

INTRODUCCIÓN

La lechuga (*Lactuca sativa* L.) es una planta anual herbácea y autógama de la familia de las Asteráceas (llamada anteriormente Compuestas). El nombre genérico *Lactuca* deriva del latín “lac”, que significa “leche”, y que se asocia con la presencia de látex en esta especie, mientras que el epíteto *sativa* se refiere a que es una especie cultivada. Su consumo se remonta a aproximadamente 2.300 años; los griegos y los romanos la conocían, aunque no consumían las mismas variedades que se utilizan en la actualidad. El origen de la especie no está bien definido, pues algunos sostienen que es originaria de Europa Meridional y otros de Asia (Muguiro, 2014). En su estado silvestre se caracteriza por plantas pequeñas y de sabor amargo, pero la selección del hombre a lo largo del tiempo ha producido gran variedad. Es la más importante dentro del grupo de las hortalizas de hoja; habitualmente se consume cruda en ensaladas, es ampliamente conocida y se cultiva casi en todos los países del mundo.

Es una especie que prefiere ambientes templados y húmedos, pero existen un gran número de cultivares que se adaptan a una gama muy amplia de climas. En términos generales es sensible a las heladas, aunque algunos cultivares pueden resistir varios grados bajo cero. En condiciones extremas de temperatura baja y alta (invierno y verano) tiene problemas de producción (Sinavimo, 2017).

En la Argentina su cultivo se ha expandido en zonas templadas con menor amplitud térmica como Mar del Plata (con clima marítimo fresco en verano) y Santiago del Estero y Santa Fe (con temperaturas moderadas en invierno). En otras zonas como La Plata, Gran Buenos Aires y Rosario se cultiva durante todo el año (Ferrato y Rodríguez, 2010). Esto la convierte en uno de los cultivos hortícolas de mayor importancia, abarcando el 4,2% del total de la superficie implantada con hortalizas a nivel nacional. El 96% de esta superficie se cultiva a campo y solo el 4% restante se realiza bajo cubierta (CNA, 2002).

La provincia de Buenos Aires es la mayor productora de lechuga a nivel nacional, concentrando el 38,1% del total de la superficie del país dedicada a esta hortaliza (CNA, 2002) y el 87% de la superficie destinada a su producción bajo invernadero (Viteri et al., 2013). Dicha producción se nuclea en torno a los grandes centros urbanos, conformando los “cinturones verdes”, denominando así al territorio ocupado por quintas o huertas familiares y comerciales que rodea a las ciudades y donde se producen hortalizas para abastecer a la población urbana. En este entramado de producciones primario-intensivas, la producción se caracteriza por la gran diversificación de cultivos, cuyo destino es la comercialización en fresco hacia el mercado interno (Barsky, 2015).

El Cinturón Hortícola de La Plata (CHLP) constituye el área de producción de hortalizas más importante de la Provincia de Buenos Aires. El CHLP abarca el 46,15% del total de la superficie provincial destinada a cultivos hortícolas, con un promedio anual de producción de 75.000 toneladas de hortalizas. El 70% de esta producción se cultiva en la zona oeste de Olmos, Etcheverry, Romero y Abasto, mientras que el 30% restante se produce en Arana, el Parque Pereyra, el sector sur del partido de La Plata y Gorina (CHFBA, 2005).

En el CHLP se cultivan 1.348,6 ha de lechuga, con un volumen de producción anual promedio de 15.260,64 t (CHFBA, 2005). Junto con los cultivos de tomate, espinaca y pimiento, la lechuga abarca el 90% de la producción conducida bajo invernaderos en el CHLP (del Pino, 2016).

La lechuga presenta una gran diversidad dada principalmente por diferentes tipos de hojas y hábitos de crecimiento de las plantas. Dentro de la especie *L. sativa* existen cuatro variedades botánicas (Ferrato y Rodríguez, 2010):

- *L. sativa* var. *asparagina* L.: llamada lechuga espárrago o de tallo, se la cultiva por sus tallos suculentos, sus hojas son angostas y puntiagudas, no forman cabeza y sólo se cultivan en China.

- *L. sativa* var. *crispa* o *intybacea* L.: llamada lechuga crespa, de hoja, de corte o de mata, o francesa; no forman cabeza tienen hojas anchas con margen muy recortado, sueltas y dispersas. Sus hojas pueden presentar color verde o morado según el cultivar comercial.

- *L. sativa* var. *longifolia* Lam.: llamada lechuga cos, romana o latina, no forman un verdadero cogollo, el mismo es alargado, cónico o cilíndrico y semicompacto. Estarían dentro de esta clasificación las llamadas criollas, gallegas o porteñas, las cuales forman una cabeza, aunque no tan alargadas como la romana.

- *L. sativa* var. *capitata* L.: llamada lechuga arrepollada, forman un cogollo apretado, las hojas son redondeadas y dentro de estas variedades se pueden distinguir 2 clases:

- De hoja consistente: Crespas, capuchinas, iceberg o batavias; con cabezas bien firmes, muy resistentes al transporte.
- De hoja mantecosa: Mantecosa, aceitosa o crasa; cabezas no tan firmes, de baja resistencia al transporte, muy cultivadas en Europa y en los últimos años en nuestro país, principalmente bajo invernadero.

Entre los tipos de lechugas cultivados en el CHLP prevalece el tipo mantecosa con 602,8 ha implantadas (44,7% del total cultivado) y una producción de 7.526,64 t (49,3% del total producido). En cultivos bajo cubierta este tipo de lechuga es también el que más superficie abarca (510,4 ha = 74,8% del total) y mayor volumen produce (6.539,39 t = 75,1 % del total). Los otros tipos de lechuga que se producen, en orden

de importancia según superficie y volumen, son: criolla, crespita, capuchina, morada y otras como corazón, crimor, francesa y gallega (CHFBA, 2005).

