

EXAMINACIÓN DE DIFERENTES COMPOSICIONES QUÍMICAS
MÉTODOS PARA EL CONTROL DE LOS RESIDUOS
Collected and prepared by Y. C. ...
COMUNICACIÓN DE LA ANTRACINOSA
DE LOS ...

... ..

... ..

... ..

20395

**EVALUACIÓN *in vitro* DE DIFERENTES COMPUESTOS QUÍMICOS
AGRÍCOLAS PARA EL CONTROL DE LOS HONGOS
Colletotrichum gloeosporioides Y *C. acutatum* ,
CAUSANTES DE LA ANTRACNOSIS
DE LOS CÍTRICOS (*Citrus spp.*)**

TABARES TABARES FERNEL ALEJANDRO

TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial
Para optar al título de

Microbiólogo agrícola y veterinario

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA AGRÍCOLA Y VETERINARIA
BOGOTÁ, D.C.
SEPTIEMBRE DE 2.002

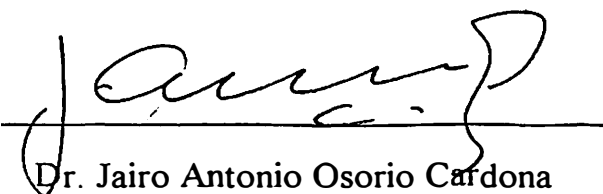
NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de julio de 1.946: “La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus tesis de grado”.

EVALUACIÓN *in vitro* DE DIFERENTES COMPUESTOS QUÍMICOS
AGRÍCOLAS PARA EL CONTROL DE LOS HONGOS
***Colletotrichum gloeosporioides* Y *C. acutatum*,**
CAUSANTES DE LA ANTRACNOSIS
DE LOS CÍTRICOS (*Citrus spp.*)

TABARES TABARES FERNEL ALEJANDRO

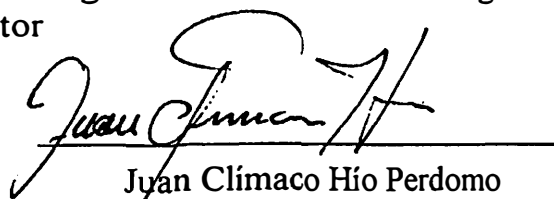
APROBADO:



Dr. Jairo Antonio Osorio Cardona
Ph.D Fitopatología
Director



Armando Angarita Blanco
Ingeniero Agrónomo, M.Sc.
Codirector



Juan Clímaco Hío Perdomo
Administrador Agropecuario
Asesor



Dra. María Clemencia Forero de La-Rotta
Ingeniera Agrónoma, M.Sc.
Jurado

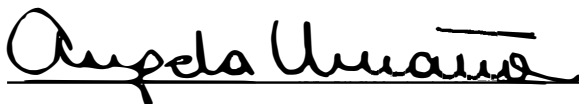


Jimena Sánchez Nieves
Bacterióloga, M.Sc.
Jurado

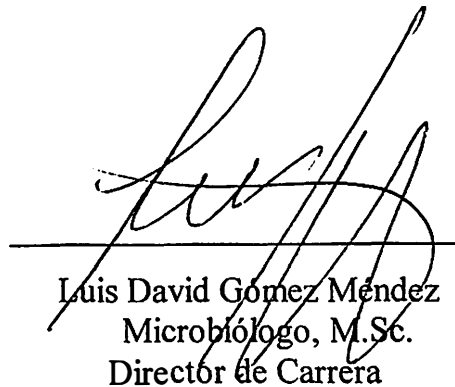
EVALUACIÓN *in vitro* DE DIFERENTES COMPUESTOS QUÍMICOS
AGRÍCOLAS PARA EL CONTROL DE LOS HONGOS
***Colletotrichum gloeosporioides* Y *C. acutatum* ,**
CAUSANTES DE LA ANTRACNOSIS
DE LOS CÍTRICOS (*Citrus spp.*)

TABARES TABARES FERNEL ALEJANDRO

APROBADO:



Dra. Ángela Umaña Muñoz, MPhil.
Decana Académica



Luis David Gómez Méndez
Microbiólogo, M.Sc.
Director de Carrera

**A mi Padre Dios por darme el don de la vida y
la fortaleza espiritual para lograr salir adelante
obteniendo grandes triunfos.**

AGRADECIMIENTOS

A todo el equipo del programa de Manejo Integrado de Plagas (MIP) de Corpoica Tibaitatá, en especial, al doctor Jairo Antonio Osorio Cardona, coordinador del programa MIP y director del presente trabajo; y, al señor Juan Clímaco Hío Perdomo, director del laboratorio de fitopatología de dicha dependencia. Gracias a ellos pude ejecutar esta tarea, como también, afianzarme en las labores habituales requeridas para ser un profesional integral con una visión ética de la vida y de la interacción comunitaria.

Cordialmente, al señor Armando Angarita Blanco, docente de la materia de entomología económica de la carrera de microbiología agrícola y veterinaria; quien codirigió esta investigación participando de forma activa y audaz.

Al director, docentes y compañeros de la carrera de microbiología agrícola y veterinaria de la Pontificia Universidad Javeriana, por su grata cooperación, dedicación y compañía, respectivamente.

Para toda mi familia, en esencia a mis padres y hermanos por su enorme apoyo, paciencia y comprensión.

Y, en general, a todas aquellas personas que intervinieron directa o indirectamente con este compromiso sin interés alguno mas que el simple hecho de colaborar.

Agosto 23 de 2.002

TABLA DE CONTENIDO

	Página
Resumen	15
1. Introducción	16
2. Marco teórico	17
2.1. El patógeno y la antracnosis	17
2.1.1. <i>Colletotrichum sp.</i>	17
2.1.1.1. Taxonomía	17
2.1.1.2. Generalidades	18
2.1.1.3. <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> y <i>Colletotrichum acutatum.</i>	18
2.1.2. Antracnosis	20
2.1.2.1. Definición	20
2.1.2.2. Historia y Expansión	20
2.1.2.3. Importancia Económica	20
2.1.2.4. Sintomatología y Trascendencia de la enfermedad	21
2.1.2.4.1. Ciclo de la antracnosis – caída del fruto después de la floración “PFD” (Postbloom fruit drop)	23
2.1.2.5. Histología de la enfermedad	24
2.1.2.6. Epidemiología	24
2.2. El control químico	25
2.2.1. Descripción de los fungicidas seleccionados	26

	Página
2.2.1.1. Benzimidazoles	26
2.2.1.1.1. Benomyl	27
2.2.1.2. Compuestos de cobre	28
2.2.1.2.1. Oxiclóruo de cobre	30
2.2.1.3. Ditiocarbamatos	30
2.2.1.3.1. Mancozeb	31
2.2.1.4. Hidrocarburos aromáticos	32
2.2.1.4.1. Clorotalonil	33
2.2.2. Mecanismos de acción	34
2.2.2.1. Interferencia con la división celular	34
2.2.2.2. Inhibición de enzimas involucradas en el metabolismo celular	35
2.2.2.3. Interferencia con la función y síntesis de la pared celular de los hongos	37
2.2.2.3.1. Biosíntesis de esteroides	38
3. Justificación	39
4. Objetivos	40
4.1. Objetivo general	40
4.2. Objetivos específicos	40
5. Materiales y métodos	41
5.1. Diseño de la investigación	41
5.2. Localización del ensayo	41
5.3. Población de estudio	41
5.4. Variables del estudio	43
5.5. Materiales	43
5.6. Metodología	44
5.6.1. Metodología para la evaluación de fungicidas ‘ <i>in vitro</i> ’	45

	Página
5.6.1.1. Procedimiento para evaluar la acción fungicida en el crecimiento micelial	45
5.6.1.1.1. Identificación de los hongos	45
5.6.1.1.2. Montaje de los hongos	45
5.6.1.1.3. Selección de fungicidas	46
5.6.1.1.4. Preparación del fungicida y del medio de cultivo	46
5.6.1.1.5. Proceso de siembra del patógeno en cajas de petri con el medio de cultivo-fungicida	47
5.6.1.2. Metodología para la evaluación de inhibición sobre la germinación de esporas (Efecto fungistático)	48
5.6.1.2.1. Preparación del fungicida	48
5.6.1.2.2. Preparación del medio de cultivo	48
5.6.1.2.3. Suspensión de esporas	48
5.7. Procedimiento para la recolección y análisis de datos	49
5.7.1. Evaluación de los fungicidas en la inhibición sobre el crecimiento micelial (Efecto fungicida)	49
5.7.2. Lectura y evaluación del efecto inhibidor en la germinación de esporas (Efecto fungistático)	50
6. Resultados y Discusión	51
6.1. Evaluación de la inhibición del crecimiento micelial	51
6.2. Evaluación de inhibición de la germinación de esporas	65
6.3. Discusión general de resultados	76
7. Conclusiones	80
8. Recomendaciones	81
9. Bibliografía	83

	Página
9.1. Referencias bibliográficas de recursos electrónicos	87
10. Anexos	90

FIGURAS

	Página
Figura 1. Presencia de antracnosis en flores de naranja causada por <i>Colletotrichum acutatum</i> .	22
Figura 2. Ciclo de la enfermedad, resaltando la caída del fruto después de la floración causada por el hongo de la antracnosis de los cítricos “ <i>Colletotrichum acutatum</i> ”.	23
Figura 3. Estructura química del benomyl.	27
Figura 4. Estructuras químicas de los tres grupos de compuestos químicos derivados del ácido ditiocarbámico.	31
Figura 5. Estructura química del clorotalonil.	33
Figura 6. Aislamientos seleccionados para ejecutar los ensayos.	43
Figura 7. Gráfico comparativo de el crecimiento micelial obtenido por los testigos absolutos de <i>C. acutatum</i> y <i>C. gloeosporioides</i> .	51
Figura 8:A. Evaluación de benomyl en la inhibición de crecimiento micelial de <i>C. acutatum</i> .	52
Figura 8:B. Testigo absoluto de <i>C. acutatum</i> en la evaluación del crecimiento micelial.	52
Figura 9:A. Resultados obtenidos del efecto inhibitor de benomyl sobre el crecimiento micelial de <i>C. gloeosporioides</i> .	53
Figura 9:B. Modelo gráfico de los resultados arrojados por el testigo absoluto de <i>C. gloeosporioides</i> .	53

	Página
Figura 10. Tratamiento con benomyl, a concentraciones de 10, 20 y 40 ppm, para la inhibición de crecimiento micelial de <i>C. acutatum</i> y <i>C. gloeosporioides</i> .	54
Figura 11:A. Efecto fungicida de oxiclóruo de cobre en <i>C. acutatum</i> .	55
Figura 11:B. . Modo de acción de oxiclóruo de cobre frente a <i>C. gloeosporioides</i>	55
Figura 12. Modelo gráfico comparativo de los resultados mostrados por el efecto del oxiclóruo de cobre en la inhibición del crecimiento micelial de <i>C. acutatum</i> y <i>C. gloeosporioides</i> .	56
Figura 13. Acción fungicida de las tres dosis de clorotalonil sobre <i>C. gloeosporioides</i> .	57
Figura 14. Efecto de la aplicación de clorotalonil sobre <i>C. acutatum</i> .	58
Figura 15. Montaje en placa con tinción de azul de lactofenol sobre micelio perteneciente a <i>C. acutatum</i> tratado con clorotalonil, donde se evidencia la aglomeración de hifas y turgencias o deformaciones entre septos.	59
Figura 16. Representación gráfica de los resultados arrojados durante el tratamiento con clorotalonil sobre <i>C. acutatum</i> y <i>C. gloeosporioides</i> .	60
Figura 17. Evidencia de la prueba de inhibición de extensión micelial utilizando como tratamiento mancozeb contra los patógenos <i>C. acutatum</i> y <i>C. gloeosporioides</i> .	61
Figura 18. Efecto de la acción fungicida de mancozeb sobre los hongos <i>C. acutatum</i> (izquierda) y <i>C. gloeosporioides</i> (derecha).	62
Figura 19:A. Porcentaje de germinación de esporas en Testigo Absoluto de <i>C. acutatum</i> .	66
Figura 19:B. Porcentaje de germinación Testigo Absoluto de <i>C. gloeosporioides</i> .	66
Figura 20:A. Viabilidad de <i>C. acutatum</i> al no estar en contacto con algún agente químico.	67

	Página
Figura 20:B. Viabilidad de <i>C. gloeosporioides</i> como testigo absoluto.	67
Figura 21. Formación del tubo germinativo de dos esporas de <i>C. acutatum</i> sin la interacción con algún tratamiento químico.	68
Figura 22:A. Porcentaje de germinación de esporas de <i>C. acutatum</i> en presencia de benomyl [0.5X]	70
Figura 22:B. Evaluación en porcentaje de la germinación de esporas de <i>C. gloeosporioides</i> expuestas a benomyl [0.5X]	70

TABLAS

	Página
Tabla 1. Clasificación de los fungicidas seleccionados para el ensayo.	26
Tabla 2. Datos de identificación y caracterización de las dos cepas de <i>Colletotrichum</i> seleccionadas.	42
Tabla 3. Clasificación de los fungicidas seleccionados para el ensayo	46
Tabla 4. Datos obtenidos de los testigos absolutos de <i>C. acutatum</i> y <i>C. gloeosporioides</i> en la evaluación del crecimiento micelial.	52
Tabla 5. Evaluación del efecto fungicida de benomyl sobre los dos patógenos.	53
Tabla 6. Resultados de la prueba de inhibición del crecimiento micelial de <i>Colletotrichum</i> aplicando oxiclóruo de cobre.	56
Tabla 7. Datos pertenecientes a la prueba efectuada con clorotalonil para determinar el efecto de inhibición del crecimiento micelial de las dos especies del patógeno.	60
Tabla 8. Resultados de la prueba de inhibición de crecimiento micelial de <i>C. acutatum</i> y <i>C. gloeosporioides</i> usando el agente químico mancozeb.	62
Tabla 9. Resultados de los testigos absolutos de <i>C. acutatum</i> y <i>C. gloeosporioides</i> en la evaluación de la inhibición de la germinación de esporas.	66
Tabla 10. Resultados del efecto fungistático de Benomyl sobre <i>C. acutatum</i> y <i>C. gloeosporioides</i> .	69
Tabla 11. Resultados derivados de la aplicación de las diferentes dosis de oxiclóruo de cobre empleadas en el ensayo sobre las dos especies de <i>Colletotrichum</i> .	72
Tabla 12. Datos reportados en la evaluación de clorotalonil como agente fungistático.	73
Tabla 13. Valoración del efecto generado por mancozeb sobre el patógeno.	74

RESUMEN

La antracnosis de los cítricos es generada por los hongos *Colletotrichum acutatum* y *C. gloeosporioides*. En Colombia, a partir de la última década se ha incrementado el índice de incidencia de la enfermedad en la mayoría de las zonas citrícolas, en especial, en los departamentos del Valle y Quindío. De igual manera, se ha presentado un incremento en la aplicación de fungicidas, especialmente de benomyl, para el control indiscriminado de diversas enfermedades propias de estos cultivos, en este caso, sobre la erradicación de la antracnosis. Es por ello que el siguiente trabajo se orientó en la evaluación de eficacia de 4 clases de fungicidas (benomyl, clorotalonil, mancozeb y oxiclورو de cobre), teniendo en cuenta el benomyl como agente químico de referencia comercial, ampliamente difundido para el control del patógeno. El ensayo se trabajó sobre dos pruebas *in vitro*, las cuales tenían por objeto evaluar los cuatro compuestos químicos seleccionados en la inhibición del crecimiento micelial (efecto fungicida) y la inhibición de la germinación de esporas (efecto fungistático), tanto para *C. acutatum* como para *C. gloeosporioides*. Para ello se tuvo en cuenta la aplicación de tres dosis de cada producto con concentraciones a 0.5X, 1X y 2X respecto a la dosis comercial de ingrediente activo, con tres repeticiones cada una. Para la evaluación del efecto fungicida se hicieron las lecturas correspondientes a cada tratamiento enfrentados a un testigo absoluto (sin la adición de algún fungicida), estimando tiempos de 72, 96 y 120 horas para la toma de datos. Por otra parte, en la evaluación del efecto fungistático se estipuló la lectura a las 6, 8 y 10 horas, donde también se tenía un testigo absoluto como referencia del comportamiento del patógeno al no estar en contacto con un compuesto químico. Se encontró que benomyl no ejerce un efecto fungistático ni fungicida sobre *C. acutatum*, pero si lo hace sobre *C. gloeosporioides*. En cambio, mancozeb presentó ambos efectos sobre las dos especies del patógeno. Finalmente, es recomendable tomar medidas preventivas, como por ejemplo, rotación de cultivos y labranza mínima; así como también, dosificar la aplicación de productos químicos, para lograr un control masivo de la enfermedad y, en general, de todas las patologías causadas por agentes exógenos en diferentes cultivos.

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, las enfermedades causadas por hongos en los cultivos de cítricos se han incrementado debido a los cambios ambientales presentados en nuestro medio tropical y a la frecuente aplicación de fungicidas utilizados por los citricultores colombianos que en su afán por obtener un cultivo libre de plagas y enfermedades utilizan anticipadamente diversas mezclas de dichos químicos como “medida de prevención”, alterando así el desarrollo de las plantas y permitiendo que los microorganismos fitopatógenos utilicen diversos mecanismos de resistencia y escape contra el producto.

Debido a la resistencia que ha adquirido el hongo causante de la antracnosis en cítricos (*Colletotrichum sp.*) al fungicida denominado Benomyl, se ha visto la necesidad de buscar otro tipo de productos químicos capaces de ejercer un control más efectivo contra este patógeno. Es por eso, que este trabajo está enfocado en la evaluación de productos químicos de uso agrícola más utilizados por los citricultores de distintas regiones del país. La investigación se centró en evaluar la eficacia de estos productos a nivel *in vitro* y la posible resistencia que el patógeno ha desarrollado con los benzimidazoles.

Subdivisión: Deuteromycotina

Clase: Deuteromycetes

Orden: Melanconiales

Género: *Colletotrichum*

Especies: *gloeosporioides* y *acutatum*

2.1.1.2. Generalidades

Colletotrichum presenta un **micelio** enramado inmerso, septado, que toma coloración hialina hasta un castaño pálido. El **acérvulo** es subcuticular, epidermal, subepidermal, formando tonos hialinos o a veces castaños, con una pared densa o gruesa.

Las **setas** presentes o ausentes, originalmente irregulares, mas o menos fuertes con una pared gruesa septada. **Conidióforos** septados, ramificados en la base de color castaño claro o completamente hialinos. Presentan **conidias** hialinas, aseptadas de forma cilíndrica, fusiforme que durante la germinación se torna de color castaño pálido y forma el apresorio.

Las formas de *Colletotrichum* pueden ser determinadas por un sinnúmero de patrones naturales, entre los que figuran desde saprofitos hasta parásitos especializados con un rango amplio de hospederos. La conidia se produce en masas mucilaginosas, de color rosado, bastante conspicuas y típicamente hundidas. El patógeno forma lesiones necróticas en tallos, hojas, frutos, siendo denominada **Antracnosis** según Jenkins. Romero (1.999)

2.1.1.3. *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum acutatum*

Glomerella cingulata (Stoneman) Spauld. & H. Schrenk, (Estado asexual, *Colletotrichum gloeosporioides* (PENZ.) PENZ. & SACC.) en PENZ. Causa enfermedades en muchas frutas incluyendo melocotón (*Prunus persica*), uva (*Carya illinoensis*), y manzanas (*Malus domestica*) La división de *Colletotrichum gloeosporioides* en subespecies o formas especiales no han sido reportadas en hospederos frutales, no obstante las formas especiales

son utilizadas en descripciones de *G. cingulata*. *Colletotrichum acutatum* también ha sido reportado en varias clases de frutales incluyendo manzana.

La taxonomía de *Colletotrichum* está en renovación. En 1.957 von Arx definió *C. gloeosporioides* como todo hongo anamorfo ligado al estado teleomorfo de *G. cingulata*, encontrándose más de 500 especies del género *Colletotrichum*, *Gloeosporium* y *Vermicularia*. Actualmente, aislamientos de *Colletotrichum* carecen del estado sexual y que son considerados *C. gloeosporioides*, o quizás consideradas especies relacionadas tales como *C. acutatum* o *C. fragariae* basados en el hospedero, las características morfológicas y culturales. Dos recientes artículos han descrito ampliamente las diferencias morfológicas y genéticas entre *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*. En 1.990, Smith and Black describieron las diferencias culturales y morfológicas entre *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* y *C. fragariae*, aislados de fresa. *Colletotrichum gloeosporioides* fue descrito como un hongo de rápido crecimiento a 32°C de temperatura, presentando conidias cilíndricas con extremos redondos y micelio gris oscuro, mientras que *C. acutatum* tuvo un crecimiento lento a 32°C, formando conidias fusiformes y micelio blanco, café, naranja o rosado.

Sonoda y Pelosi (1.988) reportaron dos tipos de *Colletotrichum* en flores de árboles de naranja. Un tipo presentó un crecimiento rápido con formación de micelio gris que tenía conidias con 14,8 x 4.8 µm de lado, y el otro creció lentamente apareciendo un micelio anaranjado que tenía conidias promedio 13.3 x 4.7 µm. El hongo gris fue altamente sensible al benomyl, mientras que, el hongo de micelio anaranjado fue poco sensible. En otras investigaciones de *Colletotrichum* en cítricos, tres tipos fueron hallados: rápido crecimiento para el hongo de micelio gris, y, crecimiento lento del hongo anaranjado y uno de la variedad tipo lima. El hongo gris se desarrolló dos a tres veces más rápido que los otros dos, y, presentó, principalmente, conidias largas con bordes redondos, entre tanto, el hongo de colonias naranjas creció más rápido que los aislamientos tipo lima, mostrando conidias que tenían un extremo redondo y el otro fusiforme. El tipo lima, además de crecer lentamente, tuvo conidias con un extremo redondo y el otro fusiforme, similar a las conidias presentes en las colonias del hongo de color naranja. Bernstein (1.995)

2.1.2. Antracnosis

2.1.2.1. Definición

Es una lesión necrótica que se asemeja a una úlcera profunda y que se produce en el tallo, hojas, frutos o flores (Figura 1) de las plantas hospedantes. *Agrios (1.999)*

2.1.2.2. Historia y Expansión

La enfermedad ha sido reportada en diferentes países: Sattar la describe en la India en 1.946, Muller en Indonesia en 1.940, Traub y Robinson la hallaron en Estados Unidos en 1.938, Roda en el Perú y Wardlaw en Trinidad en 1.939, Franco en 1.946 y Betancourt en 1.938 la reportaron en Brasil, Orjuela en 1.965 la señala como enfermedad que afecta el cultivo de mango en Colombia. *Roso (1.973)*

2.1.2.3. Importancia Económica

Las antracnosis, en particular las que producen los géneros *Colletotrichum (Gloeosporium)* o *Glomerella*, son bastante comunes y destructoras, en numerosas plantas de cultivo y de ornato, y su distribución geográfica es en la mayoría de los casos bastante amplia. Aun cuando sean severas en cualquier parte del mundo, las antracnosis ocasionan las pérdidas más severas en los trópicos y subtrópicos. *Agrios (1.999)*

Buriticá (sin editar), *Romero (1.999)*, ha hecho la más amplia y completa recolección de las diferentes especies del género *Colletotrichum*, que han sido reportados en Colombia como agentes causales de enfermedad en un sinnúmero de especies cultivadas, en las diferentes zonas agroecológicas, observándose de manera general que su incidencia y severidad registran igualmente cambios significativos en los diferentes cultivos afectados. Sin embargo, se puede afirmar que las pérdidas causadas por estas enfermedades en su mayoría ocurren como una reducción directa de la calidad y la cantidad de la producción cosechada.

