

SENSIBILIDAD A TRES FUNGICIDAS EN AISLAMIENTOS DE *Colletotrichum*
spp OBTENIDOS DE *Solanum betaceum* EN EL DEPARTAMENTO DE
PUTUMAYO.

CAROLINA BURBANO RUALES

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE BIOLOGIA
SAN JUAN DE PASTO
2010

SENSIBILIDAD A TRES FUNGICIDAS EN AISLAMIENTOS DE *Colletotrichum* spp
OBTENIDOS DE *Solanum betaceum* EN EL DEPARTAMENTO DE PUTUMAYO.

CAROLINA BURBANO RUALES

Pasantía presentada como requisito parcial para optar al título de bióloga

Directora:

MsC. LUZ ESTELA LAGOS MORA

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE BIOLOGIA
SAN JUAN DE PASTO
2010

“Las ideas y conclusiones aportadas en este trabajo, son responsabilidades exclusivas del autor, Artículo 1º del acuerdo No. 324 de Octubre 11 de 1966 del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño”.

Nota de aceptación:

Directora

Jurado

Jurado

San Juan de Pasto, Noviembre de 2010

AGRADECIMIENTOS

A Dios por sus bendiciones y otorgarme fortaleza.

A mis padres por brindarme la oportunidad de continuar mis estudios y darme todas sus enseñanzas, su cariño y comprensión.

A la profesora Luz Estela Lagos por su colaboración, enseñanzas, confianza y por guiarme en la realización de este trabajo.

A mis jurados Rodrigo Prieto y Luis Alfredo Molina por su disposición de tiempo y la valoración de mi trabajo.

A los profesores del departamento por sus valiosos aportes para mi desarrollo profesional.

A Guido Villota y a Elkin Noguera por sus sugerencias y opiniones y por su gran amistad.

A mi hermana, a mi prima Diana y a Alvaro Chaves por su apoyo, buenos consejos y por ser mi compañía. Se que cuento con ellos siempre.

A mis amigas del laboratorio del grupo GENPAT su colaboración fue muy importante para el desarrollo de mi tesis, por brindarme sus conocimientos y por su amistad incondicional, principalmente a Ana Estrada y Carolina Obando por su paciencia y apoyo.

Gracias a todos mis amigos por compartir muchos momentos de alegría en mi vida.

RESUMEN

La antracnosis causada por *Colletotrichum* spp, es considerada la enfermedad más importante en cultivos de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) causando pérdidas hasta de un 100% de su producción en Colombia. El uso intensivo de fungicidas, ha incrementado su severidad induciendo procesos de selección de cepas resistentes y patogénicas. En esta investigación se evaluó la sensibilidad *in vitro* de 25 aislamientos monospóricos de *Colletotrichum* spp del departamento del Putumayo, a los fungicidas antracol, benomil y mertec, basado en su efecto sobre la tasa de esporulación, crecimiento micelial utilizando el parámetro AUDPC y porcentajes de inhibición. A partir de estas variables se establecieron las EC_{50} .

Antracol inhibió el crecimiento del patógeno hasta en 40% con 0.1µg/ml y alcanzó 100% de inhibición en 10000 µg/ml, con benomil y mertec se logró reducción drástica del crecimiento desde 0.1 y 1µg/ml alcanzando porcentajes de inhibición mayores al 50%, en 10 a 1000µg/ml presentaron porcentajes de 60 a 95% y hasta 96% en 10000µg/ml.

La tasa de esporulación no mostró diferencias significativas entre concentraciones de mertec y benomil (P-valor > 0.05), de acuerdo al análisis de PCA se presentó menor inhibición y tasa de esporulación con antracol.

Respecto al EC_{50} , no se encontró diferencias entre municipios, presentándose aislamientos con diferentes niveles de sensibilidad a los fungicidas. El agrupamiento de acuerdo a los valores de EC_{50} muestra para antracol un grupo medianamente resistente con valores > 10µg/ml, para benomil y mertec todos los aislamientos fueron sensibles con valores menores a 0.01 µg/ml para el 72 y 68% de los aislamientos respectivamente. Los resultados se asocian con el inadecuado control de la enfermedad basado principalmente en el uso de ditiocarbamatos, lo que ha llevado a la selección de cepas resistentes a fungicidas como antracol, a diferencia de los bencimidazoles que resultaron eficientes en el control del patógeno.

Palabras clave: Antracnosis, *Colletotrichum*, fungicidas, inhibición, sensibilidad, resistencia.

ABSTRACT

Anthracnose caused by *Colletotrichum* spp, is considered the most important disease in tree tomato (*Solanum betaceum*) causing losses of up to 100% of its production in Colombia. The intensive use of fungicides has increased its severity by inducing selection processes of resistant pathogenic strains. In this study the in vitro susceptibility of 25 monosporic isolates of *Colletotrichum* spp from the department of Putumayo to Antracol, benomyl and mertec fungicides was analyzed, based on its effect on the sporulation rate, mycelial growth using the parameter AUDPC and percentage of inhibition.

From these variables, the EC_{50} were established. Antracol inhibited the growth of the pathogen in 40% with 0.1 $\mu\text{g/ml}$ and reached 100% inhibition at 10000 mg / ml, benomyl and mertec achieved a dramatic reduction in growth from 0.1 to 1 $\mu\text{g/ml}$ with percentages of inhibition greater than 50 %. In 10 to 1000 $\mu\text{g/ml}$ showed percentages of 60 to 95% and 96% in 10000 $\mu\text{g/ml}$.

Sporulation rate did not differ significantly between mertec and benomyl concentrations ($P\text{-value} > 0.05$). According to PCA analysis, less inhibition and rate of sporulation with Antracol was presented.

With respect to EC_{50} , no differences were found between municipalities, appearing isolates with different levels of sensitivity to fungicides. The grouping according to the values of EC_{50} shows for Antracol a moderately resistant group with values $> 10 \mu\text{g/ml}$, for benomyl and mertec all isolates were sensitive to values lower than 0.01 mg / ml with 72 and 68% of isolates respectively . The results are associated with inadequate disease control based primarily on the use of dithiocarbamates, which has led to the selection of strains resistant to fungicides such as Antracol, unlike the benzimidazoles that were efficient in controlling the pathogen.

Keywords: Anthracnose, *Colletotrichum*, fungicide, inhibition, sensitivity, resistance.

TABLA DE CONTENIDO

	Pag
INTRODUCCION	13
1. OBJETIVOS	15
1.1. OBJETIVO GENERAL	15
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
2. MARCO TEORICO	16
2.1. TOMATE DE ÁRBOL (<i>Solanum betaceum</i>)	16
2.1.1. Generalidades	16
2.1.2. Situación Nacional del Producto	16
2.2. ANTRACNOSIS DE TOMATE DE ÁRBOL 17	
2.3. <i>Colletotrichum</i>	17
2.3.1. Taxonomía	17
2.3.2. Etiología	18
2.3.3. Epidemiología	19
2.4. CONTROL QUÍMICO	19
2.4.1. Fungicidas preventivos	20
2.4.2. Fungicidas sistémicos	20
2.4.3. Antecedentes	21
3. MATERIALES Y METODOS	23
3.1. ÁREA DE ESTUDIO	23
3.2. FASE DE LABORATORIO	24
3.2.1. Efecto <i>in vitro</i> de los fungicidas sobre la tasa de crecimiento	24
3.2.2. Efecto <i>in vitro</i> de Fungicidas Sobre Tasa de Esporulación	26

3.2.3. Establecimiento de EC ₅₀	26
3.2.4. Determinación de la Línea Base de Fungicidas	27
4. RESULTADOS Y DISCUSION	28
4.1. ANTRACOL	28
4.2. BENOMIL	32
4.3. MERTEC	35
4.4. ANÁLISIS DE LA IMPORTANCIA DE LAS VARIABLES	38
4.5. DOSIS MEDIA EFECTIVA (EC ₅₀)	40
4.6. ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD POBLACIONAL	46
5. CONCLUSIONES	48
6. RECOMENDACIONES	49
7. BIBLIOGRAFIA	50
ANEXOS	57

TABLA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Proceso de infección por <i>Colletotrichum</i> spp	19
Figura 2. Zonas de muestreo de <i>Solanum betaceum</i>	23
Figura 3. Análisis de AUDPC para los 25 aislamientos evaluados con el fungicida antracol	28
Figura 4. Porcentajes de inhibición de los 25 aislamientos obtenidos en cada concentración de antracol	30
Figura 5. Análisis de AUDPC para los 25 aislamientos evaluados con el fungicida benomil	32
Figura 6. Porcentajes de inhibición de los 25 aislamientos obtenidos en cada concentración de benomil	33
Figura 7. Análisis de AUDPC para los 25 aislamientos evaluados con el fungicida mertec	36
Figura 8. Porcentajes de inhibición de los 25 aislamientos obtenidos en cada concentración de mertec	37
Figura 9. Análisis de PCA para las variables tasa de crecimiento, esporulación y porcentaje de inhibición para los fungicidas antracol, benomil y mertec	39
Figura 10. Valores de EC ₅₀ y municipio de procedencia de los 25 aislamientos para cada fungicida	41
Figura 11. Agrupamiento de aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp con base en la EC50 de antracol	42
Figura 12. Agrupamiento de aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp con base en la EC50 de benomil	43
Figura 13. Agrupamiento de aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp con base en la EC50 de mertec	44
Figura 14. Fenograma de agrupamiento de <i>Colletotrichum</i> spp por EC ₅₀	46

LISTA DE TABLAS

	Pág
Tabla 1. Aislamientos monospóricos y municipio de procedencia	24
Tabla 2. Especificaciones de fungicidas utilizados, formulación, porcentaje de ingrediente activo, actividad y concentración	25
Tabla 3. Diseño metodológico de los ensayos	25
Tabla 4. Clasificación de sensibilidad por EC ₅₀	26
Tabla 5. Determinación de la sensibilidad por EC ₅₀	44

INTRODUCCION

En Colombia el tomate de árbol (*Solanum betaceum*) especie originaria de la zona Andina, es uno de los productos promisorios exportables de primera generación catalogado como un cultivo de alta potencialidad en el país. Colombia fue el país pionero en abrir mercados internacionales para esta fruta en Europa y hasta la actualidad se ha mantenido como el principal proveedor de la Comunidad Europea, presentando un incremento significativo durante los últimos años como consecuencia de la demanda asociada al mejoramiento en consumo y comercialización en el mercado internacional. Actualmente, en el país estos cultivos cubren un área de siembra cercana a 6500 hectáreas y participa con el 26.25% del total de las exportaciones de Colombia de frutas frescas no tradicionales, superado únicamente por la uvilla que participa con el 34.64 % (Cadena, 2000). Los cultivos se encuentran en toda la zona Andina de los departamentos de Nariño, Cauca, Quindío, Antioquia, Cundinamarca, Boyacá, Tolima, Valle, Santander, Huila y en regiones como el Putumayo es una actividad que representa uno de los sectores agrícolas más relevantes en su economía y está concentrada principalmente en el Valle de Sibundoy, donde este cultivo alcanzó un área cultivada de 60 hectáreas (MADR, 2006).

La alta susceptibilidad de las solanáceas a patógenos afecta de forma significativa los cultivos de tomate de árbol. Uno de los problemas fitosanitarios más limitantes es la antracnosis, que genera pérdidas hasta de un 100% (Bernal *et al*, 2003). Esta enfermedad causada por *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum acutatum* afecta toda la planta y el daño es más notorio en frutos, los cuales son afectados en cualquier estado de desarrollo (Saldarriaga *et al*, 1997). Los principales factores que favorecen su propagación y dificultan el control son la altura y especialmente las temperaturas entre 14 y 18°C, acompañadas de una alta humedad relativa condiciones características de las zonas productoras de tomate de árbol.

La solución a esta problemática se ha basado principalmente en el control químico a través de la aplicación intensiva de un amplio rango de fungicidas del grupo de las fenilaminas, carboxilamidas, bencimidazoles y ditiocarbamatos (Waller, 1992), sin tener un modelo anticipado de las características de los productos y las concentraciones recomendadas (utilizando sobredosis o subdosis). Esta situación conlleva a problemas de tolerancia a fungicidas cada vez más frecuentes por la inadecuada aplicación de estos compuestos que conduce al incremento en la severidad de la enfermedad (Wharton 2004), al inducir un proceso de selección hacia cepas más resistentes y patogénicas por cambios genéticos que impiden a los fungicidas actuar en los sitios específicos de unión. Esto incrementa los casos de múltiple patogenicidad y de especies capaces de actuar sobre diversos hospederos dando lugar a daños ambientales por el alto riesgo de contaminación asociado a la presencia de residuos de fungicidas en el suelo y cuerpos de agua (Peres *et al*, 2004 y Lobo, 2006).

Fungicidas del grupo de los bencimidazoles han sido estudiados y usados en agricultura por aproximadamente 30 años y se han reportado numerosos casos de resistencia (Peres *et al*, 2004). Los ensayos de sensibilidad son utilizados para estimar un potencial de control químico sobre las poblaciones de *Colletotrichum* y mediante ellos se han indicado que este patógeno posee una capacidad extraordinaria de adaptación y variación (Freeman *et al*, 1996 – 1998 y Alahakoon *et al*, 1992). Spalding en 1982, reporta un incremento marcado en el número de aislamientos resistentes a benomil en cultivos de mango desde 1976 y en Colombia en 1981 Gómez reporta este comportamiento en cultivos de tomate de árbol. Gutiérrez *et al* en el 2003 asocian la resistencia encontrada en cepas obtenidas de mango en México al control inadecuado basado principalmente en el uso de productos pertenecientes a este grupo químico. Según la lista de FRAC 2005 y 2010 *Colletotrichum* spp no presenta resistencia a compuestos del grupo ditiocarbamatos, sin embargo Arias *et al*, en el 2007, al estudiar el control de la antracnosis del mango con antracol 70 PM, curacab 50PM, captan 50PM, benlate, funcloz 40 CE y amistar reportan que la infección fue mayor en los tratamientos donde únicamente se aplicó antracol.

De acuerdo a lo anterior, es necesario realizar estudios para determinar el efecto de los fungicidas sobre el agente causal de la antracnosis *Colletotrichum* spp lo que dará lugar a un manejo adecuado de la enfermedad y además permitirá mantener el equilibrio entre el sistema de producción y el ambiente. Por lo cual el objetivo de esta investigación es evaluar la sensibilidad *in vitro*, de *Colletotrichum* spp a diferentes concentraciones de los fungicidas antracol, benomil y mertec, mediante la determinación del efecto en cada uno de ellos sobre las tasas de crecimiento y esporulación, el establecimiento de la dosis media efectiva y la determinación de la línea base de los fungicidas, que conduciría a un mejor control de la enfermedad en el campo.

Para el desarrollo de esta investigación se planteo la siguiente pregunta de investigación:

Cual es el grado de sensibilidad que presentan las poblaciones de *Colletotrichum* Spp. aisladas de *Solanum betaceum*, frente a diferentes concentraciones de los fungicidas antracol, benomil y mertec?

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la sensibilidad *in vitro* de las poblaciones de *Colletotrichum* spp aisladas de *Solanum betaceum* del Valle de Sibundoy, a diferentes concentraciones de los fungicidas antracol, benomil y mertec.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el efecto *in vitro* de los fungicidas antracol, benomil y mertec, sobre la tasa de crecimiento micelial y de esporulación, de los aislamientos del patógeno *Colletotrichum* spp obtenidos de *Solanum betaceum*.
- Establecer las dosis media efectiva (EC50) de los fungicidas analizados para cada aislamiento de *colletotrichum* spp obtenido de *Solanum betaceum* en el departamento de Putumayo.
- Aportar al establecimiento de una línea base de los fungicidas antracol, benomil y mertec, para el control de las poblaciones del patógeno *Colletotrichum* spp aisladas de *Solanum betaceum* en el departamento de Putumayo.

2. MARCO TEORICO

2.1 TOMATE DE ÁRBOL (*Solanum betaceum*)

2.1.1 Generalidades. La familia Solanaceae a la cual pertenece el tomate de árbol, es reconocida mundialmente por su importancia en términos de vegetales cultivables y el amplio rango de utilidad agronómica de sus especies (Carreño, *et al* 2007). Es una fruta exótica originaria de la vertiente oriental de los Andes, específicamente Perú, Ecuador y Colombia, es un fruto tropical que se encuentra dentro del grupo de alimentos que por su valor nutricional y comercial son apetecidos en el mercado nacional e internacional. El fruto es una excelente fuente de vitaminas A, B6, C y, E, y minerales como el hierro además tiene un contenido bajo en carbohidratos y menos de 40 calorías por cada 100 g. Las variedades o cultivares se reconocen por el color, y se escogen según la forma de consumo de la fruta (MAG/IICA, 2001).