En la región, los cultivos bajo cubierta han ido ganando superficie desde que el invernadero llegó a la zona, destinándose en sus inicios a los cultivos de mayor valor económico como forma de recuperar de forma rápida la inversión inicial que trae implícita la adopción de esta tecnología. Actualmente, muchos productores que se inician en la actividad destinan estas estructuras a los cultivos de hoja, en especial lechuga, repitiendo los ciclos de esta especie en forma continua durante todo el año. Como consecuencia de esto, y favorecido por la situación de monocultivo, se observa un preocupante incremento de patógenos que ponen en peligro la continuidad del cultivo en los lotes bajo estas condiciones (Amoia, 2015).

El marchitamiento o Fusariosis vascular de la lechuga, ocasionado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* J.C. Hubb. & Gerik (*Fol*), es una de las enfermedades más importantes para el cultivo de la lechuga tanto por los daños que ocasiona como por la dificultad que presenta su manejo. La presencia de esta patología ha sido recientemente descrita en cultivos de lechuga mantecosa bajo cubierta en el CHLP (Malbrán et al., 2014).

Las plantas afectadas se muestran inicialmente cloróticas y de menor tamaño. Con el progreso de la enfermedad, los síntomas se agravan y pueden incluir la muerte de las hojas más viejas o el colapso de toda la planta (Cabral, 2012). El síntoma interno característico de la enfermedad es la necrosis de los vasos xilemáticos a lo largo del tallo (Fujinaga et al., 2001; Garibaldi et al., 2004; Scott et al., 2010), los que adquieren coloración marrón intensa como consecuencia de la colonización del patógeno y de las enzimas liberadas por el mismo.

En el proceso de infección el patógeno penetra por la raíz y coloniza el tallo de las plantas y su sistema vascular. Esta colonización se restringe, tanto en cultivares resistentes como susceptibles, a la región de entrada inicial del patógeno debido a la

oclusión de los vasos por geles, deposiciones de calosa y tilosas. En los cultivares susceptibles, la colonización continúa (distribución secundaria) cuando los geles y calosas son degradados por el efecto de enzimas pectolíticas del patógeno y el crecimiento de las tilosas es inhibido (González et al., 2012).

Esta enfermedad es considerada económicamente muy importante y devastadora (Lori et al., 2015), no existiendo en la actualidad un manejo sanitario que permita disminuir su incidencia una vez instalada en el cultivo. Esto lleva a que parcelas implantadas con lechuga que muestran los primeros síntomas (retraso en el crecimiento y clorosis en hojas), sean abandonadas o destruidas por los productores.

Las características de este patógeno en cuanto a su supervivencia y persistencia en los suelos lo convierten en una adversidad muy difícil de erradicar de las zonas a las que ha ingresado (Gordon y Koike, 2015). Una de las estrategias adoptadas para el manejo de la enfermedad es intentar reducir la densidad de inóculo en el suelo a niveles que no sean perjudiciales para los cultivos, por ejemplo, mediante rotación de cultivos, eliminación de hospedantes alternativos, biosolarización en barbechos, etc. (Gordon y Koike, 2015). El uso de cultivares resistentes (Scott et al., 2010) y/o la implantación del cultivo en épocas donde el clima es menos propicio para el desarrollo de la enfermedad (Matheron, 2015) son otras prácticas que permiten contrarrestar el poder destructivo de *Fol*.

El tratamiento de semillas con productos químicos o biológicos constituye una alternativa efectiva para el manejo de *Fol* (Gilardi et al., 2005). Sin embargo, no se encuentran disponibles actualmente tratamientos preventivos y/o curativos que puedan utilizarse para reducir la incidencia y/o severidad del marchitamiento en las etapas posteriores del cultivo.

Diversos principios activos han sido probados en cultivos hortícolas para el manejo de enfermedades causadas por otras formas especiales de *F. oxysporum*. En

tomate se ha evaluado la efectividad de tratamientos con los fungicidas benomil, carbendazim, procloraz, fludioxonil, bromuconazol y azoxistrobina (Amini y Sidovich, 2010), en papa, por su parte, se han utilizado himexazol, azoxistrobina, fludioxonil y quinolina (Ayed et al., 2005), mientras que en orégano se han probado carbendazim, tiabendazol, tiofanato metil, tebuconazole y mancozeb (Yossen y Conles, 2014).

En el desarrollo del presente trabajo se probaron productos registrados para el manejo de otras enfermedades ocasionadas por diferentes hongos de suelo, incluyendo formas especiales de *F. oxysporum*, con el objetivo de evaluar su eficacia frente a la Fusariosis vascular de la lechuga.

HIPOTESIS

Los fungicidas actualmente disponibles en el mercado para el manejo de enfermedades ocasionadas por diferentes formas especiales de *F. oxysporum* y otras enfermedades producidas por hongos de suelo en cultivos hortícolas son efectivos para prevenir y/o controlar el marchitamiento o Fusariosis vascular de la lechuga.

OBJETIVO GENERAL

Realizar aportes al manejo integrado del marchitamiento o Fusariosis vascular de la lechuga, causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*, diseñando estrategias preventivas y/o curativas mediante la utilización de fungicidas.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener aislamientos de *Fusarium oxysporum* a partir de plantas de lechuga con síntomas de marchitamiento.
- Identificar los aislamientos obtenidos mediante el análisis de sus características morfológicas y culturales y confirmar su pertenencia a la forma especial *lactucae* utilizando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- Evaluar el comportamiento de tres productos fitosanitarios químicos (fungicidas) frente a *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* en ensayos *in vivo* conducidos bajo invernáculo.

