

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Inhibición colonial *in vitro* de un aislado de *Colletotrichum acutatum* Simmonds a tratamientos con fungicidas

In vitro colonial inhibition of an isolate from *Colletotrichum acutatum* Simmonds to fungicide treatments

Dagoberto Guillén Sánchez¹, Celeste Isamar Cadenas Vásquez¹, Irán Alia Tejada^{1,2}, Víctor López Martínez², María Andrade Rodríguez² y Porfirio Juárez López²

¹ Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Escuela de Estudios Superiores de Xalostoc. Av. Nicolás Bravo s/n, Parque Industrial Cuautla, Xalostoc, Ciudad Ayala, Morelos, México, CP 62740

² Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Av. Universidad 1001, Colonia Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México, CP 62209

E-mails: dagoguillensanchez@outlook.es; ceicava@hotmail.com; iran.alia@uaem.mx; victor.lopez@uaem.mx; porfirio.juarez@uaem.mx

RESUMEN

En la investigación se evaluó la sensibilidad *in vitro* de *Colletotrichum acutatum* Simmonds a siete fungicidas. Se partió de un aislado conservado en el cepario del Laboratorio de Fitopatología de la Escuela de Estudios Superiores de Xalostoc, Morelos. Se empleó un diseño completamente aleatorizado, donde se evaluaron los fungicidas benomilo, difenoconazol, azoxystrobin, trifloxystrobin, oxiclورو de cobre, fluoxastrobin y captan, a dosis alta, media y baja, para un total de 22 tratamientos con seis repeticiones. En el control se aplicó agua destilada estéril. Los tratamientos se aplicaron a razón de 5 mL por placa, las cuales contenían medio PDA y un disco de micelio (ϕ 5 mm). Las placas inoculadas se incubaron a 24 °C a fotoperiodos de 12 horas. Cada 24 horas se midió el diámetro de la colonia y fue calculado el porcentaje de inhibición. Se realizó un análisis de varianza bifactorial de los datos, según fungicida y dosis; además, se detectaron las diferencias por la prueba LSD con 95 % de confiabilidad. El diámetro de la colonia y el porcentaje de inhibición no mostraron diferencias para los niveles del factor dosis, sin efectos significativos para la interacción de ambos factores. Todas las dosis de los distintos fungicidas inhibieron el crecimiento de la colonia. Los fungicidas benomilo, difenoconazol y captan lograron reducir totalmente el crecimiento de la colonia de *C. acutatum*, seguidos en orden decreciente por oxiclورو de cobre, azoxystrobin, fluoxastrobin y trifloxystrobin. Solo benomil, difenoconazol, captan y oxiclورو de cobre lograron más del 50 % de inhibición.

Palabras clave: antracnosis, control químico, naranja

ABSTRACT

The aim of the research was to evaluate the *in vitro* sensitivity of *Colletotrichum acutatum* antracnosis to seven fungicides. It began with an isolate preserved in the ceparium of the Phytopathology Laboratory of the High School Studies of Xalostoc, Morelos. A completely randomized design was used to evaluate the fungicides benomyl, diphenconazole, azoxystrobin, trifloxystrobin, copper

oxychloride, fluoxastrobin and captan at high, medium and low doses, for a total of 22 treatments with six repetitions. Sterile distilled water was applied to the control. The treatments were applied at a rate of 5 mL per plate, which contained PDA medium and a mycelial disc (\approx 5 mm). The inoculated plates were incubated at 24 °C; in 12 hour photoperiod. The colony diameter was measured every 24 hours and the percent inhibition was calculated. A bifactorial variance analysis was performed, according to Fungicide and Dose; and the differences between treatments were detected by the LSD test with 95 % confidence. The diameter of the colony and the percentage of inhibition did not show differences for dose levels, without significant effects for the interaction of both factors, fungicides, and dose. However, all doses of the different fungicides inhibited colony growth compared to the control. The benomyl, difenoconazol and captan fungicides were able to totally reduce the growth of the *C. acutatum* colony; followed by copper oxychloride, azoxystrobin, fluoxastrobin and trifloxystrobin in decreasing order. Only benomyl, difenoconazol, captan and copper oxychloride achieved more than 50 % inhibition.

Keywords: anthracnose, chemical control, orange

INTRODUCCIÓN

La antracnosis y caída prematura de los frutos del naranjo son causadas por *Colletotrichum acutatum* Simmonds (Barquero *et al.*, 2013). En el sur de México, Veracruz, los daños ocasionados por la antracnosis en la naranja dulce ‘Valencia’ han alcanzado niveles de importancia económica (Orozco y González, 1986).

