

# Efecto *in vitro* de fungicidas para el control de *Colletotrichum* SPP., en frutales Manabí - Ecuador

José Carreño<sup>1</sup>; Luis Sánchez<sup>2</sup>; Ángel, Guzmán-Cedeño<sup>3</sup>;  
Christopher, Suarez-Palacios<sup>4</sup>; Sergio, Vélez-Zambrano<sup>5\*</sup>

## Resumen

La antracnosis ocasionada por *Colletotrichum* spp provoca una de las enfermedades más limitantes en la producción de *Passiflora edulis* y *Carica papaya* en la provincia de Manabí, Ecuador. El objetivo de esta investigación fue determinar la patogenicidad de aislados de *Colletotrichum* en frutos de maracuyá y papaya, así como su sensibilidad *in vitro* a fungicidas. Los experimentos fueron realizados en el Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí. Los frutos sanos de maracuyá, variedad INIAP 2009 y papaya variedad hawaiana, se inocularon por medio de la colecta de fragmentos de micelio fúngico con la punta de un palito de madera esterilizado. Para la sensibilidad *in vitro* de los fungicidas se utilizó un diseño experimental completamente al azar, 8 tratamientos de fungicidas comerciales, con 4 repeticiones y la comparación de medias fue realizada con la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ). Todos los aislamientos fueron patogénicos en maracuyá y papaya respectivamente, provocaron síntomas característicos de antracnosis de 4 a 5 días después de inoculados. Los fungicidas tebuconazol, propiconazol, difenoconazol, benomil, carbendazim y azoxystrobin inhibieron totalmente el crecimiento miceliar del hongo, mientras que clorotalonil y sulfato de cobre disminuyeron parcialmente el desarrollo de *Colletotrichum* spp. Los fungicidas sistémicos demostraron ser efectivos en el control *in vitro* de *Colletotrichum* spp. aislado de maracuyá y papaya.

**Palabras clave:** antracnosis, enfermedad, hongo

## In vitro effect of fungicides for the control of *Colletotrichum* SPP. In fruit trees Manabí - Ecuador

### Abstract

Anthraxnose caused by *Colletotrichum* spp causes one of the most limiting diseases in the production of *Passiflora edulis* and *Carica papaya* in the province of Manabí, Ecuador. The objective of this research was to determine the pathogenicity of *Colletotrichum* isolates in passion fruit and papaya, as well as their *in vitro* sensitivity to fungicides. The experiments were carried out in the Molecular Biology Laboratory of the Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí. The healthy fruits of passion fruit, variety INIAP 2009 and papaya variety Hawaiian, were inoculated by collecting fragments of fungal mycelium with the tip of a sterilized wooden stick. For the *in vitro* sensitivity of the fungicides a completely randomized experimental design was used, 8 treatments of commercial fungicides, with 4 replicates and the comparison of means was made with Tukey's test ( $P < 0.05$ ). All isolates were pathogenic on passion fruit and papaya respectively, causing characteristic anthracnose symptoms 4 to 5 days after inoculation. The fungicides tebuconazole, propiconazole, difenoconazole, benomyl, carbendazim and azoxystrobin totally inhibited the mycelial growth of the fungus, while chlorothalonil and copper sulphate partially decreased the development of *Colletotrichum* spp. Systemic fungicides proved to be effective in the *in vitro* control of *Colletotrichum* spp. isolated from passion fruit and papaya.

**Keywords:** anthracnose, disease, fungi

**Recibido:** 19 de octubre de 2020  
**Aceptado:** 29 de diciembre de 2020

<sup>1</sup> Ingeniero agrícola; Ecuaplantas compañía limitada, Quito, Ecuador; carrear1.97@gmail.com

<sup>2</sup> Ingeniero agrícola; Manahaya S.A. Calle M1 y Av. 23, Manta, Ecuador; luisfranciscosanchezmedr@gmail.com

<sup>3</sup> PhD en Ciencias Agrícolas; Docente universitario Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, Campus Politécnico, Manabí. Ecuador y Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí. Ciudadela universitaria vía San Mateo. Manta, Manabí. Ecuador; aguzman@espam.edu.ec; <https://orcid.org/0000-0003-2360-7051>

<sup>4</sup> Ingeniero Agrónomo; Biológica S.A., Ecuador; chriss01@hotmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-8380-5178>

<sup>5</sup> Magister en Fitopatología; Docente universitario en Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, Campus Politécnico, Manabí. Ecuador y Universidade de Brasília, DF. Brasil; smvelez@espam.edu.ec; <https://orcid.org/0000-0003-3785-7457>