MATERIALES Y METODOS

Obtención de aislamientos

Los aislamientos se obtuvieron a partir de plantas de lechuga mantecosa con síntomas de marchitamiento de un lote en producción bajo cubierta ubicado en la localidad de Abasto (Longitud: -58.091656°, Latitud: -35.010628). Las plantas a partir de las cuales se realizaron los aislamientos provenían de parcelas con sucesivos cultivos de lechuga, que ya habían manifestado la presencia de esta enfermedad en campañas anteriores.

Para la realización de los aislamientos, las raíces se lavaron con agua corriente, se seccionaron longitudinalmente y se extrajeron trozos de tejido vascular que manifestaban síntomas necróticos. Estos trozos se desinfectaron superficialmente sumergiéndolos sucesivamente en una solución de alcohol etílico de 70° durante 1 min y en una solución de lavandina comercial (55 g de Cl L⁻¹) al 5% (v/v) durante 1 min, y se enjuagaron en agua destilada estéril, para sembrarlos por último en agar papa de dextrosa al 2% (APD) (Windels et al., 1988).

Después de 5 a 7 días de incubación a $23 \pm 2^\circ\text{C}$, se seleccionaron las colonias que potencialmente pertenecían a *F. oxysporum* de acuerdo con las características morfológicas descritas por Leslie y Summerell (2006).

Los aislamientos seleccionados se repicaron en tubos de ensayo con medio APD y se incubaron a $23 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 7 a 14 días, con el fin de realizar la identificación taxonómica complementaria mediante el análisis de la ontogenia conídica y de la morfología cultural de acuerdo con los criterios de Nelson et al. (1983).

Identificación taxonómica de la forma especial lactucae

La confirmación de la identidad de los aislamientos obtenidos y su pertenencia a la f. sp. *lactucae* se realizó mediante PCR especie-específica utilizando los *primers* GYCF1 (5'- CTC CGG ATT TCT GGA GAC TTG - 3') y R943 (5' - CCC ATA CTA TAT ACC AGA CG - 3') desarrollados por Mbofung y Pryor (2010).

Para la extracción de ADN, los aislamientos previamente identificados como *F. oxysporum* se sembraron en placas de Petri con caldo de papa dextrosado (PDB) al 2% (p/v) incubándose a $23 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 7 días. El ADN genómico se obtuvo de acuerdo con la metodología de Aljanabi y Martínez (1997). La cantidad y calidad del ADN extraído se estimó mediante electroforesis en un gel de agarosa 0,7%, al que se le adicionaron $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ de bromuro de etidio (Sambrook y Russell, 2001). La corrida electroforética se realizó a 80V, en buffer Trisborato-EDTA. Los fragmentos de ADN se visualizaron bajo luz ultravioleta (UV) y el ADN fue cuantificado por comparación con las bandas generadas por el marcador molecular Lambda DNA/Hind III (Fermentas, USA).

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en volúmenes de 20 μL conteniendo 5-20 ng de ADN fúngico. La mezcla de reacción contuvo 200 μM de cada nucleótido (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 0,5 μM de cada uno de los primers (GYCF1 y

R943), 1 unidad de Taq polimerasa (Highway Molecular Biology-InBio-UNICEN-Tandil), y 1,5 mM de Cl_2Mg , en buffer de reacción (50 mM KCl, 10 mM Tris-Cl, 1% Triton X-100).

El termociclador (PTC-150 MiniCycler™- M.J. Research, INC., USA) se programó con una secuencia de ciclos consistentes en: un paso de desnaturalización a 95°C por 5 min, seguido por 30 ciclos de desnaturalización por 30 s, hibridación a 63°C por 30 s y extensión a 72°C por 1 min, finalizando con un paso de extensión durante 1 min. Hasta su recuperación las reacciones fueron mantenidas a 15°C.

Los productos de amplificación se examinaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% (p/v), con 0,2 mg mL⁻¹ de bromuro de etidio, y fueron corridos a 80V, en buffer Trisborato-EDTA. Los fragmentos de ADN se visualizaron bajo luz UV y el tamaño de los mismos se estimó por comparación con las bandas generadas por un marcador molecular de ADN de 1 kb (Highway Molecular Biology- InBio- UNICEN-Tandil).

Evaluación de fungicidas

Para la evaluación del efecto de los fungicidas seleccionados sobre el marchitamiento se llevó adelante un ensayo *in vivo* bajo cubierta en instalaciones de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, intentando reproducir las condiciones de cultivo que caracterizan al CHLP. El mismo se inició el 9 de noviembre de 2016, finalizando 27 días después, el 5 de diciembre del mismo año.

Se dispuso un diseño en bloques completos al azar, con 8 tratamientos, 4 bloques (repeticiones) y 4 plantas por bloque. El esquema de aleatorización de los tratamientos dentro de cada bloque se presenta en la Figura 1.

4	8	1	5	7	6	3	2
3	7	2	6	8	1	4	5
2	6	3	7	4	5	8	1
1	5	4	8	2	3	6	7

Bloque C

1	5	4	8	2	3	6	7
2	6	3	7	4	5	8	1
3	7	2	6	8	1	4	5
4	8	1	5	7	6	3	2

Bloque D

7	6	3	2	8	4	5	1
1	8	5	4	7	3	6	2
5	4	1	8	6	2	7	3
2	3	6	7	5	1	8	4

Bloque A

2	3	6	7	5	1	8	4
5	4	1	8	6	2	7	3
1	8	5	4	7	3	6	2
7	6	3	2	8	4	5	1

Bloque B

Figura 1 - Diseño del ensayo y distribución de los tratamientos en los bloques

Los 8 tratamientos consistieron en la evaluación de 3 fungicidas (Tabla 1) aplicados en plantas inoculadas con el patógeno (*Fol*), los 3 controles correspondientes a los mismos productos sin presencia de *Fol*, un control sano sin *Fol* ni fungicida y un control inoculado con *Fol* y sin fungicida.