Las hojas y botones florales infectados son la principal fuente de conidios, inóculos que son dispersados por la lluvia hasta otros botones florales y frutas inmaduras (Wharton y Diéguez 2004, Barquero *et al.*, 2013). Los síntomas se manifiestan como lesiones pardas-naranja que evolucionan a pardas-rojizas en las flores; o manchas necróticas en estigmas, caída de frutos pequeños, cáliz persistente y manchas necróticas con deformaciones (Peres *et al.*, 2005, Barquero *et al.*, 2013).

El control químico de esta plaga en cítricos es económicamente más factible, debido a la efectividad y disponibilidad, lo que asegura ganancias frente al alto costo de las maquinarias, labores, transportación y almacenamiento (Wharton y Diéguez 2004). Los fungicidas más utilizados frente a *C. acutatum* son fosetil-AL, captan, benomilo, ziram, fenbuconazol, miclobutanil, metil tiofanato, azoxistrobina, piraclostrobina (Adasakaveg y Förster, 2000; Schilder *et al.*, 2001). No obstante, las limitaciones por fitotoxicidad, residualidad y fungo-resistencia, reducen las posibilidades del uso de fungicidas sintéticos; recomendándose aplicar en condiciones propicias y programas de rotación con fungicidas de distintos modos de acción (Wharton y Dieguez 2004, Adasakaveg y Förster, 2000).

Los fungicidas azoxistrobin, benomilo, carbendazim, difenoconazol, oxiclورو de cobre y procloraz han mostrado actividades variables en el control de *C. acutatum in vitro* (Arias *et al.*, 2006; Gaviria *et al.*, 2013).

El objetivo del ensayo fue determinar la inhibición del crecimiento colonial *in vitro* de un aislado de *Colletotrichum acutatum* a tratamientos con fungicidas.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en mayo de 2014, en el laboratorio de Fitopatología de la Escuela de Estudios Superiores de Xalostoc, perteneciente a la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Se inició a partir del aislado DGS1 de *C. acutatum*, conservado en el cepario perteneciente al Laboratorio, obtenido de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck var. Valencia, en Tlayecac, Morelos, México.

Las placas se esterilizaron por calor seco a 170 °C durante 2 horas, mientras que el medio de cultivo se esterilizó durante 15 min a 121 °C y 1,2 atm de presión. Una vez estéril, se distribuyó el medio bajo campana de flujo laminar.

El ensayo se realizó empleando un diseño completamente aleatorizado, donde se evaluaron siete fungicidas (benomilo, difenoconazol, azoxystrobin, trifloxystrobin, oxiclورو de cobre, fluoxastrobin, captan) y tres dosis (alta, media y baja), la dosis media (X) corresponde a la recomendada por la formuladora, la dosis alta 2X y la baja 1/2X, para un total de 22 tratamientos con seis repeticiones. Se incluyó un control tratado con agua estéril (Tabla 1).

Tabla 1. Fungicidas aplicados y las dosis preparadas en 125 mL de agua destilada y estéril

Fungicidas	Grupo químico	Ingrediente activo	Tipo de acción	Dosis baja	Dosis recomendada	Dosis alta
Promyl 50 PH	Benzimidazoles	benomilo	Sistémico	56,25 µg	112,25 µg	225,0 µg
Sico 250 EC	Triazoles	difenoconazol	Sistémico	39,00 µL	78,00 µL	156,0 µL
Bankit 250 SC	Estrobilurinas	azoxystrobin	Sistémico	46,80 µL	93,70 µL	187,5 µL
Tega 500 SC	Estrobilurinas	trifloxystrobin	Sistémico	11,60 µL	23,30 µL	46,7 µL
Oxicloruro de cobre PH	Compuestos cúpricos	oxicloruro de cobre	Contacto	218,70 µg	437,50 µg	875,0 µg
Vigold SC	Estrobilurinas	fluoxastrobin	Sistémico	62,50 µL	125,00 µL	250,0 µL
Captan PH	Carboxamida	captan	Contacto	0,25 g	0,50 g	1,0 g
Control	-	Agua	-	-	-	-

La unidad experimental se conformó con una placa de Petri (∅ 90 mm), donde se extendieron 30 mL de medio PDA envenenado con 5 mL de fungicida según la metodología descrita por Marcano *et al.* (2005). En el centro de cada placa se colocó un disco de micelio (∅ 5 mm), con siete días de crecimiento y fueron incubadas a 24 °C y fotoperíodo 12:12 h (luz: oscuridad).