Esto es más notable y severo cuando *Colletotrichum sp.* ataca directamente sobre frutos cosechados del cultivo. Las pérdidas en términos económicos también pueden resultar del

costo de las medidas de control, como lo son la mano de obra y los productos químicos utilizados. *Romero (1.999)*

2.1.2.4.Sintomatología y Trascendencia de la enfermedad

En particular en la naranja, toronja y el limón, la antracnosis afecta todos los órganos aéreos de la planta maduros, debilitados o que han sido dañados, incluyendo hojas, ramitas y frutos. Dicha enfermedad puede aparecer en árboles de cualquier tamaño, en el vivero o en el huerto, pero en raras ocasiones llega a desarrollarse en árboles que muestran un crecimiento vigoroso. Sin embargo, la antracnosis es común en árboles que se encuentran debilitados o son dañados por una fertilización inadecuada, por sequía, bajas temperaturas, por la aspersión, los insectos, otras enfermedades, etc. *Agrios (1.999)*

Las manchas foliares ocasionadas por la antracnosis producen la muerte y deshidratación de los tejidos infectados, produciéndose pequeños acérvulos negros dispuestos en círculos concéntricos en las zonas necrosadas. Cuando las infecciones son severas, puede ocurrir defoliación. Las ramitas debilitadas que son invadidas por el hongo de las antracnosis sufren muerte descendente rápida o lentamente, lo cual da como resultado a lo que se le ha denominado punta marchita. Las hojas de las ramitas infectadas se vuelven amarillas, se marchitan y desprenden, o bien mueren con gran rapidez y se secan antes de que puedan desprenderse. Las ramas afectadas también pierden sus frutos. En las zonas necrosadas de las ramitas el hongo produce numerosos acérvulos pequeños, negros y en forma de grano. *Agrios (1.999)*

En las zonas muertas de la superficie de los frutos cítricos, se forman manchas circulares y hundidas que van desde manchitas diminutas hasta zonas negras o pardo oscuras que tiene un diámetro de 5 a 10 mm. Estas manchas se secan y endurecen, y en ocasiones tienen un aspecto moteado debido a los pequeños acérvulos negros que en épocas de lluvias exudan masas de esporas rosadas. Aun cuando las manchas de los frutos debidas a las antracnosis casi siempre afectan sólo la cáscara, es frecuente que la enfermedad se extienda de la pulpa

del fruto y le proporcionen a éste un sabor desagradable o amargo. Algunas cepas del hongo de la antracnosis ocasionan una pudrición blanda que propicia la caída de los frutos. Asimismo, es frecuente que otros hongos invadan al fruto a través de manchas de antracnosis y aceleren su velocidad de descomposición. Los frutos demasiado maduros son particularmente susceptibles a la infección por la antracnosis. Cuando las esporas del hongo son arrastradas sobre los frutos a partir de ramitas muertas, etc., y luego germinan sobre ellos, producen la antracnosis severa del fruto. Esta condición puede aparecer como una gran mancha o como una mancha lacrimosa. *Agrios (1.999)*

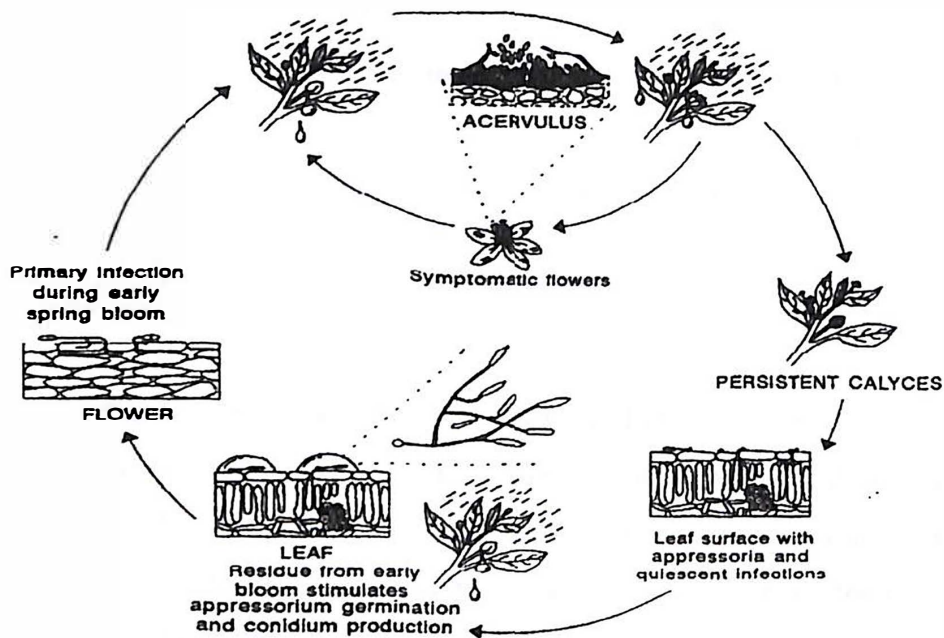
En general, los síntomas de la antracnosis pueden aparecer sobre hojas, inflorescencias y frutos. En hojas se presentan manchas redondeadas de 1 a 5 mm de diámetro de color oscuro a negro que en algunas ocasiones se unen formando manchas de mayor tamaño y forma irregular. El ataque se inicia en el envés de la hoja, encontrándose en estos sitios el mayor porcentaje de área foliar necrosada. En hojas muy afectadas se presenta ataque de patógenos secundarios.

Las flores en botón se ennegrecen y marchitan produciéndose posteriormente un alto desprendimiento de las mismas. En el pedúnculo floral se producen áreas necróticas las cuales, generalmente, se inician en la parte terminal (Fig. 1). *Roso (1.973)*



Fig. 1. Presencia de antracnosis en una flor de naranja causada por *Colletotrichum acutatum*.

2.1.2.4.1. Ciclo de la antracnosis – caída del fruto después de la floración “PFD” (Postbloom fruit drop).



POSTBLOOM FRUIT DROP

Colletotrichum acutatum

www.lal.ufl.edu/timmer/PFDdiseasecycle.htm

Fig. 2. Ciclo de la enfermedad, resaltando la caída del fruto después de la floración causada por el hongo de la antracnosis de los cítricos “*Colletotrichum acutatum*”.

La figura dos (fig.2) ilustra el ciclo de la enfermedad (PFD). En general, las conidias son producidas en acérvulos sobre los pétalos de las flores y son esparcidas durante los periodos de floración. Los cítricos frecuentemente tienen una segunda floración durante la primavera y el inicio del verano, dependiendo de las condiciones climáticas. Las conidias libres sobre la superficie de los pétalos pueden ser una fuente de inóculo para esas flores. Los apresorios sobre las superficies de la planta son las primeras estructuras sobrevivientes entre flores. Cuando la floración comienza la siguiente primavera, los nutrientes son arrastrados desde las primeras flores hasta la aparición de la estimulación de la germinación del apresorio y la producción de conidias sin formar acérvulos. Estas conidias son diseminadas a las flores, donde ellas penetran directamente los pétalos sin la formación de apresorios con lo cual se reinicia el ciclo. *Timmer (1.994)*

2.1.2.5. Histología de la enfermedad

La necrosis se inicia en las células epidermales, avanzando hasta llegar a los vasos fibrovasculares y el tejido parenquimatoso, la pared celular se torna de color marrón, las células se desorganizan y pierden su forma angular, constriéndose; es posible la observación de micelio esparcido entre las células. *Roso (1.973)*

2.1.2.6. Epidemiología

La caída de los frutos post-floración en cítricos (CPFD) es causada por una cepa de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Los hongos infectan pétalos de flores, induciendo manchas necróticas de color melocotón a anaranjado y caída de frutos inmaduros. El pedúnculo, cáliz, disco floral y néctares permanecen de forma persistente “botones” que son característicos de la enfermedad.

La enfermedad se reportó por primera vez en Bécice en 1.979 pero continuamente ha sido reportada desde varias áreas de Centro y Sur América, el Caribe y la Florida, productoras de cítricos. Poco se conoce acerca de la supervivencia de los hongos entre periodos de floración o la dinámica poblacional de los hongos en la copa de los árboles. Denham and Waller (1.981) sugirieron que los hongos persistían en forma de conidias en la superficie de los pétalos o como infecciones latentes. Estudios realizados en Florida y en Bécice usaron trampas para recolectar esporas de la copa de los árboles a través de la esorrentía del agua-lluvia, siendo un fracaso por la inhabilidad para distinguir la cepa de *C. gloeosporioides*, causante de (CPFD), de las cepas ubicuas y saprofitas que se reproducen sobre tejidos senescentes y necrosados. *a. Agostini (1.992)*

En los últimos años, esta enfermedad ha sido registrada en muchas áreas citricolas de clima tropical-húmedo de Centro y Sur América, el Caribe y fue descubierta en Florida en 1.983. *b. Agostini (1.992)*

Según la revisión bibliográfica realizada, en Colombia. no se han encontrado datos concretos sobre la incidencia y severidad de la antracnosis de los cítricos. Actualmente, sólo se sabe que las diferentes entidades de investigación agrícola en el país, entre ellas, CORPOICA, están desarrollando programas en los cuales se pueda determinar y evaluar, por departamentos y/o áreas epidemiológicas, dicho problema.

2.2. EL CONTROL QUÍMICO

La gran mayoría de los compuestos químicos antiguos, que se aplicaban a las plantas o a sus órganos, sólo los protegían de las infecciones subsecuentes y no podían detener o sanar una enfermedad una vez que ésta había iniciado su desarrollo. La gran mayoría de estos químicos son eficaces sólo en el área de la planta en la que se habían aplicado (acción local) y no se absorbían o translocaban por la planta. Sin embargo, un gran número de los compuestos químicos actuales tienen una acción terapéutica (erradicante) y varios de ellos se absorben y traslocan sistémicamente por la planta (antibióticos y fungicidas sistémicos)

Agrios (1.999)

En general, los aislamientos de las especies *C. gloeosporioides* son sensibles a fungicidas tipo benzimidazoles, tales como benomyl, y tienen un óptimo crecimiento en un rango de temperaturas de 25 a 28 °C . Quizás, dicho patógeno en almendra, ubicado en Israel, es resistente al benomyl y tiene un crecimiento intermedio a temperaturas de 20 a 22 °C.

Estas características contrastan con las dos subpoblaciones de *C. acutatum* (gris y rosada) de almendra de los Estados Unidos, las cuales son también resistentes al benomyl, pero, tienen un crecimiento óptimo alto a temperaturas de 25°C. Previamente, fue reportado que la población rosada de Estados Unidos pertenece a un grupo vegetal de compatibilidad única, diferente a lo que ocurre con la población del patógeno israelí en almendra. La desviación de los patrones de aislamientos de *C. gloeosporioides* en almendra israelí aumenta la duda estimando la identificación de estas especies. La implicación de la identificación de especies tuvo un impacto directo sobre las medidas de control, como lo

demostrado por la diferencia en sensibilidad de *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* al benomyl. Freeman (2.000)

Por lo tanto, es útil efectuar una evaluación de diferentes fungicidas capaces de ejercer un efecto protector en el hospedero, como a la vez, un efecto inhibitor del patógeno. En la siguiente tabla se muestra una breve descripción de los fungicidas requeridos para dicho estudio (Tabla 1).

Tabla 1.

CLASIFICACIÓN DE LOS FUNGICIDAS SELECCIONADOS PARA EL ENSAYO

Grupo Químico	Ingrediente Activo	Mecanismo de Acción	Nombre Comercial	Categoría Toxicológica	Formulación	Dosis Comercial
Benzimidazoles	Benomyl	Inhibe división celular	Benlate	III	50 WP	1 g/l
Cobre	Oxiclóruo de cobre	Inhibidor de enzimas	Cobox	IV	35 WP	2.5 g/l
Ditiocarbamatos	Mancozeb	Interviene en el ciclo de Krebs	Dithane M-45	III	80 WP	2.5 g/l
Hidrocarburos Aromáticos	Clorotalonil	Inhibe la síntesis de ergosterol.	Bravo 720	II	72 SC	1 cm ³ /l

SC = Concentrado soluble

WP = Polvo mojable

2.2.1. Descripción de los fungicidas seleccionados

2.2.1.1 Benzimidazoles

En 1.964 Staron y Allard señalaron la acción fungicida sistémica del thiabendazole, compuesto conocido hasta entonces como antihelmíntico. Cuatro años después (1.968) Delp y Klopping dieron a conocer las propiedades fungicidas de benomyl, y en el mismo año Noguchi et al. las del tiofanato metílico. Con ello se inició el uso de los benzimidazoles en el control de enfermedades de plantas que se ha prolongado durante más de un decenio.

Este grupo incluye fungicidas extremadamente importantes como son: Benomyl, Thiabendazole y tiofanatos, metílico y etílico; todos ellos, son efectivos contra diversas enfermedades ocasionadas por una gran variedad de hongos. *De la Isla (1.994)*

Esta familia comprende a los fungicidas sistémicos hasta ahora más importantes, como el benomyl, carbendazim, thiabendazole y tiofanato. Son efectivos a diferentes tipos de enfermedades que ocasionan una gran variedad de hongos. La mayoría de los benzimidazoles son convertidos en la superficie de las plantas al compuesto metil benzimidazol carbamato (MBC, carbendazim), el cual interfiere en la división nuclear de los hongos que son sensibles. *Agrios (1.999)*

Se considera que la acción fisiológica de los bencimidazoles , consiste en inhibir el proceso mitótico fungoso y la síntesis de ácido desoxirribonucleico. *De la Isla (1.994)*

2.2.1.1.1. Benomyl (metil-carbamato de 1-butilcarbamil 2-benzimidazol) (Fig.3.)

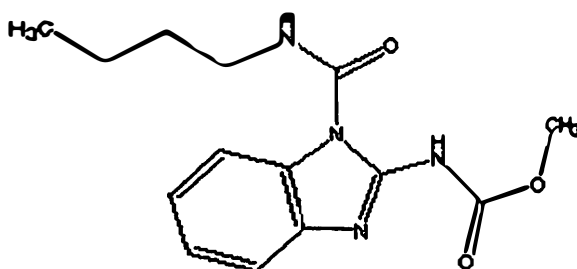


Fig. 3. Estructura química del benomyl.

Benomyl, tiene acción protectora y erradicante, es efectivo contra numerosos hongos fitopatógenos; también posee propiedades acaricidas. Es especialmente efectivo en el control de cenicillas, roña del manzano, pudrición morena de drupáceas; manchas foliares producidas por *Cercospora* , así como enfermedades inducidas por *Sclerotinia*, *Botrytis*, *Rhizoctonia*, *Thielaviopsis*, *Ceratocystis*, *Fusarium* y *Verticillium*; también es efectivo contra carbones de cereales. No tiene efecto sobre el grupo de hongos Phycomyetes, así como tampoco actúa sobre hongos Deuteromyetes de esporas pigmentadas como

Helminthosporium y *Alternaria* ni sobre algunos Basidiomycetes. No tiene efectos bactericidas.

El benomyl posee movimiento transcuticular característica que ha servido para su uso en el control de las “sigatokas” en plátano (en mezcla con aceite) También se cree que tiene movimiento de célula a célula.

El benomyl puede aplicarse como tratamiento de semillas, aspersiones foliares, inyecciones al tronco, por inmersión de órganos como raíces y frutos, así como tratamiento al suelo en donde persiste hasta 6 meses debido a su escasa solubilidad en agua (aprox. 2 ppm)

Hay ciertas pruebas de que le benomyl es mutagénico; en efecto, existe un gran número de especies fungosas que han desarrollado resistencia a este compuesto. Su acción radica en que daña la membrana celular y neutraliza las enzimas y/o toxinas fungosas. *De la Isla (1.994)*

El benomyl se vende en el mercado bajo los nombres de **Benlate**, **Tersan 1.991**, etc. Es un fungicida seguro, efectivo y de amplio espectro que se utiliza para combatir a numerosos hongos patógenos importantes, aunque también es efectivo para exterminar ácaros... La aplicación de benomyl incluye el tratamiento a las semillas, aspersiones foliares, inmersión de raíces y frutos y el tratamiento de los surcos. Es probable que este fungicida sea un agente mutagénico, que al parecer incrementa el grado de resistencia de las razas patógenas ante su efecto. *Agrios (1.999)*

2.2.1.2. Compuestos de cobre

Los fungicidas basados en cobre afectan los radicales libres sulfhidrilos (SH), aminos y carboxílicos de los componentes celulares, inactivando las enzimas esenciales para su normal funcionamiento. El Cu entra en contacto con las esporas impidiendo su germinación o desarrollo (acción fungistática) y después de dos horas de exposición al producto se logra una acción fungicida por la penetración del producto dentro de las células. *Guzmán (1.997)*

El cobre es uno de los cationes metálicos más tóxicos, siendo sólo ligeramente menos tóxico que la plata y el mercurio. Desde la introducción del sulfato de cobre (CuSO_4) como fungicida por Prevost en 1.807 para el tratamiento de semilla de trigo, y el descubrimiento del caldo bordelés en 1.882, los compuestos de cobre adquirieron una posición importante, principalmente como fungicidas, aun cuando tienen ciertas propiedades bactericidas. Los compuestos a base de cobre se emplean para la prevención y control de enfermedades de hortalizas, ornamentales y otros cultivos. Debido a su estabilidad, se usan frecuentemente como patrón comparativo al estimar la persistencia de los fitopatogenicidas.

El caldo bordelés ha sido uno de los fungicidas más empleados para el control de enfermedades de la vid, melón, papa y jitomate, como tizón tardío (*P. infestans*), mildiús (*Pseudoperonospora cubensis*) y antracnosis (*Colletotrichum spp.*) Aún ahora se usa en el control de este tipo de enfermedades.

Se supone que la acción fungicida de dicho compuesto, se genera de la formación de un precipitado gelatinoso de hidróxido cúprico estabilizado por sulfato de calcio absorbido, del cual se liberan lentamente compuestos cúpricos que se vuelven solubles mediante la acción de secreciones del hospedante y del hongo, o agua de lluvia que contiene dióxido de carbono y sales de amonio. Entre las desventajas del caldo bordelés figura su fitotoxicidad.

La característica fitotoxicidad del caldo bordelés, ocasionó que se intentara obtener otro tipo de compuestos, habiéndose encontrado los llamados "cúpricos o cobres fijos" como: el carbonato de cobre (CuCO_3), el fosfato de cobre (CuPO_4) y el oxiclورو de cobre (CuOCl). Estos compuestos son menos fitotóxicos que el caldo bordelés; sin embargo, también es menor su actividad fungicida y bactericida.

El modo de acción del cobre es probablemente similar a aquel de los metales pesados. Las altas concentraciones de iones cúpricos inactivan la mayoría de las enzimas y coenzimas formando ciertos compuestos complejos. *De la Isla (1.994)*

2.2.1.2.1. Oxiclорuro de cobre (CuOCl): En los compuestos de cobre “fijos” o “insolubles”, sólo el ion cobre es ligeramente soluble, por lo que esos compuestos son, por lo tanto, menos fitotóxicos que el caldo bordelés, pero también menos efectivos, como fungicidas. Este tipo de compuestos “fijados” se utilizan para controlar las mismas enfermedades que el caldo bordelés y también pueden utilizarse en forma de polvos. Estos compuestos tienen sulfato básico de cobre (como por ejemplo, el C-O-C-S), óxidos de cobre (como el Cuprocide, Perenox) u otras formulaciones variadas. Se sugiere que la mayoría de ellos se apliquen como aspersiones de acuerdo a la proporción de 480 gramos por cada 100 litros de agua, o bien como polvos de cobre al 7%. *Agrios (1.999)*

2.2.1.3. Ditiocarbamatos

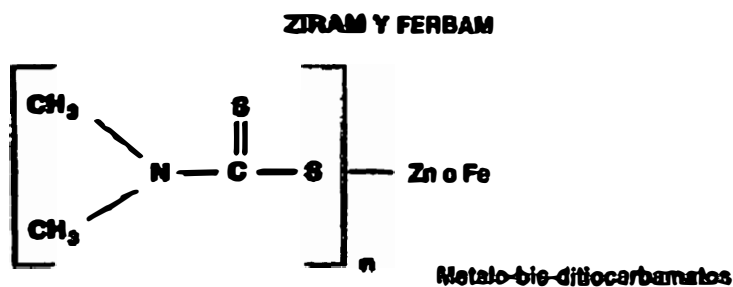
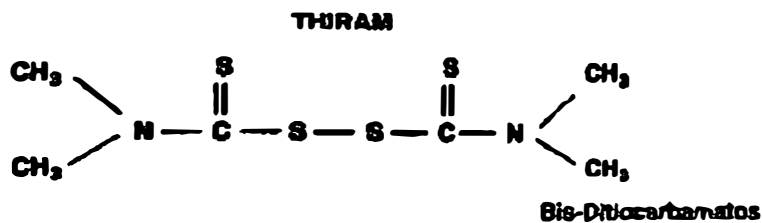
En 1.931, Tisdale demostró la posibilidad del uso de los carbamatos como fungicidas.

El grupo de fungicidas derivados del ácido ditiocarbámico, figuran aún en la actualidad entre los compuestos de acción fungicida más ampliamente empleados. Su utilidad en la industria del hule para acelerar el proceso de la vulcanización era ya conocida antes del descubrimiento de sus propiedades fungicidas.

Los derivados con acción fungicida del ácido ditiocarbámico corresponden a tres grupos de compuestos químicos: a) disulfuro de tetrametil tiouram, b) ditiocarbamatos metálicos y c) etilenbisditiocarbamatos. (Fig. 4.)

Los ditiocarbamatos son protectores excelentes de follaje y de semilla. Estos compuestos tienen además, propiedades como repelentes de insectos; se ha intentado usarlos en el tratamiento de ciertas enfermedades en humanos, y en la preservación de textiles y otros productos.

