

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

**Evaluación in vitro de fungicidas para el control de *Monilinia spp.* aislada de duraznos (*Prunus persica*) de diferentes localidades de la sierra del Ecuador.**

Estefanía Borja

Tesis de grado presentada como requisito para la obtención del título de Ingeniería en  
Procesos Biotecnológicos.

Quito, Mayo del 2011

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS**

**Evaluación in vitro de fungicidas para el control de *Monilinia spp* aislada de duraznos (*Prunus persica*) de diferentes localidades de la sierra del Ecuador.**

**Estefanía Borja**

Venancio Arahana. Ph.D

Directora de Tesis y Miembro del Comité de Tesis .....

María de Lourdes Torres. Ph. D

Miembro del Comité de Tesis .....

José Tobar. M. Sc.

Miembro del Comité de Tesis .....

Decanato de Ciencias Biológicas y Ambientales

Stella de la Torre, Ph.D

Decana de Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales .....

Quito, Mayo del 2011

© Derecho de autor

Estefanía Borja

2011

**Agradecimientos:**

A mis padres, esposo e hijo por su apoyo incondicional, y su cariño brindado durante todos estos años.

A Venancio Arahana, Lourdes Torres y José Tobar por sus enseñanzas, por su apoyo, y por su ayuda durante la realización de este proyecto.

**Resumen:**

Los cultivos de duraznos son muy susceptibles a ataques por diversos fitopatógenos. La podredumbre parda producida por el hongo *Monilinia*, es una de las principales enfermedades que afectan al cultivo de duraznero en la sierra ecuatoriana. El objetivo de este trabajo fue evaluar la eficiencia de fungicidas para controlar la podredumbre parda, analizando a qué concentración de fungicida, el 50% de las esporas del hongo dejaban de germinar ( $EC_{50}$ ). Se usó duraznos infectados provenientes de cuatro provincias: Imbabura, Carchi, Pichincha y Tungurahua, pero después de hacer varios análisis morfológicos y moleculares solo se utilizó muestras procedentes de tres provincias (Imbabura, Carchi y Tungurahua). En el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la USFQ, se realizaron las pruebas de germinación in vitro de esporas del hongo. En total se probaron cinco fungicidas comerciales (Cloratonil (Bravo®), Tiabenzanol (Mertect®), Fludioxinil y Ciprodinil (Switch®), Propiconazole (Tilt®) y Iprodione (Rovral®)), por su efecto en la germinación de esporas de *Monilinia*. En cada fungicida se sembró los tres aislamientos de *Monilinia*. Los tres aislamientos de *Monilinia spp.*, al estar en contacto con el tiabenzanol, tuvieron aproximadamente un  $EC_{50} < 1,19 \times 10^{-5} \mu\text{g/ml}$ , seguido por el principio activo Clorotonil con un  $EC_{50} < 1,14 \times 10^{-5} \mu\text{g/ml}$ , luego por el Propiconazole con un  $EC_{50} < 1,13 \times 10^{-5} \mu\text{g/ml}$ , y por el Fludioxinil y Ciprodinil con un  $EC_{50} < 2,8 \times 10^{-2} \mu\text{g/ml}$ . El principio activo iprodione fue el menos efectivo con un  $EC_{50} < 4 \times 10^{-2} \mu\text{g/ml}$ . En este estudio preliminar, se pudo determinar que los cinco fungicidas utilizados para este experimento resultaron ser muy efectivos para el control del fitopatógeno analizado. Con esto se controló efectivamente el crecimiento *Monilinia*, siendo este trabajo una base para futuras investigaciones, y de esta manera evitar su propagación en los cultivos.

**Abstract:**

Peach cultures are susceptible for being infected by a wide range of phytopathogens. The Brown rot produced by the fungi *Monilinia*, is one of the principal diseases which affect the peach culture in the Ecuadorian Highlands. The objective of this work was to evaluate the effective concentration at which 50% of spore germination of *Monilinia* was inhibited ( $EC_{50}$ ). Peaches from four provinces: Imbabura, Carchi, Pichincha and Tungurahua were collected, but after making several morphological and molecular analysis only samples of Imbabura, Carchi and Tungurahua were analyzed. All in vitro fungicide germination tests were conducted at the Biotechnology Laboratory at USFQ. Five commercial fungicides (Chloratonil (Bravo®), Thiabendazol (Mertect®), Fludioxinil y Ciprodinil (Switch®), Propiconazole (Tilt®) y Iprodione (Rovral®) were tested for their effects on germination of *Monilinia* spores. Three isolates of *Monilinia* were planted in each fungicide to perform the analysis. This preliminary results, determined that the three isolates of *Monilinia* in contact with the Thiabendazol has approximately  $EC_{50} < 1,19 \times 10^{-5} \mu\text{g/ml}$ , followed by Chloratonil with a  $EC_{50} < 1,14 \times 10^{-5} \mu\text{g/ml}$ , then by the Propiconazole with a  $EC_{50} < 1,13 \times 10^{-5} \mu\text{g/ml}$ , and the Fludioxinil and Ciprodinil with a  $EC_{50} < 2,8 \times 10^{-2} \mu\text{g/ml}$ . The active ingredient Iprodione was the least effective with an  $EC_{50}$  less than  $4 \times 10^{-2} \mu\text{g/ml}$ . In this preliminary study, it determined that the five fungicides were very effective in controlling the phytopathogen. With these tests germination of *Monilinia* was controlled, allowing this study to be the basis for future investigations and a strong basis for preventing the germination of the fungus.