2.1.2 Situación nacional del producto. El tomate de árbol es un frutal con alto potencial como alternativa productiva para los agricultores de las áreas de ladera de la zona andina, presentando amplia aceptación y potencialidad para procesamiento. Además, este frutal brinda una opción de reemplazo de cultivos ilícitos. Como país tropical, Colombia puede garantizar la producción permanente de muchas especies de esta familia, como una alternativa promisoría de cultivos con mejores posibilidades de competencia en escenarios de mercados globalizados, debido a que cuenta con una disponibilidad de tómate de árbol a lo largo del año. Los precios han evolucionado favorablemente siendo un producto muy difundido en el país y con un sin número de usos para su aprovechamiento.

Colombia presentó un área cultivada aproximadamente de 6.500 Ha, con una producción correspondiente a 120.000 ton/año (MADR, 2006) y fue el país pionero en abrir mercados internacionales para esta fruta en Europa. El Ecuador inició sus exportaciones a finales de la década de los 80's, sin embargo aún no se ha consolidado un mercado creciente. El tomate de árbol en fresco e industrializado, ha repercutido favorablemente en los mercados internacionales. Las exportaciones de este producto en 2003 fueron de 570 toneladas por valor de US\$ 1.014.028, el precio unitario aumentó un 36% en promedio para el año 2005 en el cual se exportaron 471 toneladas de producto fresco por un valor de US\$ 1.139.236. Los principales destinos fueron países Bajos (25,7%), España (18,0%), Suecia (12,3%), Alemania (12,1%) y Francia (9,9%). En el 2007 el 77% de las exportaciones, correspondieron a uchuva, granadilla y tomate de árbol con US\$ 1,4 millones y los destinos fueron países Bajos (33%), Alemania (26%) y Bélgica (20%) (Proexport, 2005), para el 2006 el tomate de árbol participó con el 26.25% del total de exportaciones de frutas frescas no tradicionales (MADR, 2006).

Sin embargo, la alta susceptibilidad a patógenos en las solanáceas afecta de forma significativa los cultivos. Las investigaciones señalan que la antracnosis

causada por el hongo *Colletotrichum spp* genera pérdidas hasta de un 100% (Bernal *et al*, 2003).

2.2 ANTRACNOSIS DEL TOMATE DE ÁRBOL

Constituye la enfermedad más importante debido a su amplia distribución y a la magnitud de las pérdidas que ocasiona (Bernal *et al*, 2003), es producida por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum acutatum* que puede ser transportado de planta a planta y de cultivo a cultivo, por el viento, lluvia, insectos o el mismo agricultor.

El patógeno infecta hojas, ramas, flores y frutos. Genera la aparición de lesiones oscuras, hundidas y bien delimitadas por una o más aureolas concéntricas que posteriormente secan las zonas afectadas, dejándolas con la apariencia de quemazón. También pueden aparecer, a lo largo de las venas de las hojas, manchas irregulares de color marrón claro correspondientes a tejido muerto (Botero *et al*, 1999).

2.3 *Colletotrichum*

Es uno de los géneros de hongos Ascomycete más grande y contiene especies fitopatógenas altamente exitosas por la prevalencia y el daño que causan a los cultivos en las regiones tropicales, subtropicales y templadas (Bailey y Jeger, 1992). En consecuencia se han realizado estudios sobre diversos aspectos de su biología, mecanismos de infección, interacción hongo - hospedero, diversidad genética y epidemiología. Especies de este género se han utilizado como modelo para estudiar estrategias de infección e interacción (Perfect *et al*, 1999), bases genéticas del estilo de vida saprófito (Rodríguez *et al*, 2000) y el desarrollo de la infección (Fitzell *et al*, 1984).

2.3.1 Taxonomía

Según Agrios, 2005 la clasificación es la siguiente:

Phylum: Ascomycota

Clase: Ascomycetes filamentosos

Género: *Colletotrichum*

Especie: *Colletotrichum gloeosporioides*

Colletotrichum acutatum

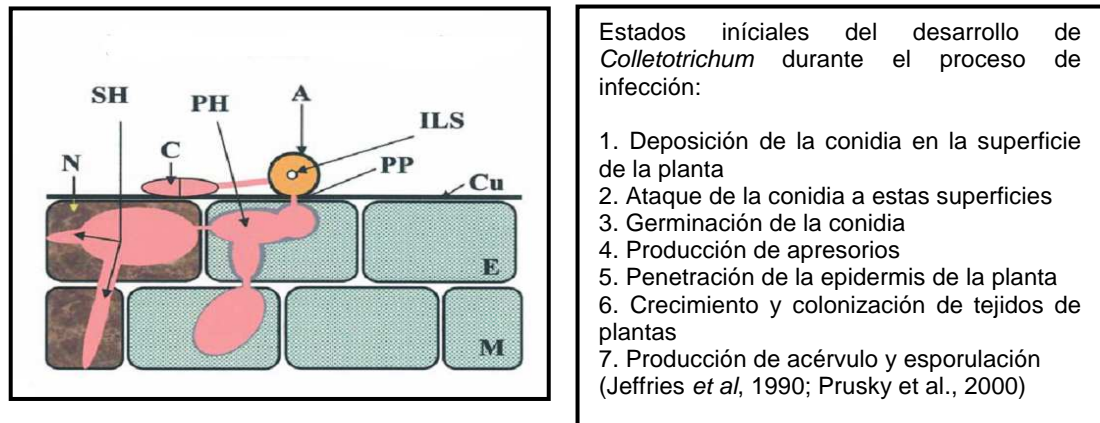
La taxonomía del género *Colletotrichum* es aún confusa, con más de 900 especies descritas o asignadas, según sus características morfológicas, culturales, conidiales, presencia de setas y forma de los apresorios. La alta plasticidad de estos hongos, dificultan la identificación de especies en los aislados cultivados. Existen casos de múltiple patogenicidad y también se ha reportado que una especie puede actuar sobre diversos hospederos. Este problema es evidente en el caso de *Colletotrichum acutatum* y *C. gloeosporioides* frecuentemente asociados a la antracnosis capaces de infectar

una amplia variedad de especies frutales. Estas especies son morfológicamente muy similares y presentan coincidencias en el rango de hospederos que dificultan su separación por métodos taxonómicos tradicionales basados en características como la morfología de los cultivos (*C. gloeosporioides* presenta colonias usualmente con apariencia gris, mientras que *C. acutatum* tienen un fenotipo rosa o anaranjado (Zulfiqar et al, 1999; Martín y García, 1999), forma y tamaño de las conidias (con terminación circular son para *C.gloeosporioides* y con terminación en punta como *C.acutatum*) y especificidad de hospederos (Smith y Black, 1990; Sutton, 1992; Förster y Adaskaveg, 1999). Otros caracteres que han sido utilizados para separar los aislados de estas dos especies son la tasas de crecimiento (lento, en *C. acutatum* y rápido en *C. gloeosporioides*), temperatura de crecimiento óptimo (25 °C en *C. acutatum* y 30 °C en *C. gloeosporioides*) y la sensibilidad a benomil (Wharton, 2004).

2.3.2 Etiología. En todos los hospederos el hongo se reproduce profusamente y forma masas rosadas en acérvulo, por debajo de la cutícula de la planta, la cual se rompe al ejercer cierta presión hacia la parte superior de la masa de conidióforos. Los conidios se mantienen unidos en una masa viscosa que en condiciones secas es dura y firme que se diseminan sólo cuando los acérvulos se encuentran húmedos, y transportados por el viento, la lluvia o al entrar en contacto con insectos, otros animales, herramientas, etc. Los conidios germinan en presencia de agua y producen un apresorio que se adhieren a la superficie por medio de un mucílago, posteriormente se forma la hifa de penetración que se introduce en los tejidos de hospedero. La melanización del apresorio es considerada un pre-requisito de la patogénesis (López, 2001), lo cual puede ser explicado por qué la melanina favorece la rigidez estructural para dirigir la presión hidrostática a través del poro de penetración.

La interacción del patógeno con su planta hospedera se caracteriza por una corta fase biotrófica que inicia cuando el organismo entra en contacto directo con la superficie celular y se da la penetración inicial de las células epidermales; seguida por la formación de una vesícula de infección larga y esférica y una o más hifas primarias intracelulares que crecen a partir de esta y continúan colonizando muchas células hospederas (Bailey et al, 1996; O'Connell et al, 1985, Hamada, 2005). Posteriormente se da una fase necrótica destructiva al desarrollar las hifas secundarias que se ramifican a través del hospedero inter e intracelularmente (O'Connell et al, 1985; Wharton et al, 2001). A medida que avanza la infección las células del hospedero mueren rápidamente (Figura 1) (Wijesundera et al, 1984).

Figura 1. Proceso de infección por *Colletotrichum* spp



(C) Conidia, (A) Apresorio, (PP) poro y tubo, (Cu) Cúcutica, (PH) Hifa primaria, Epidermis (E), Células del Mesofilo (M), Fase necrótica (N) Bailey & al. (1992) and O'Connell & al. (2000).

2.3.3 Epidemiología. Los síntomas de la infección son más evidentes en frutos en cualquier estado de desarrollo, manifestándose con mayor frecuencia en el ápice o en los puntos en que varios frutos de un mismo racimo quedan en contacto por acumulación de agua. El proceso infectivo que desarrolla el patógeno es favorecido por elevadas precipitaciones y alta humedad ambiental.

Las conidias con ayuda del mucílago hidrofílico en el que se forman son arrastradas desde las partes vegetativas hasta los órganos florales y frutos (Estrada, 1993) y son el tipo de inóculo más importante de este patógeno (Fitzell *et al*, 1984). El daño consiste en manchas ligeramente hundidas de color negro que pueden llegar a cubrir todo el fruto. Bajo condiciones favorables aparecen las masas de conidias en la superficie de la lesión. Cuando el ataque ocurre sobre frutos pequeños, estos se secan. Si se presenta en frutos ya formados pero todavía verdes, aparece una coloración amarillenta de maduración prematura con exhibición posterior de las manchas negras en el exterior, en caso de afectar frutos próximos a recolección, las manchas son pequeñas o aun inexistentes, pero el daño se manifiesta durante el transporte o el almacenamiento (Girard y Lobo, 1977)

En los frutos maduros los síntomas son fácilmente distinguibles, apreciándose manchas de color marrón oscuro, hundidas en la superficie y acompañadas de cierta emisión de gomas, finalmente estos órganos se pudren totalmente y se desprenden del árbol con facilidad (Botero, 1999).

2.4 Control químico. Por más de 200 años los fungicidas se han utilizado para el control de enfermedades causadas por hongos en las plantas. Este método ha incrementado su eficiencia a través del tiempo debido a la introducción de nuevas moléculas con diferentes mecanismos de acción (Brent y Derek, 2007), aunque los ensayos de campo son el método más usual de evaluación, los métodos de laboratorio o microensayos son de gran utilidad debido a que éstos presentan la facilidad de obtener información rápida sobre un producto químico

respecto al punto de acción sobre un patógeno determinado, a las dosis letales que se deben emplear y a su eficiencia (Peña y Ortiz, 1996).

Los métodos para determinar la acción de fungicidas se clasifican en tres tipos: a) las esporas son suspendidas en las soluciones del producto químico, con el objeto de observar la presencia o ausencia de crecimiento o germinación. b) El fungicida es incorporado a un medio artificial de cultivo sobre el cual se inocula esporas o micelio del hongo, observando posteriormente su crecimiento. c) suspensiones de esporas son expuestas a las soluciones fungicidas sobre portaobjetos colocados en cámaras húmedas, para luego registrar el porcentaje de germinación. Para la evaluación del efecto del fungicida se utiliza la medición del diámetro de las colonias del hongo y la estimación del porcentaje de germinación (Peña y Ortiz, 1996).

Generalmente las enfermedades de *Colletotrichum* pueden ser controladas por un amplio rango del grupo de las fenilaminas, carboxilamidas, bencimidazoles y dicarboximidas (Waller, 1992), sin embargo, la inadecuada aplicación de fungicidas puede conducir al incremento de la gravedad de la enfermedad debido a la alteración del mecanismo de biocontrol natural (Griffiths, 1981).

2.4.1 Fungicidas preventivos. Son productos que establecen una barrera entre el hospedero y el hongo, es decir se aplican en la semilla o en planta sanas, cuando las condiciones ambientales son favorables para la diseminación y el patógeno se encuentra en sus primeras fases de desarrollo. Estos productos generalmente tienen amplio espectro de acción o sea que actúan sobre varios mecanismos fisiológicos del patógeno.

Dentro de este grupo se encuentra antracol (propineb) perteneciente al grupo de los ditiocarbamatos. Es un fungicida de acción persistente con actividad multisitio sobre el metabolismo celular de los hongos patógenos, altera la respiración celular y la función de la membrana citoplasmática, la biosíntesis proteica y actúa sobre las enzimas sulfhidrúlicas del hongo, impidiendo el desarrollo de la enfermedad (Sañudo *et al*, 2001).

2.4.2 Fungicidas Sistémicos. Son productos que se aplican a la semilla o a la planta y son traslocados inhibiendo el desarrollo de los hongos por interferir un mecanismo fisiológico, ejerciendo una acción preventiva y en algunos casos curativa al controlar la infección primaria.

Los bencimidazoles se caracterizan por su acción inmediata al ser captados a través de raíces y hojas por lo cual son poco influenciados por la lluvia, producen acción sistémica en la planta y pueden matar al patógeno en su periodo de formación o controlarlo después de la infección. Pueden ser clasificados como estables cuando el ingrediente activo actúa contra el hongo susceptible sin sufrir ninguna transformación en su estructura o transformativos donde el ingrediente activo sufre algún tipo de alteración antes de ejercer su acción fungitóxica a nivel celular.

En esta investigación se probó la acción de dos fungicidas de este grupo químico:

-Mertec (tiabendazol): se clasifica dentro de los fungicidas estables e impide la formación del huso acromático, en consecuencia inhibe el desarrollo del tubo germinativo, el crecimiento del micelio y la formación de apresorios. Sin embargo, no inhibe la germinación de esporas.

-Benomil (benlate), se clasifica en los dos grupos, dada su capacidad de actuar como benomil y posteriormente transformarse en Carbendazim prolongando los periodos de control y efectividad. Este fungicida también inhibe el proceso de polimerización de las tubulinas. Una porción de benomil puede penetrar la cutícula de los tejidos de la planta y moverse hasta los sitios donde se encuentra la infección deteniendo su proceso como un efecto curativo postinfección.

2.4.3 Antecedentes. Durante el desarrollo de las investigaciones se ha observado que el uso intensivo de un gran número de productos químicos como las fenilaminas, carboxilamidas, bencimidazoles, ditiocarbamatos e inhibidores de la biosíntesis del esteroles, han generado en muchos hongos resistencia a los fungicidas.

En los ensayos *in vitro* efectuados por Guzmán en 1981 en Colombia, donde se evaluaron distintos fungicidas para el control de la antracnosis del tomate de árbol se determinó que la inhibición de *Colletotrichum spp* está determinada tanto por la dosis utilizada de fungicida, como por su mecanismo de acción. Los ensayos realizados con bencimidazoles no mostraron efecto fungitóxico sobre *C.gloeosporioides*, aun en concentraciones altas donde la esporulación fue normal.

Spalding en 1982, reportó que *Colletotrichum gloeosporioides* posee una capacidad extraordinaria de adaptación y variación y plantea un incremento marcado a partir de 1976 a 1980 en el número de aislamientos resistentes a benomil en cultivos de mango en Florida (E.E.U.U), teniendo en cuenta que crecieron incluso en medios de cultivo suplementados con 100µg/ml de ingrediente activo.

La mayoría de análisis de resistencia se han realizado con fungicidas del grupo de los bencimidazoles. Peres *et al*, en un estudio realizado en el año 2002, plantean que el benomil reduce el crecimiento en un 50% en la concentración de 0.1 µg/ml y no previene la germinación de las conidias utilizando 100 µg/ml, pero reduce el alargamiento del tubo germinativo en concentraciones de 10 y 100 µg/ml.

Gutiérrez *et al*, en el 2003, evaluaron en México la resistencia a tiabendazol y benomil en aislamientos de *C.gloeosporioides* obtenidos de mango, probando ocho concentraciones para evaluar la tasa de crecimiento (TCM) y la concentración letal media (CL50); encontrando que la mayoría de los aislamientos presentaron una TCM < 0.5 mm/día en 50 µg/ml para ambos

fungicidas y los que presentaron una CL50 > 20ppm en benomil y tiabendazol se consideraron resistentes.

Ensayos con aislamientos de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* obtenidos en Florida por Peres *et al* en el 2004, confirman que el mecanismo de acción del benomil es específico para la inhibición del ensamblaje de microtúbulos al unirse a la subunidad heterodimérica de la molécula de tubulina. Sin embargo, la eficiencia del fungicida varió entre especies siendo moderadamente resistentes los aislamientos de *C. acutatum* con inhibiciones del 80% en la concentración de 1.0 µg/ml donde se redujo completamente el crecimiento de *C. gloeosporioides*. No obstante Rondon *et al*, en el 2006, en aislamientos de *C.gloesporioides* obtenidos de cultivos de mango en Venezuela encontraron que este producto mostró ser efectivo en concentraciones de 10 y 100 ppm al inhibir el crecimiento del hongo en más del 90%.