\*Autor para correspondencia: smvelez@espam.edu.ec

## I. INTRODUCCIÓN

*Colletotrichum* es uno de los géneros de hongos fitopatógenos de mayor importancia económica, en áreas tropicales y subtropicales de todo el mundo; afecta a una amplia gama de hospedantes, incluyendo verduras, legumbres, cereales y frutas (Bailey 1992; Atghia *et al.*, 2015; Marquez *et al.*, 2018). Las enfermedades inducidas por este hongo incluyen: antracnosis, marchitamiento, pudrición radical, mancha foliar, pudrición de flores y tizón en plántulas (Kim, Oh, y Yang 1999; Kumar *et al.*, 2001; Moral *et al.*, 2014).

En Ecuador, en la provincia de Manabí la producción de frutas como papaya (*Carica papaya* L.) y maracuyá (*Passiflora edulis* F.), son severamente afectadas por el hongo *Colletotrichum* spp. tanto en precosecha como en poscosecha afectando significativamente la calidad de la fruta (Latunde y Akinwunmi, 2001; Tozze *et al.*, 2010; García *et al.*, 2020).

*Colletotrichum* spp. puede ocasionar graves epidemias que resultan en pérdidas superiores al 50% (Sreenivasaprasad y Talhinhos 2005; Hyde *et al.*, 2009). Este fitopatógeno tiene mucha importancia en la fruticultura tropical, por los daños económicos que ocasiona al afectar los frutos. El manejo de esta enfermedad se ha fundamentado en prácticas de control cultural y uso de fungicidas químicos (Monteon *et al.*, 2012; Landero *et al.*, 2016)

Dada la importancia del patógeno y su necesidad de encontrar un control químico eficiente, la presente investigación determinó la eficiencia in vitro de fungicidas para el control de *Colletotrichum* spp., en maracuyá y papaya en Manabí – Ecuador.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### Recolección de muestras

Las colectas de material vegetal, se realizó en las fincas productoras de los cantones Rocafuerte (papaya) y El Carmen (maracuyá), pertenecientes a la provincia de Manabí. Se colectó frutos enfermos que presentaban la sintomatología típica de antracnosis, los frutos se colocaron en fundas plásticas con su respectiva etiqueta, para su posterior procesamiento en el laboratorio de Biología Molecular de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López [ESPAM MFL], ubicado en el sitio El Limón, parroquia Calceta, cantón Bolívar.

## Análisis de Laboratorio

### Aislamiento

Para el aislamiento de los patógenos los frutos se lavaron con agua corriente y jabón líquido, después se secaron en toallas absorbentes, para proceder a cortar fragmentos de 0,5 cm<sup>2</sup> que incluían una parte enferma y una sana de tejido vegetal. El material vegetal se desinfectó con alcohol al 70% (v:v) por 30 segundos e hipoclorito de sodio 2% (v:v) durante un minuto, y se realizaron tres lavados en agua destilada estéril (ADE), para la eliminación de restos de humedad fueron colocados en papel absorbente esterilizado, Whatman Número 42 (Whatman, Maidstone, UK). Se realizó la siembra en la cámara de flujo laminar de 5 fragmentos de frutos en cajas de Petri con medio de cultivo papa dextrosa agar PDA (Difco, Detroit, USA) + antibiótico (gentamicina, ampicilina) y se incubaron a temperatura ambiente de 28 ± 1°C, hasta observar el crecimiento micelial, (Castaño 1994; Leslie y Summerell 2008). Las colonias fúngicas se repicaron hasta obtener cultivos puros.

### Identificación de los aislamientos

Para la identificación morfológica se utilizó cultivos monoconidiales, la identificación del género se realizó con base a las características del micelio, color de la colonia, formación de Acérvulos, forma de conidióforos; forma y tamaño de las conidias. La observación microscópica se realizó con un microscopio marca Olympus CX31. Las estructuras reproductivas del hongo, permitieron determinar que corresponde al género *Colletotrichum* spp., esto se corroboró con el uso de las claves (Barnett y Hunter 1998).

### Prueba de patogenicidad

#### Inoculación

Para determinar la patogenicidad de cada aislado, se inocularon frutos sanos de maracuyá INIAP 2009 y papaya hawaiana, las que se lavaron con agua, detergente y alcohol al 70% (v.v) y secados con papel absorbente esterilizado. Fragmentos de micelio fueron colectados levemente de las placas de petri con crecimiento fúngico por medio del uso de un palito de madera esterilizado, el mismo que se colocó sobre los frutos sanos de maracuyá y papaya con la intención de ocasionar una pequeña herida

para facilitar el ingreso de las estructuras vegetativas de *Colletotrichum* spp. Se realizaron 3 incisiones por cada fruto inoculado (Eizenga, et al., 2002).