## Tabla de contenido

Tabla de Contenido.....	vii
1. Introducción .....	1
1.1. Características morfológicas del durazno .....	1
1.2. Origen del durazno y su dispersión mundial .....	1
1.2.1. Historia del durazno en el Ecuador.....	1
1.2.2. Producción de durazno a nivel mundial y en el Ecuador .....	2
1.3. Enfermedades del durazno .....	2
1.3.1. Enfermedades bacterianas.....	2
1.3.2. Enfermedades virales .....	3
1.3.3. Enfermedades fungoides.....	3
1.4. Podredumbre parda .....	4
1.4.1. <i>Monilinia</i> .....	4
1.4.2. Síntomas .....	5
1.4.3. Ciclo de la enfermedad.....	6
1.4.4. Condiciones para el desarrollo de la enfermedad.....	6
1.4.5. Control de la enfermedad .....	7
1.5. Caracterización de <i>Monilinia</i> en medios de cultivo.....	8
1.5.1. Cultivo monospórico .....	9
1.6. Fungicidas .....	9
1.6.1. Fungicidas para el control de <i>Monilinia</i> .....	9
1.6.2. Resistencia de los hongos a los fungicidas.....	11
1.6.3. Origen de la resistencia.....	12
2. Objetivos .....	13
2.3. Objetivo general.....	13
2.4. Objetivos específicos .....	13
3. Justificación.....	13
4. Área de estudio.....	14
5. Materiales.....	15
5.1. Obtención de muestras.....	15
5.2. Preparación de medio de PDA para hongo.....	15

5.3.	Preparación del medio Jugo V8+MA para hongo .....	15
5.4.	Aislamiento del hongo del durazno y cultivando in vitro.....	15
5.5.	Elaboración de cámaras húmedas .....	15
5.6.	Observación de esporas .....	16
5.7.	Establecimiento de cultivos monospóricos.....	16
5.8.	Preparación de medios Agar JugoV8+MA + fungicidas .....	16
5.9.	Conteo de números de esporas.....	16
5.10.	Siembra de los aislamientos del hongo en los medios con fungicidas.....	17
5.11.	Análisis estadístico .....	17
6.	Metodología .....	17
6.1.	Obtención de muestras.....	17
6.2.	Preparación del medio PDA para aislamiento del hongo .....	17
6.3.	Preparación de medio Jugo V8+MA para inducir esporulación del hongo .....	18
6.4.	Aislamiento del hongo a partir de frutos infectados .....	18
6.5.	Elaboración de cámaras húmedas .....	19
6.6.	Identificación de aislados mediante la observación de esporas .....	19
6.7.	Cultivo monospórico.....	19
6.8.	Preparación de medio Agar JugoV8+MA + fungicidas.....	20
6.9.	Conteo de esporas .....	20
6.10.	Siembra de los aislamientos del hongo en los medios con fungicidas.....	21
6.11.	Análisis estadístico.....	22
7.	Resultados .....	22
7.1.	Colección de muestras, aislamiento e identificación de <i>Monilinia</i> .....	22
7.2.	Determinación del EC <sub>50</sub> de los cinco fungicidas .....	23
8.	Discusión.....	25
8.1.	Colección de duraznos y aislamiento de <i>Monilinia sp.</i> .....	25
8.2.	Inducción de esporulación de <i>Monilinia sp.</i> .....	26
8.3.	Determinación del EC <sub>50</sub> de los cinco fungicidas .....	27
9.	Conclusiones .....	30
10.	Recomendaciones .....	31
11.	Bibliografía:.....	31



12.	Tablas .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
13.	Figuras .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
14.	Anexos .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>

## **1. Introducción**

### **1.1. Características morfológicas del durazno**

El nombre científico del durazno es *Prunus pérsica*. Posee un fruto globoso de 5 a 7,5 cm de diámetro, amarillento con tonalidades rojizas. Tiene un hueso ahoyado, muy duro y con hendiduras muy profundas. El árbol del duraznero tiene una altura moderada y posee raíces profundas esto va a depender de la variedad. Se han descrito como 300 variedades y se les ha agrupado en cinco razas. El cultivo del duraznero se lo realiza en zonas altas, entre altitudes que van desde los 2000 a 3000 m.s.n.m, pero en lugares donde existen las cuatro estaciones se los puede cultivar hasta el nivel del mar. Crece en climas templados o abrigados ya que necesita de calor y de abundante luz para su maduración. Para su óptimo crecimiento necesita de suelos ligeros, arenosos y calcáreos (INIAP, 1992).

### **1.2. Origen del durazno y su dispersión mundial**

Se dice que el árbol de durazno se originó en China Septentrional, aunque algunos autores sugieren que el origen fue en Persia porque anteriormente se lo conocía como Manzana Persa. En China, los primeros árboles de durazno criollos producían frutas pequeñas y amargas, pero los agricultores aprendieron rápidamente a cultivar los árboles, dando como resultado una fruta más grande y jugosa. Se cree que el durazno fue llevado en caravanas desde China a Persia y de ahí se dispersó hacia Europa. A América del Sur llegó en el siglo XVI traído por los españoles y posteriormente a Norte América traído por los ingleses, chinos y europeos. Desde ahí se cultiva duraznos por toda América (Naranjo O: Sarmiento S., 1997).

#### **1.2.1. Historia del durazno en el Ecuador**

Entre las frutas traídas por los españoles a la región interandina del Ecuador, está el melocotón o durazno. Ciertos autores hacen referencia de la existencia de plantaciones de durazno en el Ecuador desde hace aproximadamente 100 años. En los años 1975 y 1976 el Ministerio de Agricultura a través del Programa de Fomento Agrícola, introdujo la variedad "Fortuna" y otras tempraneras de durazno. Posteriormente, el Programa de Fruticultura del INIAP, en colaboración con la Cooperación Técnica Suiza (COTESU), comenzaron a realizar trabajos de investigación en frutales de clima templado, en las

Granjas de Píllaro y Tumbaco en los años 1981 y 1983, respectivamente, especialmente direccionados para la solución de problemas fitosanitarios y de productividad. Para el año de 1985 se seleccionó algunas variedades de durazno que provenían de la Universidad de Florida y que se adaptaron muy bien al Ecuador. Los primeros cultivos de durazno en el Ecuador se reportaron en la provincia de Tungurahua por el requerimiento de “horas frío”, temperatura anual, pluviosidad y suelos (MAGAP, 2010).