Los derivados del ácido ditiocarbámico interfieren en la actividad de gran número de enzimas especialmente las involucradas en el ciclo de Krebs. *De la Isla (1.994)*



MANEB, ZINEB, NABAM y MANCOZEB

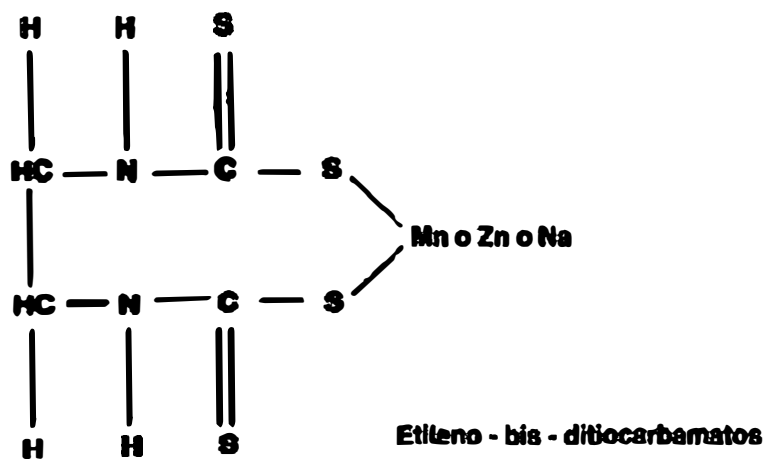


Fig. 4. Estructuras químicas de los tres grupos de compuestos químicos derivados del ácido ditiocarbámico.

2.2.1.3.1. Mancozeb

Complejo polimérico de etilenbisditiocarbamato manganoso con sales de zinc
 $(-SCS.NHCH_2CH_2NHCS.S.Mn-) \times (Zn)$
 Masa molecular: 541.0

Es el más importante, versátil y eficaz de los ditiocarbamatos. Ha sido el protector de follaje más usado en todo el mundo. En los trópicos ha dominado el mercado durante dos décadas, debido a su uso en gran escala en el control de la sigatoca del banano y las enfermedades de hortalizas y de algunos frutales. González (1.977)

En el mercado se vende como **Manzate 200, Dithane M-45 y Fore.**

*** Dithane M-45**

Polvo mojable (Fungicida)

COMPOSICIÓN: Mancozeb 80%, Inertes 20%.

DESCRIPCIÓN: Fungicida de amplio espectro, con acción de contacto perteneciente al grupo de los ditiocarbamatos, por su composición química se caracteriza por su baja solubilidad en agua, lo cual le hace más persistente en la planta. La acción fungicida es preventiva. Categoría toxicológica, III. *Anónimo (2.000)*

2.2.1.4. Hidrocarburos aromáticos

Hay un gran número de compuestos fungicidas que poseen como característica común la presencia de un anillo de benceno. *De la Isla (1.994)*

Muchos compuestos que no están relacionados entre sí y que tienen un anillo aromático son tóxicos para los microorganismos, y varios de ellos se han producido como fungicidas que se utilizan como fines comerciales. Al parecer, la mayoría de ellos inhiben las síntesis de los compuestos que tienen grupos $-NH_2$ y $-SH$, es decir, aminoácidos y enzimas. *Agrios (1.999)*

La mayoría de los fenoles, especialmente aquellos que contienen cloro, son tóxicos para los microorganismos; su acción bactericida es conocida desde hace mucho tiempo, y también muchos fenoles son fungicidas. *Cremlyn (1.990)*

2.2.1.4.1. Clorotalonil (2,4,5,6-tetracloroisofталонitrilo)

Su estructura química es la siguiente:

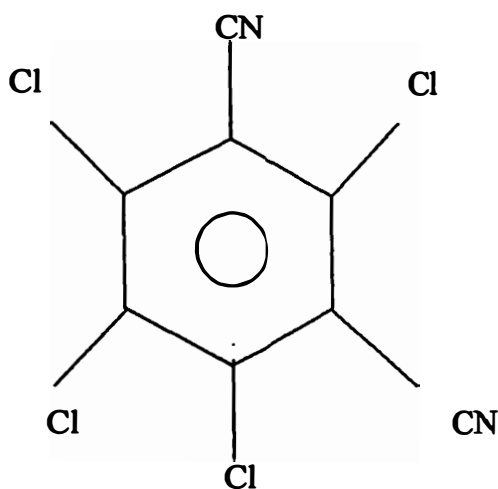


Fig. 5. Estructura química del clorotalonil.

Fórmula Molecular: C₈Cl₄N₂

Nombre químico: 2,4,5,6- tetracloro-1,3-dicarbonitrilobenceno (**Fig. 5**)

Es un compuesto aromático, que comercialmente se vende bajo el nombre de **Bravo** en forma de polvo humectable, es un fungicida excelente y de amplio espectro que se utiliza para controlar muchas de las manchas foliares, tizones, mildius, royas, antracnosis, roña y pudriciones del fruto de muchas hortalizas, cultivos mayores y plantas de ornato e incluso de árboles. Otra formulación líquida del clorotalonil se vende en el mercado bajo el nombre de **Daconil 2787** y se utiliza principalmente para tratar las enfermedades del follaje de los céspedes y de algunas plantas ornamentales. *Agrios (1.999)*

El clorotalonil es un sólido cristalino, inodoro e incoloro con un punto de fusión de 250 °C y una presión de vapor de 7.63×10^{-5} Pa (5.72×10^{-7} mmHg) a 25°C. Es poco soluble en agua (0.6-1.2 mg/litro a 25 °C) y tiene un coeficiente de partición octanol/agua (Log Kow) de 2.882. Se hidroliza lentamente en agua a pH 9, pero es estable en pH 7 o inferior a 25 °C. Clorotalonil ha sido producido comercialmente desde 1.969 por cloración del isofталонitrilo o por tratamiento de la amida tetracloroisofталolil con oxiclорuro de fósforo.

Es un fungicida con amplio espectro de actividad empleado principalmente en la agricultura pero también en el césped, los pastos y las plantas ornamentales. Los cultivos protegidos incluyen frutas de pepitas y de hueso, cítricos, grosellas, fresas, bananas, tomates, verduras, café, cacahuete, patatas, cebollas y cereales. Se emplea también en sustancias protectoras de la madera y en pinturas. *IPCS (1.996)*

2.2.2. MECANISMOS DE ACCIÓN

La acción fungicida es usualmente expresada en uno de los dos efectos físicamente visibles: la inhibición de la germinación de esporas o la inhibición de crecimiento micelial. Muchos fungicidas previenen la germinación de esporas o matan la espóra inmediatamente iniciado el proceso de germinación. Algunos de estos inhibidores químicos o fungicidas también retardan o detienen el crecimiento del hongo cuando se aplican después de que se ha desarrollado el estado de infección. El moderno sistema de fungicidas ha erradicado funciones metabólicas y detenido el progreso de las infecciones existentes.

¿Qué ocurre a nivel celular a causa de esos resultados pronto visibles? Como es comúnmente notado, todos los fungicidas son inhibidores metabólicos; es decir, éstos bloquean algunos procesos metabólicos vitales de la célula. Por consideración de organización y simplicidad, se han clasificado los modos de acción dentro de tres amplios grupos: inhibidores de la cadena transportadora de electrones, inhibidores de enzimas e inhibidores de la división celular y síntesis de proteínas. *Ware (1.982)*

2.2.2.1. Interferencia con la división celular

En este grupo se encuentran los benzimidazoles y tiofanatos, tales como: Benomyl, Carbendazim, Metil-tiofanato, Tiabendazole, Fuberidazole y el antibiótico Grisefulvín, los cuales (benzimidazoles) tienen similitud en su estructura, espectro de control y forma de acción, afectando la reproducción celular (efecto primario) y con un efecto secundario sobre la síntesis de DNA. *Guzmán (1.997)*

Probablemente, el carbamato de metil-2-bencimidazol deba sus propiedades fungicidas a su capacidad de inhibir la síntesis del ADN o la división nuclear o celular. En 1.971, Clemons y Sisler descubrieron que la aplicación de una solución 5 μ M del compuesto a los conidios de *Neurospora crassa* ocasionaba un 85 % de inhibición de la síntesis de ADN en 8 horas. La interferencia con la síntesis de ADN por medio de bencimidazoles es probablemente consecuencia de la semejanza estructural del carbamato de metil-2-bencimidazol con las bases púricas del ADN, la adenina y la guanina. Esta hipótesis se ve apoyada por la observación de que la adición de bajas concentraciones de purinas reduce la toxicidad del benomil y del tiabendazol para *Fusarium oxysporum*. Estos bencimidazoles no desacoplan la fosforilación oxidativa, ni tampoco la inhibición de la transferencia de electrones que parece ser la forma principal de acción bioquímica. *Cremlyn (1.990)*

2.2.2.2. Inhibición de enzimas involucradas en el metabolismo celular

De acuerdo a su modo de acción, los compuestos orgánicos a base de cobre son protectantes, aplicados cuando aparece el patógeno para proteger las plantas desde la inoculación. Estos fungicidas previenen la difusión de una infección pero no pueden erradicar una enfermedad existente. Así, el sitio de acción fungicida de los compuestos de cobre debe efectuarse en la espora del hongo. Los iones de cobre son concentrados por el medio circundante de la espora, cubriendo hasta 100 veces el medio en el que ésta se encuentra. Esta alta concentración de cobre en el interior de la pared de la espora demuestra que la actividad fungistática de los iones de cobre se debe a una atracción no específica de varios grupos dentro de la célula, tales como, imidazol, carboxil, fosfato o diol, provocando una denaturación no específica de proteínas y enzimas.

La teoría comúnmente aceptada del modo de acción del efecto fungistático del cobre es una denaturación no específica de proteínas. El ion cúprico (Cu ++) actúa en enzimas reaccionando con los grupos sulfhidrilo (—SH), lo cual explica su toxicidad sobre las plantas, y, especialmente, el efecto tóxico ejercido en esporas y células. *Ware (1.982)*

Incluidos en los ditiocarbamatos, el más antiguo grupo de fungicidas orgánicos, se encuentran: maneb, ferbam, zineb, manzate, dithane, poliram y ziram. Los ditiocarbamatos pueden actuar por ser metabolizados al radical isotiocianato (—N=C=S), los cuales inactivan los grupos (—SH) de aminoácidos, proteínas y enzimas ubicados dentro del patógeno. Es difícil establecer exactamente como actúan desde que se hacen inestables, y la naturaleza química de los agentes fungicidas aun no se conoce con certeza. Una de las más recientes teorías descarta los isotiocianatos como productos tóxicos, sugiriendo dentro de estos al disulfido etilenotiuram como el más fungitóxico. Sin hacer caso de la identidad de la capacidad tóxica responsable de la fungitoxicidad de estos compuestos, se cree que su efecto se debe a la inactivación química de los radicales sulfuro y sulfhidrilo del sistema metabólico de la célula fúngica.

La quelación es una función importante en plantas y árboles, lo que puede ayudar a explicar el modo de acción no solamente de los ditiocarbamatos como fungicidas sino también otros, incluyendo aquellos derivados de los metales pesados.

Un quelato es un anillo orgánico cuya estructura está compuesta de un metal enlazado al anillo por nitrógeno, oxígeno o azufre. Particularmente, se encargan de captar enzimas para ser quelados ya que son poderosos y esenciales en el metabolismo vegetal. Algunos de los metales requeridos por las plantas superiores y hongos entran en contacto con diversas enzimas para suplir las necesidades rutinarias de su metabolismo. El metal puede ser activo en este proceso como un quelato con el componente biológico.

Una de las teorías generalmente aceptadas que explica la actividad fungicida del cobre, mercurio, cadmio y otros metales pesados es la formación de quelatos dentro del hongo. Los quelatos, dentro del metabolismo, rompen la síntesis de proteínas. Y desde que el punto crítico de las proteínas sean las enzimas, los metales requeridos se filtran en señal de abastecimiento apareciendo en abundancia o excesivas cantidades que son equivalentes a la introducción de potentes venenos en las células.

Si la teoría de la quelación es correcta, esto debería explicar el modo de acción de los fungicidas orgánicos e inorgánicos compuestos de metales pesados, a partir de la formación de isotiocianatos desde las moléculas de ditiocarbamatos, y, del efecto de los metales pesados propios de este grupo. Ciertamente, los fungicidas son en si mismos agentes quelantes. Ellos atacan a los componentes metálicos más escasos dentro de las células, tales como, hierro, magnesio y zinc, literalmente, robando materiales esenciales para el funcionamiento de las células. En resumen, la quelación de metales pesados juega un papel importante en la vida y muerte celular. *Ware (1.982)*

2.2.2.3. Interferencia con la función y síntesis de la pared celular de los hongos.

Las paredes celulares de los hongos son estructuras muy complicadas tanto desde el punto de vista físico como químico, y están constituidas por un gran número de sustancias combinadas entre sí, tales como: celulosa, materias pépticas, grasas, proteínas y quitina. Estas sustancias están unidas según un orden preciso, por lo cual se protegen de la degradación enzimática y permiten el paso en ambos sentidos de productos de bajo peso molecular.

Para la síntesis de la pared celular se requiere la formación de glicolípidos a partir de las membranas, así como la fijación de C-Glucosamina a la quitina dentro de las paredes celulares.

El análisis químico de la acción tóxica de los compuestos que producen la interferencia en la célula del hongo revela que la síntesis de ergosteroles es rápidamente inhibida afectando la síntesis de la membrana celular y el crecimiento del hongo.

Casi todos estos compuestos exhiben diversos grados de sistemicidad y controlan un amplio rango de enfermedades causadas por Ascomycetos, Basidiomycetos y Deuteromycetos. *Guzmán (1.997)*

2.2.2.3.1. Biosíntesis de esteroides

Se ha demostrado que varios fungicidas sistémicos inhiben la biosíntesis del ergosterol, y comúnmente se les conoce como inhibidores del esterol o fungicidas inhibidores del esterol. Estos inhibidores comprenden a los compuestos bitertanol, fenapanil, imazalil, procloraz, triadimefon, triarimol, triforine y etaconazol. Aunque, químicamente estos compuestos tienen varias semejanzas estructurales, no forman un grupo homogéneo. El ergosterol es un compuesto celular que tiene una función crucial en la estructura y función de las membranas de muchos hongos y los compuestos químicos que inhiben su biosíntesis muestran una acción fungicida eficaz. Los fungicidas que inhiben el esterol penetran la cutícula de las hojas y, en consecuencia, son altamente efectivos en las aplicaciones curativas posteriores a la infección. *Agrios (1.999)*

Los esteroides son requeridos para el crecimiento y la reproducción de los organismos eucarióticos. Ellos sirven como componentes arquitectónicos (estructurales) de las membranas.

La síntesis de los esteroides es un aspecto del metabolismo general de los lípidos, en la cual el acetato es convertido en mevalonato. La condensación de cinco unidades de carbono o isoprenoides (formados por la pérdida de un carbono del ácido mevalónico) eventualmente conduce a la formación de escualeno.

La ciclización de escualeno, el primer intermedio de esterol, lanosterol, es el primer paso en una serie de reacciones complejas que conducen a la síntesis de ergosterol, el principal esterol de los hongos superiores.

Los fungicidas de este tipo actúan afectando la formación de quitina y la pared celular e inhiben la incorporación de C14 glucosamina en las paredes celulares. *Guzmán (1997)*

3. JUSTIFICACIÓN

En Colombia existen varios departamentos importantes en la producción de cítricos, tales como, Cundinamarca, Meta, Quindío, Risaralda, Valle, Tolima y Magdalena. Por eso, se desarrolló este trabajo con aislamientos adquiridos de dos departamentos seleccionados al azar (Valle y Quindío) ya que allí se han encontrado registros de una alta incidencia de antracnosis; además, los citricultores de esas regiones han coincidido en efectuar varias aplicaciones de fungicidas, entre ellas el Benomyl, en diferentes épocas del año y en diversos estadios del cultivo.

El uso indiscriminado de fungicidas por parte de los agricultores ha desatado una gran controversia a nivel nacional como internacional, provocando, de hecho, elevar los costos de producción debido a que el productor invierte demasiado en maquinaria e insumos agrícolas para mantener regularmente el campo en producción. Esto hace que el mercado en la canasta familiar se reduzca desmesuradamente y disminuya la apertura económica ya que se importan productos a más bajo costo. Por ello, es urgente tomar conciencia de que el comercio agropecuario necesita nuevas proyecciones a corto y largo plazo por medio de alternativas sostenibles de manejo, control, producción y mejoramiento de los diferentes cultivos. En la cultura es indispensable explorar los problemas fitosanitarios que se presentan porque, hasta el momento, existe muy poca información científica e investigación sobre soluciones y alternativas para esta problemática, principalmente lo relacionado con el control de enfermedades, entre ellas, la antracnosis.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

- ◆ Evaluar la eficacia de cuatro fungicidas seleccionados (**benomyl, clorotalonil, mancozeb y oxiclورو de cobre**) en la inhibición “*in vitro*” del hongo *Colletotrichum sp.* causante de la antracnosis en cítricos.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Examinar, por medio de valoración de efectividad biológica, el comportamiento de distintas cepas de *Colletotrichum* provenientes de cítricos, expuestas a fungicidas de uso agrícola, tales como, benomyl, clorotalonil, mancozeb y oxiclورو de cobre.
- Establecer el nivel de inhibición que inducen los fungicidas, mencionados anteriormente, sobre *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum acutatum*.
- Comprobar la acción fungicida y/o fungistática de los productos químicos seleccionados.
- Determinar en el laboratorio la posible existencia de resistencia en *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum acutatum* a los benzimidazoles.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Diseño de la investigación

El presente trabajo se realizó bajo un diseño experimental completamente al azar, con un arreglo factorial de $2 \times 5 \times 3 \times 3$, es decir, se establecieron 2 aislamientos de *Colletotrichum* (una cepa de *C. gloeosporioides* y una de *C. acutatum*), para 4 productos químicos y un testigo absoluto, tres dosis de cada producto y tres repeticiones. La eficacia de los productos se evaluó en dos escenarios: uno, en bioensayos de inhibición de la germinación de esporas para evaluar la acción fungistática, y, el otro en la supresión de crecimiento micelial para valorar la acción fungicida. Para inhibición de la germinación de esporas, las variables a valorar fueron: porcentaje (%) de esporas germinadas a las 6, 8 y 10 horas. Para supresión de micelio, las variables evaluadas consistieron en: crecimiento micelial a las 72, 96 y 120 horas.

5.2. Localización del ensayo

El trabajo se realizó en las instalaciones de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA), regional Uno; área de Manejo Integrado de Plagas y enfermedades (MIPE), laboratorio de fitopatología.

5.3. Población de estudio

La muestra para realizar el trabajo en el laboratorio se tomó de cepas conservadas de *Colletotrichum*, debidamente identificadas y referenciadas, ubicadas en la colección de cultivos monospóricos contenidos en bolsas de papel estériles, las cuales están empacadas

en bolsas herméticas depositadas en neveras de icopor con hielo, debidamente selladas y rotuladas. Cada nevera de icopor se encuentra en un refrigerador a una temperatura constante de $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Las dos cepas de *Colletotrichum*, elegidas de acuerdo a las prioridades que se requerían para ejecutar el estudio, presentaban la siguiente información (Tabla 2)

Tabla 2.

Datos de identificación y caracterización de las dos cepas de *Colletotrichum* seleccionadas

Nombre	Código	Serie	Zona	Fecha Recolección	Finca	Fecha almacenamiento
<i>C. acutatum</i>	131 NV.F36	330	Caicedonia	6-7 Abr.	Maracaibo	28 dic 2000
<i>C. gloeosporioides</i>	244 NV.B43	487	Armenia	2-3 Abr.	Paraguaycito (Municipio de Córdoba)	27 mar 2001

Donde, NV se refiere a la variedad de la fruta (naranja valencia) F y B determinan el órgano de la planta donde se extrajo el hongo (flor y botón, respectivamente)

Los hongos *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* contemplados para el desarrollo del trabajo en laboratorio, son cepas aisladas de órganos de flor y botón propios de naranja valencia, debido a que la incidencia del patógeno sobre estas áreas de la planta es supremamente elevada y su índice de severidad aumenta conforme a la especie del hospedero, para este caso, es más significativo en árboles de esta fruta.

Se evidencia a continuación (Fig. 6) la cepa de *C. acutatum* y la de *C. gloeosporioides* con sus respectivas características macroscópicas. Tales características fueron fundamentales para su selección y posterior estudio dentro de este trabajo.

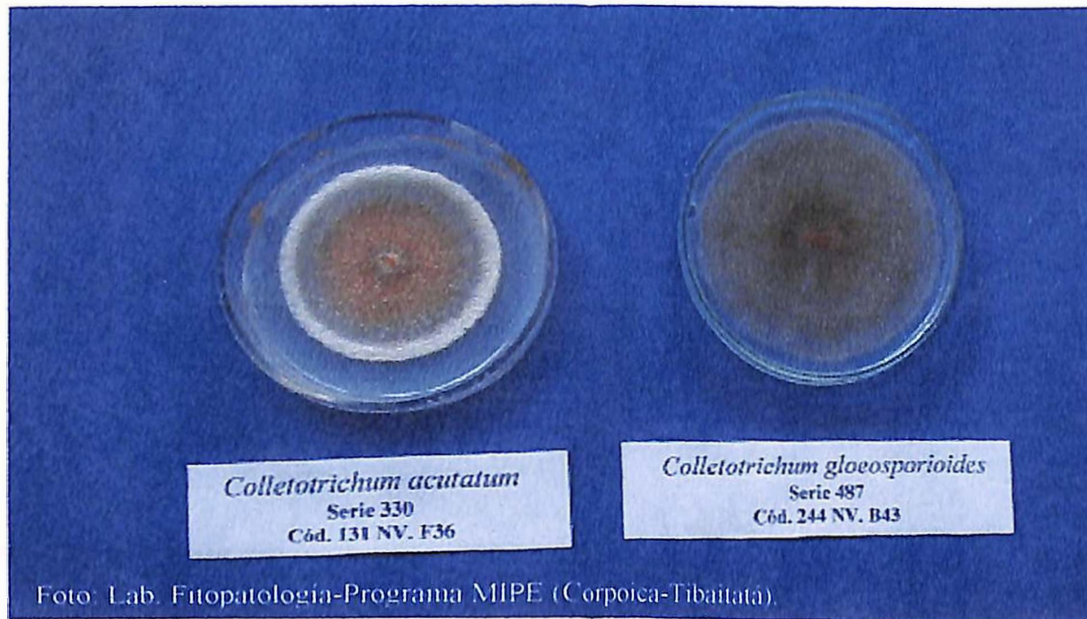


Fig. 6. Aislamientos seleccionados para ejecutar los ensayos.

5.4. Variables del estudio

Las variables contempladas para dicho estudio fueron: efecto fungistático y efecto fungicida.

