

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

EVALUACIÓN *in vitro* DE FUNGICIDAS PARA EL CONTROL DE
Colletotrichum gloeosporioides, *C. acutatum* y *C. fragariae* CAUSANTES DE LA
PODREDUMBRE AMARGA EN MANZANO

por
Diego Gabriel DAMASCO CAPECE

TESIS presentada como uno
de los requisitos para obtener
el título de Ingeniero Agrónomo

MONTEVIDEO
URUGUAY
2011

Tesis aprobada por:

Director: _____
Dra. Ing. Agr. Sandra Maria Alaniz Ferro

Dr. Ing. Agr. Pedro Emilio Mondino Hintz

Ing. Agr. MSc. Vivienne Nerina Gepp Ward

Fecha: 15 de diciembre de 2011

Autor: _____
Diego Gabriel Damasco Capece

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, a mis amigos y a mi novia por el invaluable y constante apoyo y por el estímulo que me brindaron para lograr este objetivo.

Muy especialmente a Sandra Alaniz por su apoyo y dedicación durante todo el desarrollo de la tesis.

Al Dr. Ing. Agr. Pedro Mondino y a la Ing. Agr. Msc. Vivienne Gepp por su tiempo, dedicación y aportes en la realización de esta tesis.

A Laura Hernandez por su ayuda en la preparación de materiales en el laboratorio y su colaboración.

A todo el equipo del laboratorio de Fitopatología.

Al Ing. Agr. Oscar Bentancour por su colaboración en el análisis estadístico de los datos obtenidos.

Al personal de documentación y biblioteca por su cordial atención, especialmente a la Lic. Sully Toledo por su dedicación en la corrección de este documento.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PAGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VI
1. <u>INTRODUCCION</u>	1
1.1. OBJETIVOS GENERALES.....	2
1.1.1. <u>Objetivos específicos</u>	3
2. <u>REVISION BIBLIOGRAFICA</u>	4
2.1. EL CULTIVO DE MANZANO	4
2.2. ENFERMEDADES QUE AFECTAN EL MANZANO.....	5
2.3. LA PODREDUMBRE AMARGA CAUSADA POR <i>Colletotrichum</i> spp.	6
2.3.1. <u>Síntomas y signo</u>	7
2.3.2. <u>Agentes causales</u>	9
2.3.3. <u>Ciclo de la enfermedad</u>	13
2.3.4. <u>Epidemiología</u>	14
2.4. MANEJO DE LA PODREDUMBRE AMARGA	16
2.4.1. <u>Control cultural</u>	16
2.4.2. <u>Control biológico</u>	17
2.4.3. <u>Control con productos de origen natural</u>	18
2.4.4. <u>Control químico</u>	19
3. <u>MATERIALES Y METODOS</u>	24
3.1. CULTIVOS FUNGICOS	24
3.1.1. <u>Identificación de las especies</u>	25
3.1.2. <u>Aislados seleccionados</u>	25
3.2. ENSAYOS DE INHIBICIÓN <i>in vitro</i> DEL CRECIMIENTO MICELIAL.....	26
3.2.1. <u>Productos químicos evaluados</u>	26
3.2.2. <u>Evaluación <i>in vitro</i> por inhibición del crecimiento micelial</u>	31
3.2.3. <u>Análisis de datos</u>	32
4. <u>RESULTADOS Y DISCUSION</u>	33
4.1. CULTIVOS FUNGICOS	33
4.2. ENSAYOS DE PRODUCTOS QUÍMICOS.....	33
5. <u>CONCLUSIONES</u>	43

6. <u>RESUMEN</u>	44
7. <u>SUMMARY</u>	45
8. <u>BIBLIOGRAFIA</u>	46
9. <u>ANEXOS</u>	52

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Figura No.	Página
1. Síntomas de la podredumbre amarga causados por <i>Colletotrichum</i> spp. en frutos de manzana: a) síntoma y signo en la variedad Cripps Pink; b) síntoma y signo en la variedad Granny Smith; c) varias manchas unidas formando zonas putrefactas de mayor tamaño; d) Sección transversal de un fruto donde se observa la pudrición invadiendo el interior de la fruta formando la “V” característica.....	8
2. <i>Colletotrichum gloeosporoides</i> : a) aspecto de la colonia luego de seis días de crecimiento en medio de cultivo PDA; b) conidios observados bajo microscopio a 400x de amplificación.....	11
3. <i>Colletotrichum acutatum</i> : a) aspecto de la colonia luego de seis días de crecimiento en medio de cultivo PDA; b) conidios observados bajo microscopio a 400x de amplificación.....	12
4. <i>Colletotrichum fragariae</i> : a) aspecto de la colonia luego de seis días de crecimiento en medio de cultivo PDA; b) conidios observados bajo microscopio a 400x de amplificación.....	13
5. Fuentes de inóculo de <i>Colletotrichum</i> spp.: a) fruto momificado que ha quedado adherido al árbol (fuente de inóculo primario); b) foco de frutos de Granny Smith afectados por podredumbre amarga con manchas de diferentes grados de desarrollo debido a la dispersión de inóculo secundario.....	17
6. Aspecto de las colonias de los aislados de <i>Colletotrichum fragariae</i> (Coll-37); <i>C. gloeosporioides</i> (Coll-5) y <i>C. acutatum</i> (Coll-11) luego de seis días de crecimiento en medio PDA con el fungicida sistémico difenoconazole a diferentes concentraciones; a) testigo sin fungicida; b) 0,1 ppm; c) 1,0 ppm; d) 10 ppm; e) 100 ppm.....	36

7. Aspecto de las colonias de los aislados de <i>Colletotrichum fragariae</i> (Coll-37); <i>C. gloeosporioides</i> (Coll-5) y <i>C. acutatum</i> (Coll-11) luego de seis días de crecimiento en medio PDA con el fungicida de contacto ziram; a) testigo sin fungicida; b) 0,1 ppm; c) 1,0 ppm; d) 10 ppm; e) 100 ppm.....	37
8. Aspecto de las colonias de los aislados de <i>Colletotrichum fragariae</i> (Coll-37); <i>C. gloeosporioides</i> (Coll-5) y <i>C. acutatum</i> (Coll-11) luego de seis días de crecimiento en medio PDA con fungicida fosfito 40% evaluado a pH 5,5 (pH normal en solución) a diferentes concentraciones; a) testigo sin fungicida; b) 0,5 ppm; c) 5,0 ppm; d) 50 ppm; e) 500 ppm.....	38
9. Aspecto de la colonia del aislado Coll-37 de <i>Colletotrichum fragariae</i> luego de seis días de crecimiento en medio PDA con fungicida fosfito 40% a pH 5,5 (pH normal) (1) o pH 3,5 (acidificado) (2); a) testigo sin fungicida; b) 0,5 ppm; c) 5,0 ppm; d) 50 ppm; e) 500 ppm.....	41

Tabla No.

1. Hectáreas plantadas y producción de manzana por variedad en Uruguay.....	
2. Aislados fúngicos utilizados en los ensayos.....	5
3. Fungicidas seleccionados para evaluar su efecto <i>in vitro</i> en el control de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , <i>C. acutatum</i> y <i>C. fragariae</i>	26
4. Concentraciones efectivas 50 (CE50) (mg L ⁻¹ ó ppm) de los nueve productos evaluados en la inhibición del crecimiento micelial de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , <i>C. acutatum</i> y <i>C. fragariae</i> causantes de la podredumbre amarga en manzano.....	30
	34

1. INTRODUCCION

En Uruguay y el mundo el cultivo del manzano es uno de los frutales más importantes. En nuestro país representa casi el 50% de la superficie dedicada a cultivos de frutales de hoja caduca (URUGUAY. MGAP. DIEA, 2010). Su producción se ha concentrado en la zona sur en los departamentos de Canelones, Montevideo, Colonia y San José y en menor proporción en el litoral norte del país (Gabard, 2003).

Entre las enfermedades que afectan a este cultivo se encuentra la podredumbre amarga causada por especies de hongos del género *Colletotrichum*. Esta enfermedad se caracteriza por causar podredumbre en la fruta principalmente durante las semanas previas y durante la cosecha. Se trata de una podredumbre que externamente se observa como una mancha de color café y deprimida con un diámetro de entre 0,5 y 6 cm. Esta podredumbre avanza hacia el interior de la fruta formando una “V” característica. Sobre la mancha se desarrollan los acérvulos de *Colletotrichum* spp. Es frecuente que ocurra mas de una mancha por fruta, las cuales pueden extenderse causando podredumbre en gran parte de la fruta. En general todas las variedades de manzana son sensibles a esta enfermedad, aunque, las de cosecha tardía como Granny Smith, Cripps Pink, Fuji y Golden Delicious, suelen ser las más afectadas.

En Uruguay, la podredumbre amarga no suele ser una enfermedad problemática. Sin embargo, en años en que ocurren condiciones ambientales favorables para su desarrollo, clima calido y húmedo sobre todo en el verano, puede causar importantes pérdidas de cosecha (Peres 2005, Agrios 2008). Frente a estas situaciones existe escasa experiencia nacional y la mayoría de los técnicos recurre a la aplicación de estrategias de control provenientes de otras regiones las cuales no han sido probadas aquí.

En años favorables al desarrollo de la podredumbre amarga, su manejo se ha basado en la aplicación periódica de fungicidas durante el verano que es el período más crítico.

Los productos mas utilizados son fungicidas de contacto como captan o ziram. Algunos productores realizan también control cultural eliminando los frutos afectados mediante sucesivos repases. A pesar de las medidas de manejo, en años muy favorables al desarrollo de la podredumbre amarga, las pérdidas por causa de esta enfermedad suelen ser cuantiosas como lo ocurrido la pasada zafra 2009-2010 donde en algunos montes provocó descartes de hasta 70% de fruta.

Una posible explicación es que los fungicidas a los que se recurre en estas situaciones, no sean suficientemente efectivos para el control de *Colletotrichum* spp. Por esta razón, en este trabajo se propuso evaluar la efectividad *in vitro* de diferentes formulados comerciales de fungicidas, fuentes de fosfito y un producto de origen natural con el objetivo de comparar su capacidad para inhibir el desarrollo de cepas de *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. acutatum* y *C. fragariae*, previamente identificadas en Uruguay como causantes de la podredumbre amarga del manzano. Para ello se utilizaron diferentes aislamientos monosporicos obtenidos a partir de fruta con síntomas de podredumbre amarga.

Para la comparación de los diferentes productos seleccionados se utilizó la técnica de inhibición del crecimiento micelial en placas con medio de cultivo enmendadas con diferentes concentraciones de producto.

1.1. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar nueve productos químicos por su capacidad inhibitoria en el crecimiento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. acutatum* y *C. fragariae* causantes de la podredumbre amarga del manzano en Uruguay.

1.1.1. Objetivos específicos

1. Obtener un aislado de cada una de las especies de *Colletotrichum* causantes de la podredumbre amarga del manzano en Uruguay.
2. Evaluar *in vitro* la capacidad inhibitoria de los fungicidas difenoconazole, tebuconazole, tryfloxistrobin, iprodione, captan y ziram en el crecimiento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. acutatum* y *C. fragariae*.
3. Evaluar *in vitro* el efecto de dos formulados comerciales de diferente fuente de fósforo, fosfite 40% y fosfite 70%, sobre el desarrollo micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. acutatum* y *C. fragariae*.
4. Evaluar *in vitro* la capacidad inhibitoria del producto de origen natural quitosano, sobre el desarrollo micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. acutatum* y *C. fragariae*.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1. EL CULTIVO DEL MANZANO

El manzano (*Malus x domestica* Borkh) es uno de los principales cultivos de hoja caduca del mundo, cada año se producen más de 70 millones de toneladas en cinco millones de hectáreas, con una tasa anual de crecimiento promedio de 3 a 4% (FAO, 2011).

En Uruguay hay plantadas 3596 hectáreas de manzano, las que representan el 47% de la superficie dedicada al cultivo de frutales de hoja caduca en nuestro país (URUGUAY. MGAP. DIEA, 2010). Las plantaciones de manzano se distribuyen principalmente en la zona centro sur del país en los departamentos de Canelones, Montevideo y San José; y en menor proporción en el litoral norte del país en los departamentos de Artigas, Salto y Paysandú (Gabard, 2003).

Las principales variedades plantadas en el Uruguay son Red Delicious, Red Chief, Top Red, Granny Smith, Early Red One, Royal Gala, Red Spur, Cripps Pink y Fuji, las que en conjunto representan el 84% del total de la superficie plantada (Tabla 1) (URUGUAY. MGAP. DIEA, 2010).

El destino de la producción se reparte en un 70% hacia el mercado de fruta fresca, 24% es volcado a la industria y 6% a la exportación (URUGUAY. MGAP. DIEA, 2010).

Tabla 1: Hectáreas plantadas y producción de manzana por variedad en Uruguay.

Variedades	Hectáreas plantadas	Producción (Ton.)
Red Delicious	725	9566
Red Chief	512	6806
Top Red	497	7608
Granny Smith	394	11180
Early Red One	336	4845
Royal Gala	221	4290
Red Spur	169	2280
Cripps Pink	108	2145
Fuji	96	1815
Mondial Gala	96	1940
Brasil Gala	73	633
Scarlet Spur	59	1276
Royal Red	45	479
Oregon Spur	35	342
Gala	33	519
Kiku	29	557
Otras	182	2495
TOTAL	3596	58775

Fuente URUGUAY. MGAP. DIEA (2010).

2.2. ENFERMEDADES QUE AFECTAN AL MANZANO

En Uruguay la principal enfermedad que afecta al cultivo del manzano es la “sarna del manzano” causada por el hongo *Venturia inaequalis* (Cooke) (García y Moscardi 1975, Mondino 2003). Esta enfermedad afecta todas las partes verdes de la planta

causando manchas en hojas y costras en los frutos. Si no se efectúa un manejo adecuado las pérdidas pueden ser cuantiosas (MacHardy, 1996).

Entre el resto de enfermedades que afectan al manzano se encuentran las denominadas “enfermedades de verano”. Estas enfermedades son causadas mayoritariamente por hongos pertenecientes a la familia Botryosphaeriaceae y a los géneros *Alternaria* y *Colletotrichum*. Se caracterizan por provocar podredumbre de fruta durante el verano, principalmente en el período cercano a la cosecha y durante la cosecha (Jones y Aldwinckle 2002, Leoni et al. 2003, Casco y Conde 2005).

En Uruguay, si bien estas enfermedades no suelen ser problemáticas, en ocasiones pueden causar pérdidas económicas de importancia, especialmente en el caso de las podredumbres causadas por especies del género *Colletotrichum* (Nuñez et al., 1998). Durante la cosecha 2010, la podredumbre amarga, nombre que se le otorga a esta enfermedad, causó pérdidas de hasta un 70% de fruta en algunos montes.

2.3. LA PODREDUMBRE AMARGA CAUSADA POR *Colletotrichum* spp.

La podredumbre amarga del manzano, también llamada antracnosis de los frutales de pepita, es causada por especies del género *Colletotrichum* (Travis et al. s.f., Fernández Valiela 1978, Jones y Aldwinckle 2002, Agrios 2008). Tiene distribución cosmopolita y si las condiciones ambientales son favorables para su desarrollo, clima calido y húmedo, puede ocurrir todos los años causando importantes pérdidas de cosecha (Peres 2005, Agrios 2008). Fue descrita por primera vez por Berkeley en 1856 en manzanos de Inglaterra (Fernández Valiela, 1978), y posteriormente detectada en 1867 en los Estados Unidos (Jones y Aldwinckle, 2002). La podredumbre amarga es muy frecuente en el manzano pero también puede afectar pera (Jones y Aldwinckle, 2002).