Hace 80 años el durazno que provenía de Ambato era el de mejor calidad, ya que el fruto llegaba a tener un tamaño de 7,5cm de longitud y su sabor era mejor que en otras localidades. Esta fruta crece desde 1500 a 3000 m.s.n.m. (Popenoe, 1924). Desde hace 40 años el cultivo del duraznero fue creciendo y ahora se lo siembra en varias provincias del Ecuador. Actualmente se lo siembra en las provincias de Tungurahua, Pichincha, Azuay, Imbabura, Chimborazo y Carchi (MAGAP, 2010) (Ver Anexo 1).

### **1.2.2. Producción de durazno a nivel mundial y en el Ecuador**

La producción mundial de duraznos alcanza aproximadamente 1,3 millones de TM anuales. Los principales países productores son China, Italia, Estados Unidos, España. Los mayores consumidores son los Estados Unidos, México y Alemania. Durante la última década la producción de durazno ha tenido un incremento del 9%. (MAGAP, 2010).

En el Ecuador se cultiva aproximadamente 650 hectáreas, y solo tiene una producción estimada de 3.125 TM al año. Ecuador al producir tan poca cantidad de durazno no llega a exportar. Al contrario se registra varias importaciones desde Chile, Perú y Estados Unidos. El promedio anual de estas importaciones es de 4.140TM y con un valor de CIF promedio de USD 3.280,00 (MAGAP, 2010).

### **1.3. Enfermedades del durazno**

A los árboles de durazno le pueden atacar bacterias, virus y hongos.

#### **1.3.1. Enfermedades bacterianas**

En el Ecuador solo se ha registrado la presencia de una bacteria que ataca a los árboles de durazno, provocando que disminuya la productividad. A esta bacteria se la conoce como Mancha Bacteriana (*Xanthomonas campestris pv. pruni*). Ésta se caracteriza

por producir una serie de manchas circulares que se oscurecen a medida que se extiende desde los tallos hasta los frutos. Esta enfermedad aparece cuando el fruto del durazno comienza a brotar de 3 a 5 semanas después de la caída de los pétalos y se la puede observar en las ramitas que comienzan a morir por la zona apical, quedando con las puntas negras y muchas veces se los confunde con daños hechos por insectos. Como medidas de control hay que evitar utilizar variedades muy susceptibles a contraer la enfermedad, prevenir la defoliación de las plantas, utilizar cortinas rompe vientos, podar y quemar las ramas que presenten algún chancro<sup>1</sup> (Mitidieri, 2006)

### **1.3.2. Enfermedades virales**

En el Ecuador no se ha registrado pérdidas económicas por la presencia de virus en los cultivos del duraznero pero se puede citar algunos virus que han afectado varios cultivos en otras partes de América Latina como:

- PNRSV (*Prunus Necrotic Ringspot Virus*) Produce la muerte de yemas de las flores y del tallo. El síntoma se presenta como anillos cloróticos y se los ve en las hojas jóvenes.
- PDV (*Prune Dwarf Virus*) o virus del enanismo. Causante del enanismo del durazno, produce acortamiento de los entrenudos y muerte de las yemas (Mitidieri, 2006).

### **1.3.3. Enfermedades fungoides**

Son varias las enfermedades causadas por hongos y que afectan gravemente el cultivo de duraznero. Las enfermedades más importantes en el país son: la cloaca (*Taphrina deformans*), el oídio (*Spaeroteca pannosa*), el tiro de munición (*Clasterosporium carpofilum*), podredumbre parda (*Monilinia*), la gomosis (*Phytophthora*), la roya (*Tranzchelia pruni-spinoseae*) y la podredumbre gris (*B. cinerea*) (Ver Anexo 2). Claro que existen otras enfermedades que afectan al durazno pero éstas son las que mayor pérdida causan al agricultor, perdiendo hasta el 80% de su producto tanto en la cosecha como en las plantaciones.

---

<sup>1</sup> Son heridas en las ramas provocadas por un hongo, también se los conoce como cancro.

## 1.4. Podredumbre parda

El Brown rot o podredumbre parda es una de las enfermedades más destructivas que tienen que afrontar los productores de árboles frutales. Se presenta en todas los cultivos de frutas con hueso, durante la floración y en la maduración de los frutos. Esta enfermedad afecta a los duraznos, cerezas, ciruelas, albaricoques y almendras. Los daños ocasionados por la podredumbre parda dan como resultado la descomposición de la fruta en el árbol, esto puede suceder cuando se está transportando la fruta o cuando se comercializa. Cuando existen infecciones graves en los cultivos, el 50% al 70% de la fruta se puede podrir en el huerto y el resto antes de que llegue al mercado, teniendo una pérdida del 80% del producto (Agrios, 2005).

### 1.4.1. *Monilinia*

La podredumbre parda o brown rot es una enfermedad provocada por el hongo *Monilinia sp.* En 1928, Honey estableció el género *Monilinia* para las especies *moniloides* previamente colocadas en la familia *Sclerotiniaceae* (Whetzel 1945). El nombre genérico para la fase conodial es *Monilia*. Este hongo pertenece a la subdivisión ascomycotina. Produce dos tipos de esporas: Las ascosporas<sup>2</sup> de origen sexual, contenidas en cuerpos fructíferos denominados apotecios<sup>3</sup> y las conidias de origen asexual (Agrios, 2005).

El género *Monilinia* tiene tres especies que provocan la podredumbre morena. Estas especies son *M. fructigena* (Aderh. & Ruhl), *M. laxa* (Aderh & Ruhl) y *M. fructicola* (Wint). Las principales características para distinguir las tres especies son: tamaño de conidias, modo de ramificación, y morfologías. *M. laxa* es la que más causa la enfermedad en las ramas y en las flores. *M. fructigena* causa solo un 10 a 15% de la enfermedad. *M. fructicola* es capaz de atacar tanto flores, ramas, y frutos. En varias partes del mundo dos de las tres especies coexisten. *M. laxa* y *M. fructigena* coexisten en Europa y Asia. *M. fructicola* y *M. laxa* coexisten en Latino América, América del Norte y Australia (INTA, 2003).