Estudios realizados en Israel por Maymon *et al* en el 2006, permitieron confirmar que los aislamientos fueron sensibles a benomil en concentraciones de 1 y 10 µg/ml y se reporta que la resistencia se genera después de varias aplicaciones asociada con mutaciones puntuales los genes de β- tubulina que cambia la secuencia del aminoácido en el sitio de unión del bencimidazol. Las secuencias analizadas del gen β-tubulina de hongos resistentes al benomil revelan que la resistencia casi siempre se debe a una mutación de un nucleótido que resulta del cambio de un aminoácido en el codon 198 o 200. La sustitución del aminoácido en estas dos posiciones resulta en diferentes fenotipos resistentes.

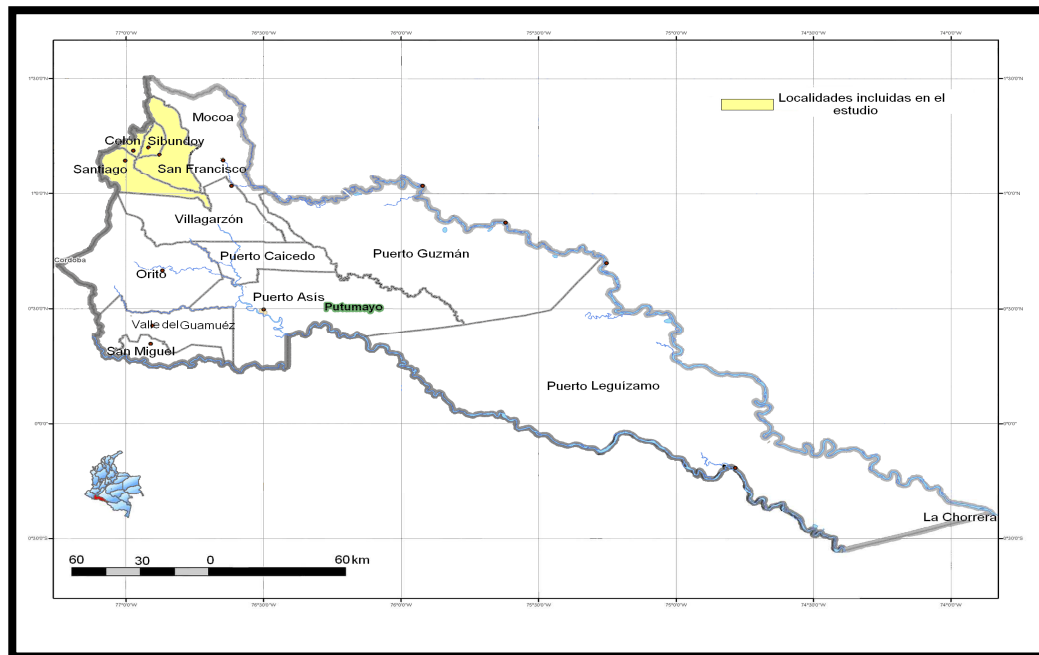
Brent y Hollomon en el 2007, reportaron que los bencimidazoles presentan un alto riesgo de inducción de resistencia por mutaciones debido su único mecanismo de acción a diferencia de los ditiocarbamatos. Sin embargo, Arias *et al* en el 2007, evaluaron el control químico de la antracnosis en campo utilizando los fungicidas antracol 70 PM, curacab 50, captan 50PM, benlate, funclofaz 40 CE y amistar Xtra. Se reportó que la infección fue mayor en los tratamientos testigo y donde solo se aplicó antracol. Las aplicaciones de benlate y curacarb, inhibieron el crecimiento de *C. gloesporioides* aislado de mango en Venezuela, cuando se emplearon en la dosis comercial y mayores a esta. Los experimentos en campo muestran la reducción significativa en el número de conidias detectadas en la copa de árboles tratados, lo cual fue asociado con una reducción significativa del desarrollo de la antracnosis en frutos en postcosecha.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 ÁREA DE ESTUDIO

La evaluación de la sensibilidad a fungicidas en aislamientos de *Colletotrichum* spp, se realizó con muestras procedentes de cuatro municipios del Valle de Sibundoy: Santiago, Colón, Sibundoy y San Francisco (Fig 2). Los cuales hacen parte de la región andino amazónica al Occidente del departamento del Putumayo. Corresponden a una región montañosa en la que sobresalen los cerros Patascoy y Putumayo con alturas que sobrepasan los 3.500 m y en la que se encuentran climas cálido, medio, frío y páramo. La temperatura media anual es de 16.3 °C (máxima 21.7 °C y mínima 10.3 °C), precipitación anual es de 1.400 mm y humedad relativa del 85%. Presenta una altitud que varía entre los 2.000 y 3.700 m.s.n.m y brillo solar entre 500 y 700 h/año, con un valor anual de 669.9 h/año; el período de mayor expresión se presenta en el mes de enero 81.52 h/año coincidiendo con la época de verano o de pocas lluvias y el menor registro en el mes de abril con 35.01 h/año época de intensas lluvias (Opción Putumayo, 2007).

Figura 2: Zonas de muestreo de *Solanum betaceum* en el departamento de Putumayo. Fuente: mapa modificado de <http://www.colombiassh.org/site/>



3.2 FASE DE LABORATORIO

Las pruebas de sensibilidad se realizaron con 25 aislamientos monospóricos de *Colletotrichum spp* obtenidos de *Solanum betaceum* en el departamento de Putumayo que hacen parte del cepario del grupo de investigación Genética de Patosistemas (Genpat) de la Universidad de Nariño. En la tabla 1 se muestra la codificación y procedencia de los aislamientos.

Tabla 1. Aislamientos monospóricos y municipio de procedencia

Código	Municipio
P8004	SANTIAGO
P8026	
P8047	
P8088	
P8094	
P8020	COLON
P8022	
P8072	
P8076	
P8083	
P8098	SAN FRANCISCO
P8109	
P8151	
P9168	
P9112	SIBUNDOY
P9117	
P9133	
P9146	
P9151	
P9175	
P9184	
P9187	
P9190	
P9192	

3.2.1 Determinación del efecto *in vitro* de los fungicidas sobre la tasa de crecimiento micelial de *Colletotrichum spp*. Para la determinación del efecto de los fungicidas sobre el patógeno, se utilizaron los productos comerciales antracol (propineb), benomil (benlate) y mertec (tiabendazol), los cuales fueron disueltos en agua destilada estéril para generar una solución stock para preparar las concentraciones de 0.1, 1, 10, 100, 1000 y 10000 µg/ ml que fueron adicionadas al medio de cultivo (agar PDA estéril) (Tabla 2).

El inóculo de 5mm de diámetro se tomó de la zona de crecimiento activo de cultivos de 10 días y fue ubicado en el centro de cada caja Petri con agar PDA previamente suplementada con el fungicida. Una vez efectuada la inoculación, las cajas petri se sellaron herméticamente y se incubaron a 24°C por 7 días durante los cuales se registró fotográficamente el crecimiento micelial (LaMondia *et al*, 1997 y Deahl *et al*, 1990) para calcular su área con el

programa tpsDig 2.14 (Copyright Rolhf, 2009) y el parámetro AUDPC (área bajo la curva de progreso de la enfermedad).

Con los resultados de crecimiento final se calculó el porcentaje de inhibición mediante la fórmula (Kumar *et al*, 2007):

$$I = \frac{C - T}{C} \times 100$$

I: porcentaje de Inhibición
 C: crecimiento diametral del control (cm²)
 T: crecimiento diametral (cm²) en los tratamientos

Tabla 2. Especificaciones de los fungicidas utilizados, formulación, porcentaje de ingrediente activo, actividad y concentraciones (Bayer CropScience, 2006 – DUPONT, 2007)

Fungicida	Nombre químico	I.A (%)	Actividad	Concentración (µg/ml)
Antracol PM	bisditiocarbamato de zinc	70	Preventiva	0.1, 1, 10, 100, 1000
Benomil PM	Metil-1-(butilcarbamoil)-2-bencimidazol-carbamato	50	Sistémica y preventiva	0.1, 1, 10, 100, 1000
Mertec SC	2-(tiazol-4-il) benzimidazol	60		0.1, 1, 10, 100, 1000

Se realizaron 3 ensayos por cada fungicida en 3 tiempos y en cada uno de ellos se evaluaron 2 réplicas por cada aislamiento en cada una de las concentraciones de fungicidas y un testigo por cada aislamiento (cajas Petri con agar PDA sin fungicidas) (Tabla 3).

Tabla 3. Diseño metodológico de los ensayos

CONDICIONES DEL ENSAYO	
Fungicidas	Antracol, Benomil, Mertec
Concentraciones	0,01,1,10,100,1000,1000
Nº de aislamientos a evaluar	25
Testigos	25*
Repeticiones por aislamiento y concentración	2
Repeticiones por fungicida	3
Duración de evaluación	7 días
*Los testigos absolutos (con crecimiento en medio PDA sin fungicidas), son evaluados para cada aislamiento por duplicado.	

Para determinar si existen diferencias significativas en los porcentajes de inhibición entre aislamientos se realizó una tabla de contingencia con el programa

Microsoft Office Excel 2007 y se aplicó la prueba U de Mann-Whitney para comparar entre concentraciones.

3.2.2 Determinación del efecto *in vitro* de los fungicidas sobre la tasa de esporulación de *Colletotrichum* spp. Al octavo día se tomó el micelio formado en cada caja Petri y se depositó en un volumen de 1.5ml agua estéril para separar las conidias, se sometió a vortex por 30 segundos y se tomaron 100 microlitros de esta solución para realizar el conteo de conidias en cámara de Neubauer.

La tasa de esporulación se expresó como número de conidias sobre área de crecimiento final para cada uno de los aislamientos por tratamiento. Se aplicó la prueba de χ^2 a partir de las tablas de contingencia calculadas para cada concentración y se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para comparar entre concentraciones.

Finalmente se aplicó a las variables un análisis de componentes principales (PCA) utilizando el programa estadístico NTSYSpc 2.1

3.2.3 Establecimiento de la dosis media efectiva (EC_{50}) de los fungicidas para cada aislamiento. Se realizó un análisis Probit para encontrar la EC_{50} (concentración que reduce el crecimiento radial en un 50% respecto al control) con los valores de inhibición y concentración obtenidos para cada uno de los aislados basado en un análisis de regresión lineal (LaMondia *et al*, 1997 y Deahl *et al*, 1990).

Con los resultados de EC_{50} se realizó un clúster para cada fungicida, mediante el algoritmo Euclidiano en el programa PAST versión 2.02 (Copyright Hammer y Harper, 1999-2010)

De acuerdo a la clasificación de sensibilidad establecida por Chung *et al* en el 2010 para *Colletotrichum* (Tabla 4), se verificó los agrupamientos obtenidos en los clúster para cada fungicida.

Tabla 4. Clasificación de sensibilidad por EC_{50}

EC_{50}	Respuesta al fungicida
>500 μ g/ml	HR
100-500 μ g/ml	R
10-100 μ g/ml	MR
<10 μ g/ml	S

*S= sensible; MR=medianamente resistente; R=resistente; HR= altamente resistente

Para el análisis de la variabilidad poblacional se elaboró un cladograma integrando los resultados de EC_{50} obtenidos para los tres fungicidas evaluados mediante el método UPGMA utilizando el programa NTSYSpc 2.1.

3.2.4 Determinación de una línea base de fungicidas para el control de las poblaciones *Colletotrichum spp.* A partir de los valores de EC_{50} y su relación con la tasa de crecimiento y esporulación, se plantean las concentraciones efectivas para el control del patógeno.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

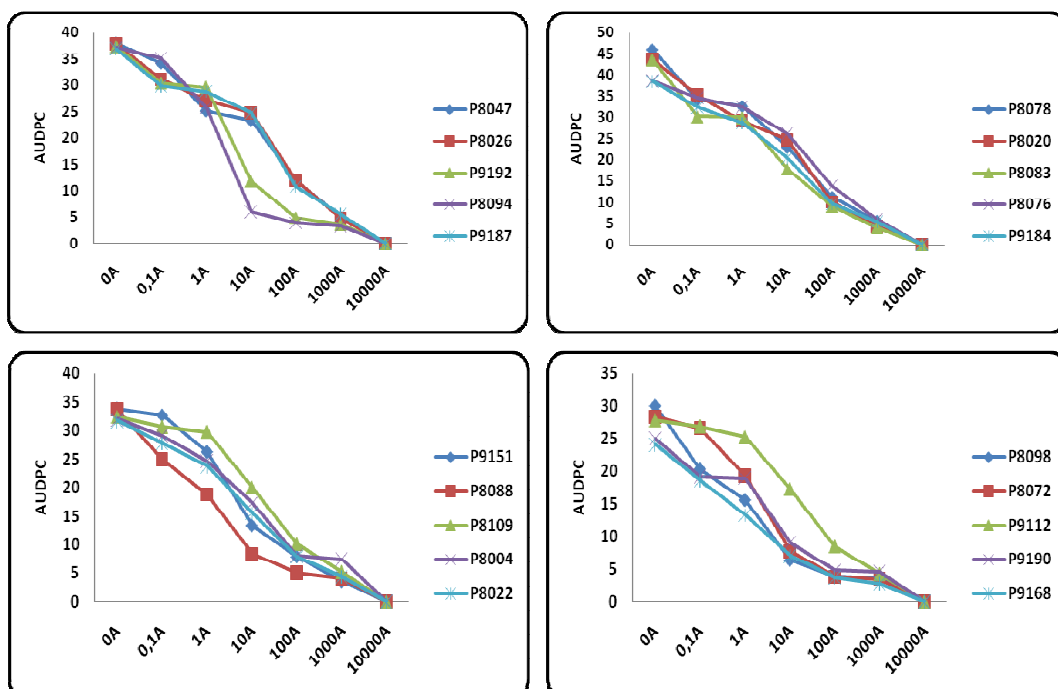
En esta investigación se evaluó la sensibilidad *in vitro* de 25 aislamientos monospóricos de *Colletotrichum* spp obtenidos de *Solanum betaceum* procedentes de cuatro municipios del departamento de Putumayo (Santiago, Colon, Sibundoy y San Francisco) a los fungicidas antracol, benomil y mertec.

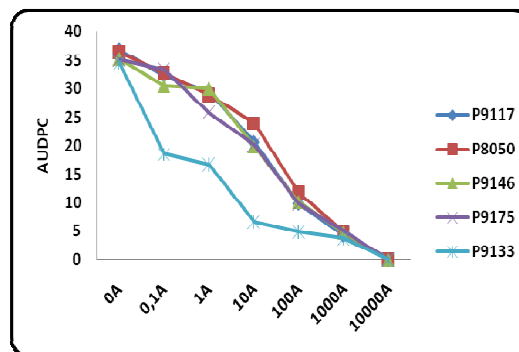
Los resultados obtenidos, permitieron determinar que existe variación en el comportamiento del patógeno para cada una de las concentraciones de los fungicidas, presentándose para la mayoría de los tratamientos una relación inversa entre la concentración y área de crecimiento. Las mediciones diarias de diámetro de los aislamientos, permitieron establecer la tasa de crecimiento de cada uno y su respuesta a las diferentes concentraciones bajo el parámetro AUDPC.