En general todas la variedades de manzana pueden ser infectadas por *Colletotrichum* spp, sin embargo las de cosecha tardía suelen ser las más afectadas como es el caso de Granny Smith, Cripps Pink, Fuji y Golden Delicious. Otras variedades que pueden ser afectadas por esta enfermedad son las rojas como Early Red One, Oregon Spur y las Red Delicious (Valdebenito et al. s.f., Yoder y Biggs s. f., Moggia y Yuri 2004, Scatoni et al. 2005, Moral et al. 2007, Mondino 2009).

2.3.1. Síntomas y signo

El síntoma principal es una podredumbre blanda que se observa cuando el fruto ha alcanzado por lo menos la mitad de su tamaño. Externamente aparece como una mancha redondeada, de color café y deprimida en el centro, con un diámetro aproximado de entre 0,5 y 6 cm (Figura 1a y 1b). En una sección transversal la podredumbre avanza hacia el corazón de la fruta formando una “V” característica (Figura 1d). Esta forma de avance es típica de la podredumbre amarga, y la diferencia de otras podredumbres que se caracterizan por lesiones que avanzan de forma cilíndrica hacia el interior del fruto (Travis et al. s.f., Jones y Aldwinckle 2002, Mondino 2005, Agrios 2008).

Inmediatamente sobre la mancha aparecen numerosas y pequeñas estructuras, principalmente cerca del centro de las mismas, que se corresponden con los acérvulos de *Colletotrichum* spp. Estas estructuras con frecuencia se disponen en círculos concéntricos. Cuando el tiempo es húmedo, los acérvulos producen masas cremosas de conidios de color rosado-salmón a marrón oscuro, lo cual hacen que la zona putrefacta se extienda con rapidez y aparezcan más anillos de masas de conidios (Figura 1a). En las zonas podridas más viejas las masas de esporas desaparecen y el tejido cambia de un color café oscuro a negro, se arruga y hunde (Figura 2a, b y c) (Jones y Aldwinckle, 2002).

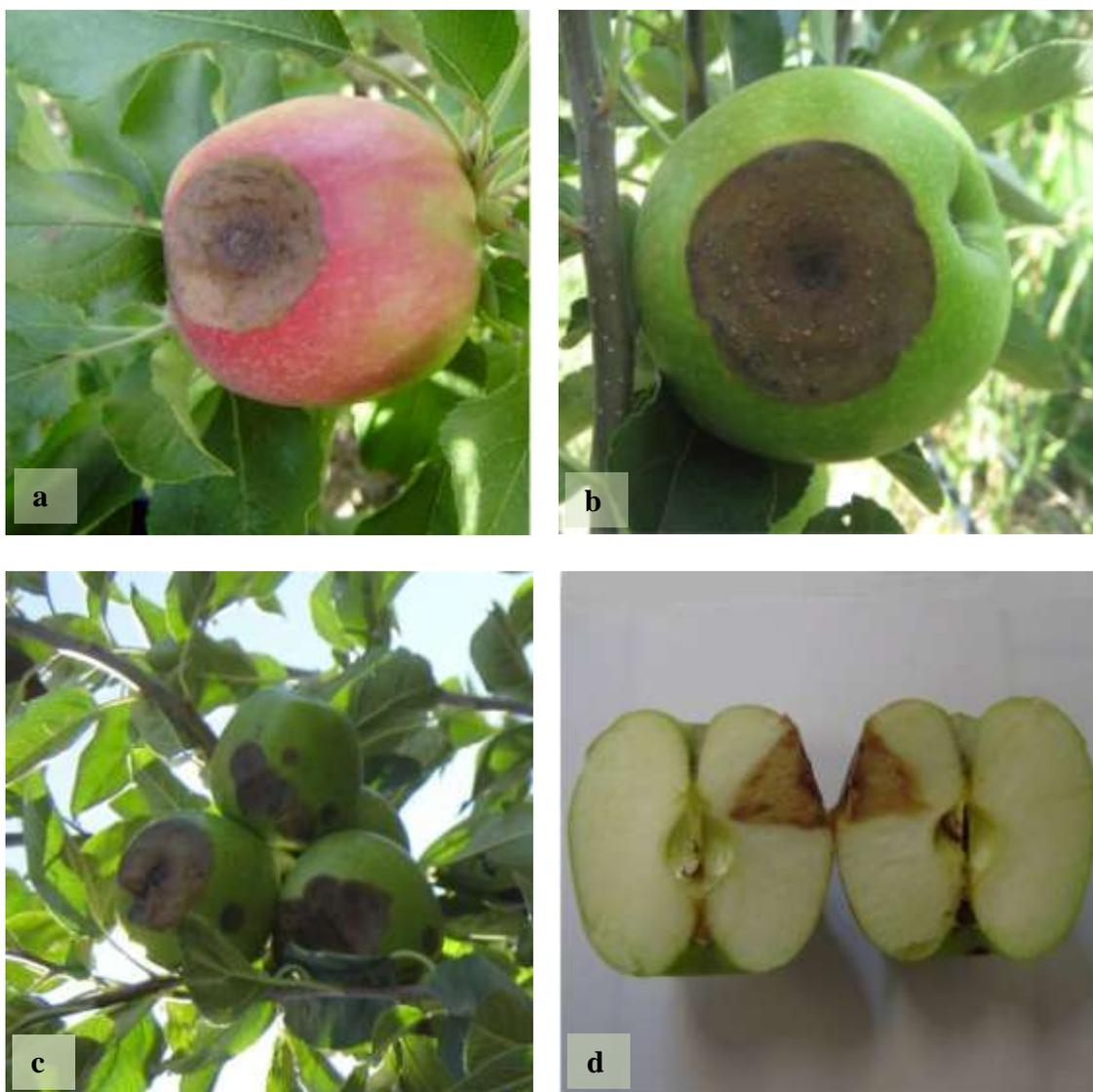


Figura 1: Síntomas de la podredumbre amarga causados por *Colletotrichum* spp. en frutos de manzana: **a)** síntoma y signo en la variedad Cripps Pink; **b)** síntoma y signo en la variedad Granny Smith; **c)** varias manchas unidas formando zonas putrefactas de mayor tamaño; **d)** sección transversal de un fruto donde se observa la pudrición invadiendo el interior de la fruta formando la “V” característica.

Cuando se desarrollan varias manchas sobre un fruto, lo que ocurre con frecuencia, es común que éstas se extiendan, se fusionen y que pudran gran parte o todo el fruto (Figura 2c). Luego el fruto puede desprenderse y momificarse o bien momificarse y mantenerse suspendido en la rama del árbol (Agrios, 2008).

El tipo de pudrición varía dependiendo de si la infección es causada por una ascospora (espora de origen sexual) o por un conidio (espora de origen asexual). Las lesiones originadas por infecciones causadas por conidios se inician como pequeñas zonas de color café claro que se extienden con rapidez y toman la forma de un círculo. En estados más avanzados la superficie de las manchas evolucionan a café oscuro o negro. Los acérvulos se ubican en forma de círculos concéntricos (Jones y Aldwinckle, 2002).

Las lesiones originadas por infecciones causadas por ascosporas son siempre de color oscuro y los acérvulos se ubican al azar sobre la superficie de la lesión, al igual que los peritecios (Jones y Aldwinckle 2002, Lolas 2005, Agrios 2008).

2.3.2. Agente causal

La enfermedad de la podredumbre amarga es causada por especies de hongos del género *Colletotrichum*. Las dos especies que tradicionalmente han sido reportadas como causantes de la podredumbre amarga son *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. y *C. acutatum* (J.H. Simmonds) (Mordue 1971, Jones y Aldwinckle 2002, Agrios 2008).

La forma perfecta o teleomorfo de *C. gloeosporioides* corresponde a *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spaulding. & Schrenk (Mordue, 1971), mientras que el teleomorfo de *C. acutatum* es *G. acutata* Guerber & Correll (Guerber y Correll, 2001).

El género *Glomerella*, se encuadra en el phylum *Ascomycota*, clase *Sordariomycetes*, subclase *Hypocreomycetidae*, orden *Glomerellales*, familia *Glomerellaceae* (NCBI s.f., Index Fungorum 2008). Si se clasifica este género según su anamorfo *Colletotrichum*, es decir teniendo en cuenta la subdivisión artificial *Deuteromycotina*, pertenece a la división *Eumycota*, subdivisión *Deuteromycotina*, clase *Coelomycetes* y orden *Melanconiales* (Ainsworth, 1971).

En medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) la colonia de *C. gloeosporioides* es de color blanco a gris claro o gris oscuro y el micelio es de tipo algodonoso (Figura 2a). Sobre la colonia se desarrollan acérvulos que contienen masas de conidios de color salmón. Los conidios son hialinos, unicelulares y de forma cilíndrica, con sus extremos obtusos o, a veces, ligeramente elipsoidales (Figura 2b). Los apresorios que produce al germinar la espora, tienen forma lobulada (Smith y Black 1990, Jones y Aldwinckle 2002, Sermeño 2005).

Los peritecios de *G. cingulata* son membranosos, esféricos, de color oscuro o negro y se disponen aisladamente o en grupos. Las ascas son oblongas o claviformes engrosadas en el ápice y poseen ocho ascosporas hialinas, unicelulares y arqueadas o fusiformes (Smith y Black 1990, Jones y Aldwinckle 2002, Oliveira et al. 2005).

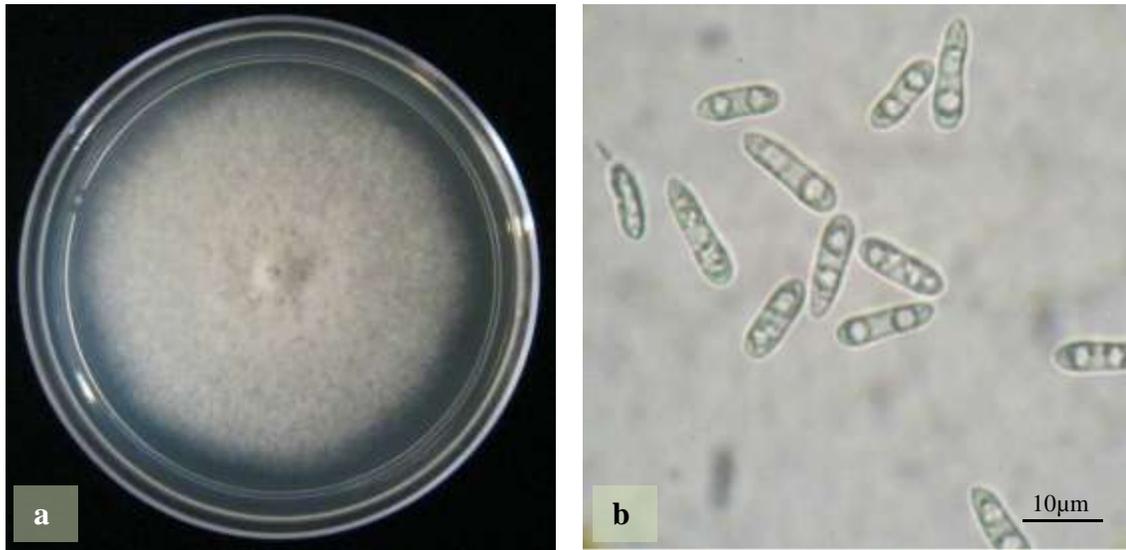


Figura 2: *Colletotrichum gloeosporioides*. **a)** aspecto de la colonia luego de seis días de crecimiento en medio de cultivo PDA; **b)** conidios observados bajo microscopio a 400x de amplificación.

La colonia de *C. acutatum* en medio de cultivo PDA (Figura 3a) es de color blanco con tonalidades salmón. Presenta una tasa de crecimiento sensiblemente más lenta y un aspecto más compacto que *C. gloeosporioides*. Las masas de conidios sobre los acérvulos, que generalmente son visibles y abundantes sobre la colonia, son de color salmón. Los conidios no presentan septos, son hialinos y mayoritariamente fusiformes con ambos extremos agudos u, ocasionalmente redondeados (Figura 3b). Cuando germinan las esporas, forman apresorios oscuros o negros de forma redondeada. La germinación y formación de apresorios en *C. acutatum* es mas lenta que en *C. gloeosporioides* (Smith y Black 1990, Jones y Aldwinckle 2002, Oliveira et al. 2005).

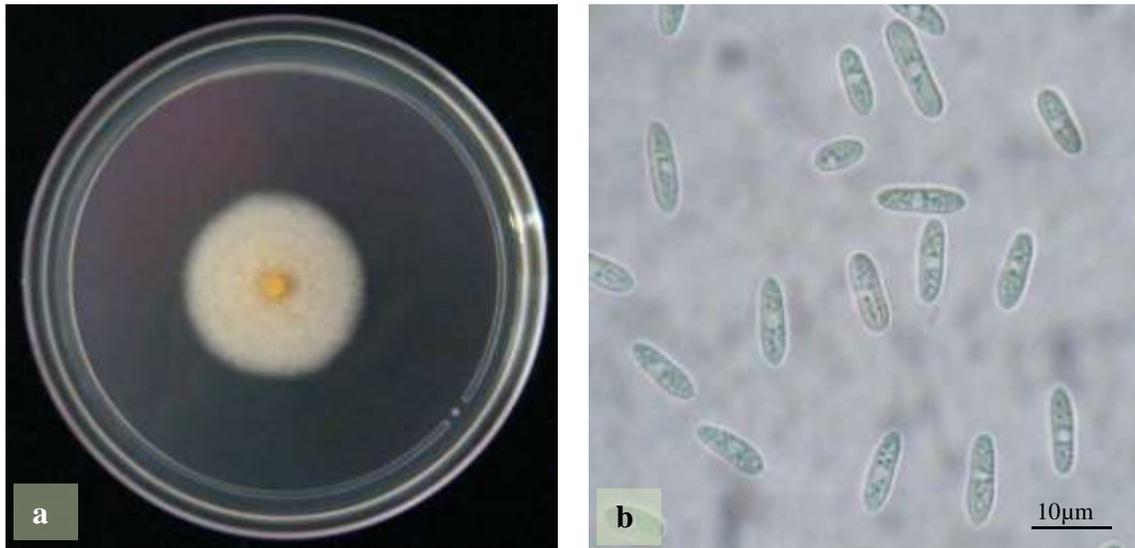


Figura 3: *Colletotrichum acutatum* **a)** aspecto de la colonia luego de seis días de crecimiento en medio de cultivo PDA; **b)** conidios observados bajo microscopio a 400x de amplificación.

La especie *C. fragariae* Brooks fue reportada por primera vez en el año 1931 asociada a frutilla como causante de antracnosis en éste cultivo (Brooks, 1931). Posteriormente se ha detectado en otros cultivos como chirimoya, palmera datilera y ciclamen (Villanueva 2005, MacKenzie et al. 2008). Esta especie nunca ha sido reportada como causante de la podredumbre amarga del manzano. Sin embargo, es conocida su capacidad de infectar frutos de manzana en inoculaciones artificiales (Mass y Howard, 1985). Hasta la fecha ningún teleomorfo ha sido asociado aún con *C. fragariae*.