Tabla 1 - Fungicidas evaluados en el ensayo de campo

Principio activo	Marca comercial
Fludioxonilo	SCHOLAR 23 SC ®
Tiabendazol	TECTO 50 SC ®
Metil tiofanato	TOPSIN FLO ®

Los 8 tratamientos resultantes y los números asignados a cada uno se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2 - Tratamientos incluidos en el ensayo *in vivo*

Número	Tratamiento	Fol
1	Control sin Fungicida	No
2	Control sin Fungicida	Si
3	Control Fludioxonilo	No
4	Control Tiabendazol	No

5	Control Metil tiofanato	No
6	Fludioxonilo	Si
7	Tiabendazol	Si
8	Metil tiofanato	Si

Para producir el inóculo utilizado en los ensayos, un disco de 5 mm de diámetro procedente de una colonia de *Fol* de 7 días de desarrollo en APD se transfirió a una placa de Petri de 9 cm de diámetro conteniendo 20 g de arroz pulido humedecido (40% de agua) y autoclavado. Por cada uno de los aislamientos de *Fol* a evaluar se prepararon de esta forma 3 placas de Petri que se incubaron a $23 \pm 2^\circ\text{C}$ en la oscuridad durante 15 días. Una vez que el hongo colonizó completamente el arroz, el mismo se secó a temperatura ambiente y se molió con molinillo de granos (Lori et al., 2004).

La concentración del inóculo se estimó utilizando la metodología de las diluciones sucesivas. Para ello se partió de una dilución inicial de 1:10 (5 g de inóculo en 50 mL de agua estéril), para luego realizar diluciones sucesivas. A partir de la dilución 10^{-5} , cada dilución sucesiva se sembró por triplicado en placas de Petri con medio de cultivo de Nash y Snyder (1962). Luego de 7 días de incubación a $23^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ en oscuridad, se realizó el recuento de colonias y se registró la cantidad de Unidades Formadoras de Colonias por gramo (UFC g^{-1}). Se utilizó para el recuento la dilución 10^{-10} ya que permitió una distribución adecuada para la visualización y conteo de las colonias.

Para llevar adelante el ensayo se utilizó suelo obtenido de un lote sin antecedentes de cultivo de lechuga ubicado en la localidad de Arana, La Plata (Longitud: $-57,93167^\circ$, Latitud: $-35,01661^\circ$). El suelo se tamizó, se incorporó el inóculo y se homogeneizó de manera de obtener una concentración final de 2×10^7 UFC g^{-1} de suelo.

Al momento del trasplante se incorporaron 2×10^{10} UFC de inóculo a cada maceta en la zona donde se ubicó el plantín correspondiente, con el objetivo de lograr el mayor contacto posible entre el inóculo y la raíz a fin de favorecer el proceso de infección.

Se utilizaron plantines de lechuga mantecosa Cv. Lores que se trasplantaron a macetas plásticas de 1 L de volumen. Estas se colocaron sobre mesadas que contaban con protección (media sombra) para las horas de mayor intensidad solar. Se aplicó riego diario de forma manual.

La elección de los principios activos, sus correspondientes marcas comerciales y la determinación de las dosis a aplicar, se realizaron de acuerdo con las consideraciones del asesor técnico Ing. Agr. Joaquín Otero de Syngenta Agro S.A. y se complementó con el análisis de los antecedentes bibliográficos existentes sobre los principios activos usados para disminuir los efectos de distintas formas especiales de *F. oxysporum* responsables de marchitamientos en otras especies hortícolas.

La aplicación de los productos químicos se efectuó al momento del trasplante, usando la metodología denominada en “drench”, que consiste en dirigir la aplicación al cuello de la planta. Se aplicaron por planta 25 mL de la solución de cada producto. Para el cálculo de las dosis a aplicar para cada producto se consideró un stand de 80.000 plantas ha^{-1} y un volumen de aplicación de 2.000 L ha^{-1} . Las dosis aplicadas se detallan en la Tabla 3.

Tabla 3 - Dosis aplicadas para cada uno de los fungicidas probados en el ensayo *in vivo*

Principio activo	Marca comercial	Dosis	
		ml/ha	ml/litro
Fludioxonilo	SCHOLAR 23 SC ®	760	0,38
Tiabendazol	TECTO 50 SC ®	1000	0,5
Metil tiofanato	TOPSIN FLO ®	1000	0,5

Con el fin de evaluar la respuesta de los distintos principios activos usados frente a la enfermedad se realizaron observaciones diarias desde el inicio del ensayo *in vivo*. A los 13 días post inoculación (dpi), se realizó una evaluación parcial que consistió en la observación de la aparición de síntomas de la enfermedad o de cualquier otro factor que los pudiera provocar (ej.: fitotoxicidad). A los 22 dpi se realizó una evaluación de cada planta según su estado, clasificándolas en planta sana o planta enferma.