Posteriormente los frutos se colocaron en cámaras húmedas provistas de papel absorbente humedecido con agua destilada estéril. Se evaluaron 3 repeticiones y el testigo estuvo conformado por frutos sanos a los que se les colocó un palillo de dientes esterilizado sin crecimiento micelial. Los postulados de Koch se confirmaron con el reaislamiento del hongo inoculado, mediante el protocolo descrito por French y Teddy (1980).

#### Bioensayos de sensibilidad *In Vitro*

Del resultado obtenido en la prueba de patogenicidad se seleccionó el aislado más agresivo para determinar la eficacia *in vitro* de los fungicidas, se utilizó la técnica de medio envenenado.

Se probaron 8 fungicidas amistar 50 wg (azoxystrobin), benacor (benomyl), blanket (tebuconazol), Bumper 25 ce (propiconazol), difecor (difenoconazol), odeon 720 sc (clorotalonil), phyton (sulfato de cobre pentahidratado) y rodazim 500 sc (carbendazim) y 4 réplicas, las dosis que se utilizaron fueron las que recomienda la etiqueta del envase. Se utilizó como testigo discos en medios de cultivo con crecimiento fúngico sin fungicidas, y se incubaron en cámara de crecimiento a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  aproximadamente.

#### Efectividad de fungicidas

La efectividad de los fungicidas se determinó mediante la prueba de Eficacia de Abbott (1925).

$$E = (\text{Test} - \text{Trat}/\text{Test}) \times 100$$

Donde:

**E:** Efectividad (%)

**Test:** Crecimiento micelial del testigo en cm

**Trat:** Crecimiento micelial del tratamiento en cm

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Pruebas de Patogenicidad

Todos los aislados tanto de maracuyá como de papaya, provocaron lesiones circulares color marrón, hundimiento de la lesión e incluso en algunos casos presencia de esporulación, que son síntomas característicos de antracnosis en frutos, a partir de los 5 días posteriores a la inoculación artificial. Para cumplir con los postulados de Koch se realizaron reaislamientos a partir de las lesiones provocadas, comprobando por medio de identificación morfológica, las semejanzas existentes con los hongos inoculados de forma inicial (Figura 1).

La sintomatología observada coincide con la descrita por Marquez *et al.* (2018) y García *et al.*, (2020), refiere síntomas de pequeñas lesiones con bordes hundidos e irregulares y esporulación de blanco a grisácea en la parte central de frutos de papaya en México, provocados por *Colletotrichum fructicola* y *Colletotrichum plurivorum*, respectivamente. De la misma forma, en frutos de maracuyá, se presentaron lesiones hundidas con masas de esporas de color naranja en la parte central (Tozze, *et al.*, 2010).



Figura. 1 (A y B). Síntomas de antracnosis en frutos de maracuyá INIAP 2009 (A), y papaya Hawaina (B), inoculados artificialmente.

### Efectividad de los fungicidas

Todos los tratamientos de fungicidas evaluados sobre los aislados de *Colletotrichum* spp. provenientes de maracuyá y papaya consiguieron inhibir el crecimiento miceliar del hongo en relación al Testigo. Los fungicidas difecor (difenoconazol), bumper 25 CE (propiconazol), rodazim 500 sc (carbendazim), benocor (benomil), amistar 50 wg (azoxystrobin) y blanket (tebuconazol), presentaron una eficacia del 100% a diferencia de odeón 720 sc (clorotalonil) que fue de 51,25 y 34,72% y phyton (sulfato de cobre pentahidratado) de 65,97 y 55,42%, en maracuyá y papaya, respectivamente. (Cuadro 1).

Los dos aislados de *Colletotrichum* spp. provenientes de maracuyá y papaya demostraron comportamientos semejantes en relación a los fungicidas utilizados. Resultados similares fueron obtenidos por Gaviria, et al. (2013) que utilizaron fungicidas triazoles (difenoconazol, propiconazol), consiguiendo inhibir de forma total el crecimiento micelial de *Colletotrichum* spp. en mora de castilla, así como azoxystrobin (estrobirulinas) también dio resultados positivos en la investigación realizada por Sundravadana, et al., (2007), para definir estrategias de manejo de antracnosis en mango, utilizando el mencionado fungicida.