En medio de cultivo PDA, la colonia de *C. fragariae* es de color gris a gris oscuro y presenta micelio algodonoso. Con frecuencia las colonias presentan sectores de color más oscuro o más claro que el resto de la colonia y con mayor tasa de crecimiento (figura 4a). Los acérvulos, que suelen ser escasos, se distribuyen de manera dispersa sobre la colonia. Los conidios que aparecen como masas de color rosado-salmón, son

unicelulares, hialinos, cilíndricos y con los extremos redondeados o fusiformes (figura 4b) (Brooks 1931, Smith y Black 1990).

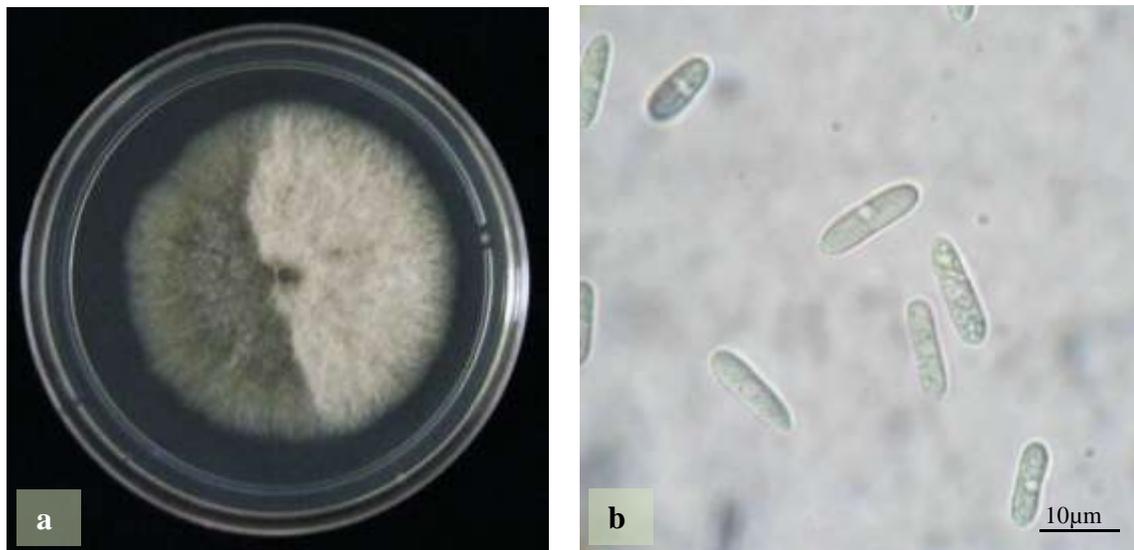


Figura 4: *Colletotrichum fragariae* **a)** aspecto de la colonia luego de seis días de crecimiento en medio de cultivo PDA; **b)** conidios observados bajo microscopio a 400x de amplificación.

2.3.3. Ciclo de la enfermedad

Según Jones y Aldwinckle (2002), *Colletotrichum* spp. sobrevive entre una estación y la siguiente en forma de peritecios y acérvulos en manzanas momificadas sobre los árboles, o como micelio en madera muerta colonizada. Los frutos momificados sobre el suelo también pueden ser fuente de inóculo (Fernández Valiela 1978, Jones y Aldwinckle 2002).

Durante la estación de crecimiento del manzano los conidios y las ascosporas se liberan durante la lluvia, aunque en ocasiones las ascosporas se pueden liberar en

ausencia de agua. Los conidios son transmitidos por salpicado de lluvia, mientras que las ascosporas por corrientes de aire (Jones y Aldwinckle, 2002).

Cuando los conidios o las ascosporas toman contacto con los frutos, en presencia de agua libre germinan e inmediatamente, se produce la infección mediante la penetración directa a los tejidos. La penetración también ocurre por las heridas, y en este caso los frutos son colonizados más rápidamente (Travis s.f., Jones y Aldwinckle 2002, Lolas 2005,).

Luego de la infección, el micelio crece intercelularmente y puede permanecer latente durante cierto tiempo antes de que las células empiecen a colapsarse y pudrirse. El micelio del hongo produce entonces acérvulos y conidios inmediatamente por debajo de la cutícula, la cual se rompe y libera los conidios para una vez más iniciar nuevas infecciones. Las infecciones secundarias ocurren durante toda la estación de crecimiento en tanto la temperatura y la humedad sean favorables a su desarrollo. Al final de la temporada los frutos podridos se momifican y pueden quedar adheridos al árbol o caer al suelo (Jones y Aldwinckle, 2002).

2.3.4. Epidemiología

El hongo no necesita heridas para penetrar el fruto, sin embargo, daños por granizo, pájaros o insectos facilitan la penetración. Por lo general, requiere de altas temperaturas y alta humedad para tener una mejor actividad. Según Lolas (2005), la podredumbre amarga se ve favorecida por temperaturas entre 24 y 28°C. Valdebenito et al. (s.f.) sugieren que la temperatura óptima para la aparición de la enfermedad es de 22 a 26°C.

Estudios *in vitro* que involucran a *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* y *C. fragariae*, indican que estas tres especies se desarrollan en el rango de temperaturas de 10 a 30°C, con un óptimo de crecimiento de 28°C. *C. gloeosporioides* y *C. fragariae* son capaces

de crecer también a 35°C, inhibiéndose el crecimiento de *C. acutatum* a esta temperatura (Smith y Black 1990, Oliveira et al. 2005).

Según Jones y Aldwinckle (2002), los conidios y las ascosporas germinan en presencia de agua libre. Una vez formados los apresorios, las infecciones pueden producirse en tan solo cinco horas si ocurre una temperatura óptima de 26°C y humedad relativa de 80 a 100%. Luego de ocurrida la infección las lesiones se expanden más rápidamente si la temperatura es de 30°C. La cantidad de infecciones aumenta cuando el periodo de humedad relativa a saturación (100%) se incrementa por un periodo de hasta 60 horas.

Los frutos infectados en la misma temporada y las manzanas momificadas producto de las infecciones de la zafra anterior, sirven como fuentes de inóculo durante toda la temporada vegetativa. Si bien aparentemente los frutos son susceptibles durante todas las fases de su desarrollo, las infecciones se inician generalmente un mes después del comienzo de la caída de pétalos y son más frecuentes a partir de que el fruto alcanza la mitad de su tamaño y hasta la cosecha (Jones y Aldwinckle, 2002).

Las epidemias más graves se producen generalmente cuando el comienzo de la temporada es cálido y húmedo. En estos casos, las infecciones primarias ocurren temprano en la primavera suministrando abundancia de inóculo secundario (Jones y Aldwinckle, 2002). Si durante el verano, donde las temperaturas promedio se ubican dentro del rango de las más favorables para el desarrollo de *Colletotrichum* spp., además ocurren frecuentes precipitaciones, también se pueden desencadenar epidemias graves.

2.4. MANEJO DE LA PODREDUMBRE AMARGA

Para realizar un adecuado control de esta enfermedad, es necesario combinar diferentes medidas siguiendo estrategias de Manejo Integrado, ya que la aplicación de métodos de control por separado puede llevar a un manejo ineficiente de esta podredumbre (García 1998, Scatoni et al. 2005).

2.4.1. Control cultural

Los frutos infectados actúan como fuente de inóculo para la infección de otros frutos sanos. Por tanto la eliminación de los frutos infectados es una de las medidas de control cultural más importante para el manejo de esta enfermedad.

Durante la temporada se deberán realizar varios repases eliminando toda fruta afectada a medida que avanza la estación. La frecuencia de los repases puede ser variable, pero es conveniente que sea semanal en el período cercano a la cosecha, sobre todo si las condiciones ambientales son favorables al desarrollo de la enfermedad. La podredumbre amarga se desarrolla en focos por lo que en cada repase se deben localizar dichos focos, y eliminar toda fruta afectada (Figura 5b). En los siguientes repases es conveniente inspeccionar los focos detectados previamente.

Durante la época de poda se deberán retirar y eliminar los frutos momificados que hayan quedado en el monte de la temporada anterior, sobre todo los que están adheridos al árbol, reduciendo así el inóculo inicial (Figura 5a) (Valdebenito et al. s.f., Scatoni et al. 2005).

Es recomendable evitar sistemas de riego que mojen la copa, realizar una fertilización balanceada y podas que favorezcan la aireación de los árboles.



Figura 5: Fuentes de inoculo de *Colletotrichum* spp.: **a)** fruto momificado que ha quedado adherido al árbol (fuente de inóculo primario); **b)** foco de frutos de Granny Smith afectados por podredumbre amarga con manchas de diferente grado de desarrollo debido a la dispersión de inóculo secundario.

2.4.2. Control biológico

El conocido efecto de los aislados de *Trichoderma* por su capacidad para controlar patógenos de plantas, también ha sido demostrado para el control de la antracnosis en fresa causada por *C. acutatum*. Freeman et al. (2004) evaluaron tres aislados comerciales de *Trichoderma* bajo condiciones controladas en invernáculo. Los controladores biológicos fueron aplicados solos o combinados a concentraciones de 0,4% y 0,8%. En todos los casos se obtuvo una reducción de la gravedad de la antracnosis, logrando el mayor control con la dosis más alta.

Baños-Guevara et al. (2004) evaluaron el efecto *in vitro* de las bacterias *Bacillus firmus* y *Pseudomonas fluorescens* para el control de *C. gloeosporioides* causante de la antracnosis de la papaya. *B. firmus* redujo hasta en un 75% el crecimiento de *C. gloeosporioides*. Aplicaciones de estos antagonistas sobre fruta en poscosecha, no

ejercieron ningún control. No está claro si el antagonismo de las bacterias está dado por un efecto de competencia por nutrientes y espacio, o bien por la producción de antibióticos y/o sustancias con propiedades antimicrobiales.

En otro trabajo se ha demostrado que una cepa de la levadura *Pichia guilliermondii* aislada en Tailandia es capaz de inhibir, entre otros hongos patógenos, a *Colletotrichum capsici* durante cosecha de chile (*Capsicum annuum*, L). Sus modos de acción incluyen la competencia por nutrientes y la secreción de enzimas hidrolíticas. Adicionalmente se evaluó su capacidad como inductor de resistencia contra *C. capsici* en estos frutos. Los resultados indicaron que la inducción de la resistencia puede ser otro mecanismo por el cual la cepa de *P. guilliermondii* R13 suprime a *C. capsici* en frutos de chile (Nantawanit, 2009).

En nuestro país no existen antecedentes de investigación en el control biológico de *Colletotrichum* spp. ni existen formulados comerciales registrados para su control.

2.4.3. Control con productos de origen natural

Bautista-Baños et al. (2003) evaluaron *in vitro* el efecto del quitosano, extractos de hojas de chirimoya y extractos de hojas con semillas de papaya, solos o combinados, para el control de *C. gloeosporioides* causante de la antracnosis de la papaya. El crecimiento micelial del hongo fue completamente inhibido por concentraciones de quitosano de 2,5 y 3,0% durante los siete días de incubación; mientras que a concentraciones de 0,5 y 1,5% el crecimiento comenzó al segundo y cuarto día del inicio de la incubación respectivamente. Los extractos de planta no mostraron ningún efecto fungicida por sí solos, mientras que la combinación de extractos y quitosano sí evidenció un cierto control.

Filipini (2008), evaluó el efecto *in vitro* del quitosano sobre la germinación de esporas y crecimiento micelial de *C. acutatum*. Para estudiar la inhibición de la germinación de esporas, fueron expuestas suspensiones de conidios a concentraciones de 25, 50, 75 y 100 µg de quitosano por mL de HCl ajustado a pH 5,6. A mayor dosis de quitosano mayor fue la inhibición de germinación de esporas obtenida, logrando el mayor resultado con la máxima dosis evaluada; en este caso la germinación fue inhibida en un 66%. Para la inhibición del crecimiento micelial se utilizaron concentraciones de 1, 2, 3, 4, y 5 mg de quitosano por mL de medio de cultivo PDA. Todas las dosis fueron capaces de reducir el crecimiento micelial, siendo las más efectivas las dosis de 4 y 5 mg mL⁻¹, alcanzándose en ambos casos en torno a 42% de inhibición.

En Méjico se evaluaron sustancias naturales y extractos de plantas con propiedades fungitóxicas provenientes de diferentes especies vegetales. De los 18 extractos de plantas evaluados *in vitro*, los de ajo (*Allium sativum*), hierba santa (*Piper aurintum*), guayaba (*Psidium guajava*) y eucalipto (*Eucalyptus globulus*) redujeron significativamente el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* en 54, 49, 48 y 39%, respectivamente. Los extractos de ajo y eucalipto se evaluaron luego sobre frutos de papaya artificialmente inoculados con *C. gloeosporioides*. Ambos extractos redujeron en 45 y 42% respectivamente la severidad de la enfermedad (Baños-Guevara et al., 2004).

2.4.4. Control químico

En años favorables al desarrollo de la podredumbre amarga, la aplicación de fungicidas es una medida de manejo que se utiliza con frecuencia para el control de esta enfermedad, sobre todo en variedades de cosecha tardía que son las más susceptibles.

Jones y Aldwinckle (2002) indican que si bien todas las variedades de manzana cultivadas difieren en susceptibilidad a la podredumbre amarga, ningún cultivar comercial es suficientemente resistente como para no requerir tratamientos químicos.

Estos investigadores sugieren que los fungicidas del grupo de los ditiocarbamatos aplicados cada 10 a 14 días entre la brotación y la cosecha, constituye el medio más importante de control. También mencionan que se puede lograr un correcto control realizando aplicaciones de captan.

Las normas de Producción Integrada Frutícola en Uruguay autorizan pulverizaciones con fungicidas durante el verano hasta la cosecha en variedades sensibles tales como clones de Fuji, Granny Smith y Pink Lady - Cripps Pink. Además, permiten la aplicación de ziram para el control de la podredumbre amarga con un máximo de 5 tratamientos por temporada, respetando un tiempo de espera de 15 días. Asimismo, especifican que el control químico puede ser ineficiente si no se acompaña de las medidas de manejo cultural recomendadas (Scatoni et al., 2005).

A nivel experimental existen trabajos donde se ha evaluado el efecto de diferentes fungicidas en ensayos *in vitro* y a nivel de campo, para el control de las diferentes especies de *Colletotrichum* que afectan a diversos cultivos.

Freeman et al. (1997) evaluaron el efecto de diversos fungicidas para el control de *C. acutatum* causante de la antracnosis de la frutilla. En ensayos *in vitro* Prochloraz-Mn, prochloraz-Zn y prochloraz-Zn combinado con Folpet fueron muy efectivos inhibiendo el desarrollo micelial de este hongo. Propiconazole y difenoconazole, aunque en menor grado, igualmente fueron efectivos. Captan y folpet también fueron capaces de inhibir el desarrollo micelial de *C. acutatum*. Los fungicidas IBE y captan fueron también evaluados sobre plantas de frutilla naturalmente infectadas por *C. acutatum*. Previo al trasplante las plantas fueron bañadas con los diferentes fungicidas y evaluadas luego de un mes de plantadas en invernáculo. El fungicida más efectivo fue prochloraz-Zn logrando reducir en un 70% la mortalidad de plantas comparada con el control sin fungicida. El resto de los IBE también fueron efectivos, pero con valores de reducción de mortalidad de plantas menores.