4.1 ANTRACOL (propineb 70 PM)

Antracol es un fungicida perteneciente al grupo de los ditiocarbamatos, recomendado como eficiente para el control de *Colletotrichum* spp por su acción multisitio (Arias y Carrizales, 2007); se encontró que existe una respuesta diferencial de los aislamientos en su tasa de crecimiento micelial, lo cual se puede observar en la figura 3:

Figura 3: Análisis de AUDPC para los 25 aislamientos evaluados con el fungicida antracol



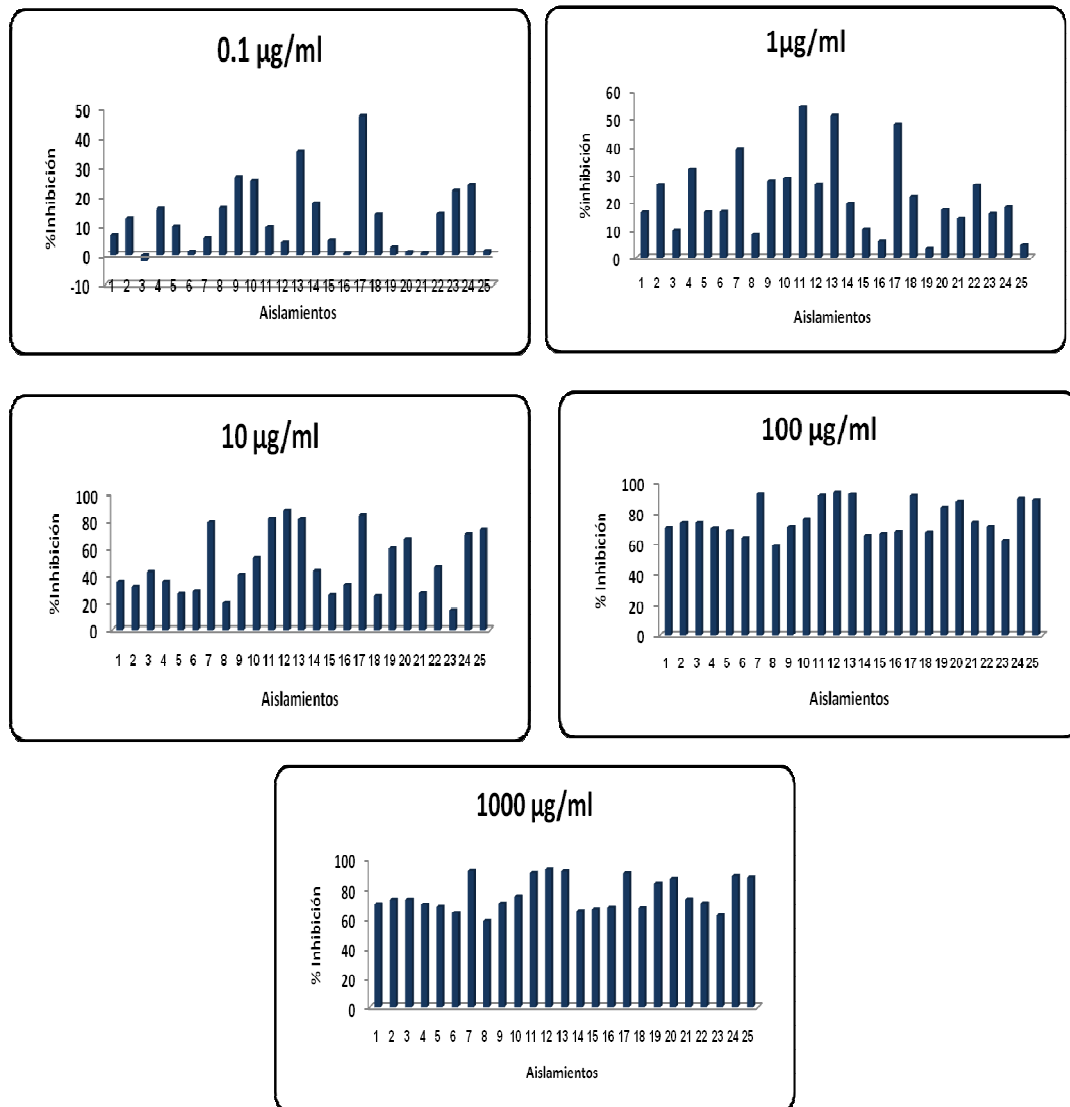


Teniendo en cuenta los resultados del análisis de crecimiento (Figura 3) los aislamientos de *Colletotrichum spp* manifiestan diferentes niveles de sensibilidad al fungicida antracol. En las concentraciones de 0.1 y 1µg/ml se alcanzaron porcentajes inferiores al 30% de reducción del crecimiento respecto al testigo. A partir de la concentración de 10µg/ml, se presenta una reducción mayor al 75% del crecimiento para el 24% de los aislamientos (P8072, P8088, P8094, P9133, P9168 y P9192), siendo considerablemente menor para el resto de ellos. Entre las concentraciones de 100 y 1000µg/ml se alcanzan los valores más altos de reducción del crecimiento (hasta del 69% y 85% respectivamente), manteniéndose tasas relativamente constantes entre aislamientos. Únicamente no se presentó crecimiento en la concentración de 10000µg/ml donde incluso se observó que esta concentración fue letal el inoculo.

La variabilidad genética de las poblaciones de *Colletotrichum* se evidencia en el comportamiento en el comportamiento diferencial con respecto a las concentraciones del fungicida encontrando aislamientos capaces de crecer en concentraciones altas.

Los valores de crecimiento al séptimo día permitieron establecer el porcentaje de inhibición para cada concentración y considerando que no se encontró homogeneidad de varianza en los resultados se utilizó la prueba de Chi² obtenida a partir de las tablas de contingencia, encontrando que no existen diferencias significativas entre los aislamientos (p-valor ≥ 36.42 , con 24 grados de libertad) como se muestra en el Anexo A. La prueba de U de Mann-Whitney (Anexo B) determinó que existen diferencias significativas entre todas las concentraciones (p-valor ≤ 0.05). En la figura 4 se representa el efecto de cada concentración sobre la inhibición.

Figura 4. Porcentajes de Inhibición de los 25 aislamientos obtenidos en cada concentración de antracol



*Rotulos:1(P8004);2(P8020);3(P8022);4(P8026);5(P8047);6(P8050);7(P8072);8(P8076);9(P8078);10(P8083);11(P8088);12(P8094);13(P8098);14(P8109);15(P9112);16(P9117);17(P9133);18(P9146);19(P9151);20(P9168);21(P9175);22(P9184);23(P9187);24(P9190);25(P9192)

Los aislamientos mostraron diferentes respuestas de inhibición en las concentraciones evaluadas (Figura 4). En 0.1 y 1 µg/ml el rango de inhibición fue muy amplio hasta alcanzar el 30% y cabe resaltar que P8098, P9133, P8072, P8088 y P8098 presentaron inhibiciones por encima del 40%. El aislamiento P8022 en la concentración 0.1µg/ml presentó un crecimiento mayor que el testigo en todos los ensayos. Este resultado posiblemente esta asociado con lo reportado por Corredor *et al* (2007), en los que se demuestra que bajas concentraciones de fungicidas pueden estimular el crecimiento del hongo en más del 38% en comparación con el control, dicho fenómeno se denomina hórmesis.

En la concentración de 10µg/ml los aislamientos P8076 y P9187 presentaron inhibiciones menores al 20%, los demás alcanzaron porcentajes de inhibición mayores llegando al 88% en el caso de P8094. En las concentraciones de 100 y 1000µg/ml se presentan porcentajes de inhibición mayores al 60% y únicamente en la concentración de 10000µg/ml se hubo inhibición total.

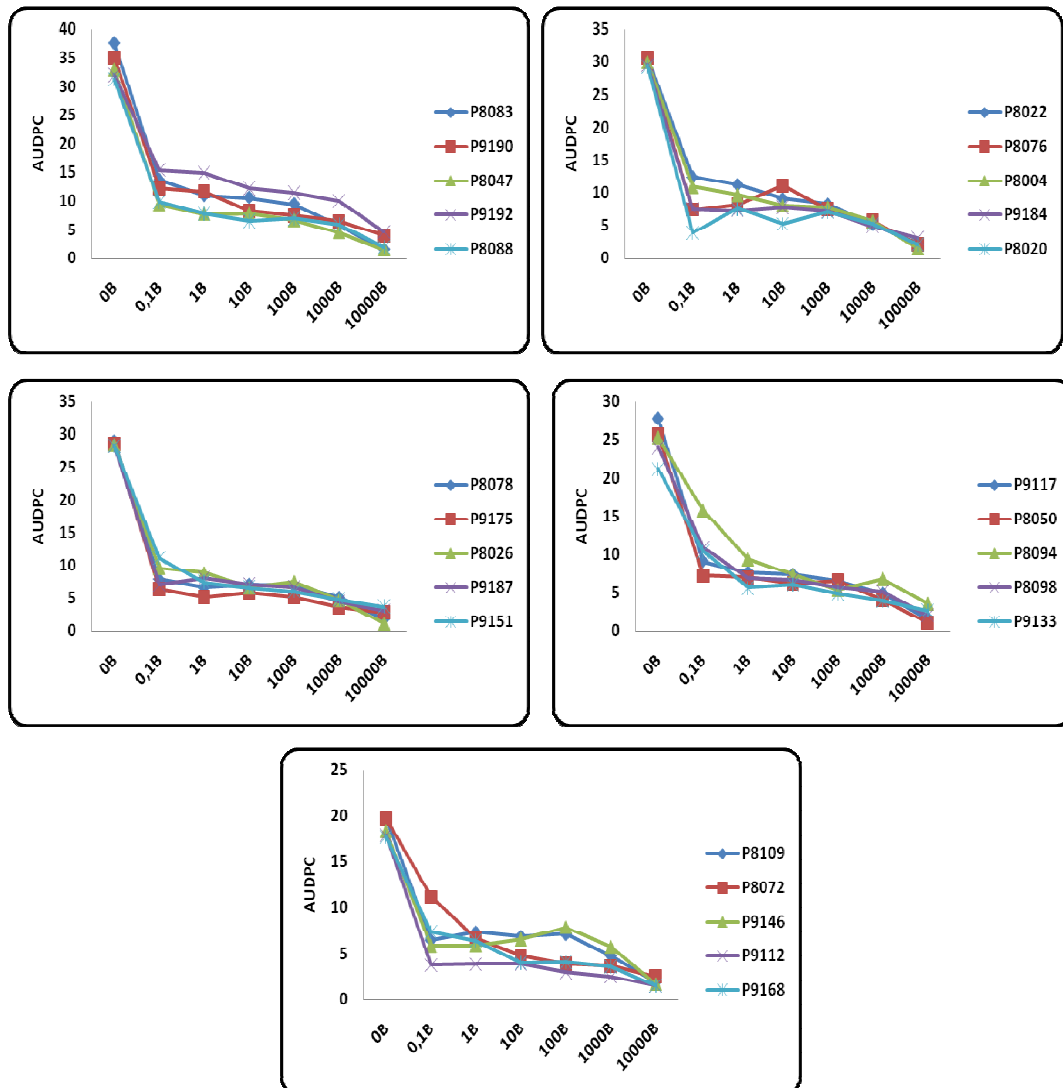
Según el comité de resistencia a fungicidas, en los ditiocarbamatos no se ha documentado ningún signo de resistencia y se catalogan de bajo riesgo (FRAC, 2010). Esto se explica por la acción multisitio que presentan fungicidas como antracol, presentándose menor probabilidad de generar resistencia en el patógeno. Sin embargo, en esta investigación la inhibición fue muy baja en el 80% de los aislamientos aún en concentraciones de 100µg/ml. Lo anterior indica que antracol no logra un control adecuado del patógeno, probablemente por su alta variabilidad como la reportada en otros estudios donde *Colletotrichum* spp. donde muestra una capacidad extraordinaria de adaptación y variación (Alahakoon *et al*, 1992). Crecimiento en altas concentraciones de fungicidas también es reportado en estudios de susceptibilidad en hongos endófitos asociados a *Rosa hybrida* realizados por Corredor *et al*, en el 2007. El estudio en campo de Arias y Carrizales en el 2007 confirma la baja eficiencia de antracol en el control de *Colletotrichum* en cultivos de mango. Es probable que los datos de inhibición obtenidos estén asociados al inadecuado control químico registrado en campo en los municipios de Putumayo, basado principalmente en el uso de fungicidas de un gran número ditiocarbamatos como Daconil, Fitoraz, Curaxil, Manzate, Previcur, Mancoceb, entre otros; esto posiblemente induzca a la selección de individuos resistentes a ingredientes activos de un mismo grupo y que conlleve a un fenómeno de resistencia cruzada, que ocurre generalmente en fungicidas que tienen la misma composición química y principio de acción donde las poblaciones al desarrollar resistencia a un fungicida la adquieren para otros al ocasionar la misma mutación del gen (Brent y Hollomon, 2007).

Respecto a la tasa de esporulación, los altos valores de χ^2 (p-valor ≥ 36.42) indican que no existen diferencias significativas entre los aislamientos para cada concentración (Anexo A), además la prueba U de Mann-Whitney indica que solo hay diferencias entre las concentraciones 0.1 y 100, 0.1 y 1000, 1 y 100 y 1 y 1000µg/ml (Anexo B). Se encontró reducción de 100% únicamente en la concentración de 10000µg/ml, estos resultados muestran una alta inestabilidad en las respuestas generadas por un mismo aislamiento desde los testigos, siendo imposible establecer un patrón general y uniforme en la producción de conidias para cada concentración. La gran variabilidad en la tasa de esporulación indica que su comportamiento se relaciona posiblemente con la respuesta defensiva del patógeno que es estimulada por la presencia de compuestos antifúngicos tanto de la planta como los adicionados para su control, ya que las esporas son estructuras fundamentales para la supervivencia en condiciones hostiles (Prusky *et al*, 2001).

4.2 BENOMIL (benlate 50PM)

Pertenece al grupo de los bencimidazoles con acción sistémica que inhibe la división mitótica y que ha sido ampliamente utilizado en la agricultura durante aproximadamente 30 años (Peres *et al*, 2004). En los ensayos se logró determinar mediante análisis AUDPC que entre los aislamientos se presentan respuestas similares a las diferentes concentraciones y con niveles bajos de tasas de crecimiento como se observa en la figura 5.

Figura 5. Análisis de AUDPC para los 25 aislamientos evaluados con el fungicida benomil



Los análisis de crecimiento con el parámetro AUDPC (Figura 5) permitieron observar que el tratamiento testigo presentó los valores mas altos y hubo una disminución drastica del crecimiento apartir de la concentración de 0.1 μ g/ml en todos los 25 aislamientos la cual continuó disminuyendo de manera constante

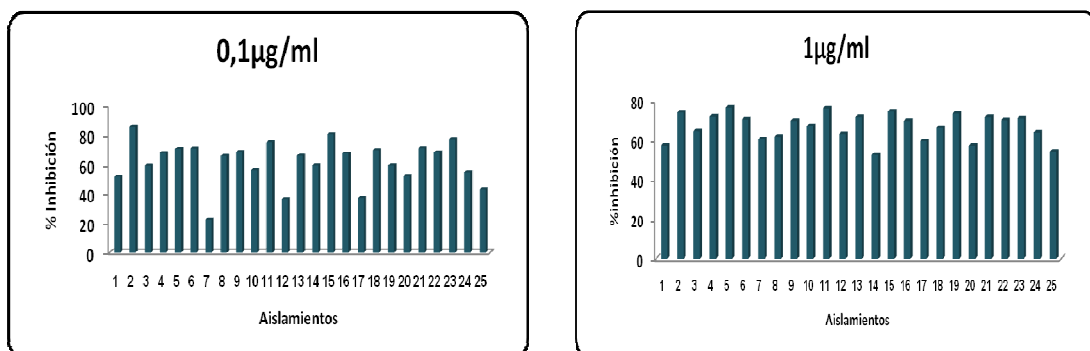
y uniforme sin alcanzar la inhibición total en 10000µg/ml, sin embargo redujo significativamente la velocidad de crecimiento lo que indica que *Colletrotrichum* spp es sensible a este fungicida.

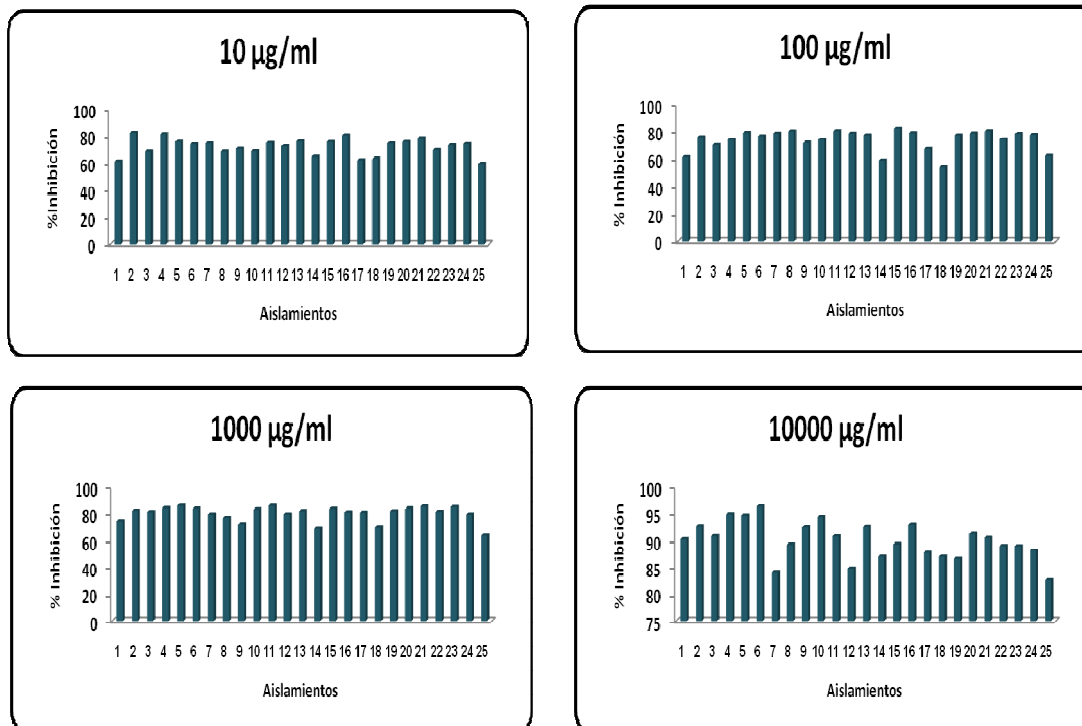
Los aislamientos P8020, P8076, P8094, P8109, P9133, P9146, P9168 y P9187 presentaron oscilaciones en el crecimiento entre 0.1 y 100 µg/ml estabilizándose el comportamiento a partir de 1000µg/ml lo cual puede estar asociado a un respuesta de defensa del patogeno como mecanismo de protección a productos tóxicos (Corredor, 2007), de igual forma lo resultados concuerdan con lo reportado por Bollen y Fuchs en 1970 donde se presentó una respuesta del crecimiento variable a la acción de ciertas concentraciones bajas del fungicida, además estudios de sensibilidad realizados con *C. gloeosporioides* basados en ensayos de sensibilidad demuestran la gran variabilidad que existe en la población de este patógeno (Gutiérrez *et al*, 2003; Batle y Kelemu, 2004).excelente

La tasa de crecimiento diario permitió analizar los porcentajes de inhibición entre aislamientos mediante la prueba de Chi², encontrando que únicamente existen diferencias significativas (p-valor ≤ 36,42, con 24 grados de libertad) en las concentraciones 1 y 10 µg/ml donde se presentan diferentes grados de sensibilidad al fungicida (Anexo A). La prueba de U de Mann-Whitney determinó que existen diferencias significativas (p-valor ≤0.05) entre todas las comparaciones pareadas excepto 0.1 - 1 y 10 - 100 µg/ml. Esto indica que existen respuestas muy similares entre los aislamientos a estas concentraciones manteniéndose uniformidad en los resultados (Anexo B).