5.5. Materiales

- Cepas de *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum acutatum* debidamente referenciadas.
- Cuatro clases de fungicidas: benomyl, clorotalonil, mancozeb y oxiclورو de cobre.
- Erlenmeyers de 2.000 ml , 500 ml y 100 ml.
- Beakers de 250 ml y 500 ml.
- Pipetas de 0.1, 1.0, 2.0, 5.0 y 10.0 ml.
- Micropipeta de 10 μ l.
- Tubos de ensayo de 10 ml.
- Agitador o Shaker
- Balanza analítica

- Cajas de petri
- Medios de cultivo: PDA (Agar Papa Dextrosa) acidificado y agar agua.
- Sacabocados de 10 mm de diámetro.
- Cuatro atomizadores
- Pinzas de punta roma
- Agujas de disección
- Tijeras
- Cinta de enmascarar
- Vinilpel
- Cámara de Neubauer
- Cámaras de humedad (Cajas de plástico que contienen un soporte del mismo material cubiertas con papel absorbente para retener la humedad del agua depositada en las cajas)
- Cámara de flujo laminar
- Dos Mecheros Bunsen
- Microscopio
- Incubadora
- Autoclave
- Bata blanca
- Guantes de látex
- Tapabocas
- Gafas de laboratorio

5.6. Metodología

Para este estudio se efectuaron ensayos basados en las normas establecidas por el comité sobre estandarización de pruebas de fungicidas de la Sociedad Fitopatológica Americana.

Se trabajó con la siguiente metodología modificada por el Sr. Armando Angarita Blanco – Ingeniero agrónomo M.Sc., y, codirector del presente trabajo.

5.6.1. METODOLOGÍA PARA LA EVALUACIÓN DE FUNGICIDAS ‘IN VITRO’

La evaluación de fungicidas “in vitro”, tiene como finalidad evaluar la efectividad de un producto frente a un patógeno específico.

Se evaluaron dos efectos del producto:

- ⇒ **Efecto fungicida:** si realmente el producto al hacer contacto directo con el patógeno, afecta su viabilidad.
- ⇒ **Efecto fungistático:** permite evaluar el efecto de inhibición de un patógeno, frente a un producto químico, por contacto.

5.6.1.1. Procedimiento para evaluar la acción fungicida en el crecimiento micelial

5.6.1.1.1. Identificación de los hongos

Los hongos *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum acutatum*, se seleccionaron de la colección monospórica de hongos fitopatógenos y antagonistas, disponible en el laboratorio de fitopatología de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA). La verificación de dichas cepas se hizo mediante la lectura del registro que aparece en el archivador de la colección, donde se encuentran la identificación del hongo junto con su respectivo historial. Además, estas dos especies tienen separadamente estudios de diagnóstico molecular.

5.6.1.1.2. Montaje de los hongos

Los aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* y *C. acutatum* se sembraron en medio PDA (Agar Papa Dextrosa) acidificándolo con 0.7 ml de ácido láctico, y, agregándole 0.4 ml de estreptomycin como antibiótico preventivo. Se utilizó una cámara de flujo laminar con las medidas de asepsia requeridas para la siembra de las cepas. Después se selló cada una de las cajas sembradas con vinilpel para asegurar su asepsia y se llevaron a incubar a una temperatura de 25 °C durante 8 días.

5.6.1.1.3. Selección de fungicidas

Tabla 3.

CLASIFICACIÓN DE LOS FUNGICIDAS SELECCIONADOS PARA EL ENSAYO

Grupo Químico	Ingrediente Activo	Mecanismo de Acción	Nombre Comercial	Categoría Toxicológica	Formulación	Dosis Aplicadas (ppm)		
Benzimidazoles	Benomyl	Inhibe división celular	Benlate	III	50 WP	10	20	40
Cobre	Oxicloruro de cobre	Inhibidor de enzimas	Cobox	IV	35 WP	36	71	143
Ditiocarbamatos	Mancozeb	Interviene en el ciclo de Krebs	Dithane M-45	III	80 WP	16	31	63
Hidrocarburos Aromáticos	Clorotalonil	Inhibe la síntesis de ergosterol.	Bravo 720	II	72 SC	7	14	28

(ppm) = Partes por millón

SC = Concentrado soluble

WP = Polvo mojable

5.6.1.1.4. Preparación del fungicida y el medio de cultivo

En erlenmeyers de 100 ml se preparó una solución madre de cada uno de los fungicidas sometidos a prueba, con la concentración establecida de acuerdo a la tabla de clasificación de los fungicidas escogidos (Tabla 3). Se evaluaron tres dosis de cada fungicida, tomando

como referencia la dosis media recomendada por la casa comercial, con una dosis por debajo y otra por encima.

Luego, se preparó el medio PDA (Agar Papa Dextrosa) de la siguiente manera: para preparar 1.000 ml del medio se pesaron, en una balanza analítica, diez gramos de agar-agar, siete gramos de gelatina industrial, 125 gramos de papa precocida y diez gramos de dextrosa. Se agregaron todos los ingredientes en un erlenmeyer de 2.000 ml, para evitar que el medio se regara cuando se colocara en el autoclave, se aforó a 1.000 ml con agua destilada a pH de 7.4. Luego, se selló el erlenmeyer con un tapón de gasa y algodón, cubriendo la boquilla del erlenmeyer con papel aluminio para evitar contaminación después del proceso de esterilización. Se agitó el erlenmeyer por un lapso de cinco minutos para homogenizar el medio y se llevó a autoclavar a quince libras de presión, 120 °C, durante quince minutos.

Autoclavado el medio de PDA se dejó enfriar el erlenmeyer hasta que alcanzara una temperatura de 40 °C. Después del enfriamiento se adicionó 0.4 ml de estreptomicina y 0.7 ml de ácido láctico, se agitó el erlenmeyer, y, en cámara de flujo laminar se depositó en los erlenmeyer de cada dosis para los 4 productos químicos, aforando hasta alcanzar 100 ml de las dosis correspondientes mezcladas con el medio PDA. El siguiente paso consistió en servir en cajas de petri cada una de las tres dosis de los cuatro fungicidas con PDA, dejando solidificar el medio en las cajas para poder ejecutar el posterior procedimiento.

5.6.1.1.5. Proceso de siembra del patógeno en cajas de petri con el medio de cultivo-fungicida

En el centro de cada caja de petri con la mezcla (medio de cultivo- fungicida), se colocó un disco de inóculo de 10 mm de diámetro obtenido con un sacabocado, a partir de la zona periférica de la colonia fungosa. Una vez efectuada la inoculación, las cajas de petri, se sellaron herméticamente con vinilpel y se dejaron incubar durante 5 días a temperatura constante (25 °C) Se hicieron 3 repeticiones por tratamiento. Como testigo absoluto se

conservó una cepa de *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum acutatum* en medio PDA sin ninguna aplicación de fungicidas.

5.6.1.2. Metodología para la evaluación de inhibición sobre la germinación de esporas (Efecto fungistático)

5.6.1.2.1. Preparación del fungicida

En un Erlenmeyer se preparó una solución madre de cada uno de los fungicidas a probar, con la concentración establecida de acuerdo a la tabla de clasificación de los fungicidas escogidos (Tabla 3). Se evaluaron tres dosis de cada fungicida, tomando como referencia la dosis media recomendada por la casa comercial, con una dosis por debajo y otra por encima.

5.6.1.2.2. Preparación del medio de cultivo

Se preparó agar agua de la siguiente forma: en un erlenmeyer de 2.000 ml se depositó 10 g de agar agar y 7 g de gelatina industrial, agregando agua destilada con un pH de 7.4 hasta completar 1 litro. Se agitó y se llevó a esterilizar en autoclave a quince libras de presión, 120°C por quince minutos. Se retiró del autoclave dejando enfriar el medio hasta que alcanzara una temperatura aproximada de 40 °C., se le adicionó 0.4 ml de estreptomicina y 0.5 ml de ácido láctico con el objeto de evitar contaminación. Posteriormente, se sirvió el medio sobre las cajas de petri estériles en cámara de flujo laminar con dos mecheros Bunsen.

5.6.1.2.3. Suspensión de esporas

Para poder efectuar la suspensión de esporas, se procedió primero a realizar el conteo de conidias, tanto de *C. acutatum* como de *C. gloeosporioides*, en la cámara de Neubauer. Se hicieron diferentes diluciones a partir de la solución madre extraída del inóculo de las cepas

de *Colletotrichum* seleccionadas estableciendo 6×10^5 esporas/ml. Tan pronto se realizó en la cámara un conteo aproximado de 120 esporas en $10 \mu\text{l}$ de solución se tomó con una pipeta 0.5 ml de la dilución establecida y se dispersó por el medio de agar agua. Por otra parte, se tomó de la misma suspensión de esporas otros 0.5 ml y se depositaron en cajas de petri con agar agua solidificado sin el químico (Testigo Absoluto), al resto de cajas inoculadas con las esporas se les asperjó con un atomizador cada una las dosis seleccionadas para los 4 tratamientos. Luego, se colocaron las cajas de cada tratamiento en cámaras húmedas, con una humedad relativa del 85 al 90 % y una temperatura en incubadora de 25°C .

La lectura de la suspensión de conidias en la cámara de Neubauer se evaluó utilizando la siguiente fórmula:

$$N \times 10^{(-1)} \times 10^4 \times 5 = \# \text{ conidias / ml}$$

En donde:

- N = Valor contado en cinco cuadrantes.
- $10^{(-1)}$ = Dilución de la suspensión de conidias.
- 10^4 = Factor de la cámara.
- 5 = Número de cuadrantes.

5.7. PROCEDIMIENTO PARA LA RECOLECCIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS

5.7.1. Evaluación de los fungicidas en la inhibición sobre el crecimiento micelial (Efecto fungicida)

Se tomaron datos de crecimiento micelial midiendo dos diámetros de la colonia fungosa en ángulo recto a las 72, 96 y 120 horas, contadas a partir del momento en que se colocó el inóculo sobre el medio con cada una de las tres dosis del fungicida evaluado.

El resultado de la medición del crecimiento de la colonia fungosa se expresó en porcentaje de inhibición, para ello se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% I = \frac{100 (T - t)}{T}$$

Donde:

I = Porcentaje de inhibición

T = Tasa del crecimiento del hongo testigo en mm
a las 72, 96 y 120 horas.

t = Tasa del crecimiento del hongo tratado en mm
a las 72, 96 y 120 horas.

5.7.2. Lectura y evaluación del efecto inhibitor en la germinación de esporas. (Efecto fungistático)

Las lecturas se tomaron a las 6, 8 y 10 horas, observando en el microscopio, con objetivo de 25X, determinando presencia o ausencia de germinación de esporas. Cada lectura se efectuó según el montaje de las 3 dosis establecidas para cada fungicida con sus tres respectivas repeticiones. Al determinar la no germinación de esporas, entonces, se dio por entendido que el efecto del producto químico fue fungistático; de lo contrario, el producto tuvo que ser comparado con los resultados obtenidos del testigo absoluto y con la prueba de crecimiento micelial para comprobar su acción fungicida. La prueba se evaluó por el % de esporas germinadas frente al porcentaje de esporas no germinadas, según la dosis aplicada de cada producto químico, sobre el % de esporas germinadas en las cajas con el testigo.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Evaluación inhibición del crecimiento micelial

Los dos testigos absolutos, tanto *C. acutatum* como *C. gloeosporioides*, presentaron un comportamiento similar durante la etapa de crecimiento micelial (Fig.7). Aunque la diferencia en promedio de las dos muestras al final del ensayo se valoró en 12.2 mm de diferencia respecto al micelio de *C.gloeosporioides* frente a *C. acutaum* (Tabla 4). Este promedio indica que durante el ensayo, probablemente, *C. gloeosporioides* se adaptó más fácilmente al sustrato proporcionado y a las condiciones de temperatura y humedad en las cuales se sometieron las dos especies.

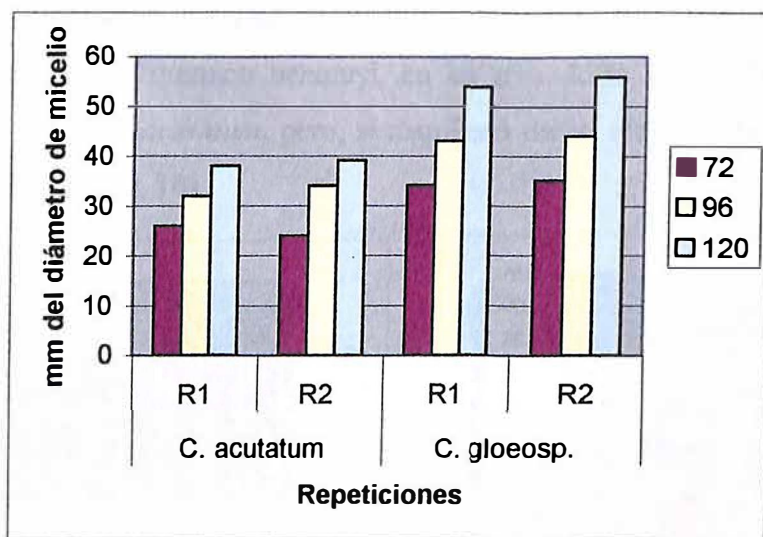


Fig. 7. Gráfico comparativo del crecimiento micelial obtenido por los testigos absolutos de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*.

Tabla 4.

Datos obtenidos de los testigos absolutos de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* en la evaluación del crecimiento micelial

Tratamiento	Dosis (ppm)	Tiempo (Horas)	Crecimiento en mm diámetro de micelio <i>C. acutatum</i>			Crecimiento en mm diámetro de micelio <i>C. gloeosporioides</i>		
			Repetición			Repetición		
			1	2	3	1	2	3
Testigo Absoluto		72	26	24		34	35	
		96	32	34		43	44	
		120	38	39		54	56	

En el tratamiento con benomyl, se observó que las tres dosis utilizadas inhibieron el crecimiento de *C. gloeosporioides*, contrario, a lo que sucedió con *C. acutatum*, donde hubo un crecimiento moderado de micelio; pero, éste respecto al testigo absoluto presentó una disminución en promedio de 8.8 mm de diámetro (Fig. 8:A, 8:B; 9:A, 9:B; y, Tabla 5). Esto indica que el agente químico benomyl, en las tres dosis manipuladas, no actuó de manera fungicida sobre *C. acutatum*, pero, si manifestó dicho efecto sobre el disco micelial de *C. gloeosporioides*. (Fig. 10)

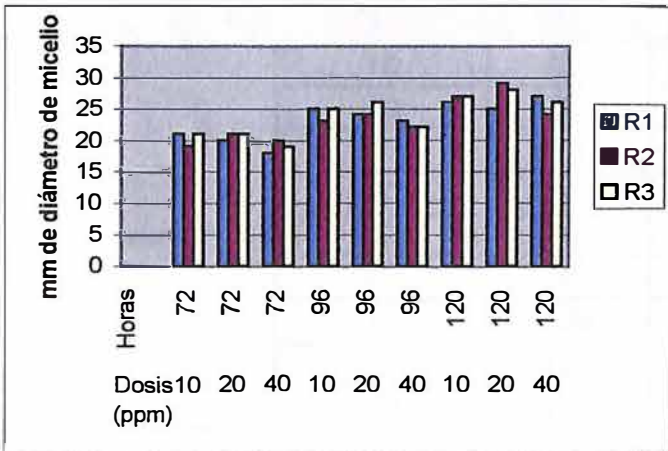


Fig.8:A. Evaluación de benomyl en la inhibición de crecimiento micelial de *C.acutatum*.

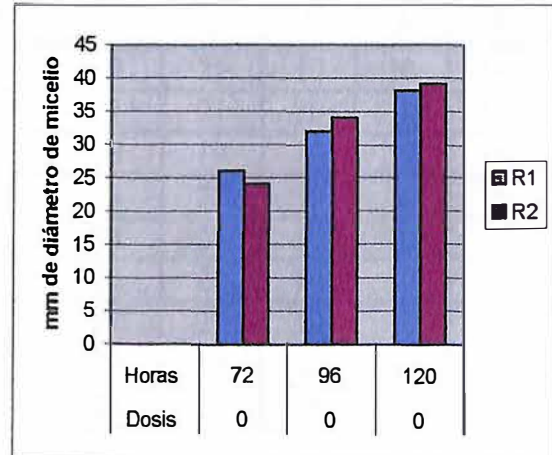


Fig. 8:B. Testigo absoluto de *C. acutatum* en la evaluación del crecimiento micelial.

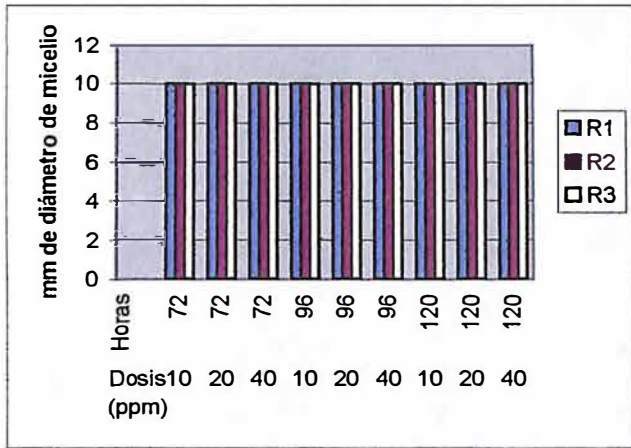


Fig. 9:A. Resultados obtenidos del efecto inhibitor de benomyl sobre el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides*.

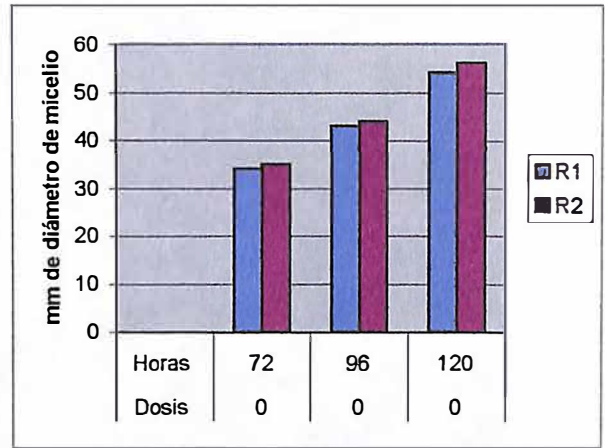


Fig. 9:B. Modelo gráfico de los resultados arrojados por el testigo absoluto de *C. gloeosporioides*.

Tabla 5.

Evaluación del efecto fungicida de benomyl sobre los dos patógenos

Tratamiento	Dosis (ppm)	Tiempo (Horas)	Crecimiento en mm diámetro de micelio <i>C. acutatum</i>			Crecimiento en mm diámetro de micelio <i>C. gloeosporioides</i>		
			Repetición			Repetición		
			1	2	3	1	2	3
Benomyl	10	72	21	19	21	10	10	10
	20	72	20	21	21	10	10	10
	40	72	18	20	19	10	10	10
	10	96	25	23	25	10	10	10
	20	96	24	24	26	10	10	10
	40	96	23	22	22	10	10	10
	10	120	26	27	27	10	10	10
	20	120	25	29	28	10	10	10
	40	120	27	24	26	10	10	10

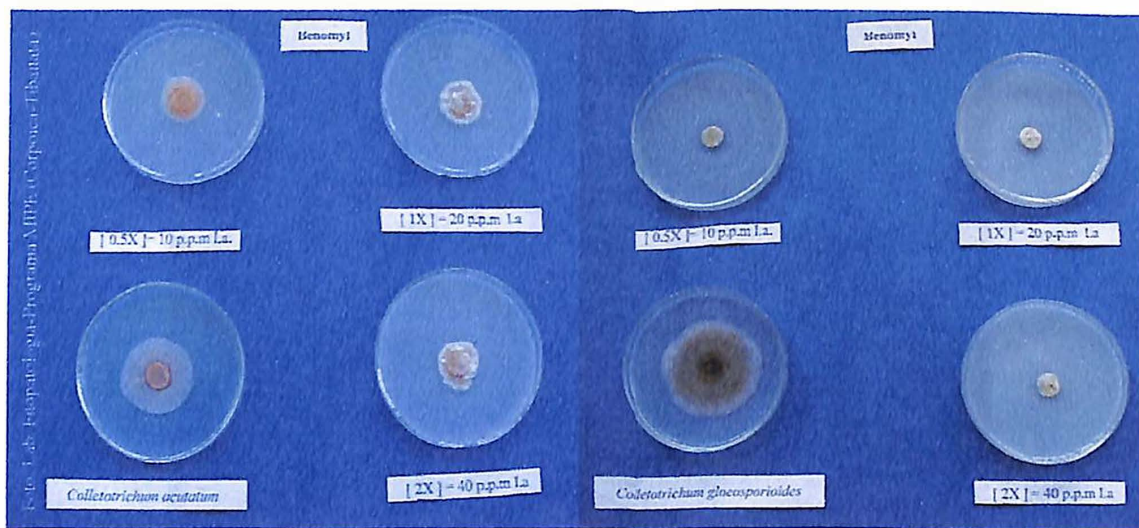


Fig. 10. Tratamiento con benomyl, a concentraciones de 10, 20 y 40 ppm, para la inhibición de crecimiento micelial de *C. acutatum* (izquierda), y, *C. gloeosporioides* (derecha).

Los resultados anteriores se relacionan con lo mencionado por Freeman (2.000), demostrando así que diversos aislamientos de las especies de *C. gloeosporioides* son sensibles al benomyl y, en general, a los productos químicos tipo benzimidazoles. Además, el comportamiento de esta especie, reportado por Freeman, al estar en contacto con algún agente químico tipo benzimidazol, es similar al comportamiento presentado por la cepa de *C. gloeosporioides* utilizada para los ensayos contemplados en este trabajo. De la Isla (1.994) menciona que el mecanismo de acción de los benzimidazoles se centra en inhibir el proceso mitótico fungoso, bloqueando a la vez la síntesis de ácido desoxirribonucleico. Con esto se soporta el efecto que exhibió benomyl en sus tres dosis frente a *C. gloeosporioides*.

