

## Evaluación *in vitro* de fungicidas comerciales para el control de *Colletotrichum* spp., en mora de castilla

### *In vitro* evaluation of commercial fungicides for control of *Colletotrichum* spp., in blackberry

Viviana Gaviria-Hernández<sup>1</sup>, Luis Fernando Patiño-Hoyos<sup>2</sup>, Alegría Saldarriaga-Cardona<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Ing. Agropecuaria. Medellín, Colombia. vivigaviria\_87@hotmail.com

<sup>2</sup>I.A. MSc. Docente-investigador. Politécnico Jaime Isaza Cadavid. Medellín, Colombia. luisferph@gmail.com

<sup>3</sup>I.A. MSc. Fitopatología. Investigadora Agrícola. Corpoica C.I. La Selva, Rionegro, Colombia. asaldarriaga@corpoica.gov.co

Fecha de recepción: 19-02-2013

Fecha de aceptación: 08-04-2013

#### ABSTRACT

Efficiency *in vitro* of five chemical fungicides, three plant extracts and three biocontrol products were evaluated by their inhibition of mycelial growth percentage and inhibition of fungal biomass percentage, for *Colletotrichum gloeosporioides* strain 52 and *Colletotrichum acutatum* strain 168. In the group of chemical fungicides, the best results for inhibition of mycelial growth of both pathogens were obtained with Copper Hydroxide and Difenoconazole, showing 100% of inhibition. Regarding biomass inhibition, the products with higher inhibitory effect in *C. gloeosporioides* were Difenoconazole showing 100% of inhibition, and Benomyl, which inhibition was between 93% and 99%, and in *C. acutatum* was Difenoconazole with 100% inhibition and Azoxystrobin with an inhibition between 91% and 97%. Regarding the plant extracts group, *Citrus sinensis* and *C. grandis* composed extract, showed 100% inhibition of mycelial growth and fungal biomass, it was the most effective for controlling both strains of fungi. In the biocontrol products group, the inhibition of mycelial growth percentage of the based products on *Trichoderma lignorum* and *T. harzianum* was between 61% and 65% for *C. gloeosporioides*, and between 77% and 79% in *C. acutatum*, considered in the group of biocontrol products as the most efficient in the *in vitro* control of 52 and 168 strains of *Colletotrichum* spp.

**Key words:** chemical control, plant diseases, plant extracts, *Rubus glaucus* Benth, *Trichoderma* spp.

#### RESUMEN

Se evaluó la eficiencia *in vitro* de cinco fungicidas de síntesis química, tres extractos vegetales y tres productos a base de biocontroladores, mediante las variables porcentaje de inhibición del crecimiento micelial y porcentaje de inhibición de la biomasa de *Colletotrichum gloeosporioides* cepa 52 y *Colletotrichum acutatum* cepa 168. En el grupo de los productos de síntesis química, los mejores resultados en la inhibición del crecimiento micelial en ambas cepas, se obtuvo con hidróxido de cobre y difenoconazol, con 100% de inhibición. En cuanto a inhibición de la biomasa, los productos con mayor porcentaje de efecto inhibitorio en *C. gloeosporioides* fueron: difenoconazol (100%) y benomil (93% a 99%); en *C. acutatum* fueron: difenoconazol (100%) y azoxystrobin (91% a 97%). Respecto a los extractos vegetales, el extracto a base de *Citrus sinensis* y *C. grandis* presentó 100% de inhibición tanto del crecimiento micelial como de la biomasa, siendo el más efectivo en el control de ambas cepas del hongo. En el grupo de los biocontroladores, el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de los productos a base de *Trichoderma lignorum* y *T. harzianum* osciló entre 61% y 65% para *C. gloeosporioides*, y entre 77% y 79% para *C. acutatum*, considerados dentro del grupo de los biocontroladores como los más eficientes en el control *in vitro* de las cepas 52 y 168 de *Colletotrichum* spp.

**Palabras claves:** control químico, enfermedades de las plantas, extractos vegetales, *Rubus glaucus* Benth, *Trichoderma* spp.

## INTRODUCCIÓN

En Colombia, la antracnosis de la mora de castilla era una enfermedad considerada de escasa o ninguna importancia económica, ya que entre 1992 y 1996, su incidencia y severidad en los cultivos variaba según el año y la localidad (Tamayo, 2003). Posteriormente, a mediados del 2001, estudios realizados acerca de la identificación de enfermedades asociadas al cultivo de la mora, reportaron que la antracnosis fue la enfermedad que presentó mayor incidencia (52,90%) en cultivos de Caldas, Quindío y Risaralda (Botero *et al.*, 2002). Hoy en día la antracnosis en mora se considera de importancia económica, debido a que puede causar pérdidas que oscilan entre 50% y 70% de los tallos (Tamayo, 2003; Afanador *et al.*, 2009). En el país, *Colletotrichum gloeosporioides* y *C. acutatum* han sido identificados como principales causantes de antracnosis en la mora de castilla (Saldarriaga *et al.*, 2002), sin embargo nuevos reportes reconocen a *C. boninense* como un nuevo agente causal de la enfermedad (Marulanda *et al.*, 2007; Saldarriaga *et al.*, 2008; Afanador *et al.*, 2009).