A los 26 dpi se dio por finalizado el ensayo, considerando el estado general que mostraban las plantas, a los efectos de observar diferencias entre tratamientos. Se procedió a la cosecha de las plantas con la precaución de extraer y no afectar la zona radicular. Las plantas descalzadas se clasificaron por su estado general, considerando parte aérea y radicular en forma conjunta. Para ello, y tomando como referencia el modelo usado por Cabral (2012) adaptado de Santos (1999), se construyó una escala acorde a las condiciones del ensayo (cultivar, ambiente y tratamientos). Se establecieron 5 niveles de severidad, con valores entre 0 y 4, considerando los síntomas típicos de la enfermedad: pérdida de turgencia, clorosis en hojas y disminución del tamaño de la planta (Figura 2). Los niveles resultantes fueron los siguientes:

- 0: planta sana
- 1: tamaño de planta y desarrollo radicular reducido.
- 2: clorosis en primeras hojas. Tamaño y desarrollo radicular muy reducidos.
- 3: clorosis generalizada en hojas y presencia de necrosis. Tamaño y desarrollo muy reducidos.
- 4: planta muerta.



Figura 2 - Escala de severidad construida para la evaluación del ensayo *in vivo*

Los valores de severidad obtenidos al aplicar la escala se analizaron utilizando el método estadístico no paramétrico de Kruskal Wallis con un nivel de significancia del 5%.

Por otro lado, se seleccionó una planta por tratamiento y por bloque y se verificó la presencia de necrosis vascular. Para ello se practicó un corte longitudinal de la raíz para observar los síntomas internos de la enfermedad. De las plantas que mostraron el síntoma necrótico característico producido por *Fol*, se realizaron aislamientos y se obtuvieron colonias del patógeno con el fin de comprobar su identidad repitiendo la PCR especie-específica como fuera descrito previamente.

También se cuantificó la longitud total de planta (parte aérea + raíz) y el peso seco de plantas enteras. Para realizar ambas evaluaciones, previamente se procedió a lavar las raíces de las plantas con agua corriente para eliminar los restos de suelo o cualquier materia extraña presente. Las plantas se protegieron con papel,

manteniendo la identidad de cada una (tratamiento y bloque), y fueron secadas en estufa con circulación de aire hasta peso constante.

Los valores de longitud total y peso seco de las plantas cosechadas se estudiaron mediante análisis de Varianza (ANOVA), realizándose también los análisis de correlación entre los parámetros analizados. En los casos en que el resultado del ANOVA arrojó la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos se aplicó el test de Tukey para el estudio de las diferencias entre las medias de los tratamientos con un nivel de significancia del 5%. Los datos obtenidos fueron sometidos a análisis estadístico utilizando el paquete informático InfoStat (v. 2017p).

RESULTADOS

De las plantas de lechuga mantecosa con síntomas de marchitamiento obtenidas de un lote en producción se obtuvieron 8 aislamientos identificados inicialmente como *Fusarium* sp. Las colonias obtenidas presentaron aspecto algodonoso y color violeta con variantes de intensidad (de oscuro a pálido), aspectos característicos de *F. oxysporum* (Leslie y Summerell, 2006). Microscópicamente se observó abundante presencia de microconidios unicelulares producidos en falsas cabezas sobre monofiálides cortas y presencia de clamidosporas, características típicas de la especie (Nelson et al., 1983) (Figura 3).



Figura 3 - Imagen microscópica de un cultivo de *Fusarium oxysporum* en la que se pueden observar las hifas delgadas y septadas y la presencia de microconidios en falsas cabezas sobre fialides cortas

La reacción de PCR especie-específica permitió confirmar la pertenencia de los aislamientos obtenidos a la f. sp. *lactucae*. En todos los casos se verificó la presencia de una banda de 936 bp. (Figura 4).

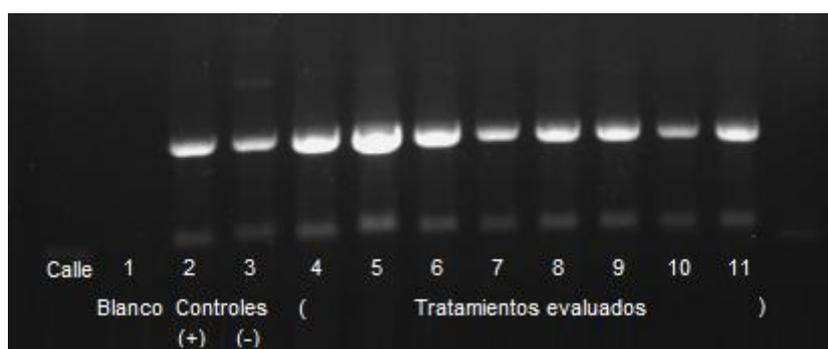


Figura 4 - Gel de agarosa mostrando el resultado de la reacción de PCR especie-específica para la identificación molecular de los aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *lactucae*

A partir de estos aislamientos se generó el inóculo utilizado en el ensayo *in vivo*.

Tabla 4 - Promedios de severidad del marchitamiento, peso seco y longitud total de la planta obtenidos para cada uno de los tratamientos en el ensayo *in vivo*

Tratamiento	Descripción	Severidad	Peso seco	Long. total
1	Control sin <i>Fol</i>	0 ^a	4,76 ^a	29,46 ^a
3	Control Fludioxonilo sin <i>Fol</i>	0 ^a	4,76 ^a	26,5 ^a
5	Control Metil tiofanato sin <i>Fol</i>	0 ^a	4,9 ^a	28,67 ^a
8	Metil tiofanato con <i>Fol</i>	2,33 ^b	0,61 ^b	12,58 ^b
2	Control con <i>Fol</i>	3,25 ^b	0,38 ^b	8,83 ^b
6	Fludioxonilo con <i>Fol</i>	3,33 ^b	0,33 ^b	9,38 ^b
4	Control Tiabendazol sin <i>Fol</i>	3,67 ^b	0,04 ^b	2,46 ^c
7	Tiabendazol con <i>Fol</i>	3,75 ^b	0,04 ^b	3,79 ^c

^{a,b,c}: valores con una letra común no presentan diferencias significativas al 5%.