Los datos arrojados durante el tratamiento con oxiclورو de cobre mostraron que *C. acutatum* fue sensible a este compuesto; mientras que, *C. gloeosporioides* presentó un alto índice de resistencia en contacto con las tres dosis del ingrediente activo (Figs. 11:A y 11:B). 19.6 mm fue el promedio de diferencia del diámetro de crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* con este tratamiento, en las tres dosis, frente al testigo absoluto. Lo anterior infiere que oxiclورو de cobre se comportó como un agente fungicida sobre *C. acutatum*, y, no fue así en *C. gloeosporioides*. (Tabla 6; fig.12)

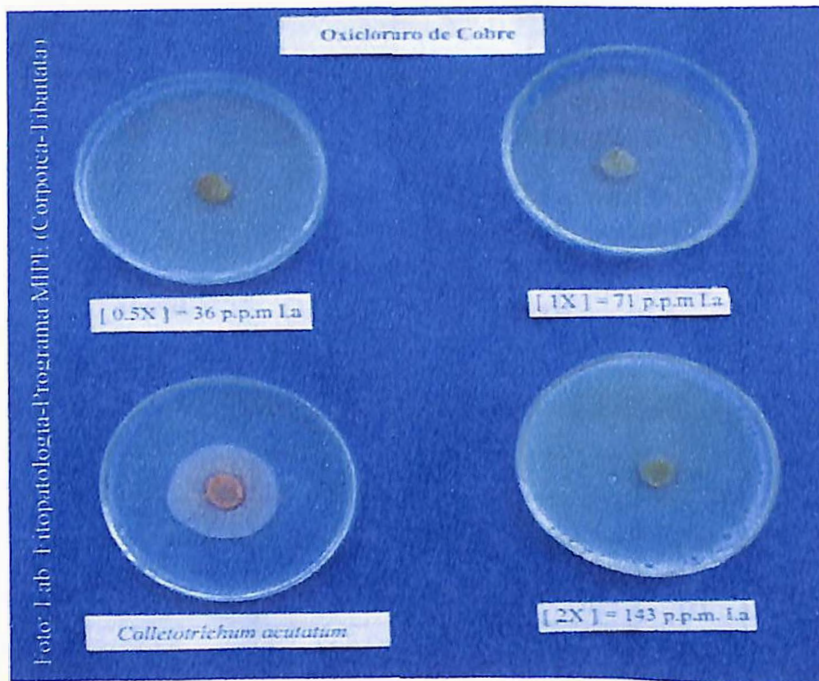


Fig. 11:A. Efecto fungicida de oxiclورو de cobre en *C. acutatum*. Las tres dosis aplicadas (36, 71 y 143 ppm) se confrontaron con un Testigo Absoluto (*Colletotrichum acutatum*, a la izquierda de la fotografía).

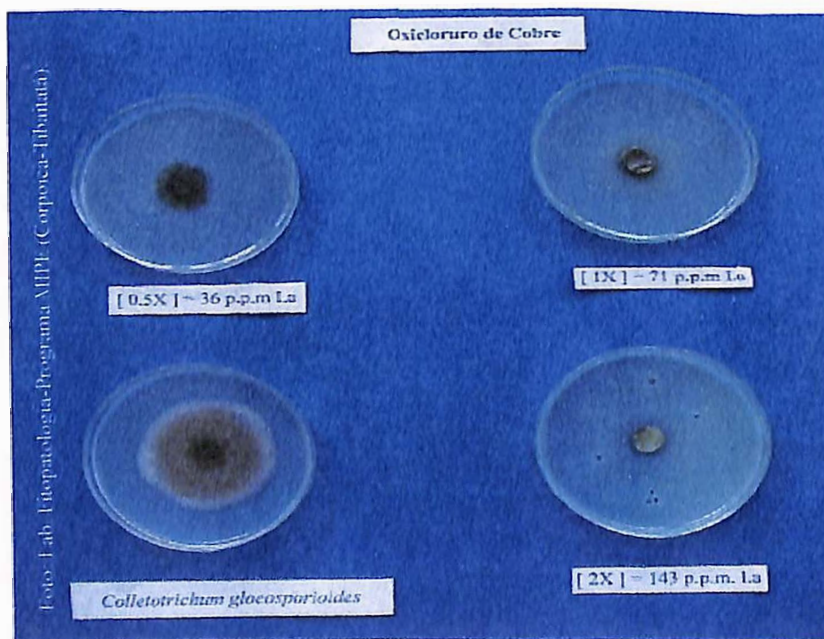


Fig. 11:B. Modo de acción de oxiclورو de cobre frente a *C. gloeosporioides*, con dosis 0.5X=36 ppm, 1X=71 ppm, y, 2X=143 ppm, de ingrediente activo (I.a).

Tabla 6.

Resultados de la prueba de inhibición del crecimiento micelial de *Colletotrichum* aplicando oxiclورو de cobre

Tratamiento	Dosis (ppm)	Tiempo (Horas)	Crecimiento en mm diámetro de micelio <i>C. acutatum</i>			Crecimiento en mm diámetro de micelio <i>C. gloeosporioides</i>		
			Repetición			Repetición		
			1	2	3	1	2	3
Ox. de Cobre	36	72	10	10	10	18	21	19
	71	72	10	10	10	21	24	25
	143	72	10	10	10	21	19	18
	36	96	10	10	10	23	21	22
	71	96	10	10	10	30	31	31
	143	96	10	10	10	24	23	22
	36	120	10	10	10	28	25	24
	71	120	10	10	10	33	35	36
	143	120	10	10	10	25	25	24

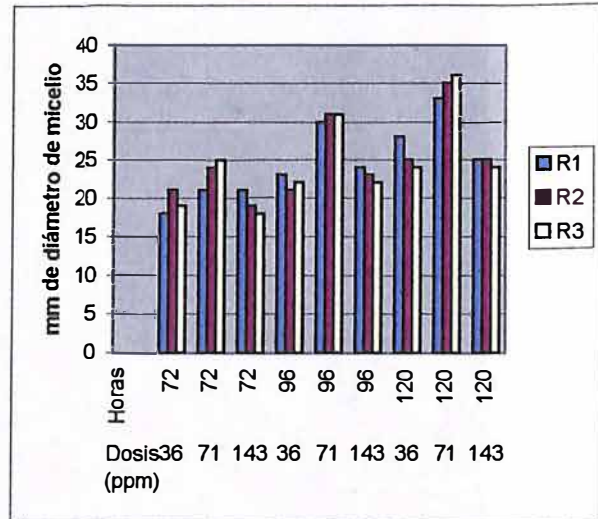
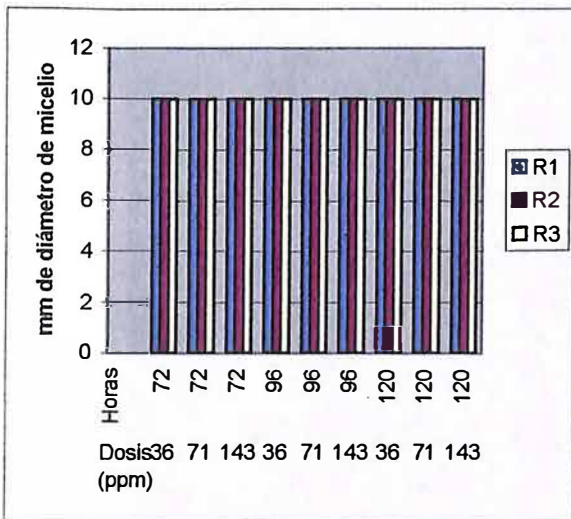


Fig. 12. Modelo gráfico comparativo de los resultados mostrados por el efecto del oxiclورو de cobre en la inhibición del crecimiento micelial de *C. acutatum* (izquierda) y *C. gloeosporioides* (derecha)

El tratamiento con clorotalonil mostró unos resultados donde se probó la inhibición de crecimiento del hongo *C. gloeosporioides*, evidenciándose así en las tres dosis aplicadas del producto (Fig. 13). Sin embargo, *C. acutatum* promovió un crecimiento aéreo (Fig. 14) a partir del disco micelial inoculado en el sustrato con el agente químico, sin llegar a tener contacto con el mismo. Esto se constató durante las tres lecturas realizadas en los tiempos ya mencionados en páginas preliminares. Es posible explicar este suceso como un mecanismo de defensa y sobrevivencia del patógeno cuando se enfrenta a un sustrato tóxico, como lo fue en este caso el contacto con un medio de PDA mezclado con el fungicida; donde, la única fuente de nutrición se encontraba en el disco de micelio incorporado sobre el anterior sustrato, a partir del cual el hongo pudo desarrollarse estrechamente hasta agotar sus reservas energéticas. De esta manera, se deduce que clorotalonil inhibe también el desplazamiento y la extensión de micelio de *C. acutatum*, aunque no interrumpe inmediata y totalmente el desarrollo de la colonia fungosa presente.

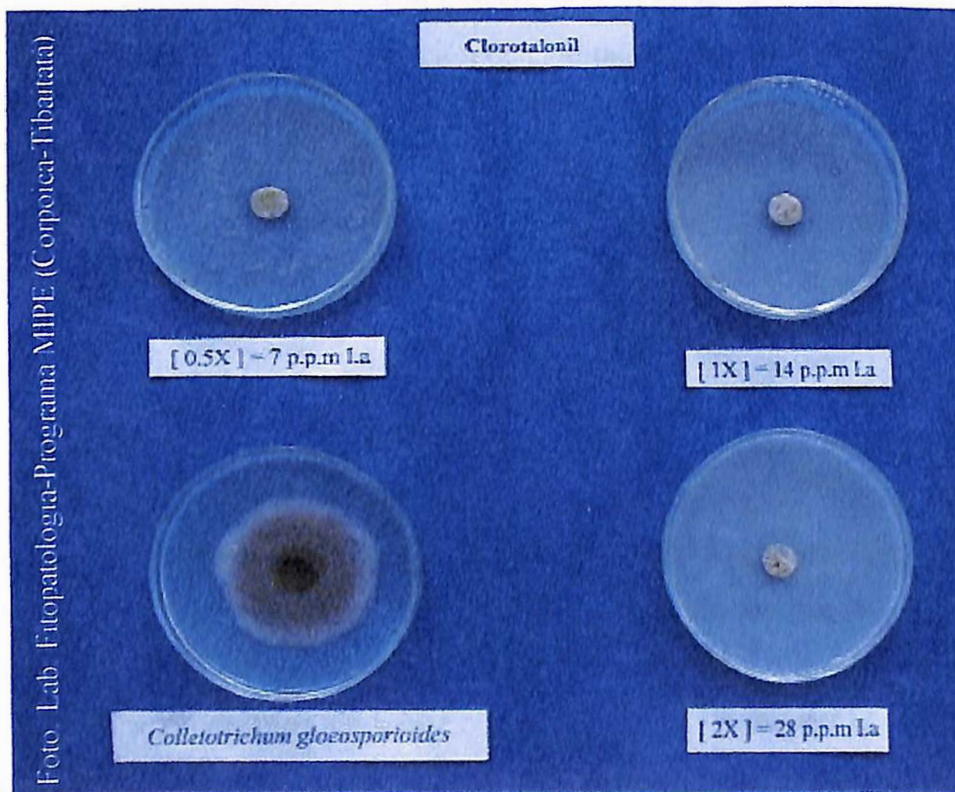


Fig. 13. Acción fungicida de las tres dosis de clorotalonil sobre *C. gloeosporioides*.

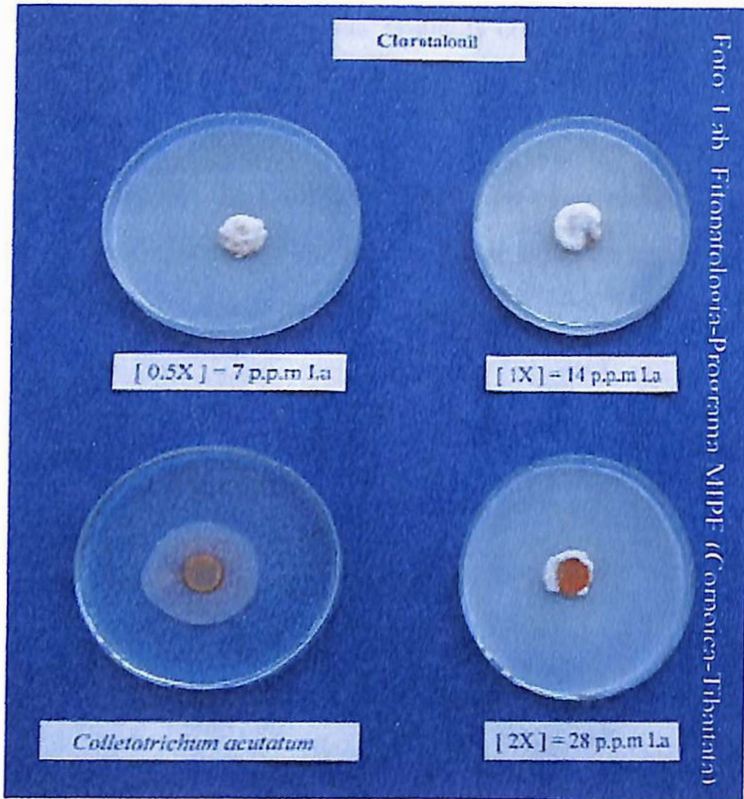


Fig. 14. Efecto de la aplicación de clorotalonil sobre *C. acutatum*.

Nótese la evidencia de micelio aéreo encima y a los lados del disco central en las tres muestras a diferencia del crecimiento micelial del testigo absoluto "*Colletotrichum acutatum*" (abajo/ izquierda), el cual se extiende de forma radial sobre el sustrato libre del químico.

Es importante resaltar que la masa micelial de *C. acutatum*, que se desarrolló sobre el disco de cada una de las muestras con su respectiva dosis, adquirió una coloración muy blanca a comparación de la presentada por el testigo absoluto, en donde el micelio era de color blanco claro con espacios anaranjados que reflejan la esporulación que ha tenido el hongo. De acuerdo con esto, el micelio del hongo, tratado con el agente químico, no continuó con el ciclo de esporulación después de haber crecido encima del disco, debido, quizás, al poco espacio sin químico que había a su alrededor, como también, a la escasez de nutrientes. Además, el crecimiento del testigo absoluto resultó más uniforme y radial, contrario a lo

exhibido por las tres muestras de micelio tratadas con el producto, donde el micelio fue muy voluminoso y aglomerado en la base del disco de inserción.

Al tomar una pequeña porción de micelio tratado con clorotalonil, y, hacerle el respectivo montaje en placa con tinción de azul de lactofenol se observó una aglomeración de hifas y deformaciones o abultamientos entre septos. (Fig. 15)

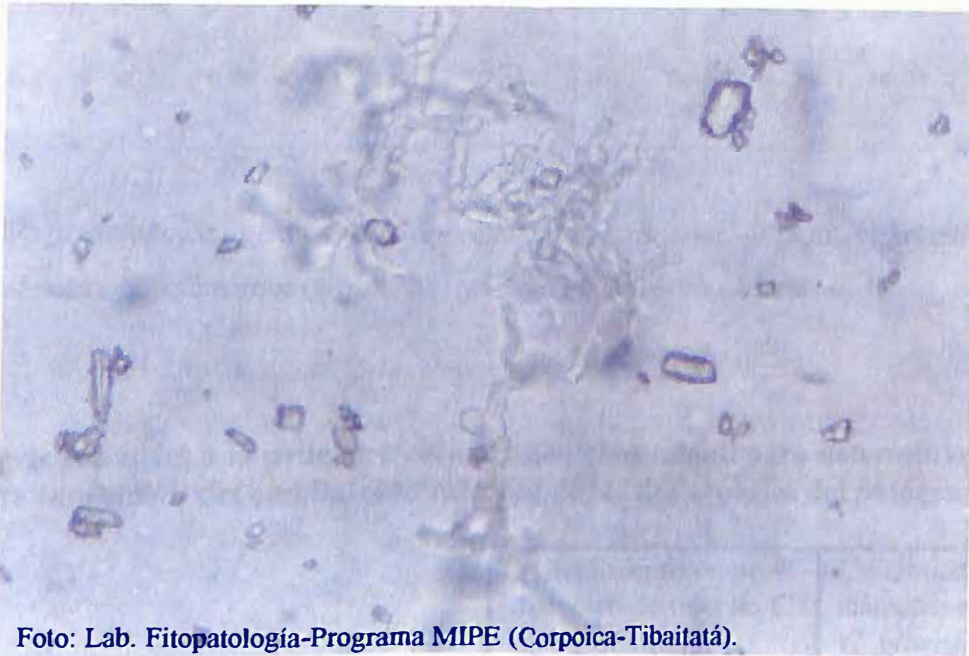


Foto: Lab. Fitopatología-Programa MIPE (Corpoica-Tibaitatá).

Fig. 15. Montaje en placa con tinción de azul de lactofenol sobre micelio perteneciente a *C. acutatum* tratado con clorotalonil, donde se evidencia la aglomeración de hifas y turgencias o deformaciones entre septos.

A continuación se presenta una comparación gráfica (Fig. 16) observando claramente las diferencias significativas del crecimiento en milímetros de diámetro de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*. Estos resultados están basados en los datos referenciados en la tabla 7 donde se muestra el efecto en el crecimiento micelial de las dos especies del patógeno presentado por clorotalonil en sus dosis correspondientes, cada una con sus tres repeticiones evaluadas en los tiempos estipulados.

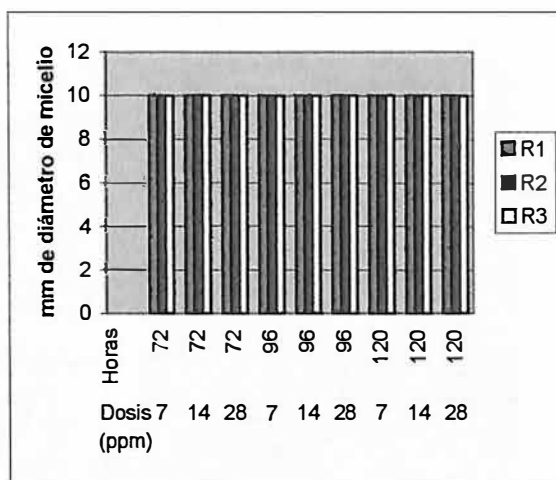
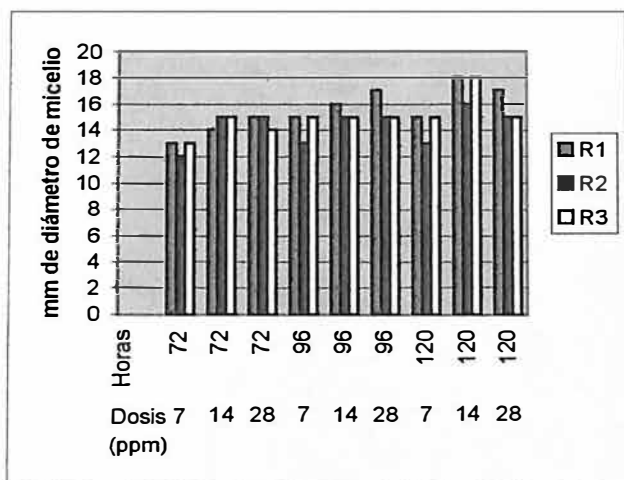


Fig. 16. Representación gráfica de los resultados arrojados durante el tratamiento con clorotalonil sobre *C. acutatum* (izquierda) y *C. gloeosporioides* (derecha).

Tabla 7.

Datos pertenecientes a la prueba efectuada con clorotalonil para determinar el efecto de inhibición del crecimiento micelial de las dos especies del patógeno

Tratamiento	Dosis (ppm)	Tiempo (Horas)	Crecimiento en mm diámetro de micelio <i>C. acutatum</i>			Crecimiento en mm diámetro de micelio <i>C. gloeosporioides</i>		
			Repetición			Repetición		
			1	2	3	1	2	3
Clorotalonil	7	72	13	12	13	10	10	10
	14	72	14	15	15	10	10	10
	28	72	15	15	14	10	10	10
	7	96	15	13	15	10	10	10
	14	96	16	15	15	10	10	10
	28	96	17	15	15	10	10	10
	7	120	15	13	15	10	10	10
	14	120	18	16	18	10	10	10
	28	120	17	15	15	10	10	10

Por otra parte, en las tres dosis del tratamiento con mancozeb se evidenció una alta inhibición de extensión micelial en las dos especies de *Colletotrichum* (Fig. 17).

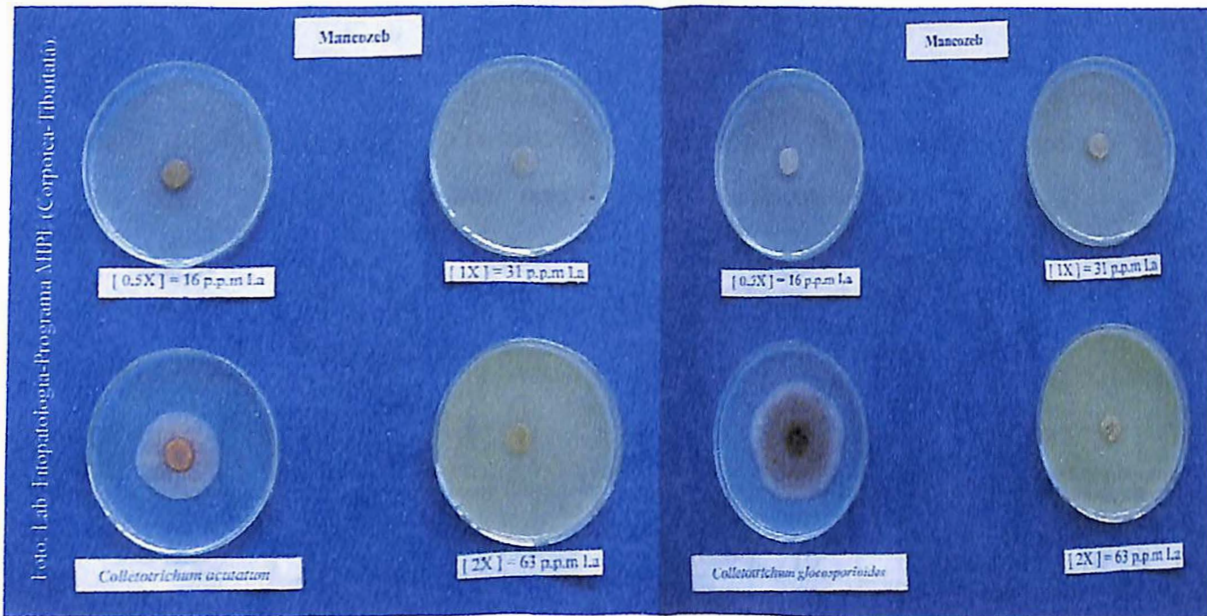


Fig. 17. Evidencia de la prueba de inhibición de extensión micelial utilizando como tratamiento mancozeb contra los patógenos *C. acutatum* (izquierda) y *C. gloeosporioides* (derecha).

El balance de los datos arrojó un porcentaje de efectividad fungicida del producto del 100 % (Tabla 8). En esta tabla se observa que en las tres repeticiones de cada una de las tres dosis del producto evaluadas en distintos tiempos (72, 96 y 120 horas), el crecimiento de micelio a partir del disco de inoculación fue nulo, es decir, las lecturas realizadas mantuvieron el mismo valor de diez milímetros de diámetro de micelio, perteneciente al disco que contenía el inóculo de *C. acutatum* o de *C. gloeosporioides*. Complementario a esto, las gráficas (Fig. 18), que se aprecian más adelante, revelan los datos arrojados durante las lecturas realizadas en las tres repeticiones de cada dosis de mancozeb, demostrando así, el grado de toxicidad que éste ejerció sobre las dos especies del patógeno. Igualmente, al cumplir el químico con su objetivo, el disco de micelio de las dos especies de *Colletotrichum* no presentó ninguna variación de las características físicas, por lo menos, perceptibles a nivel macroscópico; contrario a lo ocurrido en la prueba con clorotalonil . Lo

anterior explica que mancozeb es un ingrediente activo medianamente tóxico para el ambiente (categoría III), pero, con un rango muy elevado de toxicidad para el patógeno.