En mora, la antracnosis causa principalmente secamiento, y muerte progresiva y descendente de ramas y tallos. Los síntomas presentes en estos órganos se caracterizan por la presencia de lesiones que inician en la porción basal de las espigas, en los pecíolos, pedúnculos y en los sitios de inserción de las ramas; los tejidos afectados suelen ser de color castaño claro y presentan pequeños puntos oscuros denominados acérvulos, los cuales pueden tornarse de color salmón en condiciones de alta humedad. Alrededor de las lesiones se puede observar un borde definido de color azul-violeta intenso, la lesión puede avanzar hasta cubrir y secar parcial o totalmente el tallo (Saldarriaga y Bernal, 2000; Tamayo, 2003; Saldarriaga *et al.*, 2008). Los síntomas en brotes tiernos se manifiestan por ennegrecimiento y marchitamiento de hojas jóvenes mientras que en frutos, principalmente maduros, los síntomas son esporádicos observándose necrosis, pudrición húmeda y deshidratación (Saldarriaga y Bernal, 2000; Tamayo y Peláez, 2000).

En diferentes cultivos, el manejo de esta enfermedad se ha fundamentado en prácticas de control cultural y uso de fungicidas químicos a base de oxiclورو de cobre, hidróxido cúprico, mancozeb, clorotalonil, captan, propiconazol, procloraz, benomil, thiabendazol y carbendazim (Arauz, 2000; Agrios, 2005). En Colombia, el uso de algunas de estas moléculas químicas ha oca-

sionado el rechazo de pulpas para exportación, debido a los altos contenidos de trazas encontrados en éstas. Por otro lado, organismos internacionales han venido replanteando el uso de moléculas como el clorotalonil, carbendazim y mancozeb por altos riesgos de carcinogenicidad (Naranjo, 2011).

Actualmente se han explorado alternativas de control con productos a base de biocontroladores y extractos vegetales, que generalmente poseen compuestos biodegradables, de baja toxicidad y no son específicos en su modo de acción, lo que implica baja probabilidad de desarrollo de resistencia (Tripathi y Dubey, 2004). Reportes documentan el buen funcionamiento de productos biológicos en el control de la antracnosis, como por ejemplo extractos de chirimoya (*Annona cherimola*), papaya (*Carica papaya*), lima (*Citrus aurantifolia*), eucalipto blanco (*Eucalyptus globulus*), ajo (*Allium sativum*), ají (*Capsicum* sp.) y de biocontroladores como *Trichoderma* sp., *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas cepacia* (PC 9701 BHI), *P. fluorescens* (98B-27) y *P. maltophilia* (Bravo, 1996; Botero, 2001; Montoya *et al.*, 2004; Hernández *et al.*, 2007).

El uso de fungicidas químicos sigue ocupando el primer lugar en el control de enfermedades, seguido por la rotación de estos con productos biológicos, los cuales han dado buenos resultados en el control de antracnosis y otras enfermedades en el cultivo de mora (Hincapié y Saldarriaga, 2009). En la presente investigación se exploró la eficiencia *in vitro* de diferentes productos comerciales tanto de uso convencional (fungicidas químicos) como no convencional (extractos vegetales y biocontroladores), con el propósito de contribuir al conocimiento de nuevas alternativas para el control de la antracnosis en mora.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las evaluaciones *in vitro* fueron realizadas en condiciones del laboratorio de fitopatología de Corpoica, centro de investigación La Selva, ubicado en Rionegro, Antioquia, con humedad relativa promedio de 71% y temperatura promedio de 21 +/- 1 °C, durante la fase de experimentación. Del cepario de *Colletotrichum* sp., existente en el laboratorio de fitopatología de este centro de investigación, se seleccionaron las cepas 52 de *C. gloeosporioides* y 168 de *Colletotrichum acutatum*, aisladas de cultivos de mora del oriente antioqueño.

Para cada cepa del hongo se determinó la eficiencia de once tratamientos, distribuidos en tres grupos: 1) Fungicidas químicos: Amistar® 50 WG (azoxystrobin), Benoagro® 50 WP (benomil), Derosal® 500 SC (carben-dazim), Score® 250 EC (difenoconazol) y Kocide® 101 (hidróxido de cobre). 2) Extractos vegetales: Desfan® 100 agrícola (*Citrus sinensis* y *C. grandis*), Ecoswing® (*Swinglea glutinosa*) y BfunK® (*Eucalyptus globulus*, *Allium sativum* y *Urtica urens*); este producto también contiene otros elementos y microorganismos destinados a la nutrición de la planta). 3) Grupo de los biocontroladores: Mycobac® (*Trichoderma lignorum*), Agroguard® (*Trichoderma harzianum*) y Rhapsody® (*Bacillus subtilis*).

Para cada tratamiento se evaluaron tres concentraciones: dosis comercial del producto, mitad de la dosis comercial, y dosis comercial más la mitad de ésta, expresadas en ppm de ingrediente activo para los fungicidas químicos y los extractos, y en ml/l para el producto comercial Rhapsody®. Para los productos a base de *Trichoderma* (Mycobac® y Agroguard®) no se determinaron concentraciones, ya que se observó la capacidad antagonista de los hongos empleando la metodología de placa dual de Hoyos-Carvajal *et al.* (2008) adaptada para el presente estudio. La eficiencia de los tratamientos se evaluó mediante las variables de porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (PICM) y porcentaje de inhibición de la biomasa (PIB) que se describen a continuación. Para los productos a base de *Trichoderma* solo se estimó el PICM.

### Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial

La metodología de dilución en plato con agar consistió en mezclar cada concentración del fungicida con el medio de cultivo agar papa dextrosa PDA de Merck, el cual fue previamente acidificado con ácido láctico al 50% hasta ajustar el pH del medio a 5,6. Posteriormente se realizó la siembra de muestras de 0,5 mm de cada cepa de *Colletotrichum*, en el centro de las cajas de Petri. El testigo experimental correspondió a la siembra del hongo en medio de cultivo (PDA-acidificado) sin suplementar con fungicidas. La medición del crecimiento micelial se realizó a partir del tercer día de la siembra del patógeno hasta el día 12 para la cepa 52 (*C. gloeosporioides*) y el día 18 para la cepa 168 (*C. acutatum*); tiempo durante el cual el testigo de cada prueba ocupó más del 70% de la caja de Petri. Los datos obtenidos al final de la medición fueron utilizados para calcular el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (PICM) del hongo, de la siguiente manera:

$$\text{PICM} = \left( \frac{\text{crecimiento testigo} - \text{crecimiento tratamientos}}{\text{crecimiento testigo}} \right) * 100$$

La metodología de caja dual se aplicó reactivando las esporas de los *Trichoderma* de los productos Agroguard® y Mycobac®, para lo cual se diluyó 1 g del producto comercial en 1 litro de agua destilada, luego se adicionaron 3 ml de la dilución sobre el medio de cultivo PDA-acidificado previamente servido en cajas de Petri. Estas cajas de Petri fueron incubadas en condiciones de laboratorio durante 8 días. Pasado el período de crecimiento de los antagonistas (*Trichoderma* spp.), se tomó una nueva caja de Petri servida con PDA-acidificado y sobre el medio de cultivo se colocaron las muestras de 0,5 mm de los patógenos (*C. gloeosporioides* o *C. acutatum*) a una distancia de tres centímetros del borde de la caja de Petri. Transcurridas 72 horas de la siembra del patógeno (*Colletotrichum* sp.), se tomó una muestra de 0,5 mm del biocontrolador (*Trichoderma* sp.) y se depositó al lado opuesto a tres centímetros del patógeno. El testigo de la prueba consistió en la siembra del patógeno en el medio de cultivo (PDA-acidificado) sin el antagonista (Hoyos-Carvajal *et al.*, 2008). Las mediciones del crecimiento micelial se realizaron de la misma forma descrita en la metodología de dilución en plato con agar.

### Porcentaje de inhibición de la biomasa

En recipientes de vidrio no graduados con capacidad de 300 ml previamente esterilizados, se adicionó caldo líquido Sabouraud al 2% marca Merck (150 ml/recipiente), mezclado con las respectivas concentraciones de los productos a evaluar; luego, en cada frasco, se realizó la siembra de un disco de 0,5 mm de las respectivas cepas del patógeno a evaluar. El testigo consistió en la siembra de las cepas (52 o 168) en el medio de cultivo líquido (caldo Sabouraud) sin suplementar con productos. Se incubó en condiciones de laboratorio durante nueve días tanto los testigos como los tratamientos, con un fotoperíodo de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad, sin agitación y con una relación de aireación de crecimiento de 1:1. Posteriormente, se realizó la cosecha pasando el hongo por un tul de organza previamente pesado, a través del cual se eliminó el líquido. El micelio filtrado se secó en una estufa a 50 °C durante 24 horas y posteriormente pesado. Una vez obtenidos estos datos, se estimó el porcentaje de inhibición de la biomasa (PIB) para cada uno de los tratamientos utilizando la fórmula:

$$\text{PIB} = \left( \frac{\text{peso micelio testigo} - \text{peso micelio tratamiento}}{\text{peso micelio testigo}} \right) * 100$$

Cada grupo de productos se evaluó independientemente, bajo un diseño completamente al azar (DCA), con cuatro repeticiones de cada concentración de los tratamientos. El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa R (versión 2.12.2), y se estimaron las diferencias entre los tratamientos mediante una prueba de comparación múltiple de Tukey (a nivel de 5%).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de varianza para las variables porcentaje inhibición del crecimiento micelial e inhibición de la biomasa presentó diferencias significativas entre los tratamientos, a un nivel de confianza del 95% para las cepas *C. gloeosporioides* cepa 52 y *C. acutatum* cepa 168, a excepción de los tratamientos realizados con el producto comercial Rhapsody® (*Bacillus subtilis*), en el cual no hubo diferencias significativas para la variable porcentaje de inhibición de la biomasa en la cepa 168 (*C. acutatum*).

En las variables porcentaje de inhibición de crecimiento micelial y porcentaje de inhibición de la biomasa, las dosis 50, 100 y 150 ppm del fungicida Score 250® EC (difenoconazol) inhibieron el 100% del crecimiento micelial y la producción de la biomasa para ambas cepas; tanto la dosis recomendada como las dosis por encima y por debajo de la comercial fueron efectivas en el control *in vitro* (tabla 1).

En los tratamientos evaluados con el fungicida comercial Kocide® 101 (hidróxido de cobre) se presentaron grandes diferencias entre los resultados de las variables porcentaje de inhibición del crecimiento micelial y porcentaje de inhibición de la biomasa. En la inhibición del crecimiento micelial, las tres dosis de este producto fueron 100% efectivas para ambas cepas; sin embargo, en la variable inhibición de la biomasa ningún tratamiento fue totalmente eficiente. El porcentaje de inhibición de la biomasa en la cepa *C. gloeosporioides* 52 osciló entre 69% y 96%, cuyo tratamiento más efectivo correspondió a la dosis por encima de la recomendada (3690 ppm);

**Tabla 1.** Porcentajes de inhibición del crecimiento micelial (PICM) y porcentajes de inhibición de la biomasa (PIB) del grupo de los fungicidas químicos