Existieron diferencias significativas entre los tratamientos para los parámetros severidad del marchitamiento ($H = 71,83$; $p\text{-value} < 0,0001$) y peso seco de la planta entera ($F = 257,39$; $p\text{-value} < 0,0001$) (Tabla 4). Sin embargo, no existieron diferencias significativas entre los distintos fungicidas probados para estas variables, diferenciándose únicamente los tratamientos inoculados con *Fol* de los no inoculados. La excepción a este comportamiento la constituyó el tratamiento control con Tiabendazol, que presentó valores de severidad que no se diferenciaron significativamente de los tratamientos inoculados (Tabla 4). Las plantas pertenecientes a este tratamiento se vieron muy afectadas desde los primeros momentos post aplicación, con síntomas de clorosis y pérdida de turgencia, finalizando el ensayo con escaso crecimiento y marchitez muy marcada.

Resultados similares fueron obtenidos para la longitud de la planta ($F = 117,99$; $p\text{-value} < 0,0001$), aunque en este caso los dos tratamientos con Tiabendazol se diferenciaron significativamente del resto (Tabla 4).

Se observaron correlaciones negativas y significativas de la severidad con la longitud ($-0,96$; $p\text{-value} < 0,0001$) y el peso seco ($-0,92$; $p\text{-value} < 0,0001$). La longitud y el peso seco, por su parte, mostraron una correlación positiva y significativa ($0,94$; $p\text{-value} < 0,0001$).

Una vez finalizado el ensayo se cosecharon 12 plantas (1 por cada uno de los tratamientos sin inocular y 2 por cada uno de los tratamientos inoculados). A partir de los tejidos vasculares de estas plantas se realizaron reislamientos. Todos los tratamientos inoculados con *Fol* produjeron colonias fúngicas con las características típicas de la especie mientras que no se verificó la presencia de colonias fúngicas en los tratamientos no inoculados. Se seleccionaron 8 de los aislamientos obtenidos (uno por cada una de las plantas pertenecientes a los tratamientos inoculados) para confirmar la identidad con *Fol* mediante PCR-especie específica. Para todas las colonias obtenidas a partir de los reislamientos se observó la presencia de una banda

de 936 bp, confirmando que los síntomas observados se correspondieron con la presencia del patógeno.

DISCUSION

En el presente trabajo se evaluó la capacidad de los fungicidas fludioxonilo, tiofanato metil y tiabendazol para disminuir y/o controlar el marchitamiento de la lechuga ocasionado por *F. oxysporum* f. sp. *lactucae*.

La obtención de aislamientos positivamente identificados como *Fol* a partir de plantas extraídas de un lote en producción en la zona de La Plata, confirma los recientes reportes de la presencia de este patógeno en la zona (Malbrán et al., 2014).

Los resultados obtenidos no permitieron verificar un efecto positivo de los principios activos utilizados en la disminución de los síntomas del marchitamiento de la lechuga. Esto podría deberse, al menos parcialmente, a la alta densidad de inóculo utilizada. En el presente ensayo, se utilizaron concentraciones de 2×10^7 UFC g^{-1} de suelo más el agregado de 2×10^{10} UFC en el cuello de las plantas al momento del trasplante, buscando obtener una alta presión de inóculo que favoreciera la infección de los plantines. Estas concentraciones, sin embargo, resultan muy superiores a las citadas por otros autores. Scott et al. (2010), por ejemplo, citan densidades de inoculación con *Fol* de 5×10^3 UFC g^{-1} , mientras que Gilardi et al. (2005) inocularon plantas de lechuga por inmersión de raíces con densidades de 1×10^6 UFC g^{-1} . Amini y Sidovich (2010), trabajando con *F. oxysporum* f. s. *lycopersici* en tomate, por su parte, usaron una densidad de 1×10^6 UFC g^{-1} para verificar el efecto de tratamientos con fungicidas en el marchitamiento de esta especie. Como consecuencia, la alta concentración de inóculo aplicada podría haber actuado en detrimento del desempeño de los principios activos probados.

Referido al momento de aplicación del fungicida, Amini y Sidovich (2010) indicaron que la disminución del período entre la aplicación del fungicida y la infección generalmente resultó en un aumento de la eficacia del control. En nuestro caso, ambas acciones se realizaron simultáneamente.

Los principios activos evaluados en el presente trabajo poseen diferentes características en cuanto a su modo de acción. El fludioxonilo o fludioxonil (fenilpirrol) ejerce su acción fungicida por contacto, a través de la interferencia del proceso de regulación osmótica de las membranas celulares de los hongos, provocando la ruptura de las células (FRAC CODE: 12) (FRAC, 2017). El tiofanato metil, por su parte, es un fungicida sistémico, de acción preventiva y curativa, mientras que el tiabendazol (bencimidazol) es un fungicida sistémico de amplio espectro. Ambos actúan afectando la mitosis y división celular (FRAC CODE: 1) (CASAFE, 2011; FRAC, 2017).