Se evaluó el diámetro máximo de crecimiento de la colonia, midiéndose con una escala milimétrica cada 24 h y se calculó el porcentaje de inhibición según la fórmula utilizada por Alzate *et al.* (2009):

$$I = \left(\frac{T-t}{T} \right) * 100 \quad (1)$$

donde,

- I= % de inhibición
- T= diámetro de la colonia en control (cm)
- t= diámetro de la colonia en el tratamiento (cm)

Los datos se procesaron en el programa SPSS 16.0 y se realizó un análisis de varianza. Previamente se comprobó la normalidad (Prueba de Shapiro Wilk W.) y homocedasticidad (Prueba de Levene) de los datos. Cumplidos los supuestos paramétricos, se determinó la diferencia entre los tratamientos para cada variable por la prueba LSD de Fisher con 95 % de confiabilidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el tratamiento con trifloxystrobin el diámetro de la colonia de *C. acutatum* creció 2,7 cm, con diferencias significativas respecto a todos los tratamientos. Los fungicidas azoxystrobin y fluoxastrobin redujeron el diámetro de la colonia a 2,43 cm y 2,41 cm, respectivamente. Aunque estos no difirieron entre sí, ambos se diferenciaron significativamente de los tratamientos con oxicloruro de cobre, benomilo, difenoconazol y captan. La mayor inhibición se encontró con benomilo, difenoconazol y captan, los cuales no difirieron entre ellos, pero sí con el resto de los tratamientos.

Aunque no hubo un efecto entre las dosis de los fungicidas sobre el crecimiento de la colonia de *C. acutatum*, todas las dosis de estos mostraron diferencias estadísticas con el control, donde no se aplicó ningún fungicida (Tabla 2). La inhibición lograda con las tres dosis de benomilo, difenoconazol y captan desde el comienzo del ensayo *in vitro*, sugiere una rápida acción fungicida tras la aplicación del producto, cuestión que está sugerida para el benomilo, como posible medio que impide la fungoresistencia de forma particular en *C. acutatum* respecto a *C. gloeosporioides*, donde el benomilo actúa impidiendo la infección y desarrollo (Timmer y Peres, 2015).

Tabla 2. Efecto de las dosis de los fungicidas sobre el diámetro de la colonia de *C. acutatum*

Dosis/ Fungicida	Benomil	Difenoconazol	Azoxystrobin	Trifloxystrobin	Oxicloruro Cu	Fluoxastrobin	Captan
Control	4,77 a	4,77 a	4,77 a	4,77 a	4,77 a	4,77 a	4,77 a
Dosis baja	0,0 b	0,0 b	2,40 b	2,53 b	1,77 b	2,13 b	0,0 b
Dosis media	0,0 b	0,0 b	2,30 b	2,90 b	1,93 b	2,53 b	0,0 b
Dosis alta	0,0 b	0,0 b	2,53 b	2,67 b	1,67 b	2,57 b	0,0 b
C.V. (%)	-	-	12,07	11,78	19,88	9,2	-
E.E. (x)	-	-	0,15	0,16	0,18	0,11	-

*Letras distintas en una misma columna difieren por prueba LSD de Fisher ($p \leq 0,05$)

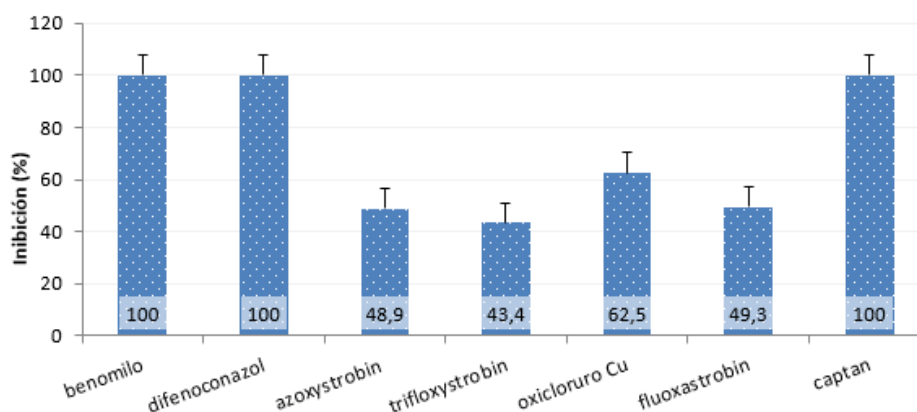
La reducción del crecimiento radial de las colonias de *C. acutatum* encontrada con difenoconazol y oxicloruro de cobre, confirmó la efectividad de estos fungicidas informada por Gaviria *et al.* (2013), quienes reportaron una reducción total del crecimiento *in vitro* de este hongo, al enfrentarlo a medios envenenados con dichos fungicidas. De manera similar, con azoxystrobin se inhibieron en menor medida el crecimiento micelial, sin embargo, estos mismos autores encontraron con este fungicida, mayor efecto inhibitorio sobre la biomasa de micelio del hongo.

