

## SENSIBILIDAD REDUCIDA AL TIABENDAZOLE EN *Colletotrichum gloeosporioides* AISLADO DE PAPAYA<sup>1</sup>

Gustavo Astúa\*  
Luis Felipe Arauz\*  
Gerardina Umaña\*\*

### ABSTRACT

Reduced sensibility to thiabendazole in *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from papaya. Isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* were obtained from papaya fruit from benomyl-sprayed orchards (commercial isolates) and from unsprayed home yards ("wild" isolates). Germ tube elongation in varying concentrations of thiabendazole (TBZ) in water was determined in 3 commercial and 3 wild isolates. Mean EC<sub>50</sub> (µg/ml) of TBZ was 0.23 for wild isolates and 24.26 for commercial isolates. Reduction in radial growth (RG) and colony weight (CW) was determined in 2 wild and 2 commercial isolates in TBZ-amended PDA. Mean EC<sub>50</sub> values (µg/ml) of TBZ were 43.75 and 10.00 for wild isolates and 202.55 and 405.11 for commercial isolates, for RG and CW, respectively. Reduced sensitivity to TBZ in commercial isolates indicates selection of benzimidazole-resistant strains of *C. gloeosporioides*, due to continuous use of fungicides of this group on papaya in Costa Rica.

### INTRODUCCION

La antracnosis del fruto de papaya (*Carica papaya*), causado por el hongo *C. gloeosporioides* Penz. es uno de los principales problemas fitopatológicos tanto en el campo como en poscosecha (Arauz y Mora, 1983). Los métodos de combate más utilizados contra esta enfermedad involucran las aplicaciones de productos químicos como benzimidazoles y carbamatos, especialmente después de la floración en combinación con tratamientos poscosecha de los frutos.

El desarrollo de resistencia a diferentes grupos fungicidas por parte de algunos hongos es un fenómeno bien estudiado (Agrios, 1988). En el

caso específico del género *Colletotrichum*, se ha encontrado resistencia a varias especies como *C. musae* (Griffiee, 1973), *C. dematium* (Trivellas, 1988) y *C. gloeosporioides* (Spalding, 1982).

La resistencia cruzada a benzimidazoles ha sido también encontrada en un gran número de microorganismos patogénicos (Georgopoulos, 1982). Al respecto, De Waard (1990) considera que la resistencia cruzada entre todos los benzimidazoles parece ser una regla. Este fenómeno fue estudiado en *C. gloeosporioides* por Spalding (1982), quien informa haber encontrado resistencia al benomil, tiabendazol y al metiltiofanato individualmente, así como la existencia de resistencia cruzada entre dichos productos en aislamientos provenientes de frutos de mango.

Para la evaluación de resistencia de los hongos a benzimidazoles se han utilizado diversos métodos, como la medición del tubo germinativo (Trivellas, 1988) y el crecimiento de la colonia del hongo en medio de cultivo (Spalding, 1982).

1/ Recibido para publicación el 25 de mayo de 1994.  
\* Centro de Investigaciones en Protección de Cultivos, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.  
\*\* Centro de Investigaciones Agronómicas, Facultad de Agronomía, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

En Costa Rica, hasta el momento no se ha encontrado resistencia a benzimidazoles por parte del hongo causante de la antracnosis de la papaya. Sin embargo, se ha observado un aumento en la incidencia de esta enfermedad aún cuando los mecanismos de combate pre y poscosecha se mantienen constantes. Por esta razón se planteó la presente investigación, con el objetivo de determinar la existencia de resistencia a fungicidas benzimidazoles en *C. gloeosporioides* asociado con el cultivo de la papaya en Costa Rica.

## MATERIALES Y METODOS

Los estudios fueron llevados a cabo en el Laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigaciones en Protección de Cultivos, Universidad de Costa Rica. Se recolectó frutos de papaya con antracnosis en 10 diferentes localidades. Se obtuvieron cultivos puros de *C. gloeosporioides* en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA).

Los aislamientos obtenidos fueron catalogados en dos clases, como se muestra en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Identificación de los aislamientos de *C. gloeosporioides* recolectados para el ensayo.