Estos principios activos han sido evaluados en otros cultivos y no han mostrado buena eficacia. Amini y Sidovich (2010) trabajaron en tomate para el control de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, y citaron el buen desempeño de fungicidas cuyo modo de acción actúa impidiendo la síntesis de ergosterol lo que produce alteraciones en las membranas celulares del hongo (Procloraz y Bromuconazol; FRAC: 48); en la misma experiencia aquellos fungicidas que actúan interfiriendo la síntesis del DNA, la mitosis y el mecanismo de transmisión de mensajes genéticos del DNA al RNA (Benomil y Carbendazim; FRAC: 32), mostraron una eficacia algo menor. Yossen y Conles (2014) trabajaron en orégano para el control de *F. oxysporum* en un ensayo *in vitro* y describieron que el fungicida que mejor se desempeñó fue Tebuconazole, de mismo modo de acción que los citados por Amini y Sidovich (FRAC: 48). Por su parte Ayed et al. (2005), cita que, en papa, para el control de *F. oxysporum* f. sp. *tuberosi*, el principio activo de mejor desempeño fue el que actuó interfiriendo la síntesis del DNA, la mitosis y el mecanismo de transmisión de mensajes genéticos del DNA al RNA (FRAC: 32), en coincidencia con lo señalado anteriormente.

Estos antecedentes pueden servir de base para la planificación de futuros ensayos, seleccionando productos que posean estos modos de acción.

Los tratamientos con Tiabendazol no presentaron diferencias entre sí, observándose en ambos, síntomas de clorosis en las hojas, pérdida de turgencia y disminución del tamaño de la planta desde los 5 días posteriores a su aplicación. Estos síntomas se condicen con los generados por efectos de fitotoxicidad, considerando la misma como un efecto detrimental, nocivo o dañino de una sustancia química aplicada que se puede expresar en distintos órganos en la planta (Ochoa et al., 2012).

Es necesario seguir avanzando en nuevos ensayos donde se puedan evaluar distintas dosis, y que éstas se vayan ajustando al cultivo de lechuga en particular, en diferentes momentos (bandeja pre trasplante, al momento del trasplante y días post trasplante) y siguiendo otras metodologías de aplicación (sumergir raíces, drench, foliar, etc.).

Es vital la evaluación de productos que utilizan nuevas moléculas con distintos modos de acción a los usados habitualmente, a fin de obtener un abanico más amplio de opciones a la hora de la elección del fungicida a utilizar.

En línea con lo expresado anteriormente, es importante seguir generando información sobre la combinación de los distintos métodos disponibles (culturales, biológicos y químicos), a fin de lograr un manejo integral de la enfermedad y minimizar la chance de que se genere resistencia a los productos usados.

CONCLUSIONES

A partir de plantas de lechuga con síntomas de marchitamiento fue posible la obtención de aislamientos de *Fusarium oxysporum*. Los mismos pudieron ser identificados a través del análisis de las características morfológicas y la evaluación de

la ontogenia conídica y cultural. Se determinó su pertenencia a la f. sp. *lactucae* mediante la prueba de su patogenicidad *in vivo* y su confirmación con la realización de la reacción de PCR especie-específica.

Se evaluó el comportamiento de tres productos fitosanitarios químicos (fungicidas) frente a *Fol*, obteniendo los siguientes resultados:

- No se observó un control efectivo de la enfermedad en ninguno de los tratamientos realizados.
- Se registró que el principio activo Tiabendazol (fungicida Tecto®), generó desde su aplicación síntomas que podrían atribuirse a fitotoxicidad.

BIBLIOGRAFIA

Aljanabi, S.M. y Martínez, I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25: 4692–4693.

Amini, J. y Sidovich, D.F. 2010. The effects of fungicides on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* associated with Fusarium wilt of tomato. *Journal of Plant Protection Research*, 50: 172-178.

Amoia, P. 2015. Pautas a tener en cuenta en el manejo sanitario de lechuga (*Lactuca sativa* L.). *Boletín Hortícola* 53: 30-31.

Ayed, F., Daami-Remadi, M., Jabnoun-Khiareddine, H., Hibar, K. y El Mahjoub, M. 2005. Evaluation of fungicides for control of Fusarium wilt of potato. *Plant Pathology Journal*, 5: 239-243.

Barsky, A. 2015. Capítulo 1. La agricultura de “cercanías” a la ciudad y los ciclos del territorio periurbano. Reflexiones sobre el caso de la Región Metropolitana de Buenos Aires. En: Svetlitz de Nemirovsky, A. (ed.) Globalización y agricultura periurbana en la Argentina. Escenarios, recorridos y problemas. FLACSO, Buenos Aires, Argentina.

Cabral, C.S. 2012. Caracterização de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* das regiões sul e sudeste do Brasil e identificação de acessos resistentes de alface. Tesis (Mestrado em Fitopatología). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomía. Recife, Brasil. 94 p.

CASAFE (Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes) 2011. Guía de productos fitosanitarios para la República Argentina Tomo I (996 pp.) y Tomo II, (997-1976 pp.) Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes, Buenos Aires, Argentina.

Censo Hortiflorícola Buenos Aires (CHFBA) 2005. Superficie y producción total a campo y bajo cubierta de hortalizas de hoja, por cultivo, según partido. Disponible en: <http://www.estadistica.ec.gba.gov.ar/dpe/Estadistica/chfba/censohort.htm>. Ultimo acceso: diciembre de 2017.

Censo Nacional Agropecuario (CNA). 2002. Hortalizas: superficie implantada a campo o bajo cubierta por especie, según provincia. Disponible en: https://www.indec.gov.ar/cna_index.asp. Ultimo acceso: diciembre de 2017.

del Pino, M. 2016. Guía didáctica: cultivo y manejo de la lechuga. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Argentina. 22 p.