Los fungicidas benomil y carbendazim (benzimidazoles) mostraron resultados favorables,

posiblemente a que su mecanismo de acción está relacionado a la inhibición de los polímeros de beta tubulina fundamentales para los procesos de división celular como lo mencionan Zhou, et al. (2016). Sin embargo, esto difiere con lo manifestado por Begum, et al. (2015), donde Carbendazim no consiguió inhibir de forma efectiva el crecimiento micelial de cuatro aislados de *Colletotrichum capsici* (Syd.) E. J. Butler & Bisby. Así como en una investigación de la sensibilidad a carbendazim de aislados de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. en fresa (*Fragaria ananassa*), donde 52,8% de los aislados presentaron resistencia en relación al fungicida, y esto tendría relación con mutaciones en varios loci del gen de la beta-tubulina 2 (TUB2), como lo indica Han et al. (2018). Mutaciones en el mismo gen, en el codón 198, definen la resistencia de *C. gloeosporioides* causante de antracnosis en *Mangifera indica* L. a carbendazim Kongtragoul, et al., (2011), y en el gen de beta tubulina 1 de varios aislados de *C. acutatum* a benomil (Nakaune y Nakano, 2007).

Los resultados de este trabajo sugieren que el diagnóstico adecuado del agente causal, el uso racional de fungicidas y el manejo de integrado de la antracnosis, se convierten en actividades necesarias para los cultivos de papaya y maracuyá en la provincia de Manabí.

**Cuadro 1.** Valores promedios (%) de las variables efectividad de fungicidas en maracuyá y papaya

Tratamientos	Maracuyá	Papaya
Odeon 720 sc	51,25 c	34,72 c
Phyton	65,97 b	55,42 b
Blanket	100 a	100 a
Bumper 25 ce	100 a	100 a
Difecor	100 a	100 a
Benocor	100 a	100 a
Rodazim	100 a	100 a
Amistar	100 a	100 a
Probabilidad	≤0,0001	≤0,0001

Medias dentro de columnas con letras distintas difieren significativamente según prueba de Tukey al 5%

### IV. CONCLUSIONES

Todos los aislados de *Colletotrichum* spp. inoculados en frutos de maracuyá y papaya fueron patogénicos.

Los fungicidas clorotalonil y sulfato de cobre pentahidratado disminuyeron levemente el crecimiento micelial del hongo, mientras que los

fungicidas tebuconazol, propiconazol, difenoconazol, benomil, carbendazim y azoxistrobin inhibieron totalmente el crecimiento micelial de *Colletotrichum* spp., lo que representaría una posible alternativa para el control de este fitopatógeno en condiciones de campo.