Aislamientos silvestres		Aislamientos comerciales	
Código	Procedencia	Código	Procedencia
S1	Cañas, Guanacaste	C1	Turrubares, San José
S2	Cañas, Guanacaste	C2	Turrubares, San José
S3	Esparza, Puntarenas	C3	Corredores, Puntarenas
S4	Esparza, Puntarenas	C4	Puntarenas, Puntarenas
S5	Sarapiquí, Heredia	C5	Buenos Aires, Puntarenas

El término "silvestre" hace alusión a que los frutos muestreados provenían de plantaciones o árboles que nunca habían estado expuestos a aplicaciones de productos químicos y, por el contrario, el calificativo "comercial" significa que los frutos muestreados provenían de plantaciones expuestas continuamente a aplicaciones de productos fungicidas.

### Ensayo 1

Una vez que el cultivo cubrió todo el diámetro del plato de Petri, se prepararon suspensiones en agua destilada estéril de conidios de los aislamientos C1, C2, C4, S1, S2 y S4, las cuales se ajustaron a una concentración de  $10^8$  esporas/ml.

Se tomó 5  $\mu$ l de cada suspensión con ayuda de una micropipeta, y se colocó dicho volumen sobre un portaobjetos limpio y estéril; luego, se agregó 5  $\mu$ l de las soluciones fungicidas correspondientes, dejándolo reposar por 6 h en cámara húmeda, a temperatura ambiente.

Las soluciones fungicidas se realizaron utilizando tiabendazole (TBZ) (Mertect 45% FW, Merck Sharp & Dohme Corp.). Las concentraciones finales (después de añadir la suspensión de conidios) fueron 0, 0.1, 1.0, 10, 100  $\mu$ g/ml de TBZ.

Luego de transcurridas las 6 h de incubación se colocaron 5  $\mu$ l de lactofenol en cada placa con el fin de detener el crecimiento del hongo. En cada portaobjetos, y con ayuda de un micrómetro ocular, se evaluó la longitud promedio del tubo germinativo de 50 esporas escogidas al azar.

### Ensayo 2

Se evaluó la sensibilidad de los restantes 4 aislamientos de *C. gloeosporioides* utilizando 2 diferentes métodos: crecimiento radial y peso de las colonias.

Para el método de crecimiento radial se tomaron discos de 5 mm de diámetro de medio de cultivo con el hongo, a partir de las colonias puras y se pusieron a crecer en platos de Petri sobre PDA mezclado con tiabendazole a concentraciones de 0, 1, 10, 100, 1000  $\mu$ g/ml. Luego de 4 días de incubación a 25°C, se midió el diámetro de las colonias en cada tratamiento.

Con el método de peso de las colonias se utilizaron discos de papel celofán de aproximadamente 7 cm de diámetro, los cuales fueron esterilizados y colocados en platos de Petri sobre el medio de crecimiento con TBZ a 0, 1, 10, 100 y 1000  $\mu$ g/ml.

Posteriormente, discos de medio con el hongo fueron colocados sobre el papel celofán para luego incubar los platos por 4 días a 25°C. Tanto el papel celofán como los discos fueron pesados previamente.

Concluido el período de incubación, se retiró el disco de celofán junto con la colonia y fueron pesados. El peso de cada colonia se determinó por diferencia.

En cada uno de los ensayos se incluyeron 5 repeticiones de cada uno de los tratamientos. Los datos fueron analizados de acuerdo con un análisis de variancia y luego se calculó la concentración efectiva media ( $CE_{50}$ ) a partir de una regresión entre el logaritmo de la concentración del fungicida y

el "probit" de la respuesta (porcentaje de inhibición del crecimiento radial o porcentaje de reducción en el peso de la colonia).

**RESULTADOS Y DISCUSION**

En el ensayo 1 se presentaron diferencias significativas entre los aislamientos evaluados con respecto al desarrollo del tubo germinativo (Figura 1).

En los aislamientos comerciales se observó crecimiento del tubo germinativo a lo largo de un rango bastante amplio de dosis del producto. En contraste con lo anterior, los aislamientos silvestres mostraron mayor sensibilidad al tiabendazole, lo cual se reflejó por una reducción de la longitud del tubo germinativo (Figura 1). Al respecto, Mendoza (1990) menciona que los fungicidas benzimidazoles afectan negativamente la germinación de esporas y la elongación del tubo germinativo.