- Ferrato, A.J. y Rodríguez, F. 2010. Buenas prácticas agrícolas para la agricultura familiar: cadena de las principales hortalizas de hoja en Argentina. Organización Mundial de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca de la Nación Argentina, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) y Universidad Nacional de Rosario, Buenos Aires, Argentina. 540 p.
- Fujinaga, M., Ogiso, H., Tsuchiya, N. y Saito, H. 2001. Physiological specialization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*, a causal organism of fusarium root of crisp head lettuce in Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 667: 205-206.
- Fungicide Resistance Action Committee (FRAC) 2017. Code List 2017: fungicides sorted by mode of action (including FRAC Code numbering). Disponible en: <http://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2017-final.pdf?sfvrsn=2>. Ultimo acceso: diciembre de 2017.
- Garibaldi, A., Gilardi, G. y Gullino, M.L. 2004. Vegetal resistance of lettuce to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*. *Crop Protection*, 23: 845-851.
- Gilardi, G., Tinivella, F., Gullino, M.L. y Garibaldi, A. 2005. Seed dressing to control *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*. *Journal of Plant Disease Protection*, 112: 240-246.
- González, I., Yailén, A. y Peteira, B. 2012. Aspectos generales de la interacción *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*-tomate. *Revista de Protección Vegetal*, 27: 1-7.
- Gordon, T.R. y Koike, S.T. 2015. Management of Fusarium wilt of lettuce. *Crop Protection*, 73: 45-49.

- Leslie, J.F. y Summerell, B.A. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Ed. Blackwell Publishing. Iowa, EE.UU. 388 p.
- Lori, G., Edel-Hermann, V., Gautheron, N. y Alabouvette, C. 2004. Genetic diversity of pathogenic and nonpathogenic populations of *Fusarium oxysporum* isolated from carnation fields in Argentina. *Phytopathology*, 94: 661-668.
- Lori, G., Malbrán, I. y Mourellos, C. 2015. Enfermedades ocasionadas por hongos del género *Fusarium*. Su impacto en especies hortícolas, ornamentales y florícolas. *Boletín Hortícola*, 53: 32-36.
- Malbrán, I., Mourellos, C., Mitidieri, S., Ronco, B.L. y Lori, G. 2014. Fusarium wilt of lettuce caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* in Argentina. *Plant Disease*, 98: 1281.
- Matheron, M.E. 2015. Biology and Management of Fusarium Wilt of Lettuce. The University of Arizona Cooperative Extension. Disponible en: <http://extension.arizona.edu/sites/extension.arizona.edu/files/pubs/az1678-2015.pdf>. Último acceso: diciembre de 2017.
- Mbofung, G.C.Y. y Pryor, B.M. 2010. A PCR-based assay for detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* in lettuce seed. *Plant Disease* 94: 860-866.
- Muguiro, A. 2014. Rehabilitación de suelos con impedimentos físicos de uso hortícola degradados por riego con aguas bicarbonatadas sódicas. Tesis (Magister en Cultivos Intensivos) Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional del Litoral. Disponible en: <http://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8080/tesis/bitstream/handle/11185/652/tesis.pdf?sequence=1>. Último acceso: diciembre de 2017.

- Nash, S.M. y Snyder W.C., 1962. Quantitative estimations by plate counts of propagules of the bean root rot *Fusarium* in field soils. *Phytopathology*, 52: 567-572.
- Nelson, P.E., Toussoun, T.A. y Marasas, W.F.O. 1983. *Fusarium species*. An Illustrated Manual for Identification. The Pennsylvania State University Press, University Park. EE.UU.
- Ochoa, C., Enmanuel, H., & Solís Arriola, A. E. 2012. Efectos del glifosato en el establecimiento de plantaciones de hule en finca Amazonas, Pajapita, San Marcos. Disponible en: <http://recursosbiblio.url.edu.gt/tesisjcem/2017/06/17/Culebro-Helvin.pdf>. Último acceso: diciembre de 2017.
- Sambrook, J. y Russell, D.W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, EE.UU.
- Santos, J.R.M. 1999. Protocolo de tecnología: seleção para resistência a doenças em hortaliças. Tomateiro/Murcha-de-Fusario. Embrapa Hortaliças. Comunicado técnico 11. 4 p. Disponible en: <https://www.embrapa.br/hortalicas/busca-de-publicacoes/-/publicacao/767613/protocolo-de-tecnologia-selecao-para-resistencia-a-doencas-em-hortalicas-3-tomateiro---murcha-de-fusario-fusarium-oxysporum-fsp-lycopersici>. Último acceso: diciembre de 2017.
- Scott, J.C., Kirkpatrick, S.C. y Gordon, T.R. 2010. Variation in susceptibility of lettuce cultivars to fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*. *Plant Pathology*, 59: 139-146.
- Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de plagas. 2017. *Lactuca sativa*. Disponible en: <http://www.sinavimo.gov.ar/cultivo/lactuca-sativa>. Último acceso: diciembre de 2017.

Viteri, M.L., Ghezán, G. e Iglesias, D. 2013. Tomate y lechuga: Producción, comercialización y consumo. Proyecto Específico AEES 302421: Economía de las Cadenas Agroalimentarias y Agroindustriales. INTA, p. 22. Disponible en: http://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_tomateylechuga_2013_viteri.pdf.
Último acceso: diciembre de 2017.

Windels, C.E., Burnes, P.M. y Kommedahl, T. 1988. Five-year preservation of *Fusarium* species on silica gel and soil. *Phytopathology*, 78:107-109.

Yossen, V.E. y Conles, M.Y. 2014. Efficacy of fungicides used *in vitro* to control *Fusarium oxysporum* and *F. proliferatum*, causal agents of oregano wilting in Argentina. *Revista industrial y agrícola de Tucumán*, 91: 19-25.