Tabla 8.

Resultados de la prueba de inhibición de crecimiento micelial de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* usando el agente químico mancozeb

Tratamiento	Dosis (ppm)	Tiempo (Horas)	Crecimiento en mm diámetro de micelio <i>C. acutatum</i>			Crecimiento en mm diámetro de micelio <i>C. gloeosporioides</i>		
			Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
Mancozeb	16	72	10	10	10	10	10	10
	31	72	10	10	10	10	10	10
	63	72	10	10	10	10	10	10
	16	96	10	10	10	10	10	10
	31	96	10	10	10	10	10	10
	63	96	10	10	10	10	10	10
	16	120	10	10	10	10	10	10
	31	120	10	10	10	10	10	10
	63	120	10	10	10	10	10	10

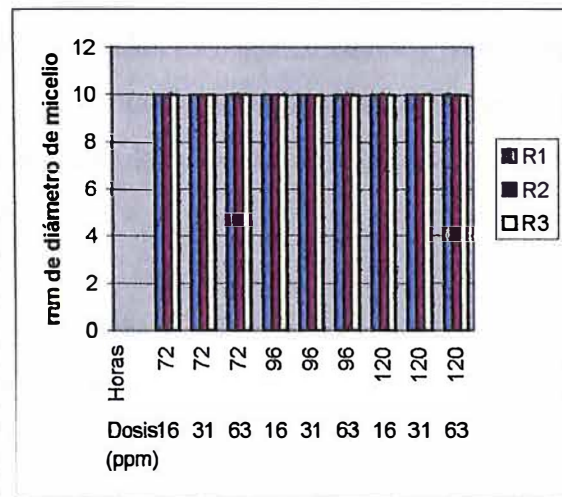
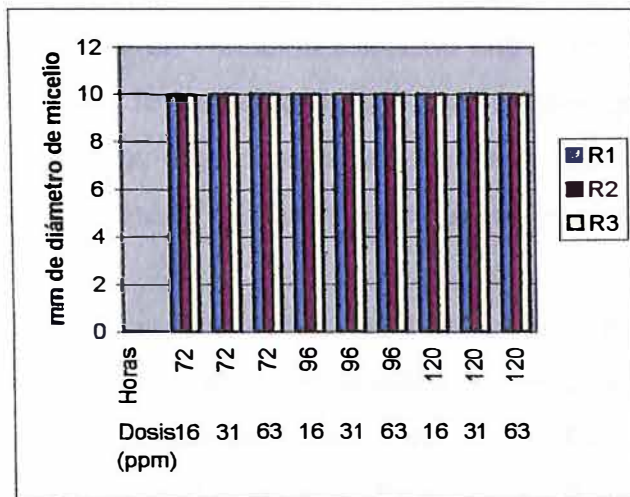


Fig. 18. Efecto de la acción fungicida de mancozeb sobre los hongos *C. acutatum* (izquierda) y *C. gloeosporioides* (derecha).

De todos los tratamientos empleados durante el ensayo *in vitro* se probó que mancozeb fue el ingrediente activo más eficaz para controlar la inhibición de crecimiento micelial de las dos especies de *Colletotrichum*. Las tres dosis aplicadas del producto demostraron el alto efecto fungicida sobre este hongo. Según referencias bibliográficas, mancozeb es un agente químico de amplio espectro disponible para combatir diversas enfermedades del follaje de árboles frutales y hortalizas. El mecanismo de acción de mancozeb consiste en inhibir ciertas enzimas esenciales dentro del ciclo de Krebs, con el objeto de bloquear la principal fuente de energía metabólica en forma de ATP requerida por la mayoría de los organismos eucariotas. Así, la alta sensibilidad que mostraron las dos especies del hongo al fungicida resalta la efectividad de éste para bloquear el ciclo del patógeno.

En el análisis estadístico se denota ampliamente que la prueba de inhibición de crecimiento micelial fue altamente significativa, debido a que, el margen de error del ensayo evaluado estadísticamente con la variable dependiente del área bajo la curva (Anexo 1.) fue menor de 0.1 %, teniendo en cuenta que el coeficiente de varianza estuvo por encima del valor de aceptación (> 1), cuyo equivalente estuvo en 3.82 para *C. acutatum* y 3.38 en *C. gloeosporioides*. Por lo tanto, la dispersión de los datos en el área bajo la curva, contemplada por el margen de error, es casi nula ya que éstos se encuentran alrededor del promedio de valores concernientes a los 4 tratamientos. Lo anterior indica que el porcentaje de variación existente entre los datos obtenidos es matemáticamente viable para comparar la variación de dos o más datos que representan la población evaluada; para este caso, dicho conjunto de datos indican la evaluación de los cuatro fungicidas enfrentados a dos variantes (*C. acutatum* y *C. gloeosporioides*).

Teniendo en cuenta la prueba de Barlett's para confirmar la homogeneidad de varianzas del área bajo la curva, se estableció que el conjunto de datos es homogéneo para toda la población evaluada (tratamientos). Conforme al test de homogeneidad la prueba debe ser mayor que Chi-cuadrado ($Pr > \chi^2$), donde Chi-cuadrado es igual a 0.1. Esto se basa en los resultados estadísticos adjuntos a este trabajo (Anexo 1.)

En la estadística de los resultados obtenidos del ensayo para *C. acutatum*, se evaluaron seis dosis (benomyl 10, 20 y 40 ppm; clorotalonil 7, 14 y 28 ppm) frente al testigo absoluto. Para este análisis no se tuvieron en cuenta las otras dosis de los dos tratamientos restantes, oxiclورو de cobre y mancozeb, puesto que los datos no presentaban ninguna clase de variación y la información para la discusión era evidente.

También, se realizó dentro del análisis una prueba de valoración del rango de amplitud de los datos según Tukey's. La información desprendida del balance estadístico refleja que las dos repeticiones del testigo absoluto tienen el más alto valor referente al crecimiento micelial de *C. acutatum*, mientras que en los tratamientos con benomyl la respuesta de mayor crecimiento micelial se presentó en las tres repeticiones de la dosis comercial, es decir, en la aplicación de 20 ppm de ingrediente activo. En seguida se encuentran la dosis menor y mayor de benomyl, respectivamente; después, continua clorotalonil con las dosis de 14, 28 y 7 ppm. Con esto es posible afirmar que de los tratamientos *in vitro* para *C. acutatum*, la mayor resistencia adquirida por el hongo se dio al estar en contacto con la dosis comercial de benomyl. Igualmente, en el tratamiento del patógeno con clorotalonil, la dosis que menos inhibió su crecimiento fue la correspondiente a 14 ppm de I.a., equivalente a la dosis comercial.

Por consiguiente, de lo anteriormente mencionado, queda corroborado, a partir de las pruebas realizadas en laboratorio, la resistencia que ha adquirido *C. acutatum* al benomyl, principalmente, a la dosis recomendada. De la misma manera, se observa esto en los ensayos con clorotalonil, donde la evidencia más clara se constata con la concentración de aplicación comercial.

Dentro del análisis también se hizo la prueba de normalidad, tomando los valores correspondientes al test de Shapiro-Wilk, siendo el más significativo de todos los presentados en la evaluación. Al medir la normalidad por medio de este test el valor arrojado fue el siguiente: $Pr < W$, $Pr = 0.5185$, donde, $W = 0.958714$, (Anexo 1). Deduciendo así que la distribución de la prueba tuvo un comportamiento normal

relacionada con el comportamiento presentado en la gráfica del área bajo la curva (Anexo 1.). Luego, la distribución normal de la prueba es simétrica.

Para la estadística realizada sobre los resultados arrojados en la prueba de inhibición del crecimiento de *C. gloeosporioides*, se tuvieron en cuenta 3 dosis del agente químico oxiclورو de cobre enfrentado al testigo absoluto. Los otros datos correspondientes a los tres tratamientos restantes no se tuvieron presente para su análisis, ya que, éstos no reflejaron ningún cambio durante su recopilación. El mayor valor matemático relacionado con el crecimiento de micelio corresponde al testigo absoluto, le sigue oxiclورو de cobre con la dosis de 71 ppm de I.a, después, la concentración de 143 ppm, y, finalmente, el ingrediente activo a 36 ppm. Consecuente con esto, se demuestra que de las tres dosis de oxiclورو de cobre evaluadas, la de menos efecto fungicida es la de mayor aplicación a nivel agrícola.

A estos valores también se les efectuó el test de Shapiro-Wilk, cuyo resultado fue: $Pr = 0.5085$, respecto a la fórmula $Pr < W$, donde W es igual a 0.938974. (Anexo 1.). Esto aprueba que la distribución normal de la prueba también es válida para *C. gloeosporioides*, teniendo en cuenta la distribución de datos en el área bajo la curva (Anexo 1).

6.2. Evaluación de inhibición de la germinación de esporas

Para la inhibición de la germinación de esporas se tuvo en cuenta la viabilidad de éstas dependiendo de la especie ya que esto influyó notoriamente en la evaluación obtenida durante las tres repeticiones del ensayo. A continuación se muestra un marco de referencia de las dos especies de *Colletotrichum* evaluadas (Tabla 9, figs. 19:A y 19:B) donde se diferencia el porcentaje de germinación de esporas tanto de *C. acutatum* como *C. gloeosporioides* a partir del testigo absoluto.

Tabla 9.

Resultados de los testigos absolutos de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* en la evaluación de la inhibición de la germinación de esporas

Hongo	Tratamiento	Dosis (ppm)	Tiempo (Horas)	Porcentaje de Germinación		
				Repeticiones		
				1	2	3
<i>C. acutatum</i>	Testigo absoluto	0	6	64	59	53
		0	8	81	75	66
		0	10	86	83	70
<i>C. gloeosporioides</i>	Testigo Absoluto	0	6	58	58	45
		0	8	83	66	58
		0	10	85	70	68

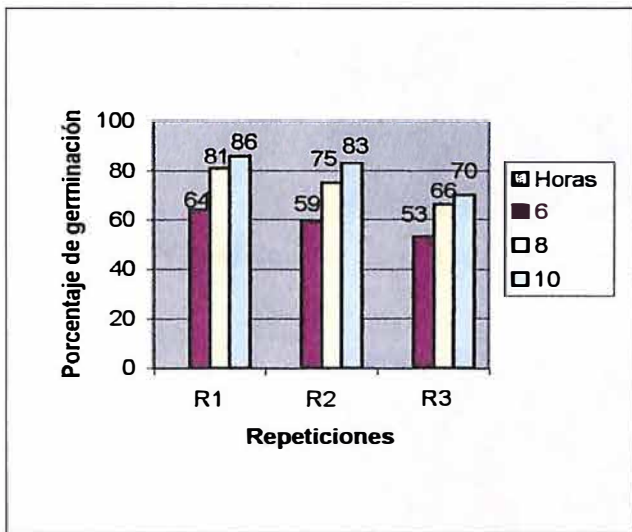


Fig. 19:A. Porcentaje de germinación de esporas en Testigo Absoluto de *C. acutatum*

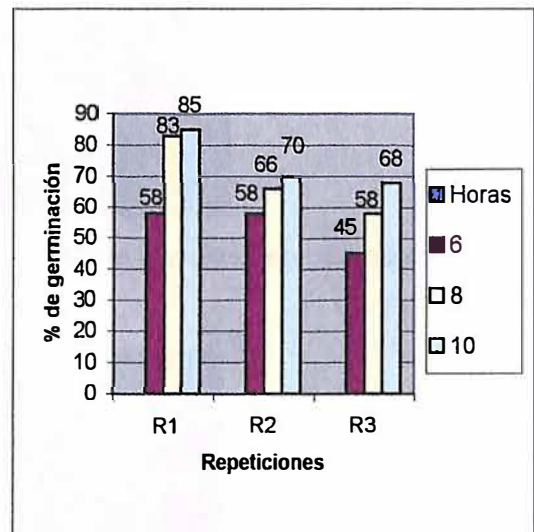


Fig. 19:B. Porcentaje de germinación Testigo Absoluto de *C. gloeosporioides*.

A partir de las figuras 19:A y 19:B se aprecia claramente el porcentaje de germinación de esporas de las dos especies de *Colletotrichum*. Se evidencia que el testigo absoluto de *C.*

acutatum en la primera repetición tiene un mayor porcentaje de germinación de esporas respecto al obtenido por el testigo de *C. gloeosporioides*. Sin embargo, en las dos repeticiones posteriores se presenta un decrecimiento de dicho porcentaje; por ejemplo, en la primera repetición hay un promedio de germinación del 77 % para *C. acutatum* y del 75.3 % para *C. gloeosporioides*, mientras que en la segunda y tercera repetición para *C. acutatum* el promedio fue de 72.3 % y 63 % respectivamente, en cambio, sobre *C. gloeosporioides* se dio un promedio de 64.6 % y de 57 % para cada una de las repeticiones correspondientes. Esto indica que *C. acutatum* (Fig. 20:A) durante la evaluación del ensayo presentó un comportamiento en la viabilidad de la germinación de esporas más alta, como a la vez, más significativa que la obtenida por *C. gloeosporioides* (Fig.20:B)



Foto: Lab. Fitopatología-Programa MIPÉ (Corpoica-Tibaitatá).

Fig. 20:A. Viabilidad de *C. acutatum* al no estar en contacto con algún agente químico.

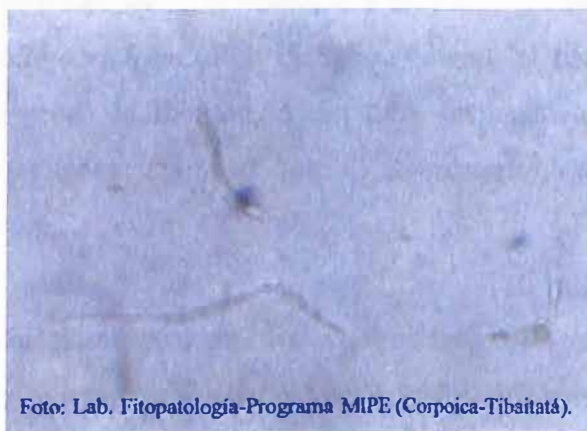


Foto: Lab. Fitopatología-Programa MIPÉ (Corpoica-Tibaitatá).

Fig. 20:B. Viabilidad de *C. gloeosporioides* como testigo absoluto.

Existen referencias bibliográficas de investigaciones realizadas por autores como Sonoda y Pelosi, Bernstein (1.995) ,donde se confirma la existencia de un índice de viabilidad mayor en *C. acutatum* que en *C. gloeosporioides*; aunque, relativamente, el desarrollo micelial sea más rápido en la segunda especie.



Figura 21. Formación del tubo germinativo de dos esporas de *C. acutatum* sin la interacción con algún tratamiento químico.

También, en la figura 21 se observa el origen del tubo germinativo de las esporas de *C. acutatum*, lo cual es de relevante importancia para su identificación de acuerdo con las referencias obtenidas a partir de su aislamiento y tipificación. Asimismo se encontró diferencias típicas y apreciables de la morfología y forma de germinación de las esporas de las dos especies de *Colletotrichum*. Por ejemplo, durante el tiempo de ejecución de la prueba, *C. acutatum* expresó la formación del tubo germinativo a partir de una de las esquinas terminales de la espora; mientras que, *C. gloeosporioides* emitió dicho tubo desde la parte ventral de la espora.

En el ensayo realizado para evaluar los cuatro fungicidas seleccionados (benomyl, clorotalonil, mancozeb y oxiclورو de cobre) en la inhibición de la germinación de esporas de las dos especies de *Colletotrichum* generadoras de antracnosis, para este caso, en cítricos; se encontró diversas diferencias en cada uno de los cuatro tratamientos aplicados

con respecto al testigo absoluto. Los resultados proporcionados a continuación (Tabla 10) reflejan la existencia o ausencia del efecto fungistático de las dosis de benomyl empleadas.

Tabla 10.

Resultados del efecto fungistático de Benomyl sobre *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*

Hongo	Tratamiento	Dosis (ppm)	Tiempo (Horas)	Porcentaje de Germinación		
				Repeticiones		
				1	2	3
<i>C. acutatum</i>			6	16	18	17
		10	8	23	23	27
			10	26	29	33
	Benomyl		6	9	10	9
			8	11	12	12
			10	11	13	13
			6	0	0	0
		40	8	0	0	0
			10	0	0	0
<i>C. gloeosporioides</i>			6	13	20	19
		10	8	13	25	23
			10	17	27	26
	Benomyl		6	0	0	0
			8	0	0	0
			10	0	0	0
			6	0	0	0
		40	8	0	0	0
			10	0	0	0

De acuerdo con la tabla de resultados, la dosis más concentrada del producto fue la única que ejerció un efecto fungistático para controlar la germinación de esporas de las dos especies de *Colletotrichum*. Las otras dos dosis no fueron efectivas mostrándose un porcentaje de germinación de esporas relativamente elevado tanto para *C. acutatum* como para *C. gloeosporioides*. Comparando el promedio del porcentaje de germinación entre las dos especies se encontró que en la prueba de la dosis más baja de benomyl sobre *C. acutatum* éste tuvo un equivalente de 23.5 % tomando en total los 3 tiempos de ejecución de la prueba; en cambio, en *C. gloeosporioides* se valoró éste promedio en 20.3 %. En

particular, lo anterior indica que ambas especies presentan una resistencia elevada al químico dado que la viabilidad de germinación de esporas para cada una de las dos especies puestas en contacto con éste fue aceptablemente significativa al compararla con los valores revelados en los testigos.

Las dos gráficas presentadas a continuación (Figs.22:A y 22:B) ilustran con más exactitud los resultados arrojados por las dosis de benomyl trabajadas en el ensayo, cuyo índice de manipulación comercial en el área citrícola es bastante demandado.

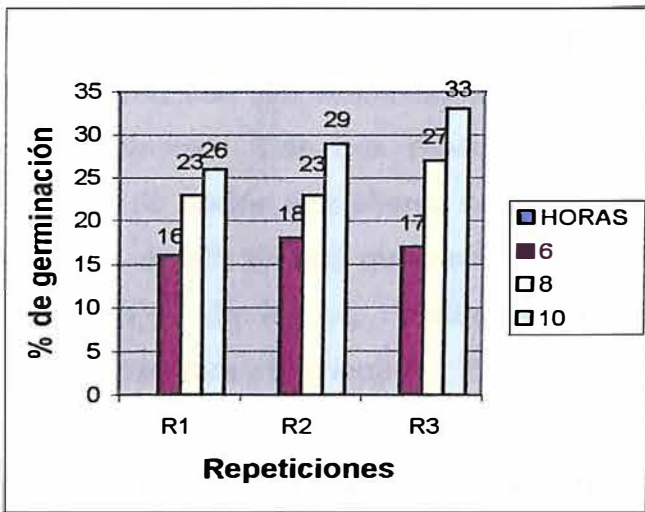


Fig. 22:A. Porcentaje de germinación de esporas de *C. acutatum* en presencia de benomyl [0.5X]

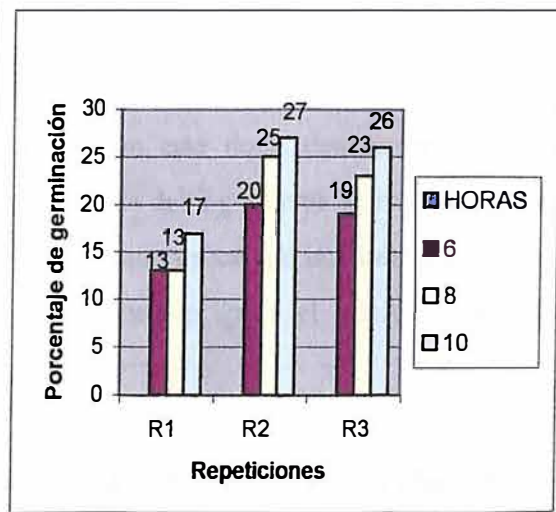


Fig. 22:B. Evaluación en porcentaje de la germinación de esporas de *C. gloeosporioides* expuestas a benomyl [0.5X]

En las dos gráficas anteriores se corrobora el creciente aumento en el porcentaje de germinación de esporas tanto para *C. acutatum* como *C. gloeosporioides*. Las tres repeticiones de la dosis expuesta mantienen un incremento en el porcentaje de germinación, aunque, en la gráfica correspondiente a *C. gloeosporioides* se alcanza a notar una leve decadencia en la tercera repetición. Sin embargo, el promedio del porcentaje de esporas germinadas es equitativo en el tratamiento para ambas especies. La resistencia de los dos hongos al benomyl en cuanto al índice de viabilidad es muy elevado, tal como lo revelan los resultados, se demuestra una equivalente resistencia por parte de ambas especies. Todo

esto demuestra que el efecto fungistático de la dosis no es favorable para contrarrestar el efecto del patógeno, y, tampoco para disminuir su proliferación.

De manera similar, la dosis comercial de benomyl, evaluada bajo tres repeticiones, tampoco arrojó datos contundentes sobre la efectividad fungistática del compuesto frente a *C. acutatum*, contrario a lo ocurrido sobre *C. gloeosporioides*, el cual fue altamente sensible a este tratamiento.

El efecto realmente fungistático de benomyl se observó en la acción de la dosis más alta cuya concentración se trazó en 40 ppm. Tanto *C. acutatum* como *C. gloeosporioides* presentaron una alta sensibilidad al compuesto en su dosis dos veces mayor a la manejada comercialmente. Las tres repeticiones efectuadas con esta dosis demuestran el amplio espectro de acción que abarca la dosis más concentrada del ingrediente activo. Esto ratifica el déficit de efectividad que tiene benomyl al ser aplicado en campo en la dosis estipulada, provocando, de hecho, resultados escasamente favorables para el cultivo y de poca rentabilidad para el agricultor.

Por otra parte, los ensayos realizados con oxiclورو de cobre se reflejan notoriamente en la tabla comparativa (Tabla 11).

Oxiclورو de cobre actuó con la dosis más baja (36 ppm) sobre *C. acutatum*. El efecto de la dosis fue rápido pero no duradero ya que al realizar la primera lectura de las tres repeticiones no hubo presencia de esporas germinadas, no obstante, completadas las 8 y 10 horas del montaje se reportaron datos en donde se había aumentado el porcentaje de germinación. En cambio, con las dosis de 71 y 143 ppm de I.a sí hubo un total efecto de inhibición, demostrando que la dosis comercialmente establecida está bien formulada y la dosis por encima de ésta ratifica el efecto fungistático del producto.

En la misma prueba realizada para *C. gloeosporioides*, oxiclورو de cobre resultó ser extremadamente efectivo durante la evaluación de inhibición de la germinación. En las tres repeticiones de las tres dosis aplicadas los resultados conseguidos no ostentaron ninguna

variación. Luego, en estas pruebas, *C. gloeosporioides* resultó ser sensible a todas las dosis ensayadas del agente químico.