Químicos	Concentración	<i>C. gloeosporioides</i> (52)		<i>C. acutatum</i> (168)	
		PICM (%)	PIB (%)	PICM (%)	PIB (%)
Amistar® 50WG	32 ppm	46,00 d*	32,50 h	62,50 c	96,00 ab
	63 ppm	45,25 d	42,25 g	64,00 bc	97,00 ab
	95 ppm	38,75 d	31,25 h	70,00 b	91,00 ab
Benoagro® 50 WP	125 ppm	74,50 c	93,00 cd	7,25 g	31,50 f
	250 ppm	78,75 bc	95,50 bc	8,25 g	38,75 ef
	375 ppm	83,75 b	99,00 ab	16,75 f	47,25 de
Derosal® 500 SC	300 ppm	85,75 b	98,00 ab	33,75 e	47,00 de
	600 ppm	85,50 b	96,00 bc	46,50 d	54,00 d
	900 ppm	85,25 b	82,50 e	47,75 d	75,25 c
Score® 250 EC	50 ppm	100,00 a	100,00 a	100,00 a	100,00 a
	100 ppm	100,00 a	100,00 a	100,00 a	100,00 a
	150 ppm	100,00 a	100,00 a	100,00 a	100,00 a
Kocide® 101	1230 ppm	100,00 a	69,00 f	100,00 a	31,00 f
	2460 ppm	100,00 a	90,00 d	100,00 a	95,30 ab
	3690 ppm	100,00 a	96,00 bc	100,00 a	86,30 bc

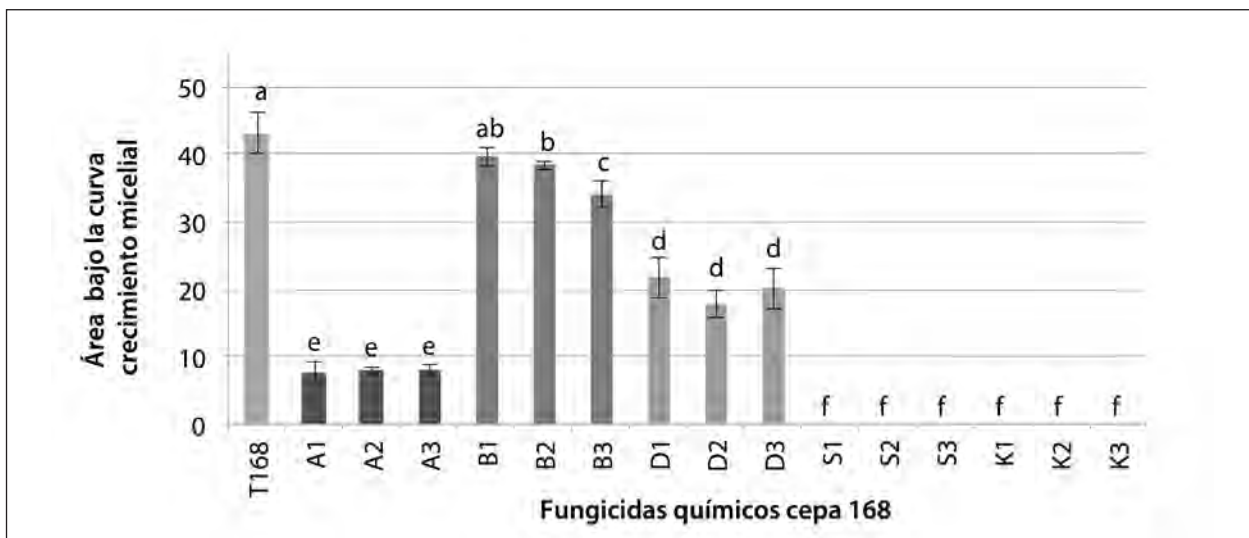
Porcentajes seguidos de letras diferentes denotan diferencias significativas según la prueba de Tukey,  $p = 0,05$ .

y en *C. acutatum*, osciló entre 31% y 95% y mostró mayor eficiencia la dosis recomendada (2460 ppm) (tabla 1). La menor efectividad del Kocide® 101 en el medio de cultivo líquido Sabouraud posiblemente esté asociada a las características físicas propias del producto, mas no a la eficiencia del ingrediente activo en el control de los patógenos, ya que según Mendoza (2010) los fungicidas cúpricos a base de cobre metálico poseen baja solubilidad en agua. Lo anterior es una propiedad física que en condiciones de campo puede ser útil, ya que reportes de Echeverri *et al.* (2007) sobre ensayos realizados con diferentes productos cúpricos mencionan que Kocide® 101 (hidróxido de cobre) presentó mayor adherencia a los frutos de tomate de árbol durante las épocas de lluvia, lo cual conllevó a reducir en 70% la aparición de síntomas de antracnosis.

Respecto a los fungicidas Benoagro® 50 WP (benomil) y Derosal® 500 SC (carbendazim), las tres concentraciones de ambos productos presentaron altos porcentajes de inhibición de *C. gloeosporioides*, obteniéndose con el Benomil un PICM que osciló de 74% a 83% y un PIB de 93% a 99%; y con el carbendazim un PICM que osciló de 82% a 98% y un PIB de 85,25% a 85,75% (tabla 1). Para la cepa 168 (*C. acutatum*), estos mismos fungicidas mostraron un bajo efecto inhibitorio tanto del crecimiento micelial como de la biomasa, el Benoagro® 50 WP (benomil) fue el fungicida con los menores PICM (entre 7% y 16%), y PIB (entre 31% y 47%) para *C. acutatum* (tabla 1).