La figura 6 representa la respuesta de inhibición a diferentes concentraciones de benomil.

Figura 6. Porcentajes de Inhibición de los 25 aislamientos obtenidos en cada concentración de benomil





*Rotulos:1(P8004);2(P8020);3(P8022);4(P8026);5(P8047);6(P8050);7(P8072);8(P8076);9(P8078);10(P8083);11(P8088);12(P8094);13(P8098);14(P8109);15(P9112);16(P9117);17(P9133);18(P9146);19(P9151);20(P9168);21(P9175);22(P9184);23(P9187);24(P9190);25(P9192)

Como se observa en las gráficas (Figura 6), los resultados de porcentaje de inhibición fueron homogéneos entre todos los aislamientos y mayores al 50% desde la concentración 0,1µg/ml excepto P8072, P8094, P9133 y P9192. En 1µg/ml estos 4 aislamientos reducen el crecimiento en más del 54% mientras los demás superan el 74%. En las concentraciones de 10, 100 y 1000µg/ml, los aislamientos alcanzan porcentajes de inhibición que varían entre 60 y 85% y para la concentración de 10000µg/ml entre 82 y 96%.

Los bencimidazoles fueron introducidos en la década de los 60's y fueron ampliamente utilizados por presentar grandes ventajas en el control de enfermedades fúngicas en comparación con los preventivos como ditiocarbamatos (Smith, 1988). Sin embargo en 1974 se detecta resistencia a benomil en diferentes especies de hongos y desde 1976 se reporta un incremento marcado en el número de aislamientos resistentes procedentes de cultivos de mango (Spalding, 1982). Estudios de Gutiérrez *et al* en el 2003, en *Colletotrichum* obtenido de este frutal donde el fungicida fue de aplicación prolongada muestran el incremento en su capacidad de crecer en altas concentraciones del (mayores a 20µg/ml).

Peres *et al* en el 2002 en evaluaciones de este fungicida en cítricos reportan que las especies de *Colletotrichum* presentan respuestas diferenciales encontrando que *C. acutatum* es más resistente que *C. gloeosporioides* corroborando los reportes de Timmer *et al* en 1998. Evaluaciones *in vitro* realizadas por el comité de acción de resistencia a fungicidas (FRAC, 2010),

han demostrado que existe resistencia en diferentes especies de *Colletotrichum* a los fungicidas del grupo de los bencimidazoles.

Las investigaciones mencionadas atribuyen los resultados encontrados al uso continuo y excesivo de este grupo de fungicidas para el control de la enfermedad teniendo en cuenta el alto riesgo de inducción de resistencia al presentar un solo mecanismo de acción y en consecuencia la aparición de mutaciones puntuales en genes altamente conservados de la β -tubulina (Nakaune *et al*, 2007). Sin embargo los resultados de esta investigación muestran que todos los aislamientos son sensibles a benomil desde la concentración inicial por lo tanto es menos probable la aparición de resistencia siempre y cuando se tenga en cuenta el manejo químico adecuado, resultados similares fueron reportados por Peres *et al*, 2002 encontrando que el crecimiento micelial se inhibe en 50% en 0.1 $\mu\text{g/ml}$ y por Rondon *et al*, 2006 un estudio de respuesta *In vitro* donde benomil mostró buena efectividad en concentraciones bajas de 1 $\mu\text{g/ml}$ obteniendo inhibiciones hasta del 58%.

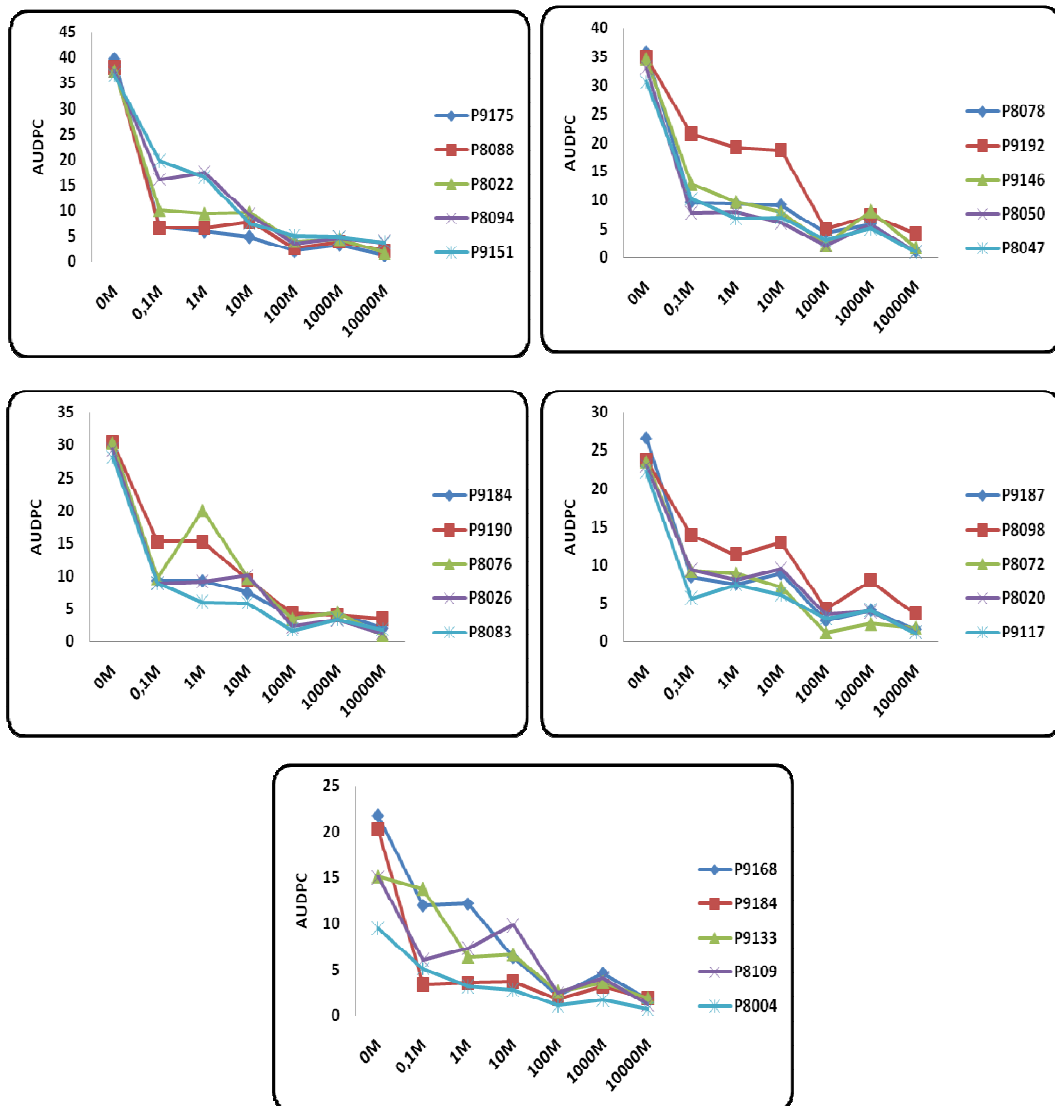
Los resultados de la tasa de esporulación no muestran una tendencia con relación a las concentraciones probadas ni a los aislamientos confirmado mediante la prueba de Chi^2 presentada en el Anexo A (p -valor > 36.42, con 24 grados de libertad) y la prueba U de Mann-Whitney indica únicamente diferencias estadísticas 100-1000 y 1000-10000 $\mu\text{g/ml}$ (Anexo B). Badel y Kelemu en el 2004, en un estudio del efecto de benomil sobre el crecimiento y la esporulación de *C. gloeosporioides* también encontraron alta variabilidad en los resultados concluyendo que la sensibilidad a benomil se debe medir únicamente por su efecto en el crecimiento del micelial y que la producción de conidias no debería ser considerada para evaluar la resistencia a fungicidas en hongos fitopatógenos.

4.3 MERTEC (tiabendazol 500SC)

También pertenece al grupo de los bencimidazoles y es ampliamente utilizado en la agricultura desde la década de los 70's (Brown, 1975). Se recomienda para el manejo de la antracnosis en distintos cultivos porque inhibe el ensamblaje de microtúbulos y la formación del tubo germinativo en hongos patógenos.

En la figura 7 se presentan el análisis de crecimiento de los 25 aislamientos con el parámetro AUDPC mostrando una tendencia marcada a la disminución del crecimiento en concentraciones iniciales seguida de oscilaciones cuando estas se incrementan.

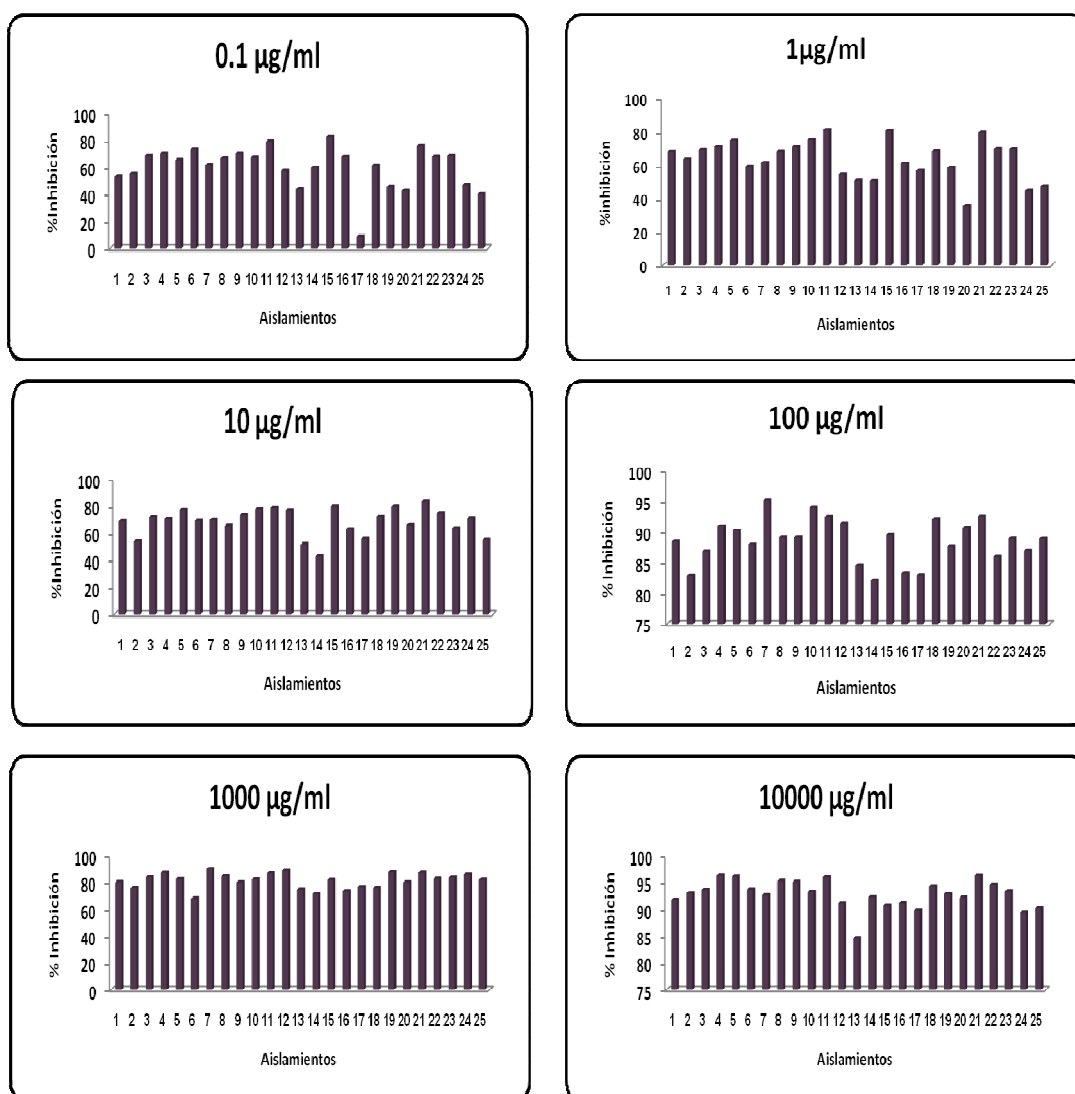
Figura 7: Análisis de AUDPC para los 25 aislamientos evaluados con el fungicida mertec



El análisis de crecimiento (Figura 7) permitió determinar que mertec reduce significativamente la formación de micelio a partir de la concentración $0.1\mu\text{g/ml}$ similar a lo encontrado con benomil. Entre las concentraciones de 0.1 y $1\mu\text{g/ml}$ se observa una relativa estabilidad en el crecimiento excepto en P8076, P8094 P8109, P9117 donde el crecimiento aumenta. A partir de $10\mu\text{g/ml}$ se presentan variaciones en la respuesta hasta alcanzar valores muy cercanos a cero en $10000\mu\text{g/ml}$. Esto puede ser un indicio de lo que ocurriría en campo al incrementar las concentraciones alterando algunos procesos metabólicos del patógeno promoviendo su crecimiento en lugar de inhibirlo o por presión de selección inducir la supervivencia de cepas con mutaciones que les confieran diferentes grados de sensibilidad al fungicida (Corredor *et al*, 2007). Es importante considerar que la susceptibilidad de los patógenos a los fungicidas depende en gran medida del uso correcto de estos en la frecuencia, modo de aplicación y así como las dosis adecuadas (Saladin *et al*, 2003).

La tasa de inhibición (Figura 8) para cada concentración del fungicida presenta diferencias significativas entre los aislamientos únicamente en 1 y 10 µg/ml de acuerdo a la prueba de Chi² (p-valor ≤36.42 con 24 grados de libertad) donde se observa variabilidad en la respuesta del patógeno. La prueba U de Mann-Whitney indica que las concentraciones 0.1-1, 0.1-10 y 1-10 µg/ml no presentan diferencias significativas en el efecto sobre el crecimiento de *Colletotrichum* spp (Anexos A y B).

Figura 8. Porcentajes de Inhibición de los 25 aislamientos, obtenidos en cada concentración de mertec



*Rotulos:1 (P8004);2(P8020);3(P8022);4(P8026);5(P8047);6(P8050);7(P8072);8(P8076);9(P8078);10(P8083);11(P8088);12(P8094);13(P8098);14(P8109);15(P9112);16(P9117);17(P9133);18(P9146);19(P9151);20(P9168);21(P9175);22(P9184);23(P9187);24(P9190);25(P9192)

Los resultados presentados (Figura 8) indican que a partir de la concentración de 0.1µg/ml los aislamientos presentaron valores altos de inhibición (mayores al 40%), únicamente la cepa P9133 presentó un valor muy bajo (9%) el cual incremento en las siguientes concentraciones. Entre las concentraciones de 1 y 10µg/ml el rango de inhibición fue superior al 50%. En 100µg/ml la inhibición alcanzó valores entre 82 y 95%. Sin embargo en 1000µ/ml la inhibición disminuyó a valores entre 67 y 88% y finalmente en 10000µg/ml la inhibición fue de 85 a 96%.