Por otra parte, contrasta el bajo crecimiento de las colonias de *C. acutatum* con oxicloruro de cobre, comparado con azoxystrobin, trifloxystrobin y fluoxastrobin. Este resultado debe tenerse en cuenta al tratarse de un fungicida no incluido en la lista de productos para el control de antracnosis en México (Orozco *et al.*, 2006); pues siendo un fungicida de contacto, tiene un mecanismo de acción multisitio, con bajo riesgo

de resistencia comparado con los Bencimidazoles, Estrobilurinas y Triazoles recomendados, que poseen mecanismos de acción unisitios y alta probabilidad de desarrollar resistencia (Kumar *et al.*, 2007; Alaniz *et al.*, 2012).

Los fungicidas benomilo, difenoconazol y captan no se diferenciaron estadísticamente entre sí alcanzaron el 100 % de inhibición del crecimiento *in vitro* de *C. acutatum*. En orden descendente del porcentaje de inhibición, les siguió oxicloruro de cobre (62 %), luego azoxystrobin (48,9 %) y fluoxastrobin (49,3 %), que no difirieron entre sí. Por último, trifloxystrobin fue el fungicida con menor inhibición sobre el crecimiento radial de *C. acutatum* respecto al control (Figura).

Los fungicidas con mayor porcentaje de inhibición fueron: benomilo, captan y difenoconazol. Es especialmente interesante el resultado con benomilo porque se ha informado con bajos niveles de control sobre *C. acutatum*, a diferencia de la alta sensibilidad de *C. gloeosporioides* (Peres *et al.*, 2004). No

**Figura.** Porcentaje de inhibición de los fungicidas sobre el crecimiento de *C. acutatum*

*Las barras verticales indican el intervalo de confianza para la prueba LSD de Fisher ($p \leq 0,05$)

obstante, benomilo y captafol han sido limitados en la práctica agrícola por su alta toxicidad, recomendándose carbendazim, del grupo Benzimidazol, con similares efectos (De Goes *et al.*, 2008).

Los fungicidas de menor potencial inhibitorio sobre *C. acutatum* fueron fluoxastrobin, trifloxystrobin y azoxystrobin (Grupo: Estrobilurinas), con porcentajes de inhibición por debajo de 50 %. Aunque demostraron ser menos efectivos aplicados solos, resultados recientes indican que son mejores cuando se emplean mezclados con tebuconazol (Silva-Junior *et al.*, 2014).

El porcentaje de inhibición del oxiclورو de cobre fue 62 %, lo cual coincide con actividades no tan altas encontradas por Kososki *et al.* (2001) al probar otros fungicidas a base de cobre, como el sulfato de cobre. A pesar de que estos autores informan baja efectividad biológica sobre *C. acutatum in vitro*, en condiciones de campo el fungicida cúprico disminuyó significativamente la caída de las flores.

Además, los efectos fitotóxicos de los fungicidas del grupo de los Bencimidazoles, como el benomilo, generan fungoresistencia en *C. acutatum* (Peres *et al.*, 2005), cuestión no comprobada en este trabajo que necesita ser profundizada en futuras investigaciones.

CONCLUSIONES

El crecimiento *in vitro* de *C. acutatum* fue totalmente inhibido por los fungicidas benomilo, captan y difenoconazol (100 %), seguido por oxiclورو de cobre (62 %).

El grupo de los fungicidas pertenecientes a las Estrobilurinas fueron pocos eficientes para inhibir este patógeno, con inhibiciones por debajo del 50 %.

BIBLIOGRAFÍA

- ADASAKAVEG, J. E. y FÖRSTER, H. 2000. Occurrence and management of anthracnose epidemics caused by *Colletotrichum* species on tree fruit crops in California. En: D. Prusky, S. Freeman, and M. B. Dickman. *Colletotrichum: Host Specificity, Pathology, and Host-Pathogen Interactions*. Eds. *American Phytopathological Society*, St. Paul, MN, p. 317-336.
- ALANIZ, S., HERNÁNDEZ, L., DAMASCO, D., MONDINO, P. 2012. La podredumbre amarga

del manzano: identificación de especies, avances en estrategias de manejo. En: Roel A., Pestillo M.G., Betancur A., Zerbino P., Mangado J., Gorriti P. Serie Actividades de Difusión N° 687. Programa de Investigación en Producción Frutícola (Eds.), Las Brujas, Uruguay, p. 45-50.