De los Santos García de Paredes y Romero Muñoz (2002), evaluaron diversos fungicidas para el control de *C. acutatum* en frutilla en condiciones de laboratorio, invernáculo y a campo. En los ensayos *in vitro*, propiconazole fue el más efectivo en reducir el desarrollo micelial, la CE50 fue de 0,5 ppm. Otros como bitertanol, imazalil, carbendazim, thiabendazole y hexaconazol lograron CE50 con valores menores a 5 ppm. Iprodione y captan tuvieron valores de CE50 de 10 ppm y 200 ppm respectivamente. En las pruebas de invernáculo y campo, tres cultivares de frutilla fueron inoculados con *C. acutatum* y previo al transplante, sumergidos en suspensiones conteniendo los distintos fungicidas. La evaluación se realizó midiendo el porcentaje de mortalidad de planta. En invernáculo se encontró que bitertanol, carbendazim y thiabendazol fueron los más efectivos. Durante los tres años de evaluación a campo estos mismos fungicidas fueron los que redujeron satisfactoriamente la mortalidad de las plantas testeadas.

En Brasil, de Goes et al. (2007) evaluaron el efecto de diferentes fungicidas para el control de *C. acutatum* causante de la caída prematura de frutos en cítricos. Los experimentos fueron conducidos sobre cultivos a campo. En este trabajo los fungicidas carbendazim y folpet fueron los que se mostraron de forma más eficaz en el control de esta enfermedad, mientras que difenoconazole mostró un efecto menor con resultados variables.

MacKenzie et al. (2009) evaluaron la capacidad de distintos fungicidas para controlar *C. gloeosporioides* uno de los causantes de la podredumbre de corona en frutilla. Los tratamientos consistieron en una aplicación dos días antes o una aplicación un día después de inocular plantas de frutilla con *C. gloeosporioides*. En las parcelas testigo se registro 64% de mortalidad. Captan aplicado dos días antes de la inoculación redujo la mortalidad de plantas a 17%, sin embargo, no fue tan eficaz aplicado un día después de la inoculación donde se registro una mortalidad media de 46%. Los fungicidas azoxistrobin, pyraclostrobin y metil-tiofanato aplicados dos días antes de la inoculación redujeron la mortalidad de plantas a valores de 46, 37, y 42% respectivamente, mientras

que cuando se aplicaron un día después se registro mayor efectividad con una mortalidad de solo 29, 27, y 32% respectivamente. Las parcelas tratadas con thiram no registraron diferencia entre las aplicaciones antes (mortalidad =30%) o después de la inoculación (mortalidad = 32%). MacKenzie et al. (2009) también evaluaron el efecto del fosfito de potasio aplicado antes y después de inocular las plantas con *C. gloeosporioides*. Este producto no afectó la mortalidad independientemente del momento de aplicación. Se registró 61% de mortalidad cuando se aplicó dos días antes y 67% cuando se aplico un día después de la inoculación.

En base a estos resultados, estos investigadores concluyen que una estrategia eficaz para el control de esta enfermedad debe estar basada en aplicaciones semanales de captan en toda la temporada de crecimiento. Las aplicaciones de los fungicidas sistémicos azoxistrobin, piraclostrobin y metil tiofanato, se reservan para cuando la actividad de los fungicidas de contacto pueda verse afectada o cuando las condiciones climáticas son muy favorables para el desarrollo de la enfermedad.

Araújo et al. (2008) evaluaron el efecto *in vitro* del fosfito de potasio en la velocidad de crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* causante de la mancha foliar de la Gala. Se evaluaron diferentes concentraciones de fosfito de potasio (40% P₂O₅- 20% K₂O) de 0 a 0,5 μL mL⁻¹ de medio PDA. Luego de seis días de incubación la concentración de fosfito de 0,5 μL mL⁻¹ a pH 2 (acidez característica del producto) logró reducir la velocidad de crecimiento del hongo en 92%. Esta misma concentración de fosfito evaluada luego de ajustar el pH a un valor de 7, redujo 50 % la velocidad de crecimiento micelial. Las otras concentraciones se comportaron de forma similar pero con valores de reducción menores. El fosfito también fue evaluado sobre planta mediante pulverizaciones hojas de manzana con fosfito antes y después de ser inoculadas con *C. gloeosporioides*. La aplicación efectuada 24 horas luego de la inoculación resulto efectiva para el control de este hongo.

En un trabajo posterior Araújo et al. (2010) evaluaron *in vitro* e *in vivo* la eficiencia de diferentes formulaciones comerciales de fosfito de potasio para el control de *C. gloeosporioides* causante de la mancha foliar de la Gala. Se utilizaron formulaciones de N-P-K 0-40-20, 0-30-20 y 0-20-20 que se incorporaron al medio de cultivo PDA en dosis de entre 1,5 a 3,0 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Los fosfitos con la formulación 0-40-20, 0-30-20 y 0-20-20 (N-P-K) a pH 3, 4,1 y 6,8 propios de cada formulación, redujeron aproximadamente 94, 85 y 36% respectivamente el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides*. Para la prueba *in vivo* se inocularon plántulas de manzana variedad Gala con *C. gloeosporioides* y luego fueron rociadas con las mismas formulaciones de fosfitos de potasio a dosis de 1,5 a 2,5 mL mL^{-1} de agua. En este caso solo la formulación 0-40-20 redujo significativamente la severidad de la mancha de la hoja, presentando 62% menos que el control.

3. MATERIALES Y METODOS

Todos los experimentos fueron realizados en el Laboratorio de la Unidad de Fitopatología de la Facultad de Agronomía.

3.1. CULTIVOS FÚNGICOS

En primer lugar se obtuvieron aislados de *Colletotrichum* causantes de la podredumbre amarga del manzano. Durante el periodo cercano a la cosecha y durante la cosecha se muestrearon diferentes zonas en la región centro sur del país, principal región de producción de manzana en Uruguay,. Las zonas muestreadas fueron Melilla, Juanico, Progreso y Las Violetas, dónde se colectaron frutos desde los árboles con síntomas típicos de podredumbre amarga. Las variedades muestreadas fueron Granny Smith, Early Red One, Fuji, Oregon Spur, Red Delicious y Cripps Pink.

Para efectuar los aislamientos, los frutos se desinfectaron superficialmente con alcohol al 70%. Luego se cortaron con un bisturí esteril y se tomaron de cada fruto siete trozos de la zona de avance de la podredumbre. Inmediatamente los trozos se sembraron en placas con medio de cultivo PDA (Oxoid, Hampshire, Inglaterra) con agregado de antibiótico sulfato de estreptomicina (Sigma-Aldrich, China) ($0,2\text{g mL}^{-1}$).

Las placas fueron selladas con parafilm e incubadas en estufa a 25°C en oscuridad. Luego de cuatro días de incubación, las colonias de *Colletotrichum* sp. desarrolladas a partir de los trozos sembrados, se repicaron a otras placas conteniendo PDA. Las placas se mantuvieron durante seis días en estufa a 25°C , con 12 horas de fotoperiodo de luz ultravioleta para favorecer la esporulación del hongo.

De todas las colonias de *Colletotrichum* se obtuvieron cultivos monospóricos. Para ello a partir de cada colonia se cortaron trozos de la zona esporulada y se colocaron en

tubos de ensayo que contenían agua destilada estéril. Cuando fue necesario, la concentración de conidios se ajustó a 1×10^5 esporas mL^{-1} mediante diluciones y contabilizando con la cámara de Newbawer. Luego se sembraron 100 μL de la suspensión de conidios en placas con medio PDA y se esparció mediante rastrillo de vidrio. Transcurridas 24 horas se seleccionó bajo microscopio una espora germinada y aislada de las demás y se repicó en una nueva placa con PDA. Las placas se incubaron a 25°C con 12 horas de fotoperiodo durante seis días.

Todos los aislamientos se conservaron a -20°C en trozos de papel de filtro colonizados y posteriormente deshidratados con sílica-gel.

3.1.1. Identificación de las especies

Los aislados obtenidos en el muestreo fueron cedidos para su identificación a la bachiller Laura Hernández (estudiante de tesis de grado) bajo la dirección de la Dra. Ing. Agr. Sandra Alaniz. La determinación de las especies se efectuó mediante estudios fenotípicos y moleculares.

3.1.2. Aislados seleccionados

Se seleccionaron tres aislados uno de cada una de las tres especies identificadas, *C. gloeosporioides*, *C. fragariae* y *C. acutatum*. En la Tabla 2 se muestran los aislados utilizados en los ensayos y su procedencia.

Tabla 2: Aislados fúngicos utilizados en los ensayos.

Especie	Aislado	Variedad/ portainjerto	Edad del monte	Origen geográfico	
				Localidad	Departamento
		Oregon			
<i>C. gloeosporioides</i>	Coll-5	Spur/semilla	10 años	Melilla	Montevideo
		Granny			
<i>C. acutatum</i>	Coll-11	Smith/M9	12 años	Juanico	Canelones
		Granny			
<i>C. fragariae</i>	Coll-37	Smith/semilla	17 años	Progreso	Canelones

3.2. ENSAYOS DE INHIBICION *in vitro* DEL CRECIMIENTO MICELIAL

3.2.1. Productos químicos evaluados

Se seleccionaron nueve productos de diferente origen para evaluar su efecto en el control de las tres especies de *Colletotrichum* identificadas; seis fungicidas, dos fuentes diferentes de fosfito y un producto de origen natural (Tabla 3). Para seleccionar estos productos se tuvo en cuenta que hubiesen sido evaluados por otros investigadores con resultados promisorios en el control de diferentes especies de *Colletotrichum*, o que estén actualmente siendo utilizados por los productores en el cultivo de manzana.

A continuación se describe las principales características de los principios activos de los nueve productos evaluados:

Difenoconazole y Tebuconazole

Ambos, son fungicidas inhibidores de la biosíntesis del ergosterol (IBE) de la membrana celular. Pertenecen al grupo químico de los triazoles. Actúan en un sitio específico en el proceso de síntesis de este compuesto deteniendo el desarrollo del hongo. Estos productos que son sistémicos, son absorbidos por las hojas por translocación translaminar y distribuidos en forma acrópeta dentro de la hoja. Tienen la capacidad de actuar como curativo en algunas enfermedades. No inhiben la germinación de esporas y tienen amplio espectro de acción. Una de las principales limitantes en el uso reiterado de este grupo de fungicidas, es el alto riesgo de que aparezcan razas de patógenos resistentes. Difenoconazole está recomendado para el control de *C. fragariae* en frutilla y presenta un tiempo de espera de 14 días en manzana (Latorre 1989, Modernel 2009).

Iprodione

Pertenece al grupo químico de las dicarboximidas. Es un fungicida de acción preventiva, cierta acción curativa y antigerminante. Se lo considera de sitio específico y esencialmente de contacto, tiene cierta penetración a la planta y probablemente una sistemicidad local en algunos cultivos. Presenta una residualidad moderada. Los depósitos biológicamente activos permanecen entre 7 y 10 días. Está recomendado para su uso en manzano. El tiempo de espera en frutales es de 14 días (Latorre 1989, Modernel 2009).

Tryfloxistrobin

Pertenece al grupo químico de las estrobilurinas. Es de amplio espectro de acción. Se utiliza en diversos cultivos para el control de varias enfermedades fúngicas. Es un fungicida de contacto con propiedades de penetración a ceras de cutículas en hojas y frutos, además actúa por medio de una distribución superficial vía gaseosa en tejidos tratados. Tiene efecto sobre la respiración de los hongos obstruyendo la transferencia de electrones en la mitocondria celular, dañando severamente su desarrollo. Sobre la

superficie de las plantas, su principal modo de acción es la inhibición de la germinación de las esporas y de la extensión del tubo germinativo. Tiene alto riesgo de generar resistencia en las poblaciones de patógenos. Está recomendado para su uso en manzanos con un tiempo de espera de 7 días (BAYER, 2007).

Captan

Pertenece al grupo químico de las ftalamidas. Es un fungicida de contacto y de amplio espectro. Interfiere en el mecanismo de respiración de los hongos por lo que inhibe la geminación de las esporas y dificulta el crecimiento y desarrollo micelial. No se debe usar en combinación con azufre en variedades de manzano sensibles como Red Delicious o cultivares relacionados. Esta recomendado para el control de la podredumbre amarga en manzana y *Colletotrichum* spp. en frutilla. El tiempo de espera es de un día (Latorre 1989, Hewitt 1998, Modernel 2009), pero tiene un periodo de reentrada restringida de 4 días.

Ziram

Pertenece al grupo químico de los ditiocarbamatos. Es un fungicida de contacto y de amplio espectro. Está recomendado para el control de *C. acutatum* en arándanos, *C. gloeosporioides* en citrus y contra otras especies de *Colletotrichum* que causan antracnosis tanto en cucurbitáceas como en tomate (Modernel, 2009). Presenta un tiempo de espera para algunos frutales de 35 días y en manzano de 20 días (Agri Star, 2011).

Fosfito 70%

Es una formulación indicada como fuente de fósforo y de potasio. Contiene 70% en peso de Fósforo total como P_2O_5 y 10% en peso de potasio como K_2O . El potasio actúa sobre la raíz aumentando la función osmótica de las paredes celulares lo que permite el paso de nutrientes y agua operando de igual forma en las hojas. Está recomendado para favorecer el desarrollo del sistema radical, estimula la floración y el cuajado y también

el mecanismo de autodefensa de la planta respondiendo más fuertemente al ataque de plagas y enfermedades¹.

Fosfito 40%

Es una formulación a base de fosforo y potasio que esta registrada como fungicida sistémico. Contiene como principio activo 40% en volumen de ácido fosfónico presente como fosfonato mono y di potasio². No presenta requerimientos de tiempos de espera (Modernel, 2009).

Quitosano

Es un producto orgánico, un polímero natural derivado de la quitina. Se extrae de los caparazones de los crustáceos marinos. Actúa estimulando los mecanismos naturales de defensa de las plantas mediante el aumento del grado de lignificación de las plantas, e induciendo la producción de compuestos que actúan como defensa haciéndolas menos susceptibles al ataque de hongos. No presenta requerimientos de tiempos de espera (BIOAGRO, 2011). Si bien el quitosano es un estimulador de resistencia y esta registrado como regulador fisiológico, existen trabajos que demuestran que el quitosano tiene efecto fungicida (Bautista-Baños et al. 2003, Filipini 2008).

¹Agro Regional S.A. s.f. Isnel Fos-P; etiqueta (sin publicar).

² Agro Regional S.A. s.f. Agrifos Supa 400; etiqueta. (sin publicar).