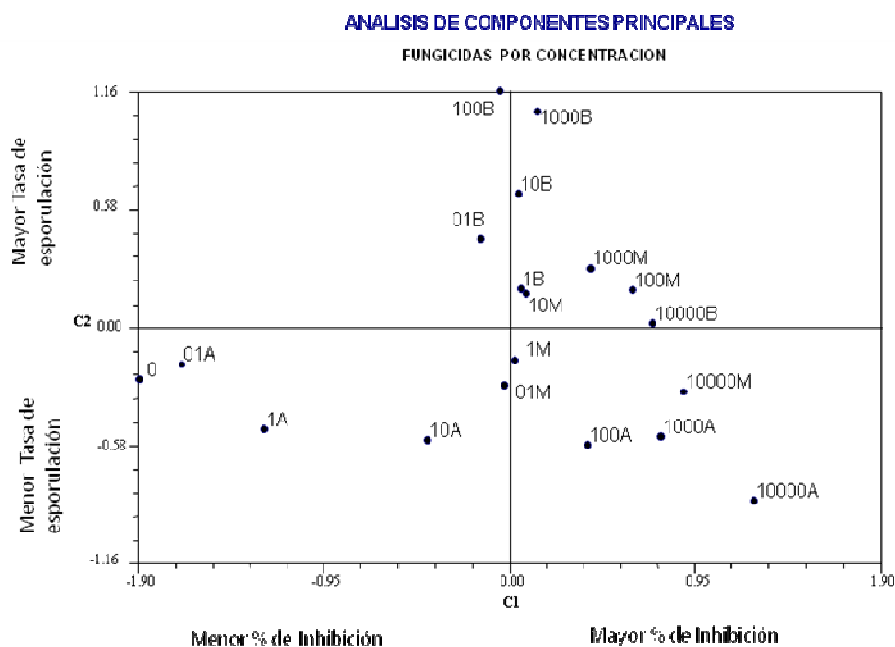
Los estudios de sensibilidad por determinación de crecimiento micelial que se han realizado utilizando mertec y benomil, demuestran que *Colletrotrichum* es un patógeno altamente resistente a la acción de este grupo químico (Gutiérrez *et al*, 2003 y FRAC, 2010). Sin embargo en esta investigación todos los aislamientos mostraron altas tasas de inhibición en bajas concentraciones de los fungicidas en concordancia con lo reportado por Dodd *et al* en 1991, para pruebas en campo donde se redujo significativamente el desarrollo de antracnosis en frutos de mango. Las diferencias en los resultados se podrían explicar por la capacidad de adaptación y variación característica del género a diferentes hospederos (Alahakoon *et al*, 1992) y al uso permanente de fungicidas bencimidazoles que puede dar lugar a la selección de cepas resistentes en países como México (Orozco, 1992).

Mertec no tuvo efecto sobre la tasa de esporulación y en ninguna concentración se logró el 100% de inhibición de la producción de conidias sin mostrar diferencias significativas entre aislamientos (χ^2 con p-valor > 36.42) al igual que lo reportado por Gutiérrez *et al*, 2003 y Péres *et al*, 2004 donde mertec y benomil no impiden la formación de conidias. Únicamente hubo diferencias significativas en la producción de conidias entre las concentraciones 10 y 10000µg/ml (p-valor = 0.0478) según la prueba U de Mann-Whitney (ver Anexos A y B).

4.4 ANÁLISIS DE IMPORTANCIA DE LAS VARIABLES

A partir de los resultados de cada fungicida para las variables tasa de crecimiento (AUDPC), tasa de esporulación y porcentaje de inhibición, se realizó un análisis de componentes principales que permitió establecer cuáles son las características determinantes para medir la sensibilidad (Figura 9).

Figura 9: Análisis de PCA para las variables tasa de crecimiento, esporulación y porcentaje de inhibición para los fungicidas antracol, benomil y mertec.



*A: Antracol; B: Benlate; M: Mertec

i	Eigenvalue	Percent	Cumulative		C1	C2	C3
1	2.07874023	69.2913	69.2913	% INHIBICIÓN	0.9872	0.1475	0.0600
2	0.91416198	30.4721	99.7634	AUDPC	-0.9724	-0.2260	0.0589
3	0.00709778	0.2366	100.0000	T ESPORULACIÓN	-0.3983	0.9173	0.0049

El análisis de PCA (Figura 9) indica que hasta el tercer componente se explica el 100% de la variación. El porcentaje de inhibición en el componente uno muestra que los mayores valores los presentan las concentraciones más altas de antracol 1000 y 1000 μ g/ml, mientras que para el fungicida benomil, la inhibición alcanza valores muy altos desde concentraciones de 1 a 10000 μ g/ml, el mertec reduce eficientemente el crecimiento del patógeno desde la concentración de 0.1 μ g/ml y aunque no se llegan a una inhibición del 100% como en antracol se alcanzan mayores porcentajes respecto al fungicida benomil.

En el eje horizontal, al lado izquierdo de la gráfica se encuentran las concentraciones de fungicidas con mayor crecimiento como es el caso de los testigos y las concentraciones de 0.1, 1 y 10 μ g/ml de antracol. En el segundo componente la variable de mayor peso fue la tasa de esporulación siendo las concentraciones desde 0.1 μ g/ml hasta 10000 μ g/ml de antracol y 0.1, 1 y 10000 μ g/ml de mertec las únicas que lograron disminuirla. La producción de esporas en las demás concentraciones de los 3 fungicidas incrementó llegando a ser mayor que la de los testigos. La tasa de esporulación más alta se

presentó en las concentraciones de 100 y 1000 µg/ml de Benlate. Este comportamiento se debe posiblemente, a que las esporas, además de permitir la reproducción y dispersión de los hongos pueden constituirse en mecanismos de supervivencia ya que permanecen latentes por largos periodos de tiempo hasta que las condiciones ambientales mejoran y permiten su germinación.

Mertec actúa en concentraciones bajas inhibiendo de manera considerable el crecimiento y reduciendo la producción de conidias, pero en concentraciones intermedias incrementa la tasa de esporulación. Antracol inhibe el crecimiento micelial con altas concentraciones pero si se muestra una tendencia a la disminución en la producción de conidias contrario a lo ocurrido con benomil y mertec donde se alcanzaron altos valores de inhibición del crecimiento sin lograr una reducción notoria en la producción de conidias. Estos resultados pueden ser producto de un mecanismo de adaptación de *Colletotrichum* a condiciones adversas donde se da lugar a producción de conidias para asegurar el crecimiento y la reactivación de todos los procesos metabólicos (Prusky *et al*, 2001). Es posible que antracol active reduzca la producción de esporas, sin embargo, es necesario evaluar la viabilidad y la capacidad de germinar de estas estructuras ya que aun no se ha comprobado el efecto del fungicida sobre la viabilidad de estas, como en el caso de los bencimidazoles.

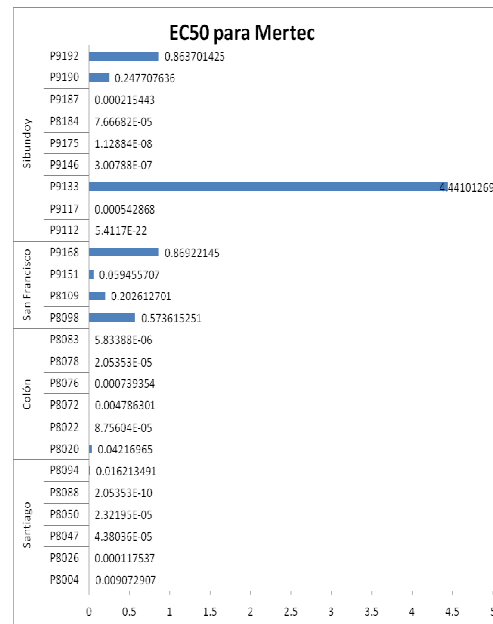
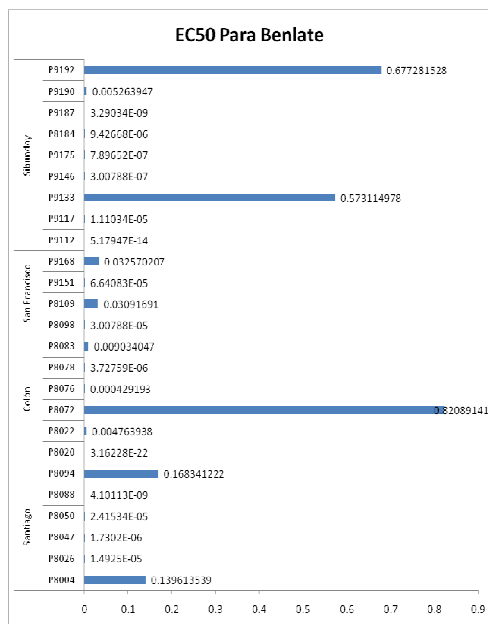
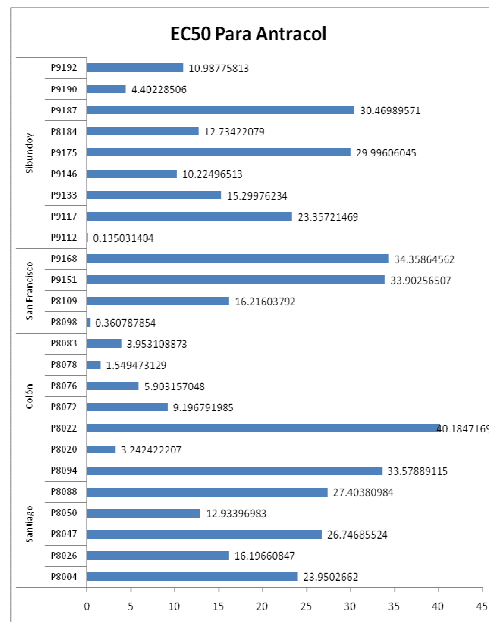
Estudios realizados confirman que mertec y benomil no previenen la formación de conidias pero reducen la elongación del tubo germinativo como se demostró que benomil al ser aplicado en patógenos de cítricos reduce su viabilidad en un 40% (Leroux *et al*, 1992 y Péres *et al*, 2002) esta pérdida de viabilidad puede estar asociada al detenimiento del proceso de infección que ocurre cuando la hifa infectiva no encuentra las condiciones ambientales y nutricionales adecuadas después de haber germinado y formado el apresorio (Soriano *et al*, 2001)

4.5 DOSIS MEDIA EFECTIVA (EC₅₀)

A partir de la respuesta de inhibición obtenida en cada concentración de fungicida se establecieron los valores de EC₅₀ que se presentan en la figura 10.

Los resultados indican que no existe un patrón de distribución de los aislamientos de acuerdo a su grado de sensibilidad entre los cuatro municipios donde se cultiva *Solanum betaceum* presentandose una gran variabilidad de comportamientos.

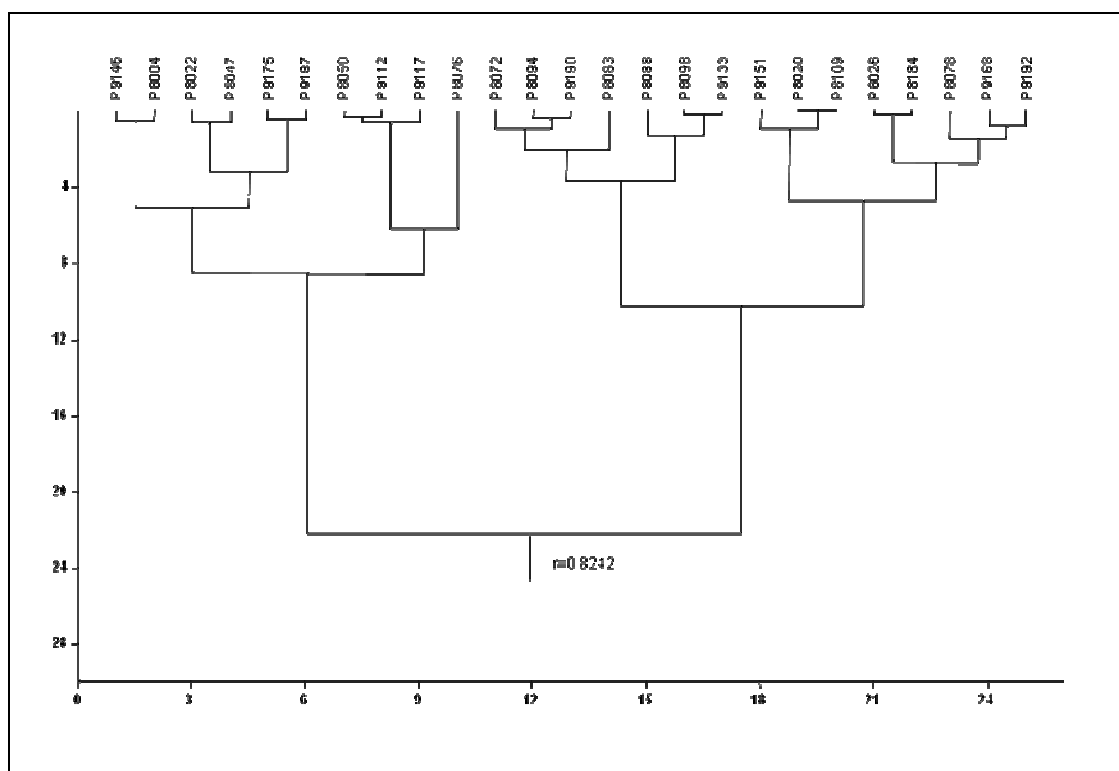
Figura 10. Valores de EC50 y municipio de procedencia de los 25 aislamientos para cada fungicida



En todos los sitios de muestreo existen aislamientos con elevados valores de EC₅₀ para antracol, mientras que para benomil y mertec son bajos y muestran comportamientos similares y homogéneos en los aislamientos. Estos resultados se relacionan con los registros de cultivadores del Valle de Sibundoy (base de datos del grupo Genpat) quienes utilizan con mayor frecuencia productos del grupo de los ditiocarbamatos en comparación con los benzimidazoles. Por lo tanto es posible que la cercanía de los municipios y consecuentemente el flujo de información genética a través de los inóculos de *Colletotrichum* spp este impidiendo que se presente variación interpoblacional.

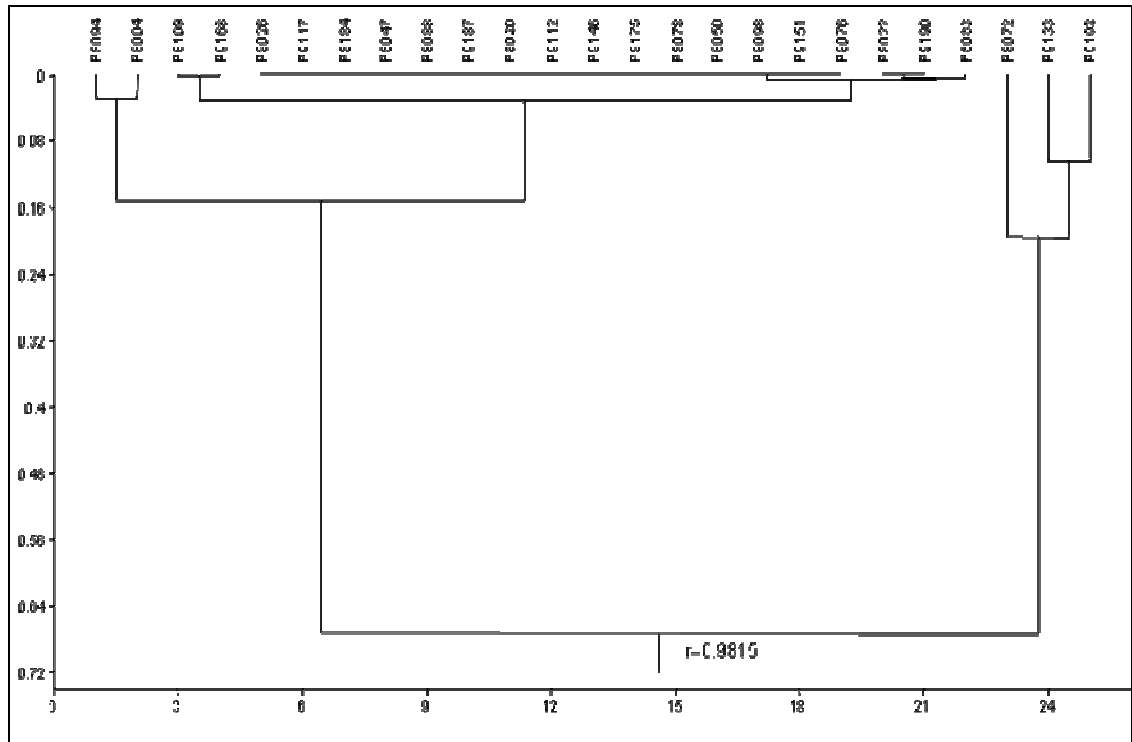
Con los resultados de EC_{50} para cada aislamiento de *Colletotrichum* spp, se realizó un cluster que permitió agruparlos de acuerdo a su respuesta a cada fungicida. Todos los análisis de conglomerados presentan un coeficiente de correlación mayor a 0.80 (r) por tanto, existe un buen grado de adecuación entre la matriz básica de datos y los agrupamientos resultantes y se descarta errores en la técnica de elaboración (Fig 11,12,13).