Los organismos provenientes de poblaciones que no habían estado expuestas a una gran presión de selección, por la aplicación constante de un determinado producto, mostraron una CE<sub>50</sub> más baja que aquellos que si lo habían estado (aislamientos comerciales) (Cuadro 2).

En el segundo ensayo también se presentaron diferencias significativas entre los aislamientos evaluados, tanto con el método de determinación del peso de la colonia como con el de crecimiento radial (Figuras 2 y 3). A este respecto, Davside, citado por Mendoza (1990) menciona que dentro de

Cuadro 2. Concentración efectiva media de tiabendazole para aislamientos silvestres y comerciales de *C. gloeosporioides*.

Aislamientos	CE <sub>50</sub> µg/ml
<b>Silvestres</b>	
S1	0,006
S3	0,63
S4	0,64
<b>Comerciales</b>	
C3	42,17
C4	16,98
C1	14,62

los efectos de la acción de los benzimidazoles la reducción del radio de crecimiento lineal es uno de los principales. Por otro lado, Sisler, citado por Erwin (1973), demostró que el tiabendazole y el MBC actúan inhibiendo no solo la multiplicación celular, sino también evitando el incremento en el peso seco y estimulando la respiración.

Al igual que en el caso anterior, el aislamiento silvestre proveniente de Cañas (S2) fue muy sensible al TBZ, con ambos métodos. Mientras tanto, los aislamientos comerciales mostraron crecimiento aún a dosis altas de dicho producto (Figura 3).

En el caso de las CE<sub>50</sub>, el aislamiento silvestre de Cañas S2 también presentó valores

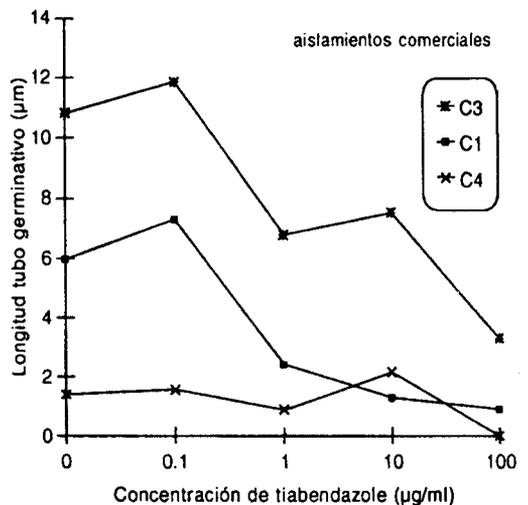
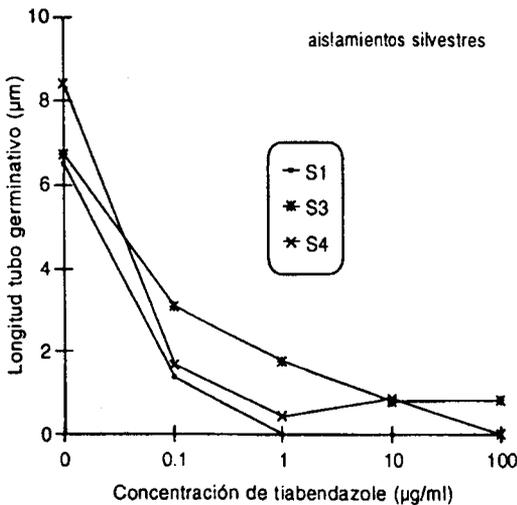


Fig. 1. Longitud promedio del tubo germinativo de conidios provenientes de aislamientos silvestres y comerciales de *C. gloeosporioides* a diferentes concentraciones de tiabendazole.