Tabla 3: Fungicidas seleccionados para evaluar su efecto *in vitro* en el control de *Colletotrichum acutatum*, *C. gloeosporioides* y *C. fragariae*

Grupo químico	Principio activo	Formulación *	Marca comercial	Marca registrante	Aptitud	Uso recomendado**
Dicarboximidias	Iprodione	500 g L ⁻¹ SC	Abril 50 SC	Zorbin	Fungicida	Manzano
Ditiocarbamato	Ziram	750 g Kg ⁻¹ GD	Ziram granuflo	Dimiron	Fungicida	Manzano
Fosfitos	Fosfito 70%	70% p/p (P ₂ O ₅)	Isnel Fos-P	Agro Regional	Fertilizante	Cítricos, frutales y Vid
	Fosfito 40%	40% Vol	Agrifos Supa 400	Agro Regional	Fungicida	Vid
Ftalamidas	Captan	800 g Kg ⁻¹ GD	Captan 80	Dikebell	Fungicida	Manzano
IBE						
Triazoles	Difenoconazole	250 g L ⁻¹ CE	Score 250 EC	Syngenta	Fungicida	Manzano
	Tebuconazole	430 g L ⁻¹ SC	Tebutec 430 SC	Agritec	Fungicida	Poscosecha en manzana
Polisacárido derivado de la quitina	Quitosano	25,5 g L ⁻¹ CS	Biorend	Marward	Regulador fisiológico	Vid, frutales de carozo, cítricos, arándanos
Strobilurinas	Tryfloxistrobin	500 g Kg ⁻¹ GD	Flint 50	Bayer	Fungicida	Manzano

* SC: suspensión concentrada, GD: gránulos dispersables, CS: Concentrado soluble, CE: Concentrado emulsionable.

** Según etiqueta del producto.

3.2.2. Evaluación *in vitro* por inhibición del crecimiento micelial

La efectividad de los productos seleccionados sobre los tres especies de *Colletotrichum*, fue evaluado mediante la técnica de inhibición del crecimiento micelial en medio de cultivo PDA. Las diferentes dosis de materia activa evaluadas fueron incorporadas al medio de cultivo inmediatamente antes de dispensarlo en las placas.

Para evaluar los fungicidas difenoconazole, tebuconazole, iprodione, tryfloxistrobin, ziram y captan las concentraciones utilizadas en los ensayos fueron 0 (control); 0,1; 1; 10 y 100 ppm., mientras que para quitosano y los fosfitos se utilizaron concentraciones de 0, 5, 5, 50 y 500 ppm. Las concentraciones se escogieron en base a lo consultado en bibliografía. En el caso de los fosfitos, para determinar el efecto del pH en la inhibición del crecimiento micelial, el fosfito 40% se evaluó de dos maneras: a pH normal en solución con medio PDA (pH 5,5) y acidificado con ácido clorhídrico al 20% de concentración hasta alcanzar un valor de pH 3,5. El fosfito 70% solo fue evaluado a su pH normal en solución que es pH 3,5.

Los tres aislados de *Colletotrichum* spp. seleccionados se sembraron en medio de cultivo PDA y se incubaron a 25°C en oscuridad. Luego de siete días se cortaron discos de agar con micelio de 3 mm de diámetro de la zona de avance de las colonias. A partir de cada aislado se sembraron cuatro discos en el centro de cuatro placas (un disco por placa) que contenían cada una de las concentraciones del principio activo a evaluar (cuatro repeticiones por cada concentración de principio activo por cada producto evaluado). Como testigo se hicieron crecer cuatro discos en cuatro placas (un disco por placa) con medio de cultivo PDA sin producto. Todas las placas sembradas se incubaron a 25°C en oscuridad durante seis días.

Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a la evaluación, para lo cual se registraron dos diámetros perpendiculares por cada colonia medidos con calibre digital

(Kamasa KM-447 USA). Con estos datos se calculó el ratio de crecimiento diario de cada aislado en mm día^{-1} . Posteriormente se estimó el porcentaje de crecimiento diario respecto al control (0 ppm de principio activo fungicida) que fue calculado como: $100(x/y)$ donde x = valor medio (dos medidas por placa) de cada repetición sembrada para cada aislado, principio activo y concentración, e y = valor medio de las cuatro colonias (repeticiones) control del aislado correspondiente. El experimento se efectuó dos veces.

3.2.3. Análisis de datos

Para poder comparar la efectividad de los productos evaluados, se calculó la concentración efectiva 50 (CE50) para cada principio activo. A cada dato de porcentaje de crecimiento diario respecto al control se le aplicó la transformación Probit; mientras que a los valores de concentración de producto utilizados, se les aplicó la transformación logaritmo decimal. Con estos datos se obtuvieron rectas de regresión lineal con su ecuación correspondiente y valor de R^2 . A partir de estas ecuaciones se estimó la CE50 como aquel valor de la concentración del principio activo que causa el 50% en la inhibición del crecimiento micelial.

Los valores de CE50 se analizaron estadísticamente utilizando un modelo lineal generalizado asumiendo una distribución gama de la variable y una función de enlace logaritmo. Se utilizó el procedimiento Glimmix del paquete estadístico SAS versión 9.2.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CULTIVOS FÚNGICOS

A partir de las prospecciones realizadas en montes de manzano, se obtuvieron un total de 41 aislados de *Colletotrichum* spp. Los resultados de identificación a cargo de la Bach. Laura Hernández indicaron que 33 de los aislados corresponden a *C. gloeosporioides*, 6 a *C. fragariae* y 2 a *C. acutatum*. Las especies *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* son ampliamente conocidos como causantes de la podredumbre amarga del manzano (Latham y Williams 1983, Shi et al. 1996, Jones y Aldwinckle 2002, Peres 2005). Sin embargo, es la primera vez que se aísla la especie *C. fragariae* a partir de frutos de manzana con síntomas de podredumbre amarga y se reporta como causante de esta enfermedad³.

4.2. ENSAYOS DE PRODUCTOS QUÍMICOS

Los resultados de los valores de CE 50 para cada producto evaluado frente a las tres especies de *Colletotrichum* se muestran en la Tabla 4.

El análisis estadístico efectuado indicó que no hubo efecto experimento ($P = 0,6132$) por lo que los datos de los dos experimentos se analizaron conjuntamente. De acuerdo a los resultados del análisis se determinó que hubo efecto fungicida ($P < 0,0001$), especie ($P < 0,0001$) y las interacciones experimento x fungicida ($P < 0,0001$) y fungicida x

³ Alaniz, S.; Hernández, L.; Damasco, D.; Mondino, P. s.f. First report of *Colletotrichum acutatum* and *C. fragariae* causing bitter rot of apple in Uruguay. (en prensa)

especie ($P < 0,0001$), pero no en el caso de la interacción experimento x especie ($P = 0,2215$).

La interacción experimento x fungicida se debe a que en el experimento uno, el fosfito 40% evaluado a pH 3,5 presento un valor de CE50 ligeramente superior a difenoconazole; mientras que en el experimento dos el comportamiento fue lo opuesto. Lo mismo ocurrió con iprodione, este producto tubo un valor de CE50 algo superior a captan en el experimento uno y lo contrario ocurrió en el experimento dos. En el caso de la interacción fungicida x especie esto se explica porque los valores de CE50 de captan y tryfloxistrobin fueron notoriamente diferentes dependiendo de la especie de *Colletotrichum* evaluada (Tabla 4).

Tabla 4: Concentraciones efectivas 50 (CE50) (mg L^{-1} ó ppm) de los nueve productos evaluados en la inhibición del crecimiento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. acutatum* y *C. fragariae* causantes de la podredumbre amarga del manzano.

Principio Activo	CE50		
	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. acutatum</i>	<i>C. fragariae</i>
Captan	13,89	> 100	18,6
Difenoconazole	0,12	0,14	0,12
Fosfito 40% pH 3,5	0,04	0,08	0,92
Fosfito 40% pH 5,5	> 500	170,89	498,79
Fosfito 70% pH 3,5	1,41	0,58	2,59
Iprodione	41,51	26,15	30,24
Quitosano	268,64	328,79	221,83
Tebuconazole	0,31	0,17	0,41
Tryfloxistrobin	> 100	0,04	> 100
Ziram	13,59	15,39	4,13

Los productos evaluados mostraron una respuesta variable en el control de *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* y *C. fragariae*. Mientras que algunos fueron eficaces inhibiendo el crecimiento micelial a concentraciones muy bajas, en otros casos aún cuando las especies de *Colletotrichum* fueran expuestas a altas concentraciones de producto, éstos no fueron capaces de inhibir el crecimiento micelial comparado con el testigo en las condiciones de este ensayo.

Los principios activos que manifestaron un comportamiento satisfactorio en la inhibición del crecimiento micelial de *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* y *C. fragariae* fueron los IBE tebuconazole y difenoconazole, los valores de CE50 estuvieron comprendidos entre 0,12 y 0,41 ppm (figura 6). De igual forma los productos fosfito 70% pH 3,5 (pH normal en solución) y fosfito 40% evaluado a pH 3,5 en solución también controlaron efectivamente las tres especies de *Colletotrichum*, las CE50 se ubicaron en un rango de valores de 0,08 a 2,59 ppm. Los productos de contacto iprodione y ziram igualmente mostraron resultados satisfactorios, estos fungicidas tuvieron valores de CE50 entre 4,13 y 41,51 ppm (figura 7).

Los fungicidas tryfloxistrobin y captan presentaron una respuesta variable dependiendo de la especie de *Colletotrichum* evaluada. En el caso de tryfloxistrobin, este fungicida fue eficaz en controlar a *C. acutatum* (CE50 0,04 ppm) pero poco efectivo en el control de las otras dos especies, *C. gloeosporioides* y *C. fragariae*, donde los valores de CE 50 fueron superiores a 100 ppm. Mientras que con captan, fue efectivo contra *C. gloeosporioides* y *C. fragariae* inhibiendo el crecimiento micelial de estos hongos, los valores de CE50 fueron de 13,89 ppm y 18,6 ppm respectivamente, pero fue poco efectivo contra *C. acutatum* (CE 50 >100 ppm).

El resto de los productos evaluados se comportaron en forma poco eficaz en la inhibición del desarrollo micelial de *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* y *C. fragariae*. Estos productos fueron fosfito 40% a pH 5,5 (pH normal en solución) y quitosano, los valores de CE50 se ubicaron entre 170,89 ppm y más de 500 ppm (figura 8). Si bien estos dos productos no fueron eficaces, se observó cierta inhibición en el crecimiento de las colonias cuando fueron expuestas a las concentraciones más altas de producto. Asimismo las colonias presentaban un aspecto atípico con bordes desiguales y en algunos casos menor densidad del micelio en relación a los testigos.

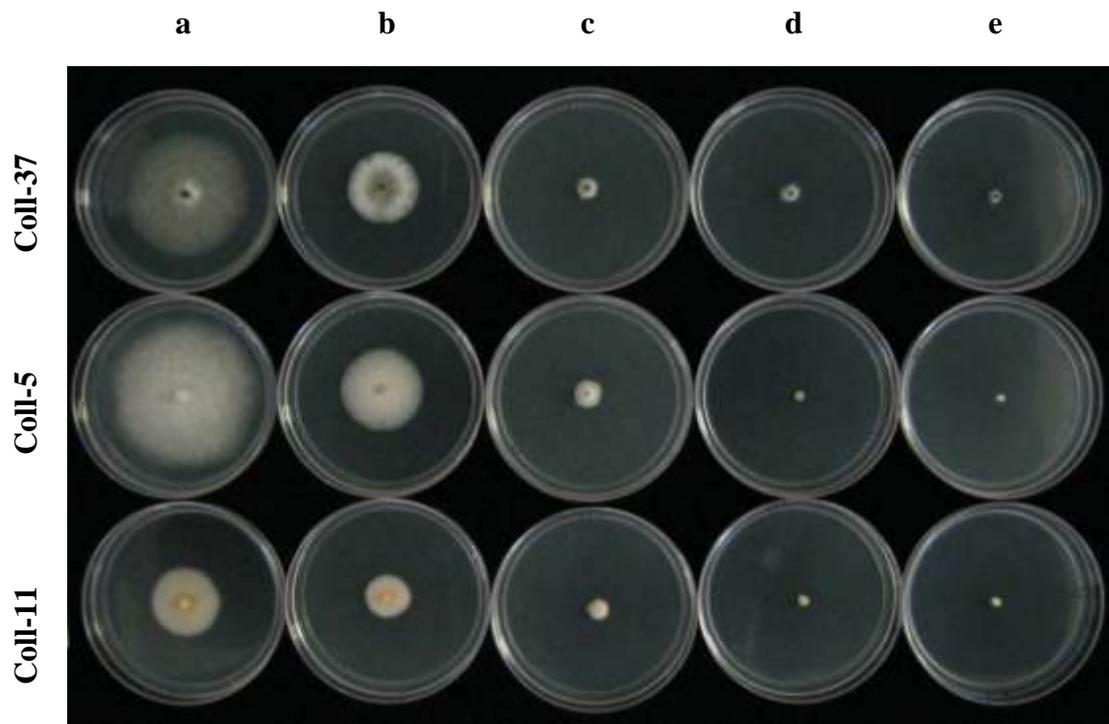


Figura 6: Aspecto de las colonias de los aislados de *Colletotrichum fragariae* (Coll-37); *C. gloeosporioides* (Coll-5) y *C. acutatum* (Coll-11) luego de seis días de crecimiento en medio PDA con el fungicida sistémico difenoconazole a diferentes concentraciones; **a)** testigo sin fungicida; **b)** 0,1 ppm; **c)** 1,0 ppm; **d)** 10 ppm; **e)** 100 ppm.

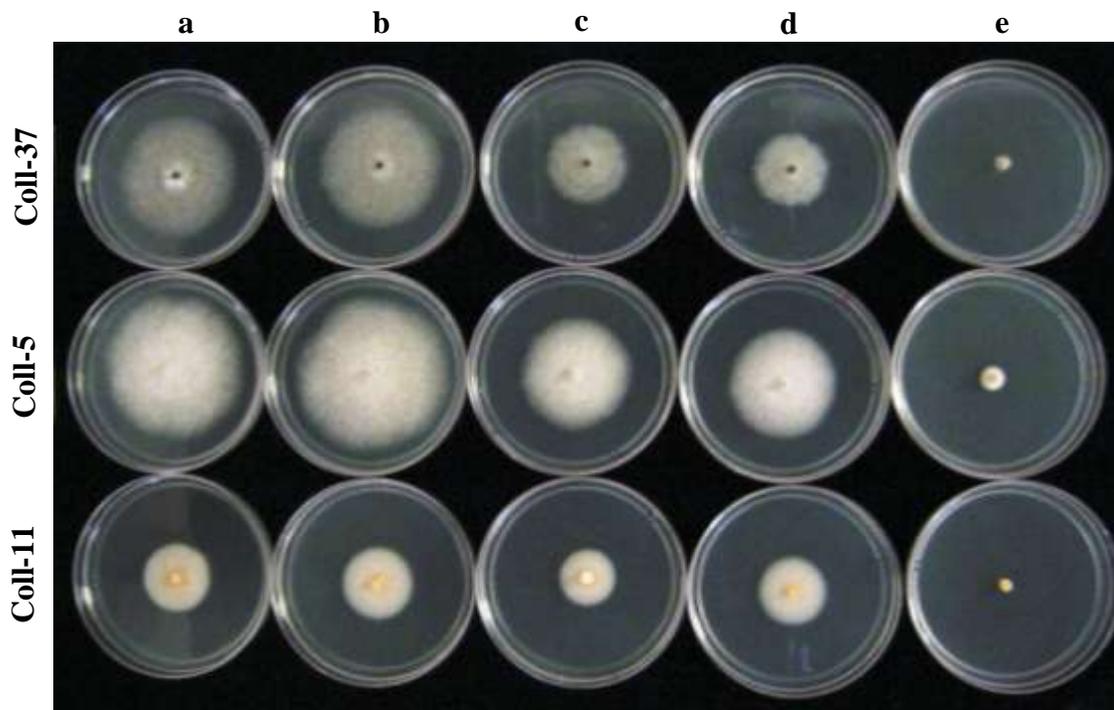


Figura 7: Aspecto de las colonias de los aislados de *Colletotrichum fragariae* (Coll-37); *C. gloeosporioides* (Coll-5) y *C. acutatum* (Coll-11) luego de seis días de crecimiento en medio PDA con el fungicida de contacto ziram; **a)** testigo sin fungicida; **b)** 0,1 ppm; **c)** 1,0 ppm; **d)** 10 ppm; **e)** 100 ppm.