Figura 11. Agrupamiento de aislamientos de *Colletotrichum* spp con base en la EC_{50} de antracol



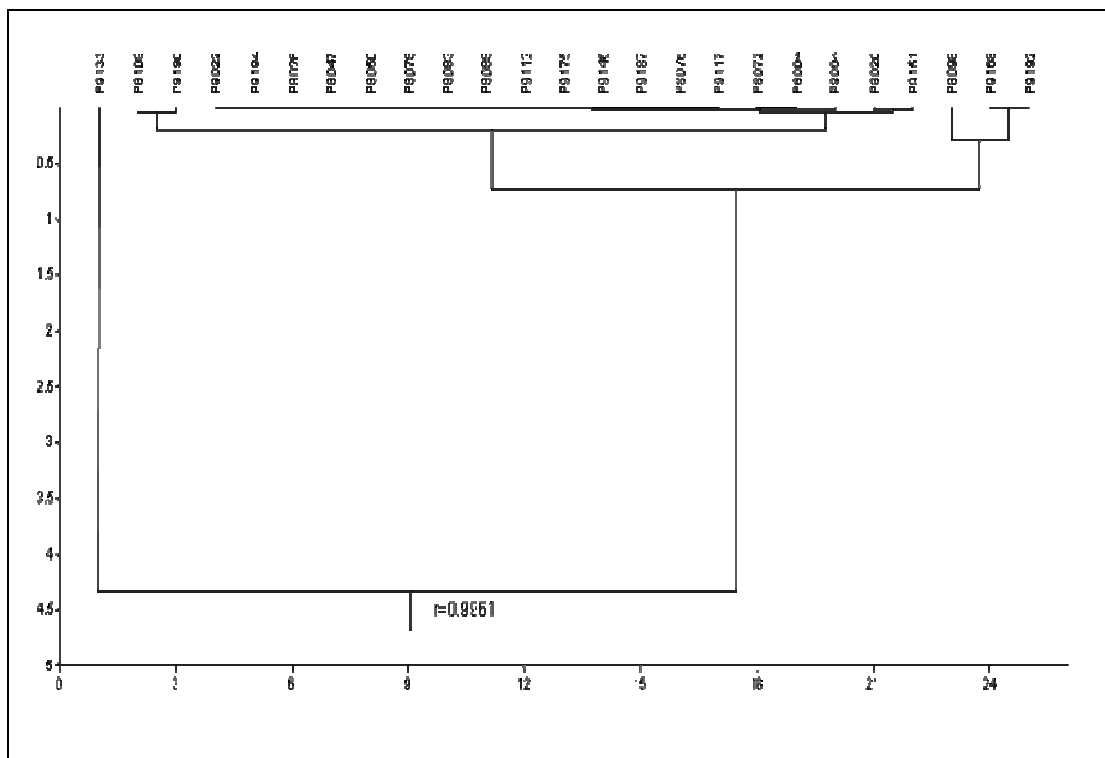
El análisis (Figura 11) permitió establecer la formación de cuatro subgrupos: el primero con el 24% de los aislamientos que presentan valores de EC_{50} entre 23.35 y 30.46 μ g/ml, el segundo grupo con el 16% lo conforman aislamientos con valores de 33.57 a 40.18 μ g/ml, el tercero formado por el 28% muestra valores de EC_{50} de 0.13 a 5.9 μ g/ml y por último un grupo con EC_{50} de 9.19 a 16.21 μ g/ml.

Figura 12. Agrupamiento de aislamientos de *Colletotrichum* spp con base en la EC_{50} de benomil



El cluster para el fungicida Benomil (Figura 12) muestra la formación de tres subgrupos: el primero constituido por los aislamientos P8004 y P8094 con EC_{50} de 0.14 y 0.17 μ g/ml respectivamente, el 80% que conforma el segundo grupo presenta valores de 3.16×10^{-22} y 0.032 μ g/ml y finalmente el tercer grupo formado por P8072, P9133 y P9192 con EC_{50} de 0.82, 0.68 y 0.57 μ g/ml respectivamente.

Figura 13. Agrupamiento de aislamientos de *Colletotrichum* spp con base en la EC₅₀ de mertec



Teniendo en cuenta los resultados de agrupamiento y la escala de sensibilidad planteada por Chung *et al* en el 2010 (Ver tabla 4), se realizó la clasificación de los aislamientos de *Colletotrichum* spp como se muestra en siguiente tabla.

Para el fungicida mertec (Figura 13) el cluster muestra 3 subgrupos donde el 84% de los aislamientos presentan EC₅₀ menores a 0.25µg/ml, los aislamientos P8098, P9168 y P9192 con valores de 0.57, 0.87 y 0.86µg/ml respectivamente constituyen el 12% y únicamente P9133 presentó una EC₅₀ de 4.44µg/ml separándose evidentemente del grupo.

Tabla 5. Determinación de sensibilidad por EC₅₀

Aislamientos	Antracol		Benomil		Mertec	
	EC50	Respuesta	EC50	Respuesta	EC50	Respuesta
P8004	23,9502662	MR	0,13961354	S	0,00907291	S
P8020	16,1966085	MR	3,1623E-22	S	0,04216965	S
P8022	26,7468552	MR	0,00476394	S	8,756E-05	S
P8026	12,9339698	MR	1,4925E-05	S	0,00011754	S
P8047	27,4038098	MR	1,7302E-06	S	4,3804E-05	S

P8050	33,5788912	MR	2,4153E-05	S	2,322E-05	S
P8072	3,24242221	S	0,82089142	S	0,0047863	S
P8076	40,184717	MR	0,00042919	S	0,00073935	S
P8078	9,19679199	S	3,7276E-06	S	2,0535E-05	S
P8083	5,90315705	S	0,00903405	S	5,8339E-06	S
P8088	1,54947313	S	4,1011E-09	S	2,0535E-10	S
P8094	3,95310887	S	0,16834122	S	0,01621349	S
P8098	0,36078785	S	3,0079E-05	S	0,57361525	S
P8109	16,2160379	MR	0,03091691	S	0,2026127	S
P9112	33,9025651	MR	5,1795E-14	S	5,4117E-22	S
P9117	34,3586456	MR	1,1103E-05	S	0,00054287	S
P9133	0,1350314	S	0,57311498	S	4,44101269	S
P9146	23,3572147	MR	3,0079E-07	S	3,0079E-07	S
P9151	15,2997623	MR	6,6408E-05	S	0,05945571	S
P9168	10,2249651	MR	0,03257021	S	0,86922145	S
P9175	29,9960605	MR	7,8965E-07	S	1,1288E-08	S
P8184	12,7342208	MR	9,4267E-06	S	7,6668E-05	S
P9187	30,4698957	MR	3,2903E-09	S	0,00021544	S
P9190	4,40228506	S	0,00526395	S	0,24770764	S
P9192	10,9877581	MR	0,67728153	S	0,86370143	S

Para antracol el 68% de los aislamientos se clasifican como medianamente resistentes (MR) y solamente 8 aislamientos presentaron sensibilidad al fungicida lo que indica una baja eficiencia en el control del patógeno.

Según la información recopilada sobre el uso de ditiocarbamatos en los cultivos de tomate de árbol en el departamento de Putumayo y los resultados de sensibilidad encontrados en este estudio es posible determinar que las inadecuadas prácticas de manejo han llevado al incremento de la respuesta de resistencia del patógeno a antracol debido a que posiblemente se esté ejerciendo presión de selección por la aplicación altas dosis o subdosis que puede ocasionar el surgimiento de mutaciones de uno o más grupos de genes que generan resistencia a ingredientes activos de fungicidas de un mismo grupo (Brent *et al*, 2007 y Corredor *et al*, 2007) como en este caso de los ditiocarbamatos.

Todos los aislamientos fueron sensibles a la adición de benomil presentando valores de dosis media, menores a 1µg/ml para el 28% y menores a 0.01µg/ml para el resto de los casos siendo un fungicida muy eficiente en el control del

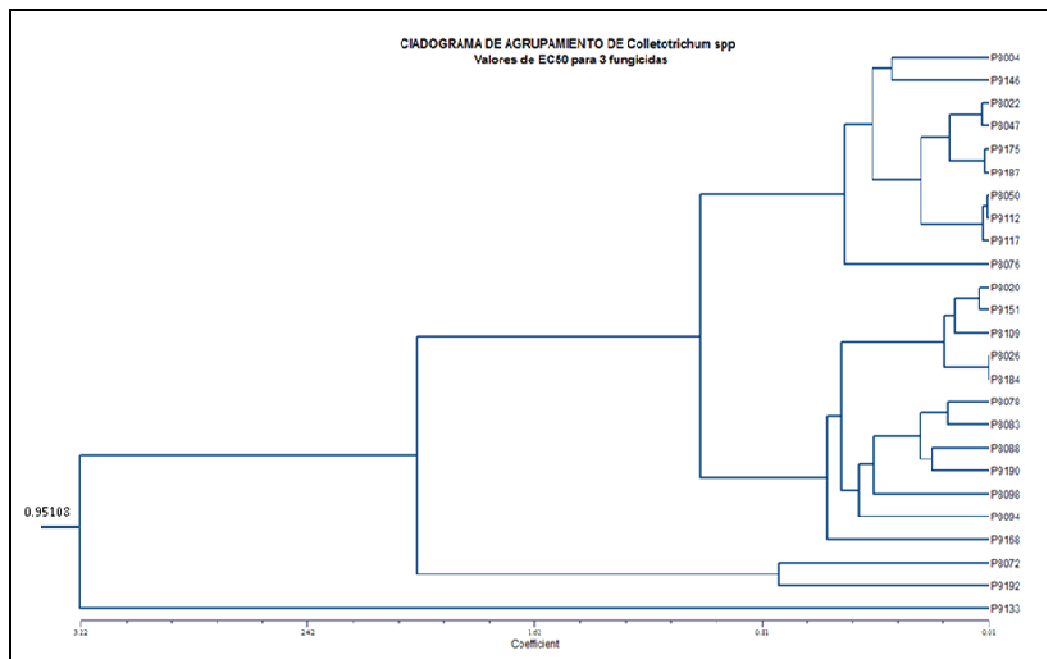
patógeno. Los resultados son similares para mertec donde se redujo el crecimiento en un 50% en concentraciones muy bajas siendo menores a 1 µg/ml para el 20% de los aislamientos y menores a 0.1µg/ml para el 76% restante. Únicamente P9133 tiene un valor de 4.44µg/ml por lo tanto este compuesto permite inhibir el patógeno con bajo riesgo de inducir resistencia con el uso adecuado.

4.6 ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD POBLACIONAL

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos de EC₅₀ se elaboró un fenograma para determinar la variación entre aislamientos de acuerdo a sus respuestas a los tres fungicidas.

El análisis presenta un coeficiente de correlación de 0.95180 por tanto, existe un buen grado de adecuación entre la matriz básica de datos y los agrupamientos resultantes (Figura 14).

Figura 14. Fenograma de agrupamiento de *Colletotrichum* spp por EC₅₀



El fenograma muestra la formación de dos primeros grupos que incluyen a la mayoría de los aislamientos y se asocian de acuerdo a la sensibilidad a los fungicidas antracol, mertec y benomil. El siguiente grupo lo constituyen los aislamientos P8072 y P9192 para los cuales cabe resaltar manifestaron los valores de EC₅₀ más altos para los benzimidazoles y más bajos para antracol contrario a lo que ocurre con el aislamiento P9133 separado de los demás aislamientos.

Los resultados obtenidos permiten establecer que no existe homogeneidad en la población presentándose una gran variabilidad entre las respuestas de los

asilamientos a los fungicidas benzimidazoles y ditiocarbamatos, lo cual se corrobora con lo presentado por Bailey y Jeger en 1992 quienes describen un elevado grado de variabilidad cultural, morfológica y patógena en ensayos *in vitro* de *C.gloeosporioides* y lo asocian con la plasticidad fenotípica y capacidad de adaptación de este patógeno a diferentes condiciones.

5. CONCLUSIONES

Uno de los mayores limitantes en la búsqueda de nuevas alternativas al control químico de la antracnosis, lo constituyen la escasa información y el desconocimiento acerca de la sensibilidad a la acción de diferentes fungicidas.

El uso intensivo de ditiocarbamatos en los municipios de Putumayo puede ser uno de los factores que está generando resistencia en las poblaciones evaluadas con el fungicida antracol.

La tasa de crecimiento fue suprimida significativamente por los fungicidas benomil y mertec desde la concentración de 0.1 µg/ml.

Todos los aislamientos fueron sensibles a los bencimidazoles con EC₅₀ menores a 1 µg/ml

El 68% de los aislamientos evaluados con antracol presentaron EC₅₀ entre 9.19 y 40.18 µg/ml.

Los fungicidas mertec y benomil no inhibieron la formación de conidias y considerando la acción del fungicida de inhibir la formación de tubos germinativos es posible que se haya causado pérdida de viabilidad en estas estructuras reflejada en las bajas tasas de crecimiento.

Benomil y mertec resultaron ser exitosos en el control *in vitro* del patógeno, mientras que antracol no resulto ser efectivo para el control de su crecimiento.

Es necesario utilizar adecuadamente estos productos a nivel de campo para minimizar el riesgo de que aparezcan signos de resistencia.

6. RECOMENDACIONES

Realizar estudios de sensibilidad utilizando otros fungicidas de diferentes grupos químicos para determinar el comportamiento del patógeno y lograr un análisis más completo que permita desarrollar un eficiente programa de control químico en campo.

Para determinar el efecto de los fungicidas sobre la tasa de esporulación, es necesario evaluar características como la formación de tubos germinativos

Las pruebas *in vitro* generan una muy buena aproximación del efecto de los fungicidas pero es necesario avanzar con las investigaciones *in vivo* para confirmar la efectividad biológica de los productos químicos evaluados.

BIBLIOGRAFIA

ALBERTINI, C., GREDT, M y LEROUX, P. 1999. Mutations on the β -tubulin gene associated with benimidazole resistance in the cereal eyespot fungi *Tapesia yallundae* and *Tapesia acuformis*. En: Pestic. Biochem. Physiol. Vol 64. pp. 17-31.

AGRIOS, G.N. 2005. En: Plant Pathology, 5th edition. Academic Press. New York, USA. pp. 922

ALAHAKOON, P.W., SEREENIVASAPRASAD, S., BROWN, A.E Y MILLIS, P.R.1992. Selection of genetic variant within *Colletotrichum gloeosporioides* isolates pathogenic on mango by passaging through wounded tomato fruit. En: Plant Pathology. Vol41. pp. 227-240

ANDRADE, A.C., DEL SORBO, G., VAN NISTELROOY, J y DE WAARD, M.A. 2000. The ABC transporter AtrB from *Aspergillus nidulans* mediates resistance to all major classes of fungicides and some natural toxic compounds. En: Microbiology. Vol 146. pp. 1987-1997

ARIAS, R. B y CARRIZALES, L. 2007. Control químico de la antracnosis del mango (*Mangifera indica* L. en pre y postcosecha en el municipio Cedeño, estado Monagas, Venezuela. En: Bioagro. Vol. 19. pp. 19-25

BADEL, J.L y KELEMU, S. 2004. Variación en crecimiento, esporulación y sensibilidad a benlate de aislamientos suramericanos de *Colletotrichum gloeosporioides*. En: Pasturas tropicales. Vol.19. Colombia. pp. 2-8.

BAILEY, A.J y JEGER, M.J. 1992. *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. En: British Society for Plant Pathology. CAB International. Wallingford UK. pp. 88-120.

BAILEY, J.A., NASH, C., MORGAN, L.W y O'CONNELL, R.J. 1996. Molecular taxonomy of *Colletotrichum* species causing anthracnose on the Malvaceae. En: *Phytopathology*. Vol 86. pp. 1076-1083.

BAYER CROPSCIENCE. 2006. Ficha técnica. Antracol 70PM

BERNAL, J., DÍAZ, C y VANEGAS. F. 2003. Generalidades del cultivo. En: Tecnología para el cultivo del tomate de árbol. Corpoica. Manual técnico 3. Antioquia. pp. 8-49 .