---

<sup>2</sup> Son esporas contenidas en una asca. Las ascas son una estructura característica de los *Ascomycetes*, es un saco de paredes finas que contiene esporas. Una asca contiene 8 ascosporas.

<sup>3</sup> Los apotecios son estructura en forma de copa ancha, en cuyo interior se encuentran, apretadas entre sí, numerosas ascas de forma cilíndrica o claviformes.

La identificación de las especies por la morfología conidial es muy difícil. Hay características como el color de la colonia, el crecimiento, la esporulación, las dimensiones de las conidias, las ascas y los apotecios que ayudan a identificarlos (Agrios, 2005) (Ver Anexo 3).

#### **1.4.2. Síntomas**

Los primeros síntomas de la podredumbre parda aparecen en las flores y en el tallo. En las flores se observa un marchitamiento o atizonamiento, pueden ser afectados los estambres, pistilos, pétalos o sépalos, donde se presentan pequeñas manchas marrones que pueden expandirse por toda la flor y tornarse atizonada. El hongo puede avanzar desde la flor por el pedúnculo hacia la rama produciendo canchales. Los canchales son de color oscuro y en condiciones de alta humedad se observa una secreción gomosa sobre las ramas. El cancro afecta cualquier tipo de rama y produce la muerte de ésta, pero hay ramas más fuertes que el hongo no alcanza a matarlas y permanece en su sitio rodeada de un tejido calloso (Mondino, 2002).

Cuando los frutos están entrando a la etapa de madurez, también pueden ser atacados por la podredumbre parda, primero el hongo los ataca superficialmente, luego provoca una pequeña mancha marrón en su superficie y si hay las condiciones adecuadas la enfermedad avanza rápidamente contaminando todo el cultivo. Sobre esta podredumbre se aprecia la esporulación del hongo que aparece de color grisáceo y polvoriento. En climas húmedos y cuando todo el fruto está infectado éste comienza a arrugarse, se seca y se forma una momificación del fruto. Si estas momias permanecen mucho tiempo en los árboles pueden contaminar a otros duraznos o puede aferrarse a las ramas. También estas frutas momificadas pueden caer al suelo y el hongo puede permanecer en estado latente por varios años y contaminar a varios cultivos (Ver Anexos 4) (INTA, 2003).

Incluso puede haber contaminación con este hongo en la cosecha, la fruta infectada se pudre rápidamente contagiando a los frutos vecinos, destruyendo totalmente la cosecha durante el transporte, almacenamiento y comercialización (INTA, 2003).

### **1.4.3. Ciclo de la enfermedad**

El ciclo de la enfermedad es igual para las tres especies. Incluye una fase sexual y otra asexual. La fase sexual ocurre en lugares de cuatro estaciones. En invierno los frutos momificados que están en los árboles caen al suelo y el hongo entra en una etapa de hibernación hasta que las condiciones sean las apropiadas para su crecimiento. Posteriormente, en primavera comienza a producir micelio. En otoño las formas iniciales de hifas comienzan a crecer hasta formar los apotecios. Cuando los árboles están floreciendo y las hojas comienzan a desplegarse, los apotecios producen ascosporas maduras. Al existir corrientes de aire muy fuertes, las ascas se rompen y se liberan las ascosporas, que son arrastradas por el viento y se inicia la infección por invasión de la parte inferior de la superficie foliar del durazno o también pueden afectar a las flores (American Phytopathological, 2002) (Ver Anexo 4).

La fase asexual en cambio corresponde la producción de conidias, cuando existe bastante humedad y la temperatura está entre los 20 a 25°C, se comienza a producir una mayor cantidad de esporas en los frutos momificados. La temperatura óptima para la infección de la flor es de 25°C. Las conidias pueden ser dispersadas por el salpicado de la lluvia o el viento. Los insectos también juegan un rol importante en la diseminación de las conidias llevándoles de un fruto a otro y produciendo heridas que favorecen la penetración del hongo. También se ha visto que se llega a contaminar el fruto y la flor por estomas y directamente a través de la cutícula. Al principio el hongo crece intercelularmente y secreta algunas enzimas que causan el oscurecimiento de los tejidos del fruto. Luego el hongo invade el fruto muy rápidamente y comienza a producir gran cantidad de conidias. En pocos días todo el durazno está cubierto por el hongo, días después se seca, se arruga y forma la momia. Las momias pueden quedarse colgadas en los árboles y contaminar a otros frutos o pueden caerse al piso; las momias que caen al piso no son afectados por los microorganismos y el hongo puede persistir así por 2 años (Agrios, 2005) (Ver Anexo 4).

### **1.4.4. Condiciones para el desarrollo de la enfermedad**

Como ya se ha mencionado anteriormente el hongo tiene varias formas para causar la podredumbre morena. Hay dos tipos de inóculos, el uno se encuentra en las frutas momificadas colgadas en los árboles y la otra en las frutas momificadas que se encuentran

en el suelo, que forman los apotecios. Para que se desarrolle la enfermedad se necesita de varias condiciones:

a) Condiciones de susceptibilidad de la planta:

El periodo de mayor susceptibilidad, es cuando el árbol está floreciendo y cuando el fruto está madurando. En la flor los órganos más susceptibles son los estambres y los estigmas. Cuando el fruto está cambiando del color verde al amarillo y está aumentando de tamaño la susceptibilidad a contagiarse es mayor. Hasta ahora no se ha visto que los duraznos inmaduros sean invadidos por el hongo. La presencia de heridas en los frutos hace que el fruto se vuelva más susceptible (INTA, 2007).

b) Condiciones ambientales:

El factor más importante para que ocurra la infección es la humedad. Se ha encontrado que si la humedad es alta (100%) todos los órganos florales son atacados por el hongo, mientras si la humedad es baja (70-80%) solo existe infección en los estigmas. La temperatura óptima para que ocurra la infección tanto en flores como en frutos ronda los 20-25°C. Las temperaturas influyen en el tiempo necesario para que ocurra la infección. Se ha determinado que a 25°C el fruto o flor será afectado en 5 horas, pero si la temperatura es de 10°C el hongo tomará 18 horas para causar la infección. Los síntomas en frutos maduros aparecen a los dos días luego de la inoculación a una temperatura de 23°C (Mondino, 2002).