- ALZATE, D.A., MIER, G.I., AFANADOR, L., DURANGO, D.L., GARCÍA, C.P. 2009. Evaluación de la fitotoxicidad y la actividad antifúngica contra *Colletotrichum acutatum* de los aceites esenciales de tomillo (*Thymus vulgaris*), limoncillo (*Cymbopogon citratus*) y sus componentes mayoritarios. *VITAE, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, 16 (1): 116-125.
- ARIAS, R.B., YÁÑEZ, V., CARRIZALES, L., SÁNCHEZ, M.C. 2006. Hongos asociados a la caída prematura de frutos en lima persa (*Citrus latifolia* Tan.) y evaluación de su control químico. *Bioagro*, 18 (1): 31-39.
- BARQUERO, Q.M., PERES, N.A. y ARAUZ, L.F. 2013. Presencia de *Colletotrichum acutatum* y *Colletotrichum gloeosporioides* en helecho hoja de cuero, limón criollo, papaya, carambola y mango en Costa Rica y Florida (Estados Unidos). *Agronomía Costarricense*, 37 (1): 23-38.
- DE GOES, A., GARRIDO, R.B.O., REIS, R.F., BALDASSARI, R.B., SOARES, M.A. 2008. Evaluation of fungicide applications to sweet orange at different flowering stages for control of postbloom fruit drop caused by *Colletotrichum acutatum*. *Crop Protection*, 27: 71-76.
- GAVIRIA, V., PATIÑO, L.F., SALDARRIAGA, A. 2013. Evaluación *in vitro* de fungicidas comerciales para el control de *Colletotrichum* spp., en mora de castilla. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 14 (1): 67-75.
- KOSOSKI, R.M., FURLANETTO, C., TOMITA, C.K., CAFÉ-FILHO, A.C. 2001. Efeito de fungicidas em *Colletotrichum acutatum* e controle da antracnose do morangueiro. *Fitopatologia Brasileira*, 26 (3): 662-666.
- KUMAR, A., REDDY, N., REDDY, K., DEVI, M. 2007. Evaluation of fungicidal resistance

- among *Colletotrichum gloeosporioides* isolates causing mango anthracnose in Agri export zone of Andhra Pradesh, India. *Plant Pathology Bulletin*, 16 (3): 157-160.
- MARCANO, A., VARGAS, N., PIRE, A. 2005. Efecto de extractos vegetales y fungicidas sintéticos sobre el crecimiento micelial *in vitro* de *Sclerotium rolfsii* y *Thielaviopsis badifenoconazole*. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 22 (4).
- OROZCO, M. y GONZÁLEZ, R. 1986. Caída de fruto pequeño y su control en naranja 'Valencia' en Veracruz. *Agricultura Técnica en México*, 12 (2): 259-269.
- OROZCO, M., MEDINA, V. M., ROBLES, M., OROZCO, J., PÉREZ, O., VELÁZQUEZ, J.J., TIMMER, L.W. Y GUZMÁN-GONZÁLEZ, S. 2006. Biología y manejo integrado de antracnosis del limón mexicano en el trópico seco de México. SAGARPA, INIFAP, CIRPAC. Campo Experimental Tecomán, Folleto Técnico Núm. 2.
- PERES, N.A.R., SOUZA, N.L., PEEVER, T.L., TIMMER, L.W. 2004. Benomyl sensitivity of isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* from citrus. *Plant Disease*, 88 (2): 125-130.
- PERES, N.A., TIMMER, L.W., ADASKAVEG, J.E., CORELL, J. C. 2005. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. *Plant Disease*, 89 (8): 784-796.
- SCHILDER, A., GILLET, J., SYSAK, R. 2001. Evaluation of Fungicides for Control of Anthracnose Fruit rot of blueberries fungicide and infanticide test 2001: SMF5. Disponible en: <http://www.scisoc.org/online/FNtests/2001top.htm>. Consultado el 01 de junio de 2010.
- SILVA-JUNIOR, G.J., SPÓSITO, M.B., MARIN, D.R., Amorim, L. 2014. Efficacy and timing of application of fungicides for control of citrus postbloom fruit drop. *Crop Protection*, 59: 51-56.
- TIMMER, L.W., PERES, N.A. 2015. Where have all the flowers gone Postbloom fruit drop of citrus in the Americas. *Journal of Citrus Pathology*, 2 (1): 1-6.
- WHARTON, P.S. y DIÉGUEZ, U.J. 2004. The biology of *Colletotrichum acutatum*. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 61(1):3-22.

Recibido el 28 de marzo de 2017 y aceptado el 13 de junio de 2017