BOLLEN, G.J y FUCHS, A. 1970. On the specificity of the in vitro and in vivo antifungal activity of benomyl. En: Plant Pathology. Vol 76. pp. 299-312

BOTERO, M. 1999. Estudios Biológicos Y Epidemiológicos de la Antracnosis (*Colletotrichum Gloeosporioides* Penz) en Tomate de Árbol y desarrollo de alternativas para su manejo integrado en Colombia". Manizales. pp.1-24

BRENT, K.J y HOLLOMON, D. 2007. En: Fungicide resistance in crop pathogens: How can it be managed?. Brussels, Belgium. pp. 9-37

BROWN, G. E. 1975. Factors affecting postharvest development of *Colletotrichum gloeosporioides* in citrus fruits. En: Phytopathology. Vol 65. pp.404-409.

CADENA, E. 2001. Estudio de Prefactibilidad para Tomate de Árbol. [Citado: agosto de 2009] Disponible en internet: <http://www.proexport.com.co/proexportim/Aplicacion/frames.as>

CARREÑO, N., VARGAS, A., BERNAL, A y RESTREPO, S. 2007. Problemas fitopatológicos en especies de la familia Solanaceae causados por los géneros *Phytophthora*, *Alternaria* y *Ralstonia* en Colombia. En: Agronomía Colombiana. Vol 25. Bogotá. pp.320- 329

CORREDOR, I., CARIDAD, M y RESTREPO, S. 2007. Evaluación de la susceptibilidad de hongos endófitos aislados de rosa (*Rosa hybrida*) a fungicidas comerciales. En: Revista Colombiana de Biotecnología. Vol 9 No 1. pp.59-74

CHUNG, WEN-HSIN., CHUNG, WEN-CHUNG., PENG, MUN-TSU., YANG, HONG-REN y HUAN, JENN-WEN. Specific detection of benzimidazoles resistance in *Colletotrichum gloeosporioides* from fruit crops by PCR-RFLP. En: New Biotechnology. Vol 27, No 1. Taiwan. pp.17-24

DEAHL, R., INGLIS, D.A y DEMUTH, S.P. 1993. Testing for resistance to Metalaxyl in *Phytophthora Infestans* isolates from north-western Washington. En: America Potato Journal. Vol 70. pp.779-795

DODD, J.C., ESTRADA, A.B., MATEHAM, J., JEFFRIES, P y JEGER, M.J. 1991. The effect of climatic factors on *Colletotrichum gloeosporioides*, the causal agent of mango anthracnose, in the Philippines. En: Plant Pathology. Vol 40. pp. 568-575

DU PONT. 2007. Hoja de datos de seguridad. Benlate 50 PM.

ESTRADA, A. B.; DODD, J. C y JEDDRIES, P. 1993. Effects of environment of the *in-vitro* growth and development of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from the Philippines.

FITZELL, R.D., PEAK, C. K y DARNELL, R. E. 1984. A model for estimating infection levels of Anthracnose of mango – Inoculum sources, spore production and dispersal. En: Annals of Applied Biology. Vol 104. pp. 53-59

FÖRSTER, H y ADASKAVEG, J.E. 1999. Identification of subpopulations of *Colletotrichum acutatum* and epidemiology of almond anthracnose in California. En: *Phytopathology*. Vol 89.pp. 1056-1065

FRAC (Fungicide resistance action committee). 2010. List of plant pathogenic organisms resistant to disease control agents. Revisado enero de 2010.pp. 1-43

FREEMAN, S., KATAN, T y SHABI, E. 1996.Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from avocado and almond fruit whit molecular and pathogenicity tests. En: *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 62. Israel. pp. 1014-1020

FREEMAN, S., KATAN, T y SHABI, E. 1998. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits.En: *Plant Disease* Vol 82. Israel. pp. 596-605

GIRARD O. E y LOBO A. M. 1977. El cultivo del tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.). En: Curso sobre frutales. Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). Medellín. pp. 195-212

GRIFFITHS, E. 1981. Pathogenic plant disease. En: *Annual Review Phytopathology*. Volumen 19. pp. 69-82

GUTIÉRREZ, J., GUTIÉRREZ, O., NIETO, D., TÉLIZ, D., ZAVATELA, E., DELGADILLO, F y VAQUERA, H. 2003. Resistencia a benomil y tiabendazol en aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz y Sacc. Obtenidos de Mango (*Mangifera Indica* L). En cinco regiones de México. En: *Revista Mexicana de Fitopatología*. Vol 21. Ciudad Obregón México. pp. 260-266

GUZMAN, M. H. 1981. Trabajo de grado: Evaluación de fungicidas para el control de antracnosis *Colletotrichum gloeosporioides* Penz del tomate de árbol *Cyphomandra betacea*. Universidad Nacional de Colombia. Medellín.

HAMADA, N. A. 2005. Caracterização morfológica, patogênica e molecular de isolados de *colletotrichum* spp. em Macierira. Florianópolis. pp. 14-19

HEWITT, H.G. 1998. Fungicide resistance. En: *Fungicides in Crop Protection*. Centre for Agriculture and Biosciences International, Wallingford, UK .pp. 155-181

JEGER, M.J y PLUMBLEY, R.A. 1988. Post-harvest losses caused by anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) of tropical fruit and vegetables. En: *Biodeterioration*. Vol 7. pp.642-646

- JEFFRIES, P., DODD, J.C., JEGER, M.J y PLUMBIEY, R.A. 1990. The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruit crops. En: Plant Pathology. Volumen 39. pp. 343-366
- LAMONDIA, J y DOUGLAS, S.M. 1997. Sensitivity of *Botrytis cinerea* from Connecticut greenhouses to benzimidazole and dicarboximide fungicides. En: Plant Disease. Volumen 81. pp. 729-732
- LEROUX, P., LANAE, C y FRITZ, R. 1992. Similarities in the antifungal activities of fenpiclonil, iprodione and tolclofos-methyl against *Botrytis cinerea* and *Fusarium nivale*. En: Pesticide Science. Vol 36. pp 255-261.
- LOBO, M. 2006. Recursos genéticos y mejoramiento de frutales andinos: una visión conceptual. En: Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria.
- LOBO, M. 2006. Tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* Sendt), frutal promisorio para la diversificación del agro andino. En: Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria.
- LÓPEZ, A.M. 2001. Taxonomía, patogênese e controle de espécies do gênero *Colletotrichum*. En: Anual de Patología de Plantas RAP Passo Fundo, Brasil. Vol 9. pp. 291-318
- MAG/IICA. 2001. Ministerio de Agricultura y Ganadería – República del Ecuador. Instituto Interamericana de Cooperación para la Agricultura. Identificación de mercados y tecnologías para productos agrícolas tradicionales de exportación. Disponible en internet: <http://www.sica.gov.ec/agronegocios/biblioteca/Convenio%20MAG%20IICA/principal.htm>.
- MADDEN, L. V. 1992. Rainfall and the dispersal of fungal spores. En: Plant Pathol. Vol 8. pp. 39-42
- MADR. 2006. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Disponible en internet: <http://www.minagricultura.gov.co>.
- MAYMON, M., ZVEIBIL, A., PIVONIA, S., MINZ, D y FREEMAN, S. 2006. Identification y Characterization of Benomyl- Resistant and Sensitive Populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from *Statice* (*Limonium spp*). En: Phytopathology. Vol 96. Israel. pp 542-548
- MOULD, M.J., BOLAND, G.J. y ROBB, J. 1991. Ultrastructure of the *Colletotrichum trifolii*-*Medicago sativa* pathosystem. II. Postpenetration events. En: Physiological and Molecular Plant Pathology. Vol 38. pp 195-210
- NAKAUNE, R y NAKANO, M. 2007. Benomyl resistance of *Colletotrichum acutatum* is caused by enhanced expression of β -tubulin 1 gene regulated by putative leucine zipper protein CaBEN1. En: Fungal Genetics and Biology. Vol 44. Hiroshima (Japón). pp. 1324-1335

O'CONNELL, R.J., BAILEY, J.A y RICHMOND, D.V. 1985. Cytology and physiology of infection of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum*. En: Physiological and Molecular Plant Pathology. Vol 27.pp. 75-98

OPCIÓN PUTUMAYO. Valle de Sibundoy, 2007. [citado: julio de 2010] Disponible en Internet: <http://personales.com/colombia/california/ONGFOP/valle.htm>

OROZCO, S.M. 1992. Control químico de la antracnosis y roña en mango "Manila". Sociedad Mexicana de Fitopatología. México. pp 203-219

PEÑA, S y ORTIZ, C. 1996.Evaluación de fungicidas no convencionales par el control de la antracnosis *Colletotrichum gloesporioides* (Pez) Penz & Sacc. Del tomate de Arbol *Cyphomandra betacea* (Cav) Sendt. Univeridad Nacional de Colombia. Medellín. pp 12-22

PERES, N.A.R., SOUZA, N.L., ZITKO, S.E y TIMMER, L. W. 2002. Activity of benomyl for control of postbloom fruit drop of citrus caused by *Colletotrichum acutatum*. En: Plant Disease. Vol 86. pp 620- 624.

PERES. N.A.R., SOUZA, N.L., PEEVER, T.L y TIMMER, L. 2004.Benomyl sensitivity of isolates of *colletotrichum acuatum* and *C.goesporioides* from citrus. En: Plant Disease, Vol 88. pp. 125-130

PERFECT, S.E., HUGHES, H.B., O'CONNELL, R.J. y GREEN, J. 1999. *Colletotrichum*: A model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. En: Fungal Genetics Biology. Vol 27. pp. 186-198

PROEXPORT COLOMBIA. 2007. Informe frutas exóticas, mermeladas y frutas deshidratadas. Subdirección de inteligencia de mercados – DIC. [Citado: agosto de 2008]. Disponible en internet: <http://www.proexport.com.co/vbecontent/library/documents/DocNewsNo10050DocumentNo7848.pdf>

PRUSKY, D., FREEMAN, S y DICKMAN, M.B. 2000. *Colletotrichum*: Host Specificity, Pathology, and Host-Pathogen Interaction. En: The American Phytopathological Society. St. Paul MN. pp. 232-244

PRUSKY,D., McEVOY, J.L., CONWAY, W.S.2001. Local inoculation of host pH by *Colletotrichum* species as a mechanism to increase virulence. En: The American Phytopathological Society. Vol 19. Bogotá (Colombia). pp. 1105-1112

RONDÓN, O., SANABRÍA, N., RONDÓN, A. 2006. Respuesta *in vitro* a la acción de fungicidas para el control de antracnosis, *Colletotrichum gloesporioides* Penz, en frutos de mango. En: Agronomía Tropical. Volumen 56. Maracay. Venezuela.pp. 219-235

ROHLF, J. 2009. Ecology and Evolution, SUNY at Sony Brook.

SALDARRIAGA, A., BERNAL, J y TAMAYO, P.J. 1997. Enfermedades del cultivo del tomate de árbol en Antioquia: Guía de reconocimiento y control. En: Boletín Técnico, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA). Antioquia. pp. 69-105

SALADIN, G., MAGNÉ, C y CLÉMENT, C. 2003. Effects of fludioxonil and pyrimethanil, two fungicides used against *Botrytis cinerea*, on carbohydrate physiology y in *Vitis vinifera* L. En: Pest Management Science. Vol 59. pp 1083-1092.

KUMAR, S., REDDY, N., REDDY, K y DEVI, M. 2007. Evaluation of Fungicidal Resitance Among *Colletotrichum gloeosporioides* Isolates Causing Mango Anthracnose in Agri Export Zone of Andhra Pradesh, India. En Plant Pathology. Vol 16. pp. 157-160

Sañudo, S., Arteaga, O.M, Vallejo. C.W, Arevalo.F.R, Burbano.R.E. 2001. Fundamentos de micología Agrícola. Universidad de Nariño. San Juan de Pasto.

SMITH, C.M. 1988. History of benzimidazole use and resistance. Fungicide Resistance in NorthAmerica. En: American Phytopathological Society Press. Minnesota, USA. pp. 23-24.

SMITH, B.J. Y BLACK, L.L. 1990. Morphological, cultural, and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. En: Plant Disease. Vol 74.pp 69-76

SORIANO, E.C., COLINAS, M.T., ZAMORA, T y CAJUSTE, J.F.2001 Anatomia del daño por rozamiento y por *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. En frutos de aguacate "HASS". En: Agrociencia. Vol 35. pp. 237-244

SPALDING. D.H. 1982. Resistance of mango pathogens to fungicides used to control postharvest diseases. En: Plant Disease. Vol 66. pp. 1185-1186

SUTTON, B.C. 1992. The genus *Glomerella* and its *anamorph* *Colletotrichum*. En: Bailey, J.A., y Jeger, M.J. *Colletotrichum*- biology, epidemiology and control. CAB International. Wallingford UK. pp. 1-26

TIMMER, L. W., BROWN, G. E y ZITKO, S. E. 1998. The role of *Colletotrichum* spp. in postharvest anthracnose of citrus and survival of *C. acutatum* on fruit. En: Plant Disease. Vol 82. pp 415-418

WALLER, J.M. 1992. *Colletotrichum* diseases of perennial and other cash crops. pp 167-185. En: *Colletotrichum*, Biology, Pathology and Control. Bailey, J.A y Jeger, M.J, eds. CAB International, Wallingford, UK. .

WHARTON, P. S. y DIÉGUEZ, J. 2004. The Biology of *Colletotrichum Acutatum*. En: Anales del Jardín Botánico de Madrid. Vol 61. pp. 3-22

Wijesundera, R.L.C., Bailey, J.A., y Byrde, R.J.W. 1984. Production of pectin lyase by *Colletotrichum lindemuthianum* in culture and in infected bean (*Phaseolus vulgaris*) tissue. En: Journal of General Microbiology. Vol 130.pp. 285-290

ANEXOS

Anexo A. Prueba de χ^2 para porcentaje de inhibición y tasa de esporulación por concentraciones

Porcentaje de inhibición

Concentración	Antracol	Benomil	Mertec
0.1	216.656	53.6701	59.9656
1	131.389	4.82875	24.2665
10	151.711	14.4223	24.4941
100	109.496	109.843	109.621
1000	1031.31	1005.27	1012.04
10000	10047.3	10007.8	10010.8

Tasa de esporulación

Concentración	Antracol	Benomil	Mertec
0.1	325476091	385679404	248695921
1	183839156	328894093	151252543
10	117798063	322750384	242234722
100	274851676	438974395	437923069
1000	304121501	258756765	241713230
10000		768390796	232233974

Grados de libertad: 24

Chi tabla: 36.42

Anexo B. Prueba U de Mann – Withney para porcentaje de inhibición y tasa de esporulación

Concentración	N	Antracol				Benomil				Mertec			
		% de Inhibición		Tasa de Esporulación		% de Inhibición		Tasa de Esporulación		% de Inhibición		Tasa de Esporulación	
		T=Ub	p(same)	T=Ub	p(same)	T=Ub	p(same)	T=Ub	p(same)	T=Ub	p(same)	T=Ub	p(same)
0.1-1	25	167	0.0049	284	0.5869	251	0.2366	279	0.522	270	0.4151	309	0.9536
0.1-10	25	39	1.18E-07	240	0.1624	160	3.19E-03	301	0.831	195	0.232	305	0.892
0.1-100	25	0	1.42E-09	176	0.00832	131	4.49E-04	277	0.4971	1	1.597E-09	308	0.9381
0.1-1000	25	0	1.42E-09	176	0.00832	64	1.50E-06	290	0.6695	32	5.548E-08	312	1
0.1-10000	25	0	1.42E-09	0	1.4E-09	3	2.03E-09	226	0.09519	0	1.416E-09	234	0.1302
1 a 10	25	99	3.58E-05	266	0.3721	176	8.32E-03	288	0.6415	2288	0.1031	310	0.969
1 - 100	25	0	1.42E-09	209	0.04566	122	2.27E-04	235	0.1352	0	1.416E-09	310	0.969
1 - 1000	25	0	1.42E-09	203	0.0344	51	4.10E-07	264	0.3517	43	1.795E-07	310	0.969
1 - 10000	25	0	1.42E-09	0	1.4E-09	0	1.42E-09	262	0.332	0	1.416E-09	228	0.1031
10 - 100	25	116	0.00014	225	0.0914	236	0.1403	263	0.3417	4	2.286E-09	306	0.9073
10 - 1000	25	10	4.64E-09	223	0.08419	106	6.42E-05	277	0.4971	73	0.00000353	310	0.969
10 - 10000	25	0	1.42E-09	0	1.4E-09	0	1.42E-09	243	0.1806	0	1.416E-09	210	0.04781
100 - 1000	25	127	0.00033	308	0.9381	126	0.00031	303	0.8614	80	6.749E-06	305	0.892
100 - 10000	25	0	1.42E-09	12.5	6.2E-09	0	1.42E-09	206	0.03971	99	0.00003584	226.5	0.09713
1000 - 10000	25	0	1.42E-09	25	2.6E-08	18	1.17E-08	220	0.07425	10	4.638E-09	231	0.116