#### **1.4.5. Control de la enfermedad**

Para el control de la podredumbre morena o brown rot se recomienda hacer un control de rutina y control químico.

a) Control de rutina:

Para reducir la incidencia de la podredumbre morena es muy importante seguir una rutina en los cultivos de durazneros. Se debe realizar algunos chequeos para poder eliminar cualquier tipo de contagio. Una de las prácticas culturales es eliminar tanto el inóculo primario como el secundario, esto significa que se debe eliminar del piso y de las ramas todas las momias que se encuentren en los cultivos. Los agricultores tienen que saber que



sus cultivos son más propensos a ser infectados por *Monilinia* en los periodos de floración y maduración. También se recomienda eliminar ramas que tengan el cancro y flores atizonadas. Se debe hacer un control de insectos ya que esto reducirá las pequeñas lesiones que se pueden encontrar en los frutos maduros. Por último se debe hacer un control nutricional porque si al cultivo le falta nitrógeno y potasio esto va a favorecerá la aparición de la enfermedad (Mitidieri, 2006).

b) Control químico:

Los tratamientos fúngicos preventivos proporcionan el mejor control contra la marchitez de la flor y de la podredumbre de la fruta. Sin tratamientos postcosecha la fruta no se puede almacenar porque la temperatura de la bodega puede incidir para que la enfermedad se presente. El uso adecuado de fungicidas con cierta actividad sistémica protege a las flores y al fruto, reduciendo la cantidad de esporulación formada sobre el tejido infectado y disminuyendo los sitios donde puede encontrarse el inóculo (Mondino, 2002).

Los fungicidas más utilizados y disponibles para el control de *Monilinia* son los dicarboximidias (iprodiona y vinclozolina), benzimidazoles (benomil y tiafonato metilo), triforina, clortalonil, miclobutanil, fenbuconazol y propiconazol. Otros fungicidas utilizados son compuestos de cobre, azufre y captan. La selección de un fungicida debe ser una mezcla de varios fungicidas, porque en un cultivo puede haber contaminación con otros hongos a mas de *Monilinia* (Mondino, 2002). El momento para aplicar el fungicida es crítico para el control de la marchitez de la flor. Los fungicidas tienen que ser aplicados cuando las partes susceptibles de la flor están expuestas, antes y después de la llegada de los periodos de temperatura y de humedad (Ogawa, 2000).

### **1.5. Caracterización de *Monilinia* en medios de cultivo**

In vitro se utiliza medios de cultivo que pueden ser líquidos y sólidos, para inducir el desarrollo de microorganismos, hongos y plantas. Los medios utilizados para hongos deben ser ricos en nutrientes, para asegurar su crecimiento y reproducción. A los medios de cultivo se les puede añadir antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes. Los más utilizados para el cultivo de hongos son: Agar agua, PDA (Potato Dextrosa Agar), Sabouraud, Agar Jugo V8+MA, y Agar harina de avena (Cañedo y Ames, 2004). Mediante

cultivos in vitro se ha llegado a identificar las tres especies de *Monilinia*, por el color del micelio, el tamaño de las conidias y las ascosporas (Ver Anexo 3) (Cañedo y Ames, 2004).

### **1.5.1. Cultivo monospórico**

Los cultivos monospóricos consisten en lograr que una sola espora forme micelio y esporule. Al tener cultivos monospóricos se garantiza la autenticidad y la pureza de la muestra. Los aislamientos monospóricos pueden ser por colonia o por punta de hifa (Cañedo y Ames, 2004).

## **1.6. Fungicidas**

Los fungicidas son sustancias químicas que se emplean para impedir el crecimiento de o para la eliminación de hongos y mohos. Los fungicidas son usados en la industria, la agricultura, en el hogar y en el jardín; para varios propósitos como son la protección de semillas, flores y frutos. Los fungicidas tienen la capacidad de penetrar en el tejido vegetal, por eso son inocuos para las plantas y atacan específicamente al hongo (EPA, 2005).

Los fungicidas han sido utilizados en los cultivos para el control de enfermedades desde hace 200 años. Todos los fungicidas se caracterizan por tener múltiples sitios de acción. En los años 60 y 70 surgió una nueva serie de productos como: benzimidazoles, dicarboximidias, acilalanidas e inhibidores de la biosíntesis del ergosterol que resultaron ser más eficientes para controlar a diversos fitopatógenos (Mondino, 2002).

### **1.6.1. Fungicidas para el control de *Monilinia***

Hay dos tipos de fungicidas para el control de enfermedades, los de contacto y los sistémicos. Los fungicidas de contacto son los que actúan en sitios múltiples, ya que interfieren con los procesos metabólicos centrales del hongo. Además la mayoría de estos fungicidas afectan la producción de ATP, e inhiben la respiración. También se sabe que el fungicida no es capaz de penetrar en el interior del vegetal, solo le brinda una protección. Estos controlan hongos epífitos, es decir de desarrollo externo, como por ejemplo el Oidio (CASAFE, 2008). En cambio los fungicidas sistémicos actúan inhibiendo el desarrollo del hongo, después de iniciada la infección. Son los fungicidas que atraviesan la cutícula y traslocan vía floema hacia otros puntos distantes de la planta. Estos controlan hongos

endófitos, o de crecimiento interno. Estos fungicidas son como una especie de vacuna para la planta y comprenden un grupo muy reducido de fungicidas (CASAFE, 2008).

Los fungicidas más utilizados para controlar *Monilinia* son el captan, dicarboximidas, benzimidazoles e IBE. En el Ecuador se utiliza otros principios activos como el Fludioxinil Ciprodinil, Tiabenzanol, Iprodione, Propiconazole y Carbendazin. En este estudio se analizó la eficiencia de cinco distintos principios activos como: clorotalonil, iprodione, fludioxinil, ciprodinil, tiabenzanol y propiconazole.