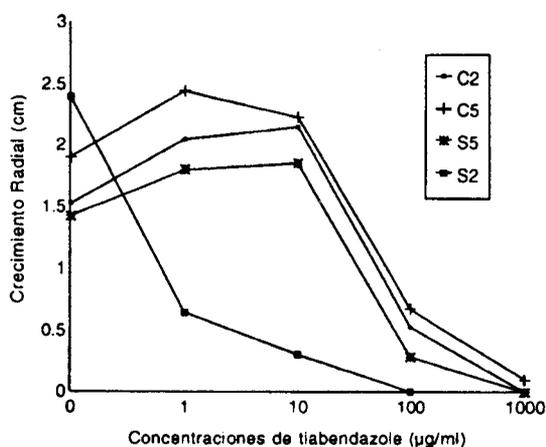


Fig. 2. Crecimiento radial de aislamientos de origen comercial (C) y silvestres (S) de *Colletotrichum gloeosporioides* bajo diferentes concentraciones de tiabendazole.

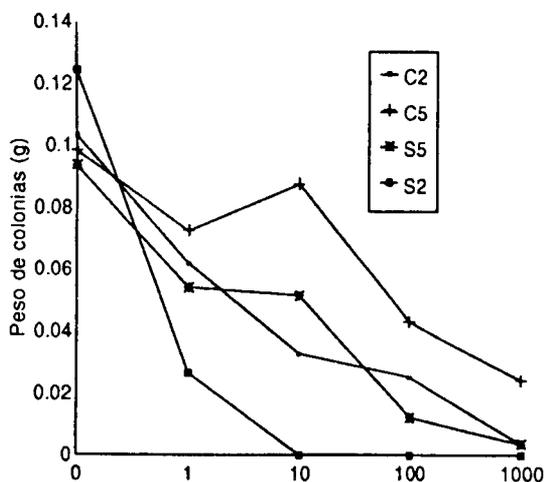


Fig. 3. Peso promedio de colonias de aislamientos comerciales (C) y silvestres (S) de *Colletotrichum gloeosporioides* obtenidas de medios con diferentes concentraciones de tiabendazole.

bastante bajos en contraste con los altos valores mostrados por los aislamientos de origen comercial (Cuadro 3).

No obstante, con ambas metodologías se presentó un caso particular en el que un aislamiento de aparente origen silvestre, S5 de Sarapiquí, mostró un comportamiento bastante similar a los

Cuadro 3. Concentración efectiva media para aislamientos silvestres y comerciales de *C. gloeosporioides*.

Aislamientos	CE <sub>50</sub> (µg/ml)	
	Crecimiento radial	Peso de la colonia
<b>Silvestres</b>		
S2	3,31	0,06
S5	84,14	19,95
<b>Comerciales</b>		
C2	92,5	16,22
C5	312,6	794,0

aislamientos comerciales (Figuras 2 y 3). Posiblemente, la cercanía de plantaciones comerciales de papaya facilita la diseminación de poblaciones menos sensibles hasta estos sitios, provocando infecciones. Es importante señalar que este fue el único aislamiento proveniente de la zona atlántica considerado en este estudio. En dicha zona, por su alta pluviosidad, el uso de fungicidas en papaya, particularmente benzimidazoles, es muy intensivo. Al respecto, 2 agricultores consultados aplicaban benomil semanalmente en su plantación.

Los benzimidazoles presentan un mecanismo de acción en el que se relacionan 1 ó 2 efectos distintos, es decir, la inhibición de la formación del huso acromático durante la profase, impidiendo la culminación del proceso de la mitosis y además, la interferencia con la síntesis de ácidos nucleicos. Esta acción inhibitoria es muy específica para ciertos tipos de hongos. Esta característica de especificidad es señalada como la causa de la generación de resistencia por el uso frecuente de este tipo de productos (Albornoz, 1991; Mendoza, 1990).

Existe gran cantidad de evidencias, tanto bioquímicas como genéticas, que señalan que el tiofanato, el metil tiofanato, el benomil y el tiabendazole poseen el mismo mecanismo de acción (Mendoza, 1990). Esto sugiere que el tipo de resistencia que se presenta en este caso es la llamada resistencia cruzada, ya que a través del uso continuo de un determinado producto (benomil) se genera resistencia a todos aquellos fungicidas que posean un mecanismo de acción similar al primero (los demás benzimidazoles).

Es pertinente señalar la existencia de importantes diferencias en la determinación de la sensibilidad de los hongos evaluados con diferentes métodos. Lo anterior sugiere la necesidad de

uniformar la metodología a utilizar en este tipo de investigaciones con el fin de obtener parámetros confiables y comunes para dichas evaluaciones.