Tabla 11.

Resultados derivados de la aplicación de las diferentes dosis de oxiclорuro de cobre empleadas en el ensayo sobre las dos especies de *Colletotrichum*.

Hongo	Tratamiento	Dosis (ppm)	Tiempo (Horas)	Porcentaje de Germinación			
				Repeticiones			
				1	2	3	
<i>C. acutatum</i>			6	0	0	0	
		36	8	24	9	11	
			10	31	13	21	
	Oxicloruro de cobre		6	0	0	0	
			71	8	0	0	0
				10	0	0	0
			6	0	0	0	
		143	8	0	0	0	
		10	0	0	0		
<i>C. gloeosporioides</i>			6	0	0	0	
		36	8	0	0	0	
			10	0	0	0	
	Oxicloruro de cobre		6	0	0	0	
			71	8	0	0	0
				10	0	0	0
			6	0	0	0	
		143	8	0	0	0	
		10	0	0	0		

Por otra parte, esta prueba ejecutada con clorotalonil sobre *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* demostró que este agente químico en sus tres dosis, cada una con sus tres repeticiones, fue totalmente efectivo al inhibir la germinación de esporas de ambas especies. Los datos conseguidos durante el ensayo (Tabla 12.) aciertan en un promedio neto del 0 % de esporas germinadas sobre el total de esporas inoculadas en el sustrato con la respectiva dosis del químico. Ya que clorotalonil, durante las pruebas *in vitro*, se comportó como un producto fungistático en todas sus concentraciones; se deduce que esto se debe a su composición química derivada de los hidrocarburos aromáticos. También, su capacidad fungistática se confirma por su mecanismo de acción, cuyo blanco se centra en la inhibición

de la síntesis de ergosterol bloqueando así el proceso de reproducción celular, porque lisa la membrana rompiendo sus enlaces lipopeptídicos, bloqueando la ciclización de escualeno.

Tabla 12.

Datos reportados en la evaluación de clorotalonil como agente fungistático

Hongo	Tratamiento	Dosis (ppm)	Tiempo (Horas)	Porcentaje de Germinación		
				Repeticiones		
				1	2	3
<i>C. acutatum</i>			6	0	0	0
		7	8	0	0	0
			10	0	0	0
			6	0	0	0
	Clorotalonil	14	8	0	0	0
			10	0	0	0
			6	0	0	0
		28	8	0	0	0
			10	0	0	0
<i>C. gloeosporioides</i>			6	0	0	0
		7	8	0	0	0
			10	0	0	0
			6	0	0	0
	Clorotalonil	14	8	0	0	0
			10	0	0	0
			6	0	0	0
		28	8	0	0	0
			10	0	0	0

La evaluación efectuada al producto químico mancozeb, en sus tres dosis aplicadas sobre las dos especies del hongo, también determinó su amplio efecto fungistático porque, durante los tres tiempos valorados para la prueba, el porcentaje de germinación de esporas equivalió a 0 (Tabla 13.). Este agente químico está contemplado comercialmente dentro de la categoría toxicológica III, es decir, medianamente tóxico para el medio ambiente, pero, posee un efecto positivo de toxicidad frente al patógeno debido a que bloquea el ciclo de Krebs, lo que hace que la célula no pueda metabolizar la energía requerida para su desarrollo. Mancozeb es un producto químico de amplio espectro distribuido comercialmente para controlar y/o erradicar diversas enfermedades, entre ellas, la antracnosis. A través de esto se puede verificar por qué este agente químico no permitió el

desarrollo germinativo de ninguna de las dos especies de *Colletotrichum*. Además, los resultados conseguidos por el ingrediente activo, perteneciente al grupo de los ditiocarbamatos, determinan la alta sensibilidad de *Colletotrichum* a este compuesto.

Tabla 13.

Valoración del efecto generado por mancozeb sobre el patógeno

Hongo	Tratamiento	Dosis (ppm)	Tiempo (Horas)	Porcentaje de Germinación			
				Repeticiones			
				1	2	3	
<i>C. acutatum</i>			6	0	0	0	
		16	8	0	0	0	
			10	0	0	0	
	Mancozeb			6	0	0	0
			31	8	0	0	0
				10	0	0	0
				6	0	0	0
		63	8	0	0	0	
		10	0	0	0		
<i>C. gloeosporioides</i>			6	0	0	0	
		16	8	0	0	0	
			10	0	0	0	
	Mancozeb			6	0	0	0
			31	8	0	0	0
				10	0	0	0
				6	0	0	0
		63	8	0	0	0	
		10	0	0	0		

El análisis estadístico (Anexo 2.) de los resultados obtenidos en la prueba de inhibición de germinación de esporas para las dos especies de *Colletotrichum* se basó en la evaluación gráfica- matemática del área bajo la curva. El reporte indica lo siguiente: la prueba para *C. acutatum* obtuvo un coeficiente de variación de 16.41 y un margen de error del 0.1 %; mientras que, en *C. gloeosporioides* el coeficiente de variación fue de 18.73 con un margen de error del 0.2 %. Esto indica que las dos pruebas tuvieron un coeficiente de variación menor que lo establecido, siendo éste el rango de aceptación para una prueba; y, el margen de error es casi despreciable, confirmando así la homogeneidad en la dispersión de la información. Por medio del coeficiente de variación se infiere que el porcentaje de variación que hay entre los datos presenta una dispersión normal.

BIBLIOTECA AGROPECUARIA DE COLOMBIA

De acuerdo con lo obtenido en la prueba de Barlett's, las varianzas son homogéneas porque el rango de aceptación de la prueba está contemplado dentro del área bajo la curva donde se encuentran los datos revelados por el ensayo de inhibición de la germinación. Además, según el test de normalidad de Shapiro-Wilk, la normal está por debajo del límite contemplado dentro de dicha prueba, lo cual es aceptable para corroborar que la distribución normal de la población es continua durante todo el proceso de evaluación del ensayo. Por consiguiente la curva no presenta mayor desviación a ninguno de los extremos donde la distribución de los datos dentro del área bajo la curva es simétrica y dependiente del promedio del balance de los datos contemplados para la prueba. En conclusión, el modelo de evaluación en los tratamientos para la inhibición de germinación de esporas es altamente significativo por lo que la reunión de datos es completamente homogénea.

Para la estadística referente al ensayo en *C. acutatum*, se seleccionaron los siguientes datos: concentraciones de 10 y 20 ppm de benomyl, oxiclورو de cobre a 36 ppm; teniendo en cuenta el testigo absoluto. La prueba de Tukey (Anexo 2) aprueba que el testigo absoluto presentó la mayor diferencia significativa en cuanto al porcentaje de germinación de esporas. En los tratamientos, benomyl con la dosis más baja estuvo por debajo del valor suministrado por el testigo absoluto, seguido por la concentración de 36 ppm de oxiclورو de cobre. Benomyl con su dosis intermedia obtuvo el puesto más bajo en cuanto al porcentaje de germinación de esporas.

En definitiva, lo anteriormente mencionado corrobora los resultados conseguidos en las pruebas de inhibición de la germinación para *C. acutatum*. Así, queda claro que el tratamiento con la dosis comercial de benomyl fue más eficiente que la aplicación de este producto en su dosis mínima utilizada en el estudio. Y, la aplicación de oxiclورو de cobre en su concentración de 0.5X resultó ser más efectiva frente al patógeno que la dosis 1X de benomyl empleada. Sin embargo, el rango de dispersión de estos datos es equidistante, difiriendo, claro está, con el valor representado para el testigo absoluto utilizando el

programa de Tukey; lo que indica que de alguna u otra forma los tratamientos revisados estadísticamente mostraron algún efecto de inhibición.

Por otra parte, para *C. gloeosporioides* sólo se valoró estadísticamente el tratamiento correspondiente a benomyl en su dosis más baja (10 ppm) frente al testigo absoluto. Afrontando estas dos variantes en la prueba de Tukey, se dio por hecho la diferencia en el porcentaje de germinación de esporas del testigo absoluto sobre la concentración más baja de benomyl utilizada. En la tabla de comparación de la prueba (Anexo 2.) se ve que entre estos dos valores la diferencia en porcentaje es de 30.6, lo cual quiere decir que benomyl en su dosis más baja alcanzó a inhibir la germinación de manera aceptable, al compararla con el valor relativo del porcentaje de germinación de esporas determinado en el testigo absoluto.

6. 3. Discusión general de resultados

A partir de los resultados originados de las dos pruebas ejecutadas *in vitro* para la evaluación del efecto fungicida y fungistático de los cuatro tratamientos seleccionados, se sacaron una serie de observaciones referidas a continuación.

En la evaluación de inhibición de germinación de esporas, se estableció que:

Conforme al testigo absoluto, la germinación de esporas de *Colletotrichum acutatum* se efectúa más rápidamente y en forma más pronunciada que en *C. gloeosporioides*.

La germinación de la mayoría de las esporas de *C. acutatum* se evidencia por la formación de dos tubos germinativos cada uno a partir de uno de los dos extremos terminales de la estructura de la espora. Mientras que, *C. gloeosporioides* presenta en la germinación de la mayoría de las esporas un tubo germinal sobresaliente de la parte intermedia de la espora ovoide.

En cuanto a los tratamientos con fungicidas, la germinación de las esporas de *C. acutatum* se dio en mayor porcentaje al estar expuestas a concentraciones de 10 y 20 ppm de benomyl. Pero el porcentaje de germinación fue nulo al estar las esporas en contacto con el producto usando una concentración equivalente a 40 ppm de ingrediente activo.

También, el porcentaje de germinación de esporas de *C. gloeosporioides* fue relativamente alto al estar en contacto con benomyl a una concentración de 10 ppm; mientras que, con las otras dos concentraciones del químico (20 ppm y 40 ppm) el porcentaje de germinación fue igual a 0.

Por otra parte, la concentración $0.5X = 36$ ppm de oxiclورو de cobre retardó la germinación de las esporas de *C. acutatum*, ya que, a las 6 horas de realizada la lectura en las tres repeticiones el porcentaje de germinación era 0, pero al efectuar de nuevo el conteo se determinó que el promedio del porcentaje de germinación en las tres repeticiones era de 15% a las 8 horas y del 22% a las 10 horas. En cambio, no hubo porcentaje significativo de germinación de esporas al estar en contacto con concentraciones $1X = 71$ ppm y $2X = 143$ ppm del producto.

En cambio, las tres dosis usadas de oxiclورو de cobre inhibieron en un 100 % de la prueba la germinación de esporas de *C. gloeosporioides*. Lo que indica el efecto de acción fungistático del compuesto químico para esta especie.

Lo anterior se corrobora con lo sugerido por Guzmán (1.997), quien resalta el modo de acción de los compuestos a base de cobre partiendo de un bloqueo de los radicales libres sulfhidrilos (SH), aminos y carboxílicos de los compuestos celulares, los cuales son de vital importancia dentro del metabolismo celular. Literalmente, el autor, mencionado anteriormente, explica: “El cobre (Cu) entra en contacto con las esporas impidiendo su germinación o desarrollo (acción fungistática) y después de dos horas de exposición al producto se logra una acción fungicida por la penetración del producto dentro de las células”. Por lo tanto, queda claro que los resultados obtenidos durante el ensayo son

válidos para afirmar y sustentar la acción ejercida por el oxiclورو de cobre frente a las dos especies de *Colletotrichum* evaluadas.

Las tres dosis de Clorotalonil y Mancozeb, en las tres repeticiones ejecutadas, también mostraron un porcentaje de inhibición de la germinación de esporas del 100% para *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*. Por lo tanto, se deduce que probablemente los dos productos químicos pueden tener un efecto preventivo en el control de la antracnosis de los cítricos. Para el compuesto químico clorotalonil, esto se verifica en lo propuesto por *Cremlyn (1.990)*, él cual define que los compuestos aromáticos conformados a partir de un anillo fenólico, en especial los que presentan cloro dentro de su composición, son altamente tóxicos para diversos microorganismos inhibiendo la síntesis de grupos amino y sulfhidrilos. Igualmente, según *Ware (1.982)*, los ditiocarbamatos también inactivan los grupos sulfhidrilos esenciales en la formación de aminoácidos y proteínas, las cuales son, en su mayoría, componentes estructurales de la membrana celular. Lo anterior confirma el por qué, tanto clorotalonil como mancozeb, presentaron un efecto fungistático frente a las dos especies del patógeno.

Para la prueba de evaluación del efecto fungicida de los cuatro tratamientos, se determinó lo siguiente:

El crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* fue más acelerado en el sustrato de PDA (Agar Papa Dextrosa) sin tratamiento, que el crecimiento producido por *C. acutatum*; debido a que la primera especie del hongo consume mayor energía, y, de esta manera, presenta una mayor actividad metabólica en la etapa de desarrollo (Ideofase); a diferencia de la otra especie, la cual presenta un mayor metabolismo en la etapa de reproducción y proliferación (Tropofase).

Benomyl en sus tres dosis no inhibió el crecimiento micelial de *C. acutatum*, pero si ejerció un efecto fungicida sobre *C. gloeosporioides*, debido a la alta resistencia que ha adquirido esta especie frente a dicho ingrediente activo.

Oxicloruro de cobre, a diferencia del benomyl, inhibió el crecimiento micelial de *C. acutatum*, aunque no se comportó de igual manera sobre *C. gloeosporioides*. Esto se debe a la resistencia generada por este hongo después de haber estado en contacto por mucho tiempo con aplicaciones sobresaturadas del químico a nivel agrario.

Clorotalonil controló con sus tres dosis (7, 14 y 28 ppm) el crecimiento de micelio de las dos especies de *Colletotrichum*. Sin embargo, en ambos casos se presentaron alteraciones en el color, en la forma y textura del micelio por la falta de un sustrato adecuado para su óptimo desarrollo. Quizás, la razón principal de dicha alteración fue el daño causado a la pared celular de las células del patógeno debido a que este compuesto químico inhibe la biosíntesis de esteroides, tal como lo señala *Agrios (1.999)*. Por tal razón, es aceptable admitir que cuando el clorotalonil ataca la pared celular y bloquea la incorporación de C 14 glucosamina en las paredes celulares, de acuerdo con lo mencionado por *Guzmán (1.997)*; se afecta parcial o totalmente el funcionamiento metabólico de las células del patógeno reflejándose ampliamente en sus características físicas.

Mancozeb en sus tres dosis empleadas actuó como fungicida tanto para *C. acutatum* como para *C. gloeosporioides*, por su alta composición tóxica de amplio espectro. Esto se demuestra a partir de lo mencionado por *Ware (1.982)*, él cual considera que los fungicidas tienen propiedades quelantes, en este caso, los compuestos derivados del ácido ditiocarbámico. Debido a que estos compuestos y muchos otros pueden presentar un mecanismo de acción frente al patógeno como agentes quelantes, se deduce, por lo tanto, que su capacidad fungitóxicas está emparentada con la captura de elementos metálicos, dentro de los que figuran el hierro, magnesio y zinc, esenciales dentro de la conformación de diferentes unidades estructurales y funcionales fundamentales en el desarrollo celular. De ser así, se concluye que mancozeb presentó una acción fungicida y fungistática favorable para el control de los aislamientos efectuados a partir de las dos especies del patógeno debido a su excelente capacidad de inhibición de enzimas propias del metabolismo celular, actuando como un potente agente quelante.

7. CONCLUSIONES

- *C. acutatum*, causante de la antracnosis de los cítricos exhibe resistencia al ingrediente activo benomyl bajo las condiciones de un ensayo *in vitro*.
- *C. gloeosporioides* fue más sensible al benomyl pero más resistente frente al oxiclورو de cobre.
- La dosis de aplicación comercial de benomyl no demostró ser potencialmente fungicida ni fungistática sobre *C. acutatum*.
- Oxiclورو de cobre es un compuesto potencialmente fungicida y fungistático para *C. acutatum*.
- Clorotalonil es un compuesto químico altamente tóxico que generó un efecto fungistático y fungicida sobre ambas especies del patógeno.
- Mancozeb fue el producto químico que cumplió con todos los parámetros medidos en las dos pruebas debido a su efecto fungicida y fungistático con todas las tres dosis sobre las dos especies de *Colletotrichum*.
- En laboratorio, mancozeb es un producto medianamente tóxico pero de amplio espectro en el control de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*.








8. RECOMENDACIONES

- ◆ Evaluar y corroborar las pruebas en campo correspondientes a los cuatro compuestos químicos evaluados *in vitro* para el control de *C. acutatum* y de *C. gloeosporioides*.
- ◆ Realizar otros estudios en laboratorio para evaluar el comportamiento de otras cepas de las dos especies de *Colletotrichum* encontradas en diferentes regiones citrícolas del país.
- ◆ Ensayar tanto *in vitro* como en campo otros productos químicos de categoría toxicológica baja pero con alto poder de acción sobre el patógeno.
- ◆ Examinar otras alternativas preventivas y/o curativas para el control del patógeno, como por ejemplo, el uso de extractos vegetales.
- ◆ Promover la capacitación en las diferentes regiones citrícolas del país sobre el manejo y uso seguro de las aplicaciones de compuestos químicos; además, del momento oportuno de la aplicación, previo diagnóstico y/o dependiendo de las condiciones ambientales favorables al desarrollo de la enfermedad, teniendo en cuenta variables como la susceptibilidad o tolerancia de los cítricos a la enfermedad, fertilización, podas, riego, tiempo de floración y de recolección de los frutos, como también, la distribución y dispersión del cultivo.

9. BIBLIOGRAFÍA

- 📖 **Aceros Ortiz Pedro P. & Pineda A. Edwin O.** 1.997. *Efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento in vitro de *Colletotrichum lindemuthianum* y sobre la severidad de la antracnosis y los componentes de rendimiento de frijol (*Phaseolus vulgaris*) en dos regiones del departamento de Santander.* Trabajo de grado (Ing. Agrónomo). Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía, Instituto de Estudios Ambientales (IDEA). Bogotá D.C. 64 p.
- 📖 **Adaskaveg J. E. & Hartin R. J.** 1.997. *Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in California.* Phytopathology 87:9.
- 📖 **a Agostini J.P., Timmer L.W. & Mitchell D. J.** 1.992. *Morphological and Pathological characteristics of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus.* Phytopathology 82:11.
- 📖 **b Agostini J. P. & Timmer L. W.** 1.992. *Selective isolation procedures for differentiation of two strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus.* Plant Disease 76:11.
- 📖 **Agrios George N.** 1.999. *Fitopatología.* Segunda edición. Ed. Limusa, México, D.F. México. 838 p.
- 📖 **Anónimo.** 2.000. *Diccionario Agropecuario.* Ediciones HC, Ltda. Bogotá D.C., Colombia. 168 p.

- 📖 **Bayer Químicas Unidas S.A.** 2.000. Compendio de pesticidas agrícolas. Departamento fitosanitario. Bayer , Bogotá. Colombia. 122 p.
- 📖 **Bernstein B.**1.995. *Characteristics of Colletotrichum from peach, apple, pecan and other hosts.* Plant Disease 79:5.
- 📖 **Büchel K. H.** 1.983. *Chemestry of pesticides.* John Wiley & Sons, Adisson Wisley-Interscience Publication, New York. U.S.A. 518 p.
- 📖 **Cremlyn R. J.** 1.990. *Plaguicidas modernos y su acción bioquímica.* Ed. Limusa, Noriega editores. México. 356 p.
- 📖 **De la Isla Lourdes.** 1.994. *Fitopatología.* Segunda reimpresión. Noriega Editores, México, D.F. México. 384 p.
- 📖 **Eldon Brown G.** 1.975. *Factors affecting postharvest development of Colletotrichum gloeosporioides in citrus fruits.* Phytopathology 65: 404-409.
- 📖 **Förster H. & Adaskaveg J. E.** 1.999. *Identification of subpopulations of Colletotrichum acutatum and epidemiology of almond anthracnose in California.* Phytopathology 89:11.
- 📖 **a Freeman Stanley.** 1.996. *Characterization of Colletotrichum gloeosporioides isolates from avocado and almond fruits with molecular and pathogenicity tests.* Applied and Environmental Microbiology 62:3.
- 📖 **b Freeman Stanley.** 2.000. *Molecular analyses of Colletotrichum species from almond and other fruits.* Phytopathology 90:6.

-  **González L. C.** 1.977. *Introducción a la fitopatología*. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. San José, Costa Rica. 148 p.
-  **Guzmán Mora M. & Alarcón Torres R.** 1.997. *Establecimiento de metodología de evaluación de fungicidas in vitro y screening de 23 fungicidas promisorios para el control de la mancha marrón del arroz*. Tesis (Ing. Agrónomo). Corporación Universitaria de Ciencias Aplicadas y Ambientales. Facultad de ciencias agropecuarias, carrera de ingeniería agrónoma. Bogotá D.C., Colombia. 92 p.
-  **IPCS, International Programme on Chemical Safety.** 1.996. *Environmental Health Criteria 183 Chlorothalonil*. World Health Organization. Génova. 145 p.
-  **Posada Duque A. & Guzmán M. Herman.** 1.981. *Evaluación de fungicidas para el control de antracnosis *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. del tomate de árbol (*Cyphomanora betacea*)*. Tesis (Ing. Agrónomo). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. Medellín. 47 p.
-  **Romero Suárez Sandra Elizabeth.** 1.999. *Caracterización morfológica, molecular y variabilidad patogénica del agente causal de la antracnosis *Colletotrichum gloeosporioides* en tomate de árbol en Colombia*. Tesis (Magíster). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. Bogotá D.C.
-  **Roso E. Sterling T.** 1.973. *Control químico de la antracnosis (*Colletotrichum sp.*) del mango (*Mangifera indica L.*)*. Trabajo de grado. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. Bogotá D.C. 23 p.
-  **Tamayo M. Pablo J.** 1.995. *Recuperación de huertos de tomate de árbol afectados por antracnosis*. Ascolfi Informa 21:6.

- 📖 **Timmer L. W., Agostini J. P., Zitko S. E. & Zulfiqar M.** 1.994. Postbloom fruit drop, an increasingly prevalent disease of citrus in the Americas. The american phytopathological society. *Plant disease* 78:4.
- 📖 **Villegas Gerardo.** 1.983. *Plagas y enfermedades de los cítricos.* Agricultura de las Américas. Colombia. Marzo - No. 136.
- 📖 **Ware George W.** 1.982. *Pesticides: theory and application.* W. H. Freeman and company, San Francisco. U.S.A. 308 p.