- **Clorotalonil:** Este principio activo se lo encuentra en los siguientes fungicidas: Nopocide N-96, Daconil, Chlorothalonil Technical Termil, Groutcide, Mold-Ex, Brovomil. Es un policlorado aromático derivado del ácido cloroisoftálico con actividad fungicida de amplio espectro, de aplicación foliar, no sistémico, con limitada capacidad de traslocación local, actividad por contacto y acción preventiva y erradicante sobre numerosas enfermedades de origen fúngico. Es un benceno sustituido, es granulado soluble en agua (Etiqueta del fungicida Bravo).
- **Iprodione:** Este principio activo se lo encuentra en los siguientes fungicidas: Kidon, Rovral, Chipco 26019, LFA 2043, NRC 910, DOP 500F. Es un fungicida de contacto, de amplio espectro de acción, perteneciente al grupo de las dicarboximidas. Destaca por su alta eficacia y es recomendado para el control de *Botritis*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Monilia*, *Phomopsis*, *Mycosphaerella*, *Sclerotium*, *Rhizoctonia* y *Sclerotinia*, *Pleiochaeta* y *Colletotrichum* (Etiqueta del fungicida Rovral).
- **Fludioxinil:** Es un fenilpirrol con actividad fungicida por contacto, no sistémico, persistente, adecuado en aplicaciones foliares preventivas y en tratamientos de semillas de cereales. Su estructura está directamente relacionada con el pirrolnitrin, producto antimicótico de origen natural que es producido como metabolito secundario por algunas bacterias del suelo como *Pseudomonas* spp. (Etiqueta del fungicida Switch).
- **Ciprodinil:** Este principio activo se lo encuentra en los siguiente fungicida: Switch 62,5 WG. Es un fungicida sistémico, que viene del grupo de las anilino pirimidina con traslocación ascendente por el xilema y actividad fungicida muy amplia que

incluye Ascomicetos, Basidiomicetos, Deuteromicetos y Oomicetos. Su modo de acción es diferente al de otros fungicidas. (Etiqueta del fungicida Switch).

- **Tiabendazol:** Algunos productos que tienen este principio activo son: Mertect 500SC, TBZ, Tecto, Thiazole, entre otros. Es un fungicida altamente sistémico con propiedades preventivas y curativas. Pertenece al grupo de los benzimidazol. Actúa inhibiendo la división celular de los patógenos. Es rápidamente absorbido y es llevado dentro de la planta (Etiqueta del fungicida Mertect).
- **Propiconazole:** Algunos productos que tienen este principio activo son: Banner, Benit, Desmel, Orbit, Radar, Tilt, Fidis, Alamo, Spire, Practis, Bumper, entre otros. Es un fungicida sistémico, con acción preventiva y curativa, especialmente desarrollado para el control de Tizón de la flor, *Botritis*, *Oidio* y *Roya* en frutales de carozo y *Septoriosis* en apio. En frutales de carozo puede aplicarse durante la floración, desarrollo del fruto y pre-cosecha (Etiqueta del fungicida Tilt)

### 1.6.2. Resistencia de los hongos a los fungicidas

#### a) Resistencia natural

La resistencia natural ocurre cuando un hongo es resistente a un principio activo sin haber estado en contacto con ese fungicida. Esto se puede evaluar cuando se quiere sacar al mercado un nuevo fungicida, los laboratorios hacen algunas pruebas en el campo para ver que hongos se eliminan con ese principio activo (Mondino, 2002).

#### b) Resistencia adquirida

La resistencia adquirida se da cuando el hongo ya ha sido expuesto al fungicida. Al principio éste era sensible al fungicida pero al pasar el tiempo comienza a adquirir una resistencia y el fungicida deja de controlar al hongo. Esta resistencia adquirida aparece como resultado del repetido uso del fungicida o de otro fungicida que tiene el mismo mecanismo de acción (Mondino, 2002).

#### c) Resistencia de laboratorio

La resistencia de laboratorio se refiere a cuando las cepas estudiadas en el laboratorio, en las que un patógeno aislado se lo hace crecer en determinadas

concentraciones de fungicidas y aparecen cepas resistentes a altas concentraciones (Mondino, 2002).

**d) Resistencia cualitativa o discreta**

La resistencia cualitativa o también conocida como discreta es cuando el hongo pasa de ser altamente sensible al fungicida a altamente resistente. Esta se caracteriza por una marcada pérdida de efectividad del fungicida y por la presencia de un corte claro entre la sensibilidad y la resistencia. Si el hongo se vuelve altamente resistente al fungicida es muy raro que vuelva a ser sensible (Mondino, 2002).

**e) Resistencia cuantitativa o de pasos múltiples**

La resistencia cuantitativa o de pasos múltiples es cuando la resistencia se desarrolla más lentamente, y es menos evidente. Esta resistencia se va adquiriendo a través de los años, pero si se deja de usar ese fungicida puede ser que esa resistencia se pueda revertir (Mondino, 2002).

**f) Resistencia cruzada**

La resistencia cruzada es cuando las poblaciones patógenas desarrollan una resistencia a un fungicida y simultáneamente se vuelven resistentes a otro fungicida que tiene el mismo modo de acción (Mondino, 2002).

**g) Resistencia Múltiple**

La resistencia múltiple se da cuando el hongo es resistente a varios principios activos. Se trata de cepas que poseen mecanismos de resistencia frente a dos o más fungicidas. Un ejemplo es la resistencia a benzimidazoles y dicarboximidias por las cepas de *Botrytis cinerea* (Mondino, 2002).