## V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott, y Walter S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. econ. Entomol* 18(2):265-67.
- Atghia, O., Alizadeh, A., Fotouhifar, K., Damm, U., Stukenbrock, E., y Javan-Nikkhah, M. (2015). First Report of *Colletotrichum fructicola* as the causal agent of Anthracnose on Common Bean and Cowpea. *Mycologia Iranica*, 2(2), 139-140. doi: 10.22043/mi.2015.19966
- Bailey, J. (1992). *Colletotrichum*; biology, pathology and control.
- Barnett, H. y Hunter, B. (1998). *Illustrated genera of imperfect fungi*. St. Paul, Minnesota, USA: The American Phytopathological Society.
- Begum, S., Devi, N., Marak, T., Nath, P. y Saha, J. (2015). In Vitro Efficacy of Some Commercial Fungicides Against *Colletotrichum capsici*, the Causal Agent of Anthracnose of Chilli. *Environment & Ecology* 33 (4B): 1863–1866
- Castaño, Jairo. (1994). *Guía para el diagnóstico y control de enfermedades en cultivos de importancia económica*.
- Eizenga, G., Lee, F. y Rutger, J. (2002). Screening *Oryza* species plants for rice sheath blight resistance. *Plant Disease* 86(7):808-12.
- French, ER, y TH Teddy. (1980). *Métodos de investigación fitopatológica*. San José, Costa Rica, IICA». CATIE.
- Gaviria, V., Patiño, L. y Saldarriaga, A. (2013). Evaluación *in vitro* de fungicidas comerciales para el control de *Colletotrichum* spp., en mora de castilla. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 14(1), 67-75.
- García, R., Cruz, I., Osuna, A. y Marquez, I. (2020). First Report of *Carica papaya* Fruit Anthracnose Caused by *Colletotrichum plurivorum* in Mexico. *Plant disease*. 104:2, 589-589.
- Han, Y. C., Zeng, X. G., Xiang, F. Y., Zhang, Q. H., Guo, C., Chen, F.Y. & Gu Y. Chen. (2018). Carbendazim sensitivity in populations of *Colletotrichum gloeosporioides* complex infecting strawberry and yams in Hubei Province of China. *Journal of Integrative Agriculture*, 17(6): 1391-1400. DOI: [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(17\)61854-9](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(17)61854-9).
- Hyde, K., Lei C., McKenzie, E., Yang, Y., Zhang, J., y Prihastuti, H. (2009). *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. *Fungal Diversity* 39(1):1-17.
- Kim, Ki Deok, BJ Oh, y JM Yang. (1999). Differential interactions of a *Colletotrichum gloeosporioides* isolate with green and red pepper fruits. *Phytoparasitica* 27(2):97-106.
- Kongtragoul, P., Nalumpang, S., Miyamoto, Y., Izumi, Y. y Akimitsu, K. (2011). Mutación en el codón 198 del gen Tub2 para la resistencia a carbendazim en *Colletotrichum gloeosporioides* que causa la antracnosis del mango en Tailandia. *Journal of Plant Protection Research*, 51 (4), 377-384.
- Kumar, V., Gupta, V., Babu, A., Mishra, R., Thiagarajan, V. y Datta, R. (2001). Surface ultrastructural studies on penetration and infection process of *Colletotrichum gloeosporioides* on mulberry leaf causing black spot disease. *Journal of Phytopathology* 149(11-12):629-33.
- Landero, N., Lara, F., Andrade P., Aguilar, L., y Aguado, G. (2016). Alternativas para el control de *Colletotrichum* spp. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 7(5), 1189-1198. Recuperado en 18 de septiembre de 2020, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-09342016000501189&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342016000501189&lng=es&tlng=es).
- Latunde-Dada, O. y Akinwunmi O. (2001). *Colletotrichum*: tales of forcible entry, stealth, transient confinement and breakout. *Molecular plant pathology* 2(4):187-98.
- Leslie, J. y Summerell, B. (2008). *The Fusarium laboratory manual*. John Wiley & Sons.

- Marquez, I., Cruz, I., Ley, N., Carrillo, A., Osuna, A., y García, R. (2018). First Report of *Carica papaya* Fruit Anthracnose Caused by *Colletotrichum fructicola* in Mexico. *Plant disease*.102: 12. 2649-2649doi.org/10.1094/PDIS-05-18-0736-PDN
- Monteon Ojeda, Abraham, Mora Aguilera, José Antonio, Villegas Monter, Ángel, Nava Diaz, Cristian, Hernández Castro, Elías, Otero-Colina, Gabriel, & Hernández Morales, Javier. (2012). Temporal analysis and fungicide management strategies to control mango anthracnose epidemics in Guerrero, Mexico. *Tropical Plant Pathology*, 37(6), 375-385. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762012000600001>
- Moral, J., Xaviér, C., Roca, L. F., Romero, J., Moreda, W. y Trapero, A. (2014). La antracnosis del olivo y su efecto en la calidad del aceite. *Grasas y aceites*, 65(2).
- Nakaune R, Nakano M. (2007). Benomyl resistance of *Colletotrichum acutatum* is caused by enhanced expression of beta-tubulin 1 gene regulated by putative leucine zipper protein CaBEN1. *Fungal Genet Biol.* (12):1324-35. doi: 10.1016/j.fgb.2007.03.007. o. PMID: 17507270.
- Sreenivasaprasad, S., y Pedro Talhinhos. (2005). Genotypic and phenotypic diversity in *Colletotrichum acutatum*, a cosmopolitan pathogen causing anthracnose on a wide range of hosts. *Molecular plant pathology* 6(4):361-78.
- Sundravadana, S., Alice, D., Kuttalam, S., y Samiyappan, R. (2007). Efficacy of azoxystrobin on *Colletotrichum gloeosporioides* penz growth and on controlling mango anthracnose. *Journal of Agricultural and Biological Science* 2 (3): 10-15.
- Zhou, Y., Xu, J., Zhu, Y., Duan, Y., y Zhou, M. (2016). Mechanism of Action of the Benzimidazole Fungicide on *Fusarium graminearum*: Interfering with Polymerization of Monomeric Tubulin But Not Polymerized Microtubule. *Phytopathology* 106:8, 807-813.