9.1. Referencias bibliográficas de recursos electrónicos

- @ Biggs, Alan R., & Miller Stephen S. "Relative susceptibility of selected apple cultivars to *Colletotrichum acutatum*" [en línea]. USDA, GOV. 19 junio 2000, data/000011. <http://warp.nal.usda.gov/ttic/tektran/data/000011/42/000014221.html> [Consulta: 4 jul. 2002].
- @ Cornell University. Tree fruit & berry pathology [en línea]. Agricultural Experiment Station. [New York, U.S.A]: Cornell University, Geneva. 2.000. NYSAES, 2001. <http://www.nysaes.cornell.edu/pp/extension/tfabp/pestnews.shtml> [Consulta: 19 nov. 2001].
- @ Ellis, Michael A. & Erincik O. "Antracnose of strawberry" [en línea]. Ohio State University extension fact sheet plant pathology. 2021 coffey road, Columbus, OH 43210-1087. OSU:EDU, 2002. <http://ohjoline.osu.edu/hyg-fact/3000/3209.html> [Consulta: 19 nov. 2001].
- @ Extension Plant pathology. *Colletotrichum* [en línea]. Cooperative extension service. [Georgia, U.S.A]: Edward. A. Brown, extension program coordinator The University of Georgia. 2000. College of agriculture and environmental sciences. CES:UGA, 2001. <http://www.ces.uga.edu/Agriculture/planpath/plantdis/fungi/Colletotrichum.html> [Consulta: 11 feb. 2002]
- @ Futch, Stephen H. & Timmer L.W. "A guide to citrus disease" [en línea]. Florida:U.S.A. University of Florida- Cooperative extension service. Institute of food

- and agricultural sciences. EDIS, 2001. http://edis.ifas.ufl.edu/BODY_CH159
[Consulta: 8 feb. 2002].
- @ Gelski Jeff. "Growers sep pest control options" [en línea]. The Packer. FQPA Resources, Implementation. 12 jun. 2000. Karen Lutz Benbrook. Ecologic-IPM, 28 jul. 2000. http://www.ecologic-ipm.com/growers_seek_control.html [Consulta: 13 mar. 2002]
- @ Los cítricos (*Citrus spp.* Rutaceae). Cosme chaves: 2002. cosmech-tripod, 2.002.[en línea]. <http://cosmech.tripod.com/cultivos/cítricos.htm> [Consulta: 25 may. 2002]
- @ Oregon State University. Use of pesticides. Pest management guide for the Willamette Valley [en línea]. (2001: Oregon, U.S.A). Walnut. EM8421, Feb. 2002. <http://eesc.orst.edu/agcomwebfile/edmat/html/em/em8421/em8421.html> [Consulta: 4 may. 2002].
- @ Peres Natalia A.R. & et.al. "A fungicide application decision (FAD) support system for postbloom fruit drop citrus (PFD)". Published 31 jul. 2002. Plant health progress [en línea]. Plant health progress doi:10.1094/PHP-2002-0731-01-RV. Plant Management Network, 2002. <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/review/fruitdrop>
[Consulta: 9 ago. 2002]
- @ Pesticide information profiles (1996: U.S.A) Extension toxicology network. Exttoxnet [en línea]. ACE:ORST, june 1996. <http://ace.orst.edu/info/exttoxnet/pips/mancozeb.htm>
[Consulta: 4 may. 2002].
- @ Postbloom fruit drop (2002: Florida, U.S.A). Citrus pathology research and extension program [en línea]. Dr. Timmer, L.W. University of Florida, citrus research and education center. Florida:LAL-UFL, 17 june 2002. <http://www.lal.ufl.edu/timmer/PFDdiseasecycle.htm> [Consulta: 11 feb. 2002].

- @ Red Andina de información sanitaria agropecuaria. Antracnosis [en línea]. (2000: Quito, Ecuador) Saninet. Instituto interamericano de cooperación para la agricultura (IICA). 2000. <http://www.iicasaninet.net/pub/sanveg/html/frejol/antr.htm> [Consulta: 19 nov. 2001]
- @ Simone, Gary W. “Disease control in strawberry (*Fragaria vesca*)” [en línea]. Department of plant pathology. University of Florida. EDIS web site. 1.999, PG056. <http://edis.ifas.ufl.edu/BODY-PG056> [Consulta: 27 jun. 2002].
- @ Universidad de la República, Facultad de agronomía, Departamento de protección vegetal. Antracnosis[en línea]. Cátedra de fitopatología. [Montevideo, Uruguay], 14 dic. 2001. http://www.fagro.edu.uy/fitopato/web/Enfermedades_Vid/sld016.htm [Consulta: 8 feb. 2002]
- @ Ureña, Alvaro & et.al. “Oversummer survival in Florida of *Colletotrichum gloeosporioides* in Strawberry crowns” [en línea]. Department of plant pathology, University of Florida. June, 2001. Gainesville: Florida. UFL, 2001. <http://strawberry.ifas.ufl.edu/randeoversummer.htm> [Consulta: 27 jun. 2002].

10.
ANEXOS

BIBLIOTECA AGROPECUARIA
DE COLOMBIA

ANEXO 1.

201

DATOS DE ABC CRECIMIENTO *C. gloeosporioides*

07:51 Tuesday, July 23, 2002

Obs	REP	TRA	ABC
1	1	OXC-143	1128
2	1	OXC-36	1104
3	1	OXC-71	1368
4	1	TA-0	2088
5	2	OXC-143	1080
6	2	OXC-36	1056
7	2	OXC-71	1452
8	2	TA-0	2148
9	3	CXC-143	1032
10	3	CXC-36	1044
11	3	CXC-71	1476
12	3	TA-0	.

DATOS DE ABC CRECIMIENTO *C. acutatum*

202

07:51 Tuesday, July 23, 2002

Obs	REP	TRA	ABC
1	1	BEN-10	1164
2	1	BEN-20	1116
3	1	BEN-40	1092
4	1	CLOR-14	768
5	1	CLOR-28	792
6	1	CLOR-7	696
7	1	TA-0	1536
8	2	BEN-10	1104
9	2	BEN-20	1176
10	2	BEN-40	1056
11	2	CLOR-14	732
12	2	CLOR-28	720
13	2	CLOR-7	612
14	2	TA-0	1572
15	3	BEN-10	1176
16	3	BEN-20	1212
17	3	BEN-40	1068
18	3	CLOR-14	756
19	3	CLOR-28	708
20	3	CLOR-7	696
21	3	TA-0	.

ANAVA *C. acutatum* 07:51 Tuesday, July 23, 2002 203

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
TRA	7	BEN-10 BEN-20 BEN-40 CLOR-14 CLOR-28 CLOR-7 TA-0

Number of observations 21

NOTE: Due to missing values, only 20 observations can be used in this analysis.

ANAVA *C. acutatum* 07:51 Tuesday, July 23, 2002

204

The GLM Procedure

Dependent Variable: ABC

Sum of

C
 C . 740.00 3 CLOR-28
 C
 C 668.00 3 CLOR-7
 RESIDUALES C. C. ACUTATUM 07:51 Tuesday, July 23,

The UNIVARIATE Procedure
 Variable: RABC

Moments

N	20	Sum Weights	20
Mean	0	Sum Observations	0
Std Deviation	31.2072866	Variance	973.894737
Skewness	-0.28077	Kurtosis	-0.8172917
Uncorrected SS	18504	Corrected SS	18504
Coeff Variation	.	Std Error Mean	6.97816142

Basic Statistical Measures

Location		Variability	
Mean	0.0000	Std Deviation	31.20729
Median	6.0000	Variance	973.89474
Mode	-20.0000	Range	108.00000
		Interquartile Range	44.00000

NOTE: The mode displayed is the smallest of 2 modes with a count of 2.

Tests for Location: Mu0=0

Test	-Statistic-	-----p Value-----		
Student's t	t 0	Pr > t	1.0000	
Sign	M 1	Pr >= M	0.8238	
Signed Rank	S 1	Pr >= S	0.9783	

Tests for Normality

Test	--Statistic--	-----p Value-----	
Shapiro-Wilk	W 0.958714	Pr < W	0.5185
Kolmogorov-Smirnov	D 0.14592	Pr > D	>0.1500
Cramer-von Mises	W-Sq 0.055663	Pr > W-Sq	>0.2500
Anderson-Darling	A-Sq 0.328334	Pr > A-Sq	>0.2500

Quantiles (Definition 5)

Quantile	Estimate
100% Max	52
99%	52
95%	48
90%	36
75% Q3	24

RESIDUALES C. acutatum 07:51 Tuesday, July 23, 2002

The UNIVARIATE Procedure
 Variable: RABC

Quantiles (Definition 5)

Quantile	Estimate
50% Median	6
25% Q1	-20
10%	-48
5%	-54
1%	-56
0% Min	-56

Extreme Observations

----Lowest----		----Highest---	
Value	Obs	Value	Obs
-56	13	28	15
-52	2	28	6
-44	8	28	20
-32	19	44	16
-20	12	52	5

Missing Values

Missing Value	Count	Percent All Obs	Percent of Missing Obs
.	1	4.76	100.00

Stem	Leaf	#	Boxplot
4	42	2	
2	0888	4	+-----+
0	48668	5	*-+---*
-0	864	3	
-2	200	3	+-----+
-4	624	3	

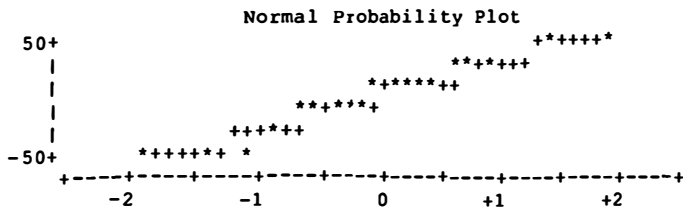
-----+-----+-----+-----+

Multiply Stem.Leaf by 10**+1

RESIDUALES *C. acutatum* 07:51 Tuesday, July 23,

2002 209

The UNIVARIATE Procedure
Variable: RABC



ANAVA *C. gloeosporioides* 07:51 Tuesday, July 23,

2002 210

The GLM Procedure
Class Level Information

Class	Levels	Values
TRA	4	OXC-143 OXC-36 OXC-71 TA-0

Number of observations 12

NOTE: Due to missing values, only 11 observations can be used in this analysis.
 ANAVA *C. gloeosporioides* 07:51 Tuesday, July 23,
 2002 211

The GLM Procedure

Dependent Variable: ABC

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	1655648.727	551882.909	260.04	<.0001
Error	7	14856.000	2122.286		
Corrected Total	10	1670504.727			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	ABC Mean
0.991107	3.383754	46.06827	1361.455

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRA	3	1655648.727	551882.909	260.04	<.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRA	3	1655648.727	551882.909	260.04	<.0001

ANAVA *C. gloeosporioides* 07:51 Tuesday, July 23,
 2002 212

The GLM Procedure

Bartlett's Test for Homogeneity of ABC Variance

Source	DF	Chi-Square	Pr > ChiSq
--------	----	------------	------------

TRA	3	0.5216	0.9141
-----	---	--------	--------

ANAVA *C. gloeosporioides* 07:51 Tuesday, July 23,
 2002 213

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for ABC

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher

Type II error rate than REGWQ

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	7
Error Mean Square	2122.286
Critical Value of Studentized Range	4.68124
Minimum Significant Difference	132.06
Harmonic Mean of Cell Sizes	2.666667

NOTE: Cell sizes are not equal.

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	TRA
A	2118.00	2	TA-0
B	1432.00	3	OXC-71
C	1080.00	3	OXC-143
C	1068.00	3	OXC-36

RESIDUALS C. acutatum 07:51 Tuesday, July 23,

2002 214

The UNIVARIATE Procedure
Variable: RABC

Moments

N	11	Sum Weights	11
Mean	0	Sum Observations	0
Std Deviation	38.5434819	Variance	1485.6
Skewness	-0.2942544	Kurtosis	-1.2630591
Uncorrected SS	14856	Corrected SS	14856
Coeff Variation	.	Std Error Mean	11.6212971

Basic Statistical Measures

Location		Variability	
Mean	0	Std Deviation	38.54348
Median	-227E-15	Variance	1486
Mode	.	Range	112.00000
		Interquartile Range	66.00000

Tests for Location: Mu0=0

Test	-Statistic-	-----p Value-----	
Student's t	t 0	Pr > t	1.0000
Sign	M -0.5	Pr >= M	1.0000
Signed Rank	S 0	Pr >= S	1.0000

Tests for Normality

Test	--Statistic--	-----p Value-----	
Shapiro-Wilk	W 0.938974	Pr < W	0.5085
Kolmogorov-Smirnov	D 0.152628	Pr > D	>0.1500
Cramer-von Mises	W-Sq 0.040206	Pr > W-Sq	>0.2500
Anderson-Darling	A-Sq 0.269736	Pr > A-Sq	>0.2500

Quantiles (Definition 5)

Quantile	Estimate
100% Max	4.80000E+01
99%	4.80000E+01

95% 4.80000E+01
 90% 4.40000E+01
 75% Q3 3.60000E+01
 50% Median -2.27374E-13
 25% Q1 -3.00000E+01
 RESIDUALES C. acutatum

07:51 Tuesday, July 23,

2002 215

The UNIVARIATE Procedure
 Variable: RABC

Quantiles (Definition 5)

Quantile	Estimate
10%	-4.80000E+01
5%	-6.40000E+01
1%	-6.40000E+01
0% Min	-6.40000E+01

Extreme Observations

----Lowest----		----Highest---	
Value	Obs	Value	Obs
-64	3	20	7
-48	9	30	8
-30	4	36	2
-24	10	44	11
-12	6	48	1

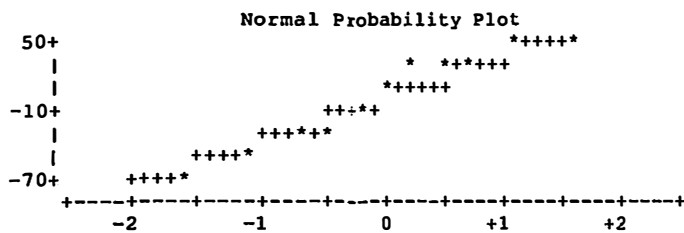
Missing Values

Missing Value	Count	-----Percent Of-----	
		All Obs	Missing Obs
.	1	8.33	100.00

Stem Leaf	#	Boxplot
4 48	2	
2 006	3	+-----+
0 0	1	*--+--*
-0 2	1	
-2 04	2	+-----+
-4 8	1	
-6 4	1	

-----+-----+-----+
 Multiply Stem.Leaf by 10**+1

The UNIVARIATE Procedure
Variable: RABC



ANEXO 2.

217

DATOS DE ABC GERMINACION *C. gloeosporioides*

07:51 Tuesday, July 23, 2002

Obs	tra	rep	ABC
1	B_10	1	56
2	B_10	2	97
3	B_10	3	91
4	ta_0	1	309
5	ta_0	2	260
6	ta_0	3	229

DATOS DE ABC GERMINACION *C. acutatum*

218

07:51 Tuesday, July 23, 2002

Obs	tra	rep	ABC
1	B_10	1	88
2	B_10	2	93
3	B_10	3	104
4	B_20	1	42
5	B_20	2	47
6	B_20	3	46
7	ocu_36	1	79
8	ocu_36	2	31
9	ocu_36	3	43
10	ta_0	1	312
11	ta_0	2	292
12	ta_0	3	255

ANAVA ABC GERMINACION *C. acutatum*

219

07:51 Tuesday, July 23, 2002

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
tra	4	B_10 B_20 ocu_36 ta_0

Number of observations 12
 ANAVA ABC GERMINACION *C. acutatum*

220

07:51 Tuesday, July 23, 2002

The GLM Procedure

Dependent Variable: ABC

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	116028.0000	38676.0000	100.83	<.0001
Error	8	3068.6667	383.5833		
Corrected Total	11	119096.6667			

R-Square Coeff Var Root MSE ABC Mean
 0.974234 16.41225 19.58528 119.3333

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
--------	----	-----------	-------------	---------	--------

tra 3 116028.0000 38676.0000 100.83 <.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
tra	3	116028.0000	38676.0000	100.83	<.0001

ANAVA ABC GERMINACION C. acutatum

221

07:51 Tuesday, July 23, 2002

The GLM Procedure

Bartlett's Test for Homogeneity of ABC Variance

Source	DF	Chi-Square	Pr > ChiSq
tra	3	7.4192	0.0597

ANAVA ABC GERMINACION C. acutatum

222

07:51 Tuesday, July 23, 2002

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for ABC

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher

Type II error rate than REGWQ

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	8
Error Mean Square	383.5833
Critical Value of Studentized Range	4.52880
Minimum Significant Difference	51.21

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	tra
A	286.33	3	ta_0
B	95.00	3	B_10
B	51.00	3	ocu_36
B	45.00	3	B_20

RESIDUALES ABC GERMINACION C. acutatum

223

07:51 Tuesday, July 23, 2002

The UNIVARIATE Procedure

Variable: RABC

Moments

N	12	Sum Weights	12
Mean	0	Sum Observations	0
Std Deviation	16.702386	Variance	278.969697
Skewness	0.00300204	Kurtosis	0.39429825
Uncorrected SS	3068.66667	Corrected SS	3068.66667
Coeff Variation	.	Std Error Mean	4.82156352

Basic Statistical Measures

Location		Variability	
Mean	0.00000	Std Deviation	16.70239
Median	-0.50000	Variance	278.96970
Mode	.	Range	59.33333
		Interquartile Range	14.83333

Tests for Location: Mu0=0

Test	-Statistic-	-----p Value-----		
Student's t	t	0	Pr > t	1.0000
Sign	M	0	Pr >= M	1.0000
Signed Rank	S	-1.5	Pr >= S	0.9248

Tests for Normality

Test	--Statistic--		-----p Value-----	
Shapiro-Wilk	W	0.958057	Pr < W	0.7558
Kolmogorov-Smirnov	D	0.149312	Pr > D	>0.1500
Cramer-von Mises	W-Sq	0.047267	Pr > W-Sq	>0.2500
Anderson-Darling	A-Sq	0.294368	Pr > A-Sq	>0.2500

Quantiles (Definition 5)

Quantile	Estimate
100% Max	28.00000
99%	28.00000
95%	28.00000
90%	25.66667
75% Q3	7.33333
50% Median	-0.50000

RESIDUALES ABC GERMINACION C. acutatum

224

07:51 Tuesday, July 23, 2002

The UNIVARIATE Procedure
Variable: RABC

Quantiles (Definition 5)

Quantile	Estimate
25% Q1	-7.50000
10%	-20.00000
5%	-31.33333
1%	-31.33333
0% Min	-31.33333

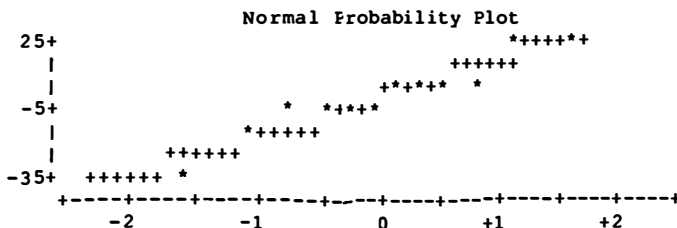
Extreme Observations

-----Lowest-----		-----Highest-----	
Value	Obs	Value	Obs
-31.3333	12	2.00000	5
-20.0000	8	5.66667	11
-8.0000	9	9.00000	3
-7.0000	1	25.66667	10
-3.0000	4	28.00000	7

```

Stem Leaf          #          Boxplot
  2 68             2             |
  1                |             |
  0 1269           4             +---+---+
 -0 8732           4             *-----*
 -1                |             |
 -2 0              1             |
 -3 1              1             0
  -----+-----+-----+-----+
Multiply Stem.Leaf by 10**+1

```



ANAVA ABC GERMINACION *C. gloeosporioides*

225 07:51 Tuesday, July 23, 2002

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
tra	2	B_10 ta_0

Number of observations 6

ANAVA ABC GERMINACION *C. gloeosporioides*

226 07:51 Tuesday, July 23, 2002

The GLM Procedure

Dependent Variable: ABC

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	51152.66667	51152.66667	48.32	0.0023
Error	4	4234.66667	1058.66667		
Corrected Total	5	55387.33333			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	ABC Mean
0.923544	18.73541	32.53716	173.6667

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
tra	1	51152.66667	51152.66667	48.32	0.0023

Source DF Type III S² Mean Square F Value Pr > F
 tra 1 51152.66667 51152.66667 48.32 0.0023
 ANAVA ABC GERMINACION *C. gloeosporioides*
 227 07:51 Tuesday, July 23, 2002

The GLM Procedure

Bartlett's Test for Homogeneity of ABC Variance

Source DF Chi-Square Pr > ChiSq
 tra 1 0.5439 0.4608
 ANAVA ABC GERMINACION *C. gloeosporioides*
 228 07:51 Tuesday, July 23, 2002

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for ABC

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ

Alpha 0.05
 Error Degrees of Freedom 4
 Error Mean Square 1058.667
 Critical Value of Studentized Range 3.92649
 Minimum Significant Difference 73.76

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping Mean N tra
 A 266.00 3 ta_0
 B 81.33 3 B_10
 RESIDUALES ABC GERMINACION *C. acutatum*

229 07:51 Tuesday, July 23, 2002

The UNIVARIATE Procedure
 Variable: RABC

Moments

N	6	Sum Weights	6
Mean	0	Sum Observations	0
Std Deviation	29.1021191	Variance	846.933333
Skewness	0.20847775	Kurtosis	-0.614143
Uncorrected SS	4234.66667	Corrected SS	4234.66667
Coeff Variation	.	Std Error Mean	11.8808904

Basic Statistical Measures

Location		Variability	
Mean	0.000000	Std Deviation	29.10212
Median	1.833333	Variance	846.93333
Mode	.	Range	80.00000
		Interquartile Range	41.00000

Tests for Location: Mu0=0

Test	-Statistic-		-----p Value-----
Student's t	t	0	Pr > t 1.0000
Sign	M	0	Pr >= M 1.0000
Signed Rank	S	0.5	Pr >= S 1.0000

Tests for Normality

Test	--Statistic--		-----p Value-----
Shapiro-Wilk	W	0.977241	Pr < W 0.9370
Kolmogorov-Smirnov	D	0.141319	Pr > D >0.1500
Cramer-von Mises	W-Sq	0.022008	Pr > W-Sq >0.2500
Anderson-Darling	A-Sq	0.159715	Pr > A-Sq >0.2500

Quantiles (Definition 5)

Quantile	Estimate
100% Max	43.00000
99%	43.00000
95%	43.00000
90%	43.00000
75% Q3	15.66667
50% Median	1.83333

RESIDUALES ABC GERMINACION C. acutatum

230

07:51 Tuesday, July 23, 2002

The UNIVARIATE procedure
Variable: RABC

Quantiles (Definition 5)

Quantile	Estimate
25% Q1	-25.33333
10%	-37.00000
5%	-37.00000
1%	-37.00000
0% Min	-37.00000

Extreme Observations

-----Lowest-----		-----Highest-----	
Value	Obs	Value	Obs
-37.00000	6	-25.33333	1
-25.33333	1	-6.00000	5
-6.00000	5	9.66667	3
9.66667	3	15.66667	2
15.66667	2	43.00000	4