El área bajo la curva del crecimiento del patógeno *C. acutatum* en presencia de Benoagro® 50 WP (benomil) fue similar a la del testigo (figura 1). Los anteriores resultados concuerdan con lo citado por diferentes autores acerca del benomil. Aunque este es un fungicida utilizado para control de la antracnosis en diferentes cultivos, durante muchos años se ha reportado la resistencia de *C. acutatum* a este compuesto (Baily y Jeger, 1991; De los Santos y Romero, 2002; Peres *et al.*, 2002; Peres *et al.*, 2005). Según Peres *et al.* (2005), niveles de 0,1 a 1,0 µl/ml de benomil inhiben totalmente el crecimiento de algunas especies de *Colletotrichum*, mientras que en *C. acutatum* la inhibición es sólo de 20% a 50%.

Por otro lado, en pruebas de sensibilidad a benomil, realizadas a cepas de *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* colectadas de tallos e inflorescencias de mora procedentes de cultivos del oriente antioqueño, Rueda (2010) reportó que de 36 aislamientos evaluados de *C. acutatum*, 19 fueron clasificados como moderadamente resistentes, 15 altamente resistentes, y ninguno de ellos fue sensible al fungicida. También existen otras especies de *Colletotrichum* que son resistentes a este compuesto, por ejemplo Smith y Black (1991) en De los Santos y Romero (2002) reportaron la resistencia al benomil en algunas cepas de *C. fragariae*. El grupo de los benzimidazoles dentro del cual se encuentran el benomil y el carbendazim es considerado de alto riesgo de resistencia (FRAC, 2007).



**Figura 1.** Comportamiento de *Colletotrichum acutatum* (cepa 168) respecto a las dosis evaluadas de los fungicidas químicos  
**Convenciones:** testigo de la cepa 168 (T168). Amistar: (A1) 32 ppm, (A2) 63 ppm y (A3) 95 ppm. Benoagro: (B1) 125 ppm, (B2) 250 ppm y (B3) 375 ppm. Derosal: (D1) 300 ppm, (D2) 600 ppm y (D3) 900 ppm. Score: (S1) 50 ppm, (S2) 100 ppm y (S3) 150 ppm. Kocide: (K1) 1230 ppm, (K2) 2460 ppm y (K3) 3690 ppm  
 Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey = 0,05.

**Tabla 2.** Porcentajes de inhibición del crecimiento micelial (PICM) y porcentajes de inhibición de la biomasa (PIB) del grupo de los extractos vegetales

Químicos	Concentración	<i>C. gloeosporioides</i> (52)		<i>C. acutatum</i> (168)	
		PICM (%)	PIB (%)	PICM (%)	PIB (%)
BfunK®	750 ppm	1,75 d *	15,75 d	16,25 e	25,00 c
	1500 ppm	16,25 c	29,50 c	15,50 e	24,75 c
	2250 ppm	17,25 cd	37,25 c	40,50 c	24,50 c
Ecoswing®	725 ppm	44,00 b	35,00 c	51,50 b	71,50 b
	1450 ppm	19,50 c	37,00 c	29,25 d	71,50 b
	2175 ppm	85,25 a	49,25 b	33,25 cd	58,75 b
Desfan® 100 agrícola	172 ppm	100,00 a	100,00 a	100,00 a	100,00 a
	344 ppm	100,00 a	100,00 a	100,00 a	100,00 a
	516 ppm	100,00 a	100,00 a	100,00 a	100,00 a

Porcentajes seguidos de letras diferentes denotan diferencias significativas según la prueba de Tukey,  $p = 0,05$ .

Con relación a los extractos vegetales, los resultados obtenidos en las tres dosis del Desfan® 100 agrícola (*Citrus sinensis* y *C. grandis*) mostraron una inhibición total del crecimiento micelial y de la producción de biomasa de ambas cepas. Según reportes de Manthey (2004), el éxito de los extractos cítricos a base de *C. sinensis* se debe a la presencia de altas concentraciones de compuestos fenólicos o flavonoides como flavonas y glicósidos de flavona, los cuales según Tripathi y Dubey (2004) son metabolitos secundarios que poseen la capacidad de formar alcoholes y ésteres que inhiben el crecimiento de las hifas e impiden la germinación de esporas, además de ser inhibidores enzimáticos que afectan la respiración celular de los hongos. El biofungicida Ecoswing® (*Swinglea glutinosa*) presentó un mediano efecto inhibitorio de las variables evaluadas para *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*, sin embargo, los resultados obtenidos para ambas cepas (52 y 168) fueron variables y no se pudo establecer claramente su efectividad (tabla 2).

Las tres dosis evaluadas del producto B-funk® (*Eucalyptus globulus*, *Urtica urens* y *Allium sativum*) presentaron poco efecto inhibitorio en el crecimiento micelial y en la producción de biomasa de *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* (tabla 2). Considerando las especificaciones de la ficha técnica del producto, posiblemente el BfunK® tenga mejores efectos como fertilizante que como fungicida; probablemente los extractos vegetales que contiene este producto poseen sustancias que contribuyen

principalmente a la inducción de resistencia en la planta, más que a la actividad antifúngica directa sobre el patógeno. Zuluaga *et al.* (2007) evaluaron la efectividad del Biofun® (registrado por el ICA como BfunK®) en rotación con fungicidas químicos utilizados en banano, y observaron que este producto presentó buenos resultados en el control de *Mycosphaerella fijiensis*, al registrarse un control de la enfermedad estadísticamente igual al control obtenido con los productos convencionales, lo que redujo en 46% el uso de fungicidas químicos.