**1.6.3. Origen de la resistencia**

Las poblaciones de hongos que son resistentes a los fungicidas son capaces de adaptarse a nuevos ambientes para poder sobrevivir. Todos los seres vivos tienen la capacidad de adaptarse a los cambios del medio ambiente. Esta adaptación se demuestra por la variabilidad genética. La diversidad genética permite disponer de individuos adaptados a sobrevivir a diferentes condiciones del medio ambiente. Estos individuos que se adaptaron

son los encargados que su especie no se llegue a extinguir. Cualquier tipo de medida de control de poblaciones patógenas será susceptible a que exista alguna cepa que se vuelva resistente a un fungicida determinado. Por esta razón hay tantos fungicidas en el mercado para poder controlar a los fitopatógenos (Mondino, 2002).

## **2. Objetivos**

### **2.3. Objetivo general**

- Evaluar la eficiencia de cinco fungicidas utilizados para el control de *Monilinia spp.* en cultivos de durazno de tres provincias de la sierra ecuatoriana.

### **2.4. Objetivos específicos**

- Aislar cepas de *Monilinia sp.* colectadas de huertos de durazno en tres provincias de la sierra ecuatoriana: Imbabura, Carchi y Tungurahua.
- Determinar in vitro el  $EC_{50}$  para cinco fungicidas de uso comercial para el control de *Monilinia* en durazno.

## **3. Justificación**

Actualmente en el Ecuador se pueden encontrar cultivos de duraznos en las provincias de Tungurahua, Pichincha, Imbabura, Azuay, Chimborazo y Carchi. Aproximadamente 650 hectáreas son dedicadas para la siembra del duraznero con una producción estimada de 3.15TM al año (MAGAP, 2010).

Actualmente, los cultivos de durazno sufren varias plagas y enfermedades tanto en el fruto como en sus hojas y tallos lo que provoca daños irreparables en las plantas y disminuye la calidad del producto. Como consecuencia de estos la productividad disminuye y existen pérdidas económicas.

Una de las enfermedades más destructivas que ataca a los duraznos es la podredumbre parda, conocida también como “brown rot”. La podredumbre parda es producida por el hongo *Monilinia spp.* Este hongo induce la descomposición de toda la fruta madura, pudiendo infectar otras frutas cuando se están transportando, ya sea en camiones, en las

cajas y luego en los mercados o centros de distribución del producto, llegando a pérdidas del 80% del producto.

Teniendo en cuenta las grandes pérdidas generadas por este fitopatógeno, los cultivadores de durazno en búsqueda de eliminar los problemas causados por hongos en sus cultivos, han incrementado la frecuencia de aplicación de fungicidas para el control de plagas. Por lo tanto, surge la necesidad de evaluar diversos productos químicos que tengan la capacidad de ejercer un efectivo control sobre los hongos patógenos, para que la aparición de resistencia se retarde, logrando un manejo de plagas más adecuado.

En el Ecuador no han existido estudios o pruebas específicas para el control de *Monilinia* por lo tanto, el presente estudio tiene como fin evaluar in vitro las concentraciones de los fungicidas a las que el 50% de las esporas de *Monilinia* dejan de germinar, lo que equivale a determinar la dosis letal media. Este estudio pionero, permitirá conocer la efectividad de los fungicidas que se utilizan en el Ecuador para el control de *Monilinia*. Con estos datos los agricultores de durazno podrán establecer estrategias efectivas para el control de esta enfermedad.

#### **4. Área de estudio**

Este estudio fue realizado en dos fases. En la primera, se recolectó frutas de duraznos afectados por la enfermedad de donde se aisló el hongo, y la segunda fue las pruebas de evaluación in vitro de los fungicidas contra los aislados de *Monilinia*. Las muestras de duraznos fueron recolectadas en cuatro provincias de la sierra Ecuatoriana: Imbabura, Carchi, Pichincha y Tungurahua desde marzo del 2009 hasta abril del 2010.

El cultivo “in vitro” de *Monilinia* y pruebas de germinación de esporas en varias concentraciones de fungicidas fue realizada entre el periodo de enero del 2010 hasta enero del 2011 en los Laboratorios de Biotecnología Vegetal y en el de Patología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito.

## **5. Materiales**

### **5.1. Obtención de muestras**

- ❖ Duraznos afectados por la podredumbre parda

### **5.2. Preparación de medio de PDA para hongo**

- ❖ PDA (Potato dextrosa agar)
- ❖ Agua destilada
- ❖ Gentamicina

### **5.3. Preparación del medio Jugo V8+MA para hongo**

- ❖ Jugo V8
- ❖ Agar-agar
- ❖ Asparagina
- ❖ Extracto de malta
- ❖ Maltosa
- ❖ Agua destilada
- ❖ CaCO<sub>3</sub>
- ❖ Gentamicina

### **5.4. Aislamiento del hongo del durazno y cultivando in vitro**

- ❖ Duraznos afectados por la enfermedad
- ❖ Agua destilada estéril
- ❖ Hipoclorito de sodio al 2,5%
- ❖ Incubadora Vindon Scientific

### **5.5. Elaboración de cámaras húmedas**

- ❖ Duraznos enfermos
- ❖ Duraznos sanos
- ❖ Agua destilada estéril
- ❖ Hipoclorito de sodio al 2,5%
- ❖ Fundas estériles
- ❖ Tarrinas plásticas estériles



### **5.6. Observación de esporas**

- ❖ Cultivos de esporas de diferentes aislamientos de *Monilinia spp.*
- ❖ Porta objetos
- ❖ Cubre objetos
- ❖ Azul de metileno
- ❖ Microscopio Reichert/Austria

### **5.7. Establecimiento de cultivos monospóricos**

- ❖ Agua destilada estéril
- ❖ Microscopio Reichert/Austria
- ❖ Medios de Agar JugoV8+MA
- ❖ Incubadora Vindon Scientific

### **5.8. Preparación de medios Agar JugoV8+MA + fungicidas**

- ❖ Jugo V8
- ❖ Agar-agar
- ❖ Asparagina
- ❖ Extracto de malta
- ❖ Maltosa
- ❖ CaCO<sub>3</sub>
- ❖ Gentamicina
- ❖ Fungicidas Bravo 720 (Syngenta)
- ❖ Fungicida Rovral 50% WP (Syngenta)
- ❖ Fungicida Switch 62,5 WQ (Syngenta)
- ❖ Fungicida Mertect 500 SC (Syngenta)
- ❖ Fungicida Tilt Plus (Bayer)