Coincidiendo con lo expuesto en este trabajo, Freeman et al. (1997) manifiestan que difenoconazole presenta efectividad en el control *in vitro* del desarrollo micelial de *C. acutatum*. Sin embargo, estudios en campo realizados por de Goes et al. (2007) indican que el difenoconazole, aunque con resultados variables, resulto poco efectivo para impedir la caída prematura de frutos en citrus causado por *C. acutatum* en las condiciones del ensayo. En el caso del tebuconazole el otro IBE evaluado en esta tesis, Gentjan (2009) también lo destaca como efectivo en el control *in vitro* del crecimiento micelial de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* en olivo. Por otra parte Thomas et al. (2008) evidenciaron menor efectividad del tebuconazole que otros fungicidas de

contacto cuando fue aplicado de forma preventiva para el control de *Colletotrichum lupin* en lupino.

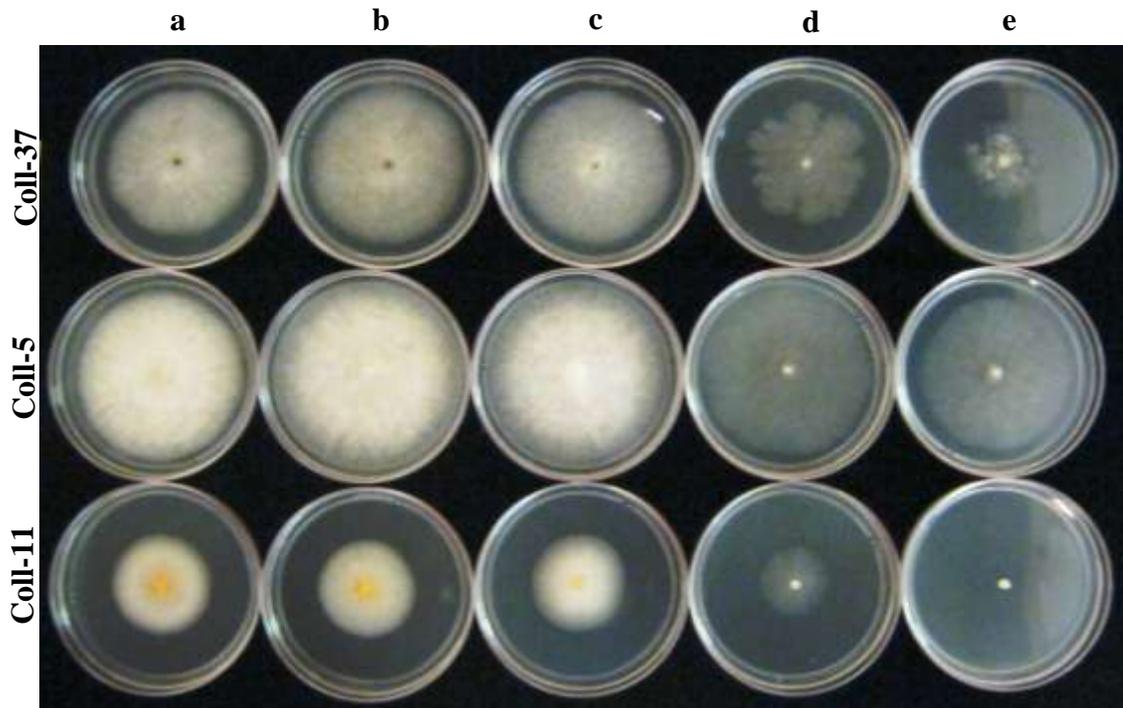


Figura 8: Aspecto de las colonias de los aislados de *Colletotrichum fragariae* (Coll-37); *C. gloeosporioides* (Coll-5) y *C. acutatum* (Coll-11) luego de seis días de crecimiento en medio PDA con fungicida fosfito 40% evaluado a pH 5,5 (pH normal en solución) a diferentes concentraciones; **a)** testigo sin fungicida; **b)** 0,5 ppm; **c)** 5,0 ppm; **d)** 50 ppm; **e)** 500 ppm.

La ventaja que presenta el tebuconazole frente a otros fungicidas que también fueron efectivos, es que podría ser utilizado en los días previos o durante la cosecha por no presentar tiempo de espera según etiqueta. La época cercana a la cosecha es un momento crítico del año para el desarrollo de esta enfermedad, por lo que disponer una herramienta eficiente para su control en esos momentos, resulta de mucha utilidad. Sin embargo, si se trata de manzana para exportación, ya no es posible utilizar este producto

en esos momentos porque el mercado europeo exige un tiempo de espera de 30 días para tebuconazole (URUGUAY. MGAP. DGSA, 2008).

Por otra parte si bien difenoconazole y tebuconazole se mostraron como muy promisorios en el control de *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* y *C. fragariae*, estos fungicidas pertenecen al grupo de los IBE por lo que poseen la dificultad de que presentan alto riesgo de generar resistencia tras un reiterado uso en campo. Esta situación condiciona y restringe las recomendaciones para su uso en manzana.

En el caso de los fungicidas iprodione y ziram los resultados obtenidos *in vitro* indican que podrían ser efectivos para el control de la podredumbre amarga en campo. Para el caso de iprodione evaluado sobre *C. acutatum*, los resultados obtenidos en éste trabajo se aproximan a los de los Santos García de Paredes y Romero Muñoz (2002) quienes en ensayos similares obtuvieron valores de CE50 10 ppm. En el caso de ziram los resultados obtenidos en esta tesis son aún mejores que los de iprodione. Esto da fundamento a las recomendaciones de producción integrada para Uruguay publicadas por Scatoni et al. (2005), quienes recomiendan el uso de ziram para el control de esta enfermedad.

Ziram e iprodione permiten un uso más reiterado en cada zafra. Esto se debe a que tienen la ventaja de presentar bajo riesgo de generar resistencia en las poblaciones de *Colletotrichum* spp., por sus características como fungicidas de múltiples sitios de acción. Cabe destacar que iprodione presenta un tiempo de espera de 14 días y ziram de 20 días según etiqueta, lo que genera un inconveniente importante al momento de tener la necesidad de usarlo próximo a cosecha, momento en que la podredumbre amarga causa los mayores daños si existen condiciones ambientales favorables para su desarrollo.

Tanto el fosfito 40% evaluado a pH 3,5 como el fosfito 70%, cuyo pH normal en solución es 3,5, arrojaron resultados prometedores. Estos resultados demuestran que el fosfito tiene un efecto directo sobre el desarrollo de los hongos, independientemente de su conocida acción como inductor de resistencia. Estos resultados coinciden con lo expuesto por Araújo et al. (2008), quienes lograron reducir la velocidad de crecimiento *in vitro* de *C. gloeosporioides* en un 92% con una concentración de 0,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de fosfito (40% P_2O_5 - 20% K_2O) evaluado a pH 2 en solución (acidez característica del producto). Estos mismos investigadores en un trabajo posterior (2010), encontraron que la eficiencia del fosfito varía notoriamente dependiendo de su fuente. Esto implica que para utilizar este tipo de productos, es recomendable evaluar primero la efectividad de las diferentes formulaciones disponibles.

En el caso de los fosfitos, no quedaba claro cuánto de su efecto inhibitorio depende del propio producto y cuanto del pH que éste otorga al medio. El fosfito 40%, fue mucho más eficiente inhibiendo el desarrollo micelial de las tres especies de *Colletotrichum* cuando fue evaluado en medio ácido (pH 3,5) que cuando se lo evaluó a su pH normal en solución (pH 5,5) (figura 9). El pH tiene un efecto directo en la inhibición de estos hongos y esto queda demostrado en ésta tesis. Araújo et al. (2010) mencionan, que la mayoría de los hongos tolera un amplio rango de pH y tienen un intervalo de crecimiento óptimo que va desde pH 5,0 a 6,5. Estos investigadores indican además que se ha demostrado que *C. gloeosporioides* tiene un mayor crecimiento micelial entre pH 5,0 y 6,0, por lo tanto, concluyen que si éste hongo se encuentra por encima o por debajo de este rango sufrirá un deterioro adicional en su desarrollo.

Tryfloxistrobin reveló un comportamiento selectivo controlando de forma muy eficaz a *C. acutatum*, pero no a *C. gloeosporioides* y *C. fragariae*. Una posible explicación podría deberse a un historial de uso reiterado de este producto en los montes de manzano. Este fungicida que pertenece al grupo de las estrobilurinas, se ha utilizado con mucha frecuencia para el control de la sarna del manzano causada por el hongo *Venturia*

inaequalis. Una posibilidad es que este uso reiterado haya provocado indirectamente la generación de resistencia en poblaciones de *C. gloeosporioides* y *C. fragariae*, las dos especies predominantes en los montes de manzana en el sur del país según el muestreo efectuado en este trabajo. La generación de resistencia de poblaciones de *V. inaequalis* a este producto, ya ha sido verificada en la zona sur de nuestro país, la principal región productora de manzana (Casanova y Celio, 2011).

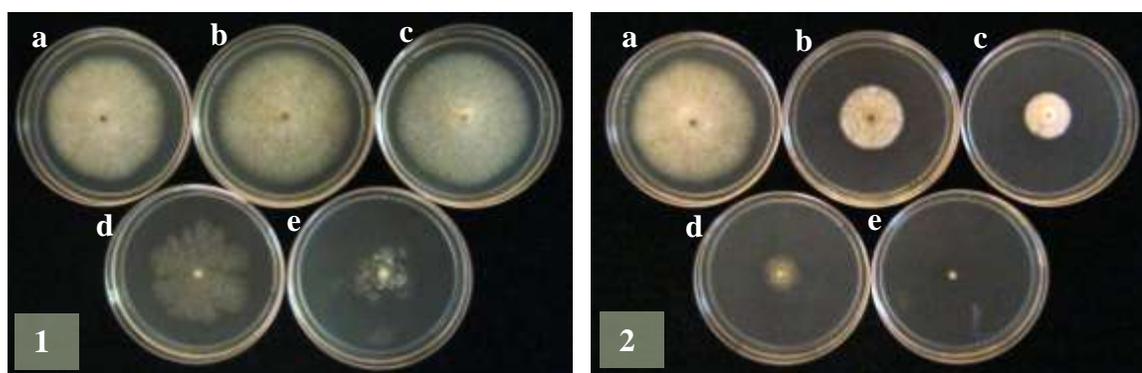


Figura 9: Aspecto de la colonia del aislado Coll-37 de *Colletotrichum fragariae* luego de seis días de crecimiento en medio PDA con fungicida fosfito 40% a pH 5,5 (pH normal) (1) o pH 3,5 (acidificado) (2); a) testigo sin fungicida; b) 0,5 ppm; c) 5,0 ppm; d) 50 ppm; e) 500 ppm.

El otro producto que presentó una selectividad en el control de las especies de *Colletotrichum* fue captan. Este producto fue efectivo inhibiendo a *C. gloeosporioides* y *C. fragariae* pero no a *C. acutatum*. MacKenzie et al. (2009) también obtuvieron resultados positivos cuando evaluaron al captan contra *C. gloeosporioides*. Aplicaciones preventivas con este producto, lograron disminuir la mortalidad de plantas de frutilla artificialmente inoculadas con *C. gloeosporioides*. En el caso de la especie *C. acutatum*, De los Santos García de Paredes y Romero Muñoz (2002) en ensayos similares, también obtuvieron altos valores de CE50 cuando evaluaron este fungicida (CE50 200 ppm). Freeman et al. (1997) contrariamente a los resultados de este trabajo, indican que el captan fue capaz de inhibir *in vitro* el desarrollo micelial de *C. acutatum*. Wedge et al.

(2007), también encontraron efectividad en este producto, tratamientos a campo con captan fueron capaces de reducir la incidencia en fruta de la antracnosis en frutilla causada por *C. acutatum*.

El quitosano, este producto de origen natural, ha presentado resultados satisfactorios en el control de otros hongos como *Botrytis cinérea* en pepino (Ben-Sholom, 2003) y en uva (Láres, 2008). En este trabajo el quitosano fue de los productos menos efectivos en relación a los demás. Bautista-Baños et al. (2003) en ensayos *in vitro* lograron incluso inhibir totalmente el desarrollo micelial de *C. gloeosporioides*, pero con concentraciones de quitosano varias veces superiores a las utilizadas en este ensayo. Esto estaría indicando que este producto puede ser muy efectivo siempre y cuando se utilice a altas concentraciones. Por otra parte, este producto al igual que a los fosfitos, se le atribuye la capacidad de estimular los mecanismos naturales de defensa de las plantas, lo que indica que en aplicaciones sobre plantas su efecto puede ser mayor.

Es importante resaltar que todos los productos químicos que en este trabajo se manifestaron satisfactoriamente inhibiendo el desarrollo micelial de *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* y *C. fragariae*, deberán ser evaluados en ensayos a campo para verificar su efectividad en el control de la podredumbre amarga del manzano antes de recomendar su uso para el control a campo.

5. CONCLUSIONES

En Uruguay la podredumbre amarga del manzano es causada por las especies *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. acutatum* y *C. fragariae*.

El método de evaluación basado en la inhibición del crecimiento micelial resultó útil al momento de comparar los diferentes productos químicos seleccionados, indicando cuales son los más eficientes en reducir el desarrollo micelial de las tres especies de *Colletotrichum* causantes de la podredumbre amarga del manzano en Uruguay.

Los IBE difenoconazole y tebuconazole, fosfito 70% (pH normal) y fosfito 40% acidificado a pH 3,5 y los productos de contacto ziram e iprodione, presentan efectividad inhibiendo el crecimiento micelial de las tres especies de *Colletotrichum*. Estos productos tienen alta potencialidad de ser útiles en el manejo de la podredumbre amarga.

En el caso de tryfloxistrobin y captan estos productos inhiben el desarrollo micelial de las tres especies de *Colletotrichum* de manera selectiva; mientras que fosfito 40% a pH 5,5 y quitosano resultan poco eficaces. Estos productos podrían tener mayor o menor eficiencia en función de las especies de *Colletotrichum* presentes en el campo.

Los productos que se mostraron como eficaces inhibiendo el desarrollo micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. acutatum* y *C. fragariae*, deberán ser evaluados en ensayos a campo para verificar su efectividad en condiciones de producción.