En los tratamientos que incluyeron el uso de los biocontroladores Agroguard® (*Trichoderma harzianum*) y Mycobac® (*T. lignorum*), para ambas cepas de *Colletotrichum* se obtuvieron valores de PICM entre 61% y 79%, y presentaron mayor porcentaje de inhibición respecto a los tratamientos realizados con el producto a base de *B. subtilis* (Rhapsody) cuyos valores oscilaron entre 26% y 44% (tabla 3). No obstante, el área de crecimiento micelial de la cepa 52 de *C. gloeosporioides* fue mayor para *T. harzianum* y *T. lignorum* que para las dosis evaluadas del Rhapsody® (figura 2a); diferente a lo ocurrido con la cepa 168 (figura 2b). Estas diferencias se deben al comportamiento del patógeno en cuanto a su crecimiento, y al mecanismo de acción y el tiempo en el cual los *Trichodermas* parasitaron y detuvieron totalmente el crecimiento micelial de ambas cepas, que para *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* ocurrió luego del décimo y sexto día de la siembra, respectivamente.

**Tabla 3.** Porcentajes de inhibición del crecimiento micelial (PICM) y porcentajes de inhibición de la biomasa (PIB), del grupo de los biocontroladores

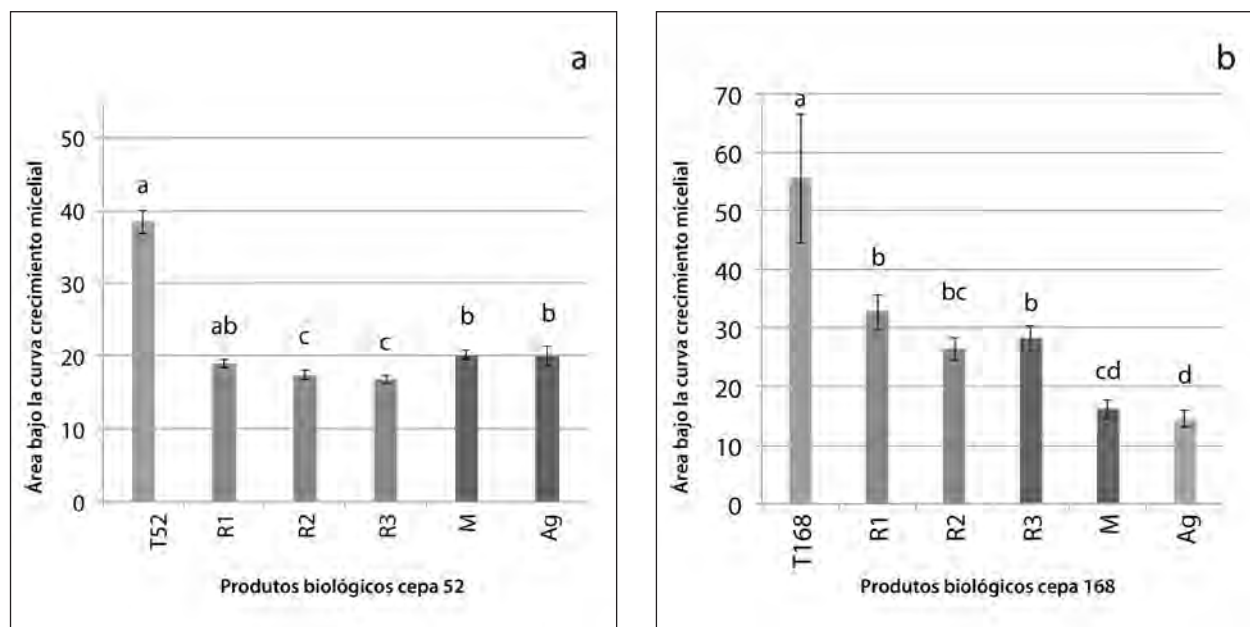
Químicos	Concentración	<i>C. gloeosporioides</i> (52)		<i>C. acutatum</i> (168)	
		PICM (%)	PIB (%)	PICM (%)	PIB (%)
Rhapsody®	2,5 ml/l	41,75 b *	38,45 b	26,75 c	57,50
	5,0 ml/l	44,00 b	63,22 a	37,50 b	38,75
	7,5 ml/l	44,50 b	55,52 a	35,00 b	39,25
Agroguard®		61,5 a		77,00 a	
Mycobac®		61,5 a		79,25 a	

\* Porcentajes seguidos de letras diferentes denotan diferencias significativas según la prueba de Tukey,  $p = 0,05$ .

\*\* No se presentaron diferencias significativas entre los resultados de la prueba.

Estudios *in vitro* e *in vivo* mencionan la efectividad antagonista de *Trichoderma* sp., y *Bacillus subtilis* para el control de *Colletotrichum* sp. Martins *et al.* (2007) reportaron que de 20 cepas evaluadas de *Trichoderma* sp., (de las cuales 10 correspondían a la especie *T. harzianum*) todas inhibieron el crecimiento *in vitro* de *C. gloeosporioides*, y observaron un fuerte parasitismo sobre el patógeno. Así mismo, estudios *in vivo* realizados por Freeman *et al.* (2004) demuestran la eficiencia de distintas especies de *Trichoderma*, utilizadas de manera tanto individual como conjunta, en la reducción de la incidencia de *C. acutatum* en plantas de fresa. Por otro

lado, Montoya *et al.* (2004) demuestran la eficiencia tanto *in vitro* como *in vivo* de *B. subtilis* en el control de *C. gloeosporioides* en frutos de aguacate. Sin embargo, aunque Kupper *et al.* (2003) obtuvieron resultados eficientes *in vitro* con *B. subtilis* en la inhibición del crecimiento micelial de *C. acutatum* en cítricos, en campo el control de síntomas en flores y frutos fue ineficiente. Esto concuerda con lo sugerido por Bravo (1996), quien menciona que la efectividad de inhibición *in vitro* de *B. subtilis* sobre hongos fitopatógenos depende de la cantidad y de la velocidad de difusión de los metabolitos producidos por la bacteria, sobre el medio de cultivo.