### CONCLUSIONES

Los resultados de esta investigación indican que existe una marcada reducción en la sensibilidad al tiabendazole en aislamientos de *C. gloeosporioides* provenientes de plantaciones comerciales de papaya donde el uso de benomil ha sido intensivo.

Sin embargo, para confirmar en forma concluyente la existencia de resistencia sería recomendable evaluar una mayor cantidad de aislamientos del hongo, con el fin de tener una muestra con mayor representatividad de la población. Además, deben realizarse evaluaciones que permitan establecer la precisión y exactitud de los diferentes métodos utilizados en la determinación del grado de sensibilidad de los microorganismos ante los productos químicos, con el fin de uniformar los ensayos y establecer parámetros comunes de comparación.

Los resultados también indican la existencia de resistencia cruzada a los benzimidazoles por parte de aislamientos de *C. gloeosporioides* provenientes de frutos de papaya. Esta situación sugiere la necesidad de revisar las actuales prácticas de combate químico de antracnosis en papaya, y evaluar la factibilidad de sustituir los benzimidazoles por fungicidas con otro modo de acción, en zonas donde se presente resistencia.

### RESUMEN

Se aisló *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de papaya de plantaciones asperjadas con benomil (aislamientos comerciales) y de huertos caseros sin uso de fungicidas (aislamientos "silvestres"). Se midió la elongación del tubo germinativo de 3 aislamientos comerciales y 3 silvestres en agua con tiabendazole (TBZ). La  $CE_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) de TBZ fue en promedio de 0,23 para los aislamientos silvestres, y de 24,26 para los comerciales. Se midió la reducción en el crecimiento radial (CR) y en el peso de las colonias (PC) de 2 aislamientos silvestres y 2 comerciales, en PDA con

TBZ. Los valores promedio de  $CE_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) fueron 43,75 y 10,00 para los aislamientos silvestres y 202,55 y 405,11 para los comerciales, para CR y PC, respectivamente. La menor sensibilidad al TBZ en los aislamientos comerciales indica la selección de cepas de *C. gloeosporioides* resistentes a benzimidazoles, que ha ocurrido debido al uso continuo de fungicidas de este grupo en el cultivo de la papaya en Costa Rica.

### LITERATURA CITADA

- AGRIOS, G. 1988. Plant pathology. 3 ed. California, E.U.A., Academic Press. p. 225-226.
- ALBORNOZ, R. 1991. Grupos importantes de fungicidas usados en Colombia y su mecanismo de acción. Colombia, División Agropecuaria de Hoechst S.A. 19 p.
- ARAUZ, L.F.; MORA, D. 1983. Evaluación preliminar de los problemas poscosecha en seis frutas tropicales de Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 7:43-53.
- DE WAARD, M.A. 1990. Fungicidas. In *Phytopharmacy Course*. Ed. by M. A. de Waard, J; Bakker, J. H. Koe-man and J. J. Van Rensen. Wageningen, The Netherlands, Wageningen Agricultural University. 121 p.
- ERWIN, D. C. 1973. Systemic fungicides: disease control, translocation and mode of action. *Ann. Rev. Phytopathology* 11: 389-422.
- GEORGOPOULOS, S.G. 1982. Cross resistance. In *Fungicide resistance in crop protection*. Ed. by J. Dekker and S.G. Georgopoulos.
- WAGENINGEN. The Netherlands, Centre for Agricultura Publishing and Documentation. p. 53-59.
- GRIFFEE, P.J. 1973. Resistance to benomyl and related fungicides in *Colletotrichum musae*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 60(3): 433-439.
- MENDOZA, C. 1990. Fungicidas sistémicos y su modo de acción. Chapingo, México, Universidad Autónoma de Chapingo. 91 p.
- SPALDING, D. 1982. Resistance of mango pathogens to fungicides used for control of post-harvest diseases. *Plant Disease* 66:1185-1186.
- TRIVELLAS, A.E. 1988. Benzimidazole-resistance monitoring techniques and the use of monitoring studies to guide benomyl marketing. In Delp, C.E. (ed.) *Fungicide resistance in North America*. APS Press, St. Paul, Minnesota, E.U.A. p. 28-30.