6. RESUMEN

En Uruguay y el mundo el manzano es uno de los frutales más importantes. Entre las enfermedades que afectan a este cultivo se encuentra la podredumbre amarga causada por especies de hongos del género *Colletotrichum*. Esta enfermedad causa podredumbre en la fruta principalmente en las semanas previas y durante la cosecha. Las variedades de cosecha tardía son las más sensibles. En Uruguay, la podredumbre amarga no suele ser problemática, sin embargo, en años de clima cálido y húmedo sobre todo durante el verano, puede causar importantes pérdidas de cosecha. Su manejo en nuestro país se basa principalmente en la aplicación periódica de fungicidas como captan o ziram durante el verano. A pesar de ello, en años favorables al desarrollo de la enfermedad, las pérdidas pueden ser cuantiosas. Una posible explicación es que los fungicidas comúnmente utilizados, no sean efectivos. Por esta razón, en este trabajo se evaluó el efecto de nueve productos, químicos y de origen natural, para el control de las especies *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. acutatum* y *C. fragariae* identificadas en Uruguay como causantes de la podredumbre amarga. Los productos se evaluaron en ensayos de control *in vitro*, por medio de la técnica de inhibición del crecimiento micelial. Los IBE difenoconazole y tebuconazole así como el fosfito 70% a pH 3,5 (pH normal) y fosfito 40% acidificado a pH 3,5 manifestaron un muy buen comportamiento inhibiendo el crecimiento micelial de esos hongos; los valores de CE50 se ubicaron entre 0,12 y 2,59 ppm. Los productos de contacto ziram e iprodione también mostraron resultados satisfactorios; los valores de CE50 estuvieron entre 4,13 y 41,51 ppm. Tryfloxistrobin y captan presentaron una respuesta variable dependiendo de la especie de *Colletotrichum* evaluada. El resto de los productos evaluados fosfito pH 5,5 y quitosano se comportaron en forma poco eficaz bajo las condiciones de este ensayo.

Palabras clave: Evaluación *in vitro* de fungicidas; Podredumbre amarga; Manzana; *Colletotrichum gloeosporioides*; *C. acutatum*; *C. fragariae*.

7. SUMMARY

Apple is one of the most important fruit in Uruguay and the world. Bitter rot disease of apple is caused by species of fungi of the genus *Colletotrichum*. Bitter rot causes fruit rot nearly and during the harvest. The most susceptible apple cultivar are the once harvest in April. In Uruguay, bitter rot is not a problematic disease. However, in years of warm and humid climate especially during the summer, this disease can cause significant fruit losses. In our country, the management is based on the regular application of fungicides such as captan or ziram during the summer. In spite of this, same years fruit losses can be significant. One explanation is that the fungicides utilized by farmers are not effective. That's why, this study evaluated the effect of six fungicides, two sources of phosphate and a natural product for the control of *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. acutatum* and *C. fragariae*. This three species were identified as the cause of bitter rot in Uruguay. These products were evaluated in vitro assay using mycelial growth inhibition technique. The IBE difenoconazole and tebuconazole, phosphate 70% at pH 3.5 (normal pH) and phosphate 40% acidified to pH 3.5, showed a very good performance inhibiting the mycelial growth of these fungi. The EC50 values were located between 0.12 and 2.59 ppm. The contact fungicides ziram and iprodione, also showed satisfactory results, the EC50 values were between 4.13 and 41.51 ppm. Tryfloxistrobin and captan have a variable response depending on the species of *Colletotrichum* evaluated. The other tested products phosphate 40% at pH 5.5 and chitosan, were less effective under assay conditions.

Keywords: In vitro fungicides evaluation; Bitter rot; Apple; *Colletotrichum gloeosporioides*; *C. acutatum*; *C. fragariae*.

8. BIBLIOGRAFIA

1. AGRIOS, G.N. 2008. Fitopatología. 2da. ed. México, Limusa. 838 p.
2. AGRI STAR. 2011. Agri Star. (en línea). s.l. Consultado oct. 2011. Disponible en <http://www.agristar.com.ar/fungicidas/ZIRAM%20GRANUFLO.pdf>
3. AINSWORTH, G.; 1971. Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi. 6th ed. Kew, Surrey, England, CMI. 663 p.
4. ARAÚJO, L.; BORSATO, L.; VALDEBENITO-SANHUENZA, R.; STADNIK, M. 2008. Fosfito de potássio e ulvana no controle da mancha foliar da gala em macieira. *Tropical Plant Pathology*. 33:74-80.
5. _____.; VALDEBENITO-SANHUENZA, R.; STADNIK, M. 2010. Avaliação de formulações de fosfito de potássio sobre *Colletotrichum gloeosporioides in vitro* e no controle pós-infeccional da mancha foliar de *Glomerella* em macieira. *Tropical Plant Pathology*. 35:54-59
6. BAÑOS-GUEVARA, P.; ZA VALETA-MEJÍA, E.; COLINAS-LEÓN, M.; LUNA-ROMERO, I.; GUTIERREZ-ALONSO, J. 2004. Control biológico de *Colletotrichum gloeosporoides* en papaya Maradol roja (*Carica papaya* L.) y Fisiología de postcosecha de frutos infectados. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 2 (22): 198-205.
7. BAUTISTA-BAÑOS, S.; HERNANDEZ-LOPEZ, M.; BOSQUES-MOLINA, E.; WILSON, C. 2003. Effect of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporoides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. *Crop Protection*. 22: 1087-1092.
8. BAYER. 2007. Flint[®] 50% W. (en línea). Monheim, Germany. 7 p. Consultado oct. 2011. Disponible en [http://www.bayercropscience.cl/upfiles/etiquetas/Eti_Flint_50_WG_30-11-07 .pdf](http://www.bayercropscience.cl/upfiles/etiquetas/Eti_Flint_50_WG_30-11-07.pdf)
9. BEN-SHALOM, N.; ARDI, R.; PINTO, R.; AKI, C.; FALLIK, E. 2003. Controlling gray mould caused by *Botrytis cinerea* in cucumber plants by means of chitosan. *Crop Protection*. 22: 285–290.
10. BIOAGRO S.A. 2011. Biorend. (en línea). San Miguel. Consultado oct. 2011. Disponible en

http://www.biorend.cl/v15/index.php?option=com_content&view=article&id=58&Itemid=48

11. BROOKS, A. 1931. Anthracnose of strawberry caused by *Colletotrichum fragariae*, n. sp. *Phytopathology*. 21: 739 – 744.
12. CASANOVA, L.; CELIO, A. 2011. Determinación de los niveles de resistencia “in vitro” a trifloxistrobin en poblaciones de *Venturia inaequalis*. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 63 p.
13. CASCO, M.; CONDE, A. 2005. Efecto de la eliminación de las aplicaciones de fungicidas para el control de sarna del manzano (*Venturia inaequalis*) y otras enfermedades, en variedades de manzanos tardías. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 106 p.
14. DE GOES, A.; GARRIDO, R.; REIS, R.; BALDASSARI, R.; SOARES, M. 2007. Evaluation of fungicide application to sweet orange at different flowering stages for control of postbloom fruit drop caused by *Colletotrichum acutatum*. *Crop Protection*. 27: 71-76.
15. DE LOS SANTOS GARCÍA DE PAREDES, B.; ROMERO MUÑOZ, F. 2002. Effect of different fungicides in the control of *Colletotrichum acutatum*, causal agent of anthracnose crown rot in strawberry plants. *Crop Protection* 21: 11-15.
16. FAO. 2010. FAOSTAT. (en línea). Roma. s.p. Consultado ago. 2011. Disponible en <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>
17. FELIPINI, R.; 2008. Avaliação de quitosano para o controle da podridão amarga da maceira. Monografia apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Engenheiro Agrônomo no curso de Agronomia. Florianópolis, Brasil. Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências Agrárias. 37 p.
18. FERNANDEZ VALIELA, M. 1978. Introducción a la Fitopatología. 3ª. ed. Buenos Aires, INTA. v.3, 779 p.
19. FREEMAN, S.; NIZANI, Y.; DOTAN, S.; EVEN, S.; SANDO, T. 1997. Control of *Colletotrichum acutatum* in strawberry under laboratory, greenhouse, and field conditions. *Plant Disease*. 81:749-752.

20. _____.; MINZ, D.; KOLESNKI, I.; BARBUL, O.; ZVEIBIL, A.; MAYMON, M.; NITZANI, Y.; KIRSHNER, B.; RAV-DAVID, D.; BILU, A.; DAGI, A.; SHAFIRI, S.; ELAD, Y. 2004. *Trichoderma* biocontrol of *Colletotrichum acutatum* and *Botrytis cinérea* and survival in strawberry. *European Journal of Plant Pathology*. 110: 361–370.
21. GABARD, Z. 2003. La Fruticultura. *In*: Telis, V.; Cárrega, E.; Elhordoy, J. eds. Producción integrada en Uruguay; claves de un sistema amigable con el medio ambiente que permite obtener frutas y hortalizas de alta calidad. Montevideo, Artes Gráficas. pp. 13-24.
22. GARCÍA, S.; MOSCARDI, C. 1975. Sarna del manzano. Sintomatología y ciclo biológico. CIAAB Las Brujas. Hoja de divulgación no. 23. 2 p.
23. _____. 1998. Enfermedades a hongos que deben ser consideradas prioritariamente dentro de un programa de Manejo Integrado. *In*: Nuñez, S.; García, S.; Paullier, J.; Pagani, C.; Maeso, D. eds. Guía para el manejo integrado de plagas y enfermedades en frutales. Montevideo, INIA. pp. 49-90 (Boletín de Divulgación no. 66).
24. GENTJAN, A. 2009. Evaluación de fungicidas para el control de la antracnosis del olivo causada por *Colletotrichum acutatum*. (en línea). s.n.t. s.p. Consultado set. 2011. Disponible en <http://www.uco.es/organiza/departamentos/agronomia/tesis-trabajos/masteres/olivicultura.html>
25. GUERBER, J.; CORRELL, J. 2001. Characterization of *Glomerella acutata*, the teleomorph of *Colletotrichum acutatum*. *Mycologia*. 93:216–229.
26. HEWITT, H.G. 1998. Fungicides in crop protection. Wallingford, CABI. 221 p.
27. INDEX FUNGORUM. 2008. Taxonomy. (en línea). s.l. Consultado oct. 2011. Disponible en <http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp>.
28. JONES, A.; ALDWINCKLE, H. 2002. Compendium of apple and pear diseases. St. Paul, MN, USA, APS. 100 p.
29. LÁREZ VELÁSQUEZ, C. 2008. Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica. *Revista UDO Agrícola*. 8 (1): 1-22.

30. LATHAM, A. J.; WILLIAMS, J. C. 1983. Cultural characteristics and pathogenicity of *Glomerella cingulata* isolates from apples in Alabama. *Plant Disease*. 67: 1065-1068.
31. LATORRE, B. ed. 1989. Fungicidas y nematocidas; avances y aplicabilidad. Santiago, Pontificia Universidad Católica de Chile. Facultad de Agronomía. 216 p. (Colección en Agricultura).
32. LEONI, C; MONDINO, P.; ALANIZ, S. 2003. Prospección de las “enfermedades de verano” en la producción de manzanas tipo Red. In: Telis, V.; Cárrega, E.; Elhordoy, J. eds. Producción integrada en Uruguay; claves de un sistema amigable con el medio ambiente que permite obtener frutas y hortalizas de alta calidad. Montevideo, Artes Gráficas. pp. 131-134.
33. LOLAS, M. 2005. Enfermedades de verano en manzanas Pink Lady. Pomaceas. *Boletín Técnico*. 5(2): 1-4.
34. MACHARDY, W. 1996. Apple scab; biology, epidemiology and management. St. Paul, MN, APS. 545 p.
35. MacKENZIE, S.J.; MERTELY, J.C.; SEIJO, T.E.; PERES, N.A. 2008. *Colletotrichum fragariae* is a pathogen of hosts other than strawberry. *Plant Disease*. 92: 1432-1438.
36. _____.; _____.; PERES, N. A. 2009. Curative and protectant activity of fungicides for control of crown rot of strawberry caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Disease*. 93: 815-820.
37. MASS, J.; HOWARD, C. 1985. Variation of several Antracnose Fungi in virulence to strawberry and apple. *Plant Disease*. 69: 164-166.
38. MODERNE, P. 2009. Guía para la protección y fertilización vegetal. 11ª ed. Montevideo, Tradinco. 499 p.
39. MOGGIA, C.; YURI, J. 2004. Apple postharvest practices in Chile. In: Annual Meeting (99th., 2003, Wenatchee, WA). Proceedings. Talca, Washington State Horticultural Association. pp. 149-159.
40. MONDINO, P.; ALANIZ, S.; LEONI, C. 2003. Racionalización y reducción del uso de fungicidas en el control de la sarna del manzano ocasionada por *Venturia inaequalis*. In: Telis, V.; Cárrega, E.; Elhordoy, J. eds. Producción integrada en Uruguay; claves de un sistema amigable con el

medio ambiente que permite obtener frutas y hortalizas de alta calidad. Montevideo, Artes Gráficas. pp. 119-121.

41. _____. 2005. Sistema de Soporte a la Decisión (SSD) para la protección integrada del manzano. Tesis doctoral. Córdoba, España. Universidad de Córdoba. 258 p.
42. _____. 2009. Manual de identificación de enfermedades de manzana en poscosecha. Montevideo, Uruguay, Facultad de Agronomía. 67 p.
43. MORAL, J.; OLIVEIRA, R.; TELLO, J.; TRAPERO, A. 2007. Caracterización fisiológica y patogénica de aislados de *Colletotrichum* spp. causantes de la antracnosis del olivo. Boletín Sanidad Vegetal (Plagas). 33: 219-234.
44. MORDUE, J. E. M. 1971. *Glomerella cingulata*. Commonwealth Agriculture Bureaux. C.M.I. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria no. 315. 2 p.
45. NANTAWANIT, N.; CHANCHAICHAOVIVAT, A.; PANIJPAN, B.; RUENWONGSA, P. 2009. Induction of defense response against *Colletotrichum capsici* in chili fruit by the yeast *Pichia guilliermondii* strain R13. Biological Control 52. 145–152
46. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). s.f. Taxonomy browser. (en línea). s.l. Consultado oct. 2011. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=13548>
47. NUÑEZ, S.; GARCÍA, S.; PAULLIER, J.; PAGANI, C.; MAESO, D. 1998. Guía para el manejo integrado de plagas y enfermedades en frutales. Montevideo, INIA. 116 p. (Boletín de Divulgación no. 66).
48. OLIVEIRA, R.; MORAL, J.; BOUHMIDI, K.; TRAPERO, A. 2005. Caracterización morfológica y cultural de aislados de *Colletotrichum* spp. Causantes de la antracnosis del olivo. Boletín Sanidad Vegetal (Plagas). 31:531-548.
49. PERES, N.; TIMMER, L.; ADASKAVEG, J.; CORRELL, J. 2005. Lifestyle of *Colletotrichum acutatum*. Plant Disease. 89: 784-795.
50. SCATONI, B.; MONDINO, P.; LEONI, C.; NUÑEZ, S.; BUZCHIAZZO, M.; DE LUCA, R.; MOIZO, A.; RABELLINO, F.; MARTINEZ, N. 2005. Normas para la producción integrada de manzano – Temporada 2005-2006. (en línea). Montevideo, Facultad de Agronomía. Consultado may.