**Figura 2.** Comportamiento de *Colletotrichum gloeosporioides* con respecto a los biocontroladores. a. Área bajo la curva del crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* (cepa 52) b. Área bajo la curva del crecimiento micelial de *C. acutatum* (cepa 168) Convenciones: testigo *C. gloeosporioides* (T52); testigo *C. acutatum* (T168); Rhapsody (*B. subtilis*): (R1) 2,5 ml/l, (R2) 5 ml/l y (R3) 7,5 ml/l; Mycobac (*T. lignorum*) (M), Agroguard (*T. harzianum*) (Ag).

Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey = 0,05.

## CONCLUSIONES

El Score 250° EC (difenoconazol) y el Kocide® 101 (hidróxido de cobre) fueron los fungicidas químicos con mayor eficiencia *in vitro* en el control de *C. gloeosporioides* y de *C. acutatum*. Se observó la baja efectividad del Benoagro® 50 WP (benomil) en el control de *C. acutatum*, concordando con reportes realizados por Bailey y Jeger (1992), De los Santos y Romero (2002), Peres *et al.* (2002) y Rueda (2010).

De los extractos vegetales, el Desfan® 100 agrícola (*Citrus sinensis* y *C. grandis*) demostró ser el producto más eficiente en el control de ambas cepas de *Colletotrichum*, sin embargo, se recomienda determinar su eficiencia en campo.

Los productos Mycobac® (*Trichoderma lignorum*) y Agroguard® (*T. harzianum*) demostraron ser eficaces en el control de *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*, considerando el fuerte grado de micoparasitismo y la rápida colonización que presentaron las cepas de *Trichoderma*.

En este estudio, los fungicidas químicos presentaron una alta eficiencia en el control de ambas cepas de *Colletotrichum* (*C. gloeosporioides* y *C. acutatum*); sin embargo, es de considerar que los productos utilizados en la investigación pertenecen a grupos químicos como los bencimidazoles, estrobilurinas y triazoles, los cuales son considerados con alta probabilidad de desarrollar

resistencia debido a su modo de acción específico o unisitio (FRAC, 2007).

Los fungicidas cúpricos como el hidróxido de cobre, por su mecanismo de acción multisitio no específico poseen bajo riesgo para el desarrollo de resistencia (Kumar *et al.*, 2007).

Los productos a base de extractos vegetales como Desfan® 100 agrícola (*Citrus sinensis* y *C. grandis*), y de biocontroladores como Mycobac® (*Trichoderma lignorum*) y Agroguard® (*T. harzianum*) pueden contribuir a disminuir los niveles de trazas de agroquímicos en los frutos, los cuales además de su efecto tóxico constituyen una barrera a la comercialización, y un riesgo en la aparición de biotipos fitopatógenos resistentes.

Finalmente, se plantea una posible integración de alternativas de control de diferente naturaleza (química o biológica) en programas de manejo integrado de la antracnosis de la mora.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento a la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica), a la Asociación Hortifrutícola de Colombia (Asohofrucol) y al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.

## REFERENCIAS

- Agrios G. 2005. Plant Pathology. 5th edition. New York. Academic Press, 922 p.
- Afanador L, Álvarez E, Mejía J. 2009. Especies de *Colletotrichum* causantes de la antracnosis de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) en Colombia. Memorias del XXIX Congreso Nacional Fitopatología y Ciencias Afines –ASCOLFI-. Medellín, Editorial ASCOLFI, p. 107–108.
- Arauz L. 2000. Mango Anthracnose: Economic impact and current options for integrated management. En: Plant Disease 86 (6):600–611. Consulta: agosto de 2010. <http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PDIS.2000.84.6.600>;
- Bailey JA, Jeger MJ. 1992. *Colletotrichum*: Biology, Pathology and control. United Kingdom, British Society for Plant Pathology, 388 p.
- Botero M. 2001. Interacción biológica de microorganismos relacionados con *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz y Sacc., agente causal de la antracnosis en tomate de árbol (*Solanum betaceae* (Cav.) Sendt). Trabajo de grado para optar al título de Magister en Fitopatología. Manizales, Universidad de Caldas, 183 p.
- Botero M, Ríos G, Franco G, Romero M, Pérez J, Morales E, Gallego J, Echeverri I. 2002. Identificación y especialización de enfermedades asociadas a los cultivos de mora (*Rubus glaucus* Benth) en el eje cafetero. En: Memorias del Cuarto Seminario Nacional de Frutales de Clima Frío Moderado. Medellín, Corpoica y Universidad Pontificia Bolivariana, p. 87-99.
- Bravo N. 1996. Efecto *in vitro* de *Bacillus* sp., sobre el crecimiento, esporulación y germinación de conidias y esporas de nueve hongos. Fitopatología Colombiana 17 (2): 62-72.
- De Los Santos B, Romero F. 2002. Effect of different fungicides in the control of *Colletotrichum acutatum*, causal agent of anthracnose crown rot in strawberry plants. Crop Protection. 21:11–15.
- Echeverri L, Echeverri C, Navarro R, Gaviria B. 2007. Evaluación de fungicidas cúpricos para el control de antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) del tomate de árbol en el municipio de Rionegro. Revista Universidad Católica de Oriente (24):99-108.
- Freeman S, Minz D, Kolesnik I, Barbul O, Zveibil A, Maymon M, Nitzani Y, Kirshner B, Rav-David D, Bilu A, Dag A, Shafir S, Elad Y. 2004. European Journal of Plant Pathology 110:361–370.

- Fungicide Resistance Action Committee (FRAC). 2007. FRAC Code list ©\*: Fungicides sorted by mode action. En: [http://www.frac.info/frac/publication/anhang/FRAC\\_Code\\_List\\_2007\\_web.pdf](http://www.frac.info/frac/publication/anhang/FRAC_Code_List_2007_web.pdf), consulta: marzo de 2011.
- Hernández R, Barrera L, Bautista S, Bravo L. 2007. Antifungal potential of crude plant extracts on conidial germination of two isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc. En: Revista Mexicana de Fitopatología 25(002):180-185, <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/612/61225213.pdf>; consulta: diciembre de 2010.
- Hincapié O, Saldarriaga A. 2009. Avances de investigación en la exploración de alternativas para el manejo integrado de las principales enfermedades de la mora. En: Memorias publicadas en CD Seminario de actualización tecnológica: Cultivo, agroindustria y comercialización de la mora de castilla. Rionegro, Corpoica C.I La Selva, Antioquia, Colombia.
- Hoyos-Carvajal L, Duque G, Orduz S. 2008. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp., sobre aislamientos de *Sclerotinia* spp. y *Rhizoctonia* spp. Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas 2(1):76-86.
- Kumar A, Reddy N, Reddy K, Devi M. 2007. Evaluation of fungicidal resistance among *Colletotrichum gloeosporioides* isolates causing mango anthracnose in Agri export zone of Andhra Pradesh, India. Plant Pathology Bulletin 16:157-160.
- Kupper K, Gimenes-Fernandez N, De Goes F. 2003. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. En: Fitopatologia Brasileira 28(3): 251-257, <http://www.scielo.br/pdf/fb/v28n3/a05v28n3.pdf>. Consulta: junio de 2011.
- Manthey J A. 2004. Fractionation of orange peel phenols in ultra-filtered molasses and mass balance studies of their antioxidant levels. J. Agric. Food Chem. 52(25):7586-7592.
- Marulanda M, Isaza L, Ramírez A. 2007. Identificación de la especie de *Colletotrichum* responsable de la antracnosis en la mora de castilla en la región cafetera. En: Scientia et Technica Año XIII. (37):585-590, [http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/html/849/84937101/84937101\\_1.html](http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/html/849/84937101/84937101_1.html). Consulta: agosto de 2010.
- Martins I, Peixoto J, Menêzes J, Mello, S. Avaliação *in vitro* do antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *Colletotrichum gloeosporioides*. 2007. En: Boletim de pesquisa e desenvolvimento Embrapa (193) <http://www.cenargen.embrapa.br/clp/publicacoes/2007/bpd/bpd193.pdf>. Consulta: noviembre de 2012.
- Mendoza G. 2010. Utilización del cobre en la agricultura intensiva. En: Actualidad del campo agropecuario (110):30-32, <http://issuu.com/adca/docs/agosto2010>. Consulta: marzo de 2011.
- Montoya C, Vargas E, Villegas L. 2004. Evaluación de bacterias con potencial de biocontrol sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal de la antracnosis en frutos de aguacate (*Persea americana*). Revista ASIAVA 64:13-18.
- Naranjo J. 2011. Propuesta de un perfil de riesgo químico establecido para la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth.) producida en Colombia. Trabajo de grado para optar al título de Master en Gerencia de Programas Sanitarios en Inocuidad de Alimentos. San José, Costa Rica, Universidad para la Cooperación Internacional, 76 p.
- Peres N, Souza N, Zitko S, Timmer L. 2002. Activity of benomyl for control of postbloom fruit of citrus caused by *Colletotrichum acutatum*. En: Plant Disease 86(6):620-624, <http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PDIS.2002.86.6.620>; consulta: septiembre de 2010.
- Peres N, Timmer L, Adaskaveg J, Correl J. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. 2005. Plant Disease 89(8).
- Rueda K. 2010. Caracterización molecular de especies de *Colletotrichum* prevalentes en las zonas productoras de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) en Antioquia. Trabajo de grado para optar al título de Magister en Biotecnología. Medellín, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, 143 p.
- Saldarriaga A, Bernal J. 2000. Enfermedades asociadas al cultivo de mora (*Rubus glaucus* Benth) en el departamento de Antioquia. En: Memorias del Tercer Seminario de Frutales de Clima Frío Moderado. Manizales, Colombia, Corpoica. p. 132-135.
- Saldarriaga A, Rodríguez E, Arango R. 2002. Estudios biológicos de aislamientos de *Colletotrichum* sp., a partir de frutos de tomate de árbol, manzano y tallos de mora. En: Memorias VIII Congreso Corporación para Investigaciones Biológicas –CIB-. Medellín, CIB, p. 21.
- Saldarriaga A, Castaño-Zapata J, Arango R. 2008. Caracterización del agente causal de la antracnosis en tomate de árbol, manzano y mora. Revista Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales 32(123):145-156.
- Tamayo P. 2003. Principales enfermedades del tomate de árbol, la mora y el lulo en Colombia. Boletín técnico 20. 2a edición. Rionegro, Colombia, Corpoica, Centro de Investigación La Selva, 40 p.
- Tamayo P, Peláez A. 2000. Caracterización de daños y pérdidas causadas por enfermedades del fruto de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) en Antioquia. En: Memorias del Tercer Seminario de Frutales de Clima Frío Moderado. Manizales, Colombia. Corpoica. p 174-179.
- Tripathi P, Dubey N. 2004. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. Postharvest Biology and Technology 32(3):325-245.
- Zuluaga C, Patiño L, Collazos J. 2007. Integración de inducción de resistencia con bacterias quitinolíticas en el control de la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en banano. Revista de la Facultad Nacional de Agronomía 60(2):3891-3905.