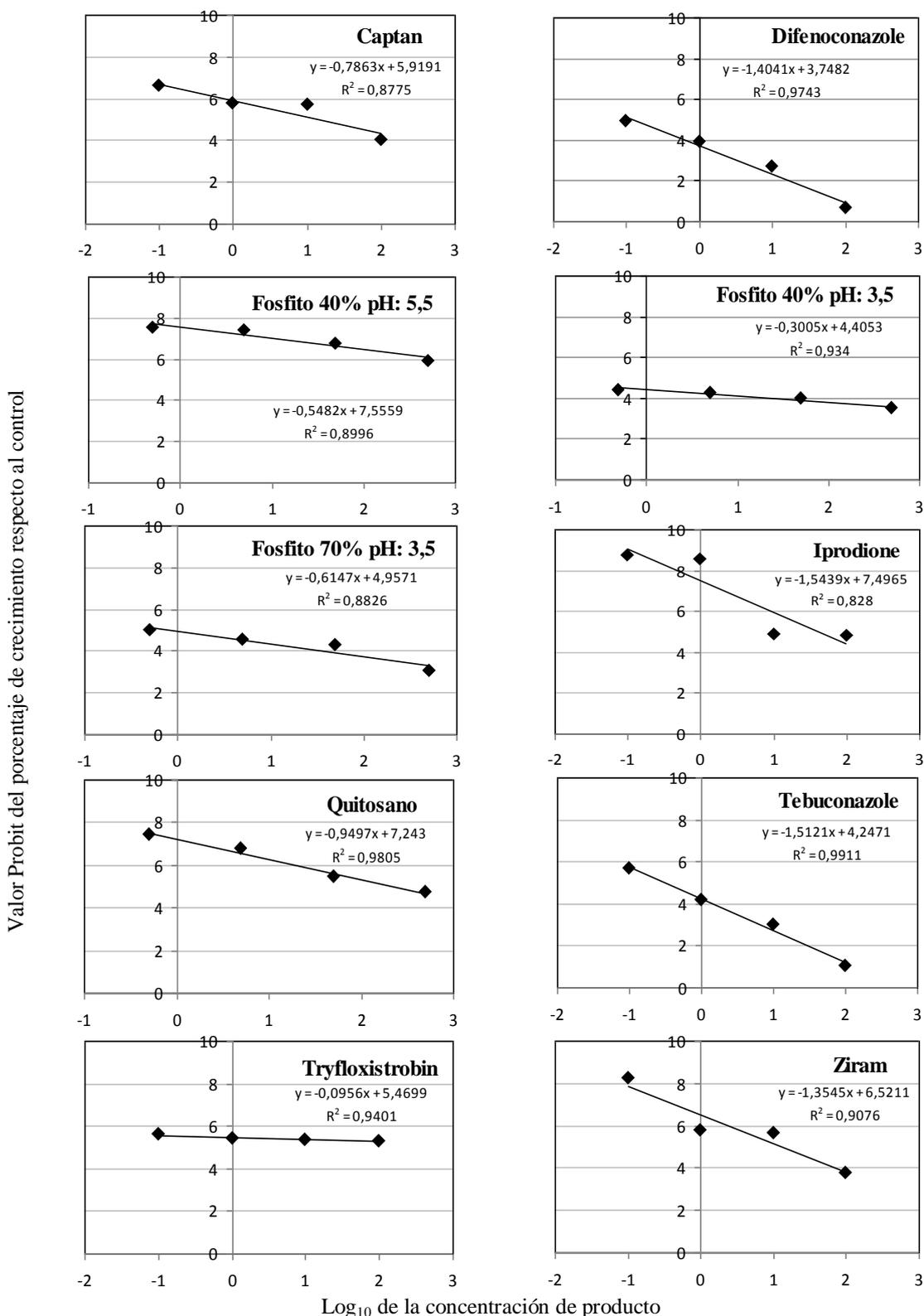
2011. Disponible en <http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/PI/doc/Version%20final%20Normas%202005-2006/MANZANA%20PI%202005.pdf>. 45 p.

51. SERMEÑO, J.M. 2005. Guía técnica de las principales plagas artrópodas y enfermedades de los frutales. Santa Tecla, El Salvador, Ministerio de Agricultura y Ganadería. Programa Nacional de Frutas de El Salvador. 78 p.
52. SHI, Y.; CORRELL, J. C.; GUERBER, J.C.; ROM, C. R. 1996. Frequency of *Colletotrichum* species causing bitter rot of apple in the Southeastern United States. *Plant Disease*. 80: 692-696.
53. SMITH, B.J.; BLACK, L. L. 1990. Morphological, cultural, and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolates from strawberry. *Plant Disease*. 74: 69-76.
54. THOMAS, G. J.; SWEETINGHAM, M. W.; ADCOCK, K. G. 2008. Application of fungicides to reduce yield loss in anthracnose-infected lupins. *Crop Protection*. 27: 1071-1077.
55. TRAVIS, J.; RYTTER, J.; BIGGS, A. s. f. Bitter Rot. (en línea). Virginia, West Virginia University. Consultado nov. 2011. Disponible en http://www.caf.wvu.edu/kearneysville/disease_descriptions/ombitter.html. 3 p.
56. URUGUAY. MINISTERIO DE GANADERÍA, AGRICULTURA Y PESCA. DIRECCIÓN DE INVESTIGACIONES ESTADÍSTICAS AGROPECUARIAS. 2010. Encuesta frutícola, zafra 2009-2010. (en línea). Montevideo. Consultado jul. 2011. Disponible en <http://www.mgap.gub.uy/diea/Encuestas/>
57. _____. _____. DIRECCIÓN GENERAL DE SERVICIOS AGRICOLAS. 2008. Plan de acción y recomendaciones para los productores que orienten su producción de manzanas y peras a la exportación. (en línea). Montevideo. Consultado nov. 2011. Disponible en <http://www.mgap.gub.uy/DGSSAA/Noticias/documentos/recomendaciones.pdf>
58. VALDEBENITO SANHUENZA, R.; BECKER, W.; BONETI, J.; KATSURAYAMA, Y.; COSTA CZERMAINSKI, A. s.f. Características e controle das doenças de verao na producao integrada de Maca. (en línea). s.n.t. pp. 51- 60. Consultado oct. 2011. Disponible en

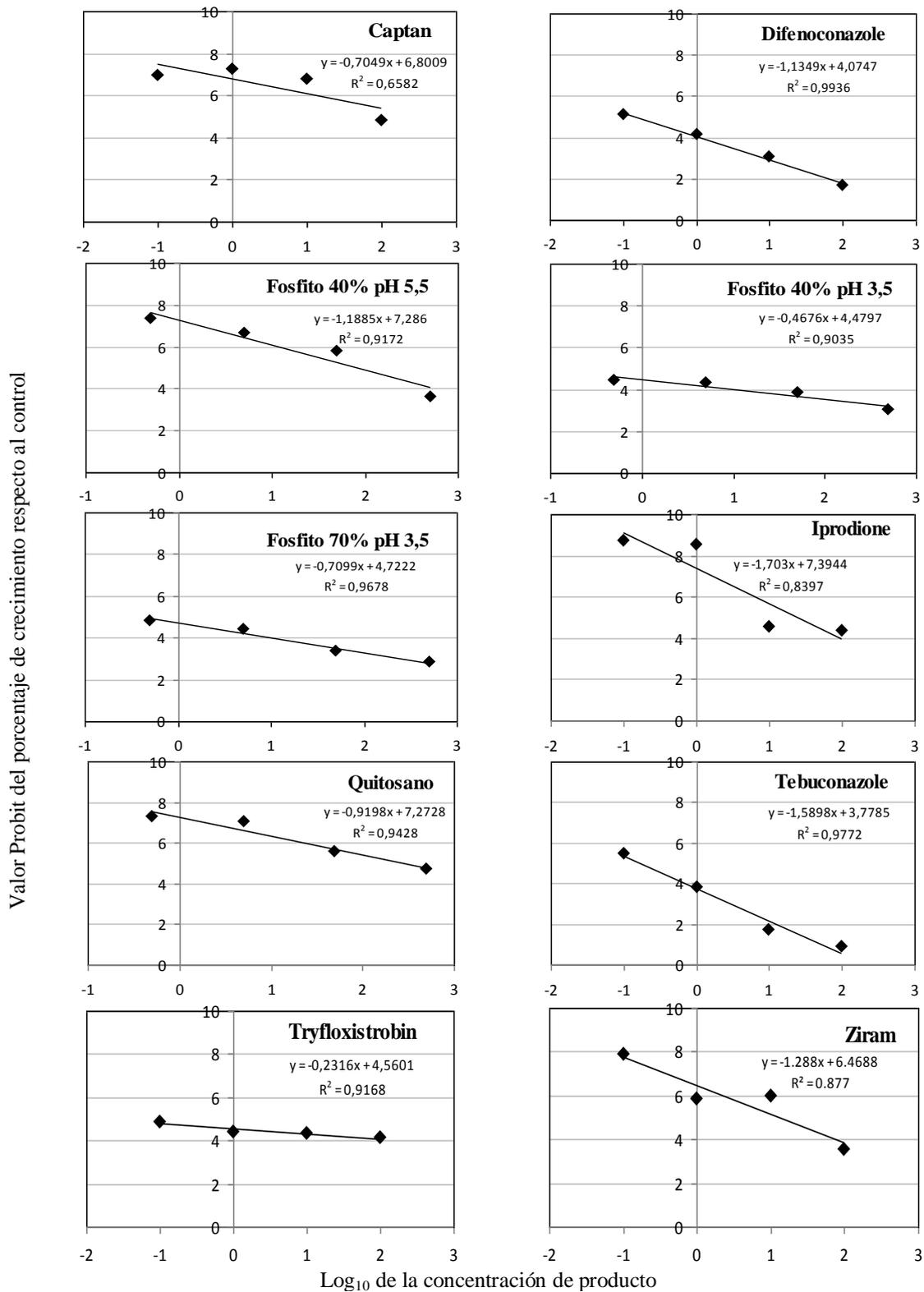
http://ag20.cnptia.embrapa.br/Repositorio/4CaracteristicasControleDoencas_000fbp9myd102wx5eo0sawqe3hiwpztx.pdf

59. VILLANUEVA, A. HERNANDEZ, A. YÁÑEZ, M. TÉLIZ, D. MORA, A. CÁRDENAS, E. CASTAÑEDA, A. 2005. Caracterización e identificación de *Colletotrichum fragariae* en frutos de chirimoya. *Agrociencia*. 39(1): 93-103.
60. WEDGE, D. ; SMITH, B. ; QUEBEDEAUX, J. ; CONSTANTIN, R. 2007. Fungicide management strategies for control of strawberry fruit rot diseases in Louisiana and Mississippi. *Crop Protection*. 26 : 1449-1458.
61. YODER, K.; BIGGS, A. s.f. Table of apple susceptibility to the bitter Rot Fungi. (en línea). Virginia, West Virginia University. Consultado set. 2011. Disponible en <http://www.caf.wvu.edu/kearneysville/tables/bitterrotsus.html>

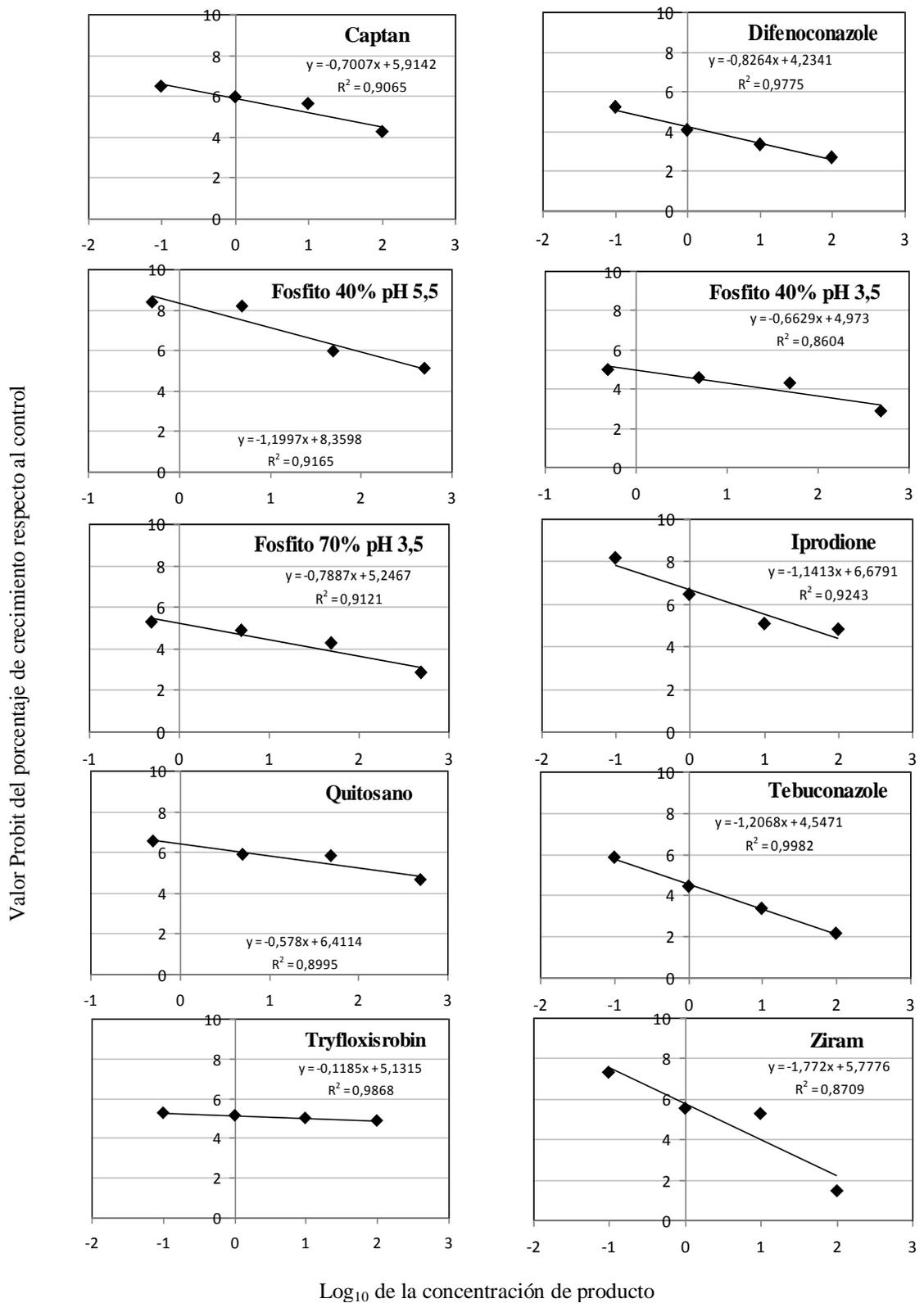
9. ANEXOS



Anexo 1: *Colletotrichum gloeosporioides*, representación gráfica del valor Probit del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial respecto al control y el log₁₀ de la concentración de los productos químicos evaluados.



Anexo 2: *Colletotrichum acutatum*, representación gráfica del valor Probit del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial respecto al control y el log₁₀ de la concentración de los productos químicos evaluados.



Anexo 3: *Colletotrichum fragariae*, representación gráfica del valor Probit del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial respecto al control y el log₁₀ de la concentración de los productos químicos evaluados.