### **5.9. Conteo de números de esporas**

- ❖ Cámara de Neubauer LABOLAN
- ❖ Medios de cultivos con esporas de diferentes cepas de *Monilinia*
- ❖ Microscopio Reichert/Austria

### **5.10. Siembra de los aislamientos del hongo en los medios con fungicidas**

- ❖ Medios de Agar JugoV8+MA con fungicida varias concentraciones
- ❖ Cámara de Neubauer LABOLAN
- ❖ Microscopio Reichert/Austria
- ❖ Incubadora Vindon Scientific

### **5.11. Análisis estadístico**

- ❖ Microsoft Excel (2007)

## **6. Metodología**

### **6.1. Obtención de muestras**

La recolección de los duraznos afectados por *Monilinia sp.* se hizo desde marzo de 2009 hasta abril de 2010. Se recolectó duraznos de las provincias de Tungurahua, Pichincha, Imbabura, y Carchi. Se seleccionó frutos de durazno que presentaron síntomas de la podredumbre parda y simultáneamente se recolectó algunos frutos momificados. La nomenclatura utilizada para la identificación de las muestras fue: la primera letra es de la provincia donde se recolectó los duraznos enfermos, y los dos siguientes números corresponden al orden de colección de la muestra (Ver Tabla 1).

### **6.2. Preparación del medio PDA para aislamiento del hongo**

Para la preparación del medio PDA (Potato Dextrosa Agar), se pesó 39g de PDA en polvo por cada litro de medio a preparar. Se colocó en un Erlenmeyer con tapa los 39g de PDA, se agregó el agua y se calentó en el microondas hasta la ebullición. Toda la mezcla fue homogenizada completamente. Luego se esterilizó a 121°C por 20 minutos, se dejó enfriar hasta que sea tolerable al tacto y se añadió 800µl de gentamicina (no es necesario filtrar) por cada litro para alcanzar una concentración de antibiótico de 40mg/l. Por último se mezcló bien y se repartió en cajas petri de plástico, aproximadamente 20 ml por caja.

### **6.3. Preparación de medio Jugo V8+MA para inducir esporulación del hongo**

Para la preparación del medio de JugoV8+MA se colocó en un Erlenmeyer, 200ml de jugo V8, 20g de maltosa, 1g de Asparagina, 10g de extracto de malta, 3g de CaCO<sub>3</sub>, y 15g de agar (Ver Anexo 8).

Luego se agregó agua destilada hasta completar un litro, y se esterilizó a 121°C por 20 minutos. Se dejó enfriar hasta que fue tolerable al tacto y se añadió 800µl de gentamicina por cada litro de medio de Jugo V8+MA preparado para alcanzar una concentración de antibiótico de 40mg/l. Por último se mezcló bien y se repartió en cajas petri de plástico, aproximadamente 20ml por caja.

### **6.4. Aislamiento del hongo a partir de frutos infectados**

Para aislar y cultivar el hongo in vitro se utilizó frutos de durazno que presentaban la podredumbre parda y que fueron recolectados en las cuatro provincias mencionadas anteriormente (Ver Tabla 1). Primero se lavó el fruto con un poco de agua y detergente para eliminar impurezas y bacterias. Luego se cortó pequeños pedazos de fruto, estos pedazos tenían que incluir una parte sana del fruto y la otra parte enferma del fruto. Los siguientes pasos se los realizó en la cámara de flujo laminar. Los pedazos del durazno sano y enfermo fueron colocados en un vaso de precipitación con agua destilada estéril, por un minuto. Luego se los trasladó a otro vaso de precipitación que contenía hipoclorito de sodio al 2,5%, por un minuto. En seguida se los lavó con agua destilada estéril, para eliminar los restos de hipoclorito de sodio. Se colocó los pedazos de durazno sobre papel filtro estéril y se los dejó ahí hasta que estuvieron totalmente secos. En seguida se sembró de 4 a 5 pedazos de durazno sobre el medio de PDA o de Jugo V8+MA. Se sembró los pedazos en forma horizontal colocando la parte sana y la parte con el hongo dentro del medio de cultivo. Luego se incubó a 25°C por una semana.

- Cuando el aislamiento se hizo a partir de frutos momificados, se realizó el mismo procedimiento de desinfección, solo que al final se raspó un poco a la fruta momificada con una pinza o aguja y se sembró en el medio de cultivo. Por último, se lo incubó a 25°C por una semana.

### **6.5. Elaboración de cámaras húmedas**

Las cámaras húmedas se hicieron para comprobar que el hongo aislado era *Monilinia* y que reproducía la podredumbre parda en frutas de duraznos sanos, se usó los aislados de la Tabla 1. Los frutos sanos fueron lavados con agua y detergente, para eliminar bacterias e impurezas. Los siguientes pasos se los realizó en la cámara de flujo laminar. A los duraznos sanos se los lavó con agua destilada estéril por un minuto en un vaso de precipitación. Luego éstos fueron colocados en hipoclorito de sodio al 2,5% por un minuto y fueron colocados en otro vaso de precipitación con agua destilada estéril para eliminar restos del desinfectante. Con la pinza se sacó los duraznos del agua destilada estéril y se los colocó en un papel filtro estéril para que se sequen. Algodones estériles se los mojó con agua destilada estéril y se los colocó en el fondo de la tarrina de plástico o fundas estériles. En las tarrinas se colocó los duraznos sanos con pequeñas heridas, y se los inoculó con cada uno de los tres aislamientos (Imbabura, Carchi, y Tungurahua) de *Monilinia*. Por último se puso las tarrinas con el fruto infectado en la incubadora a 25°C por 14 días.

### **6.6. Identificación de aislados mediante la observación de esporas**

Para la identificación de *Monilinia* se observó con el microscopio Reichert/Austria las esporas de las muestras aislados de los frutos (Ver Tabla 1). Sobre un porta objetos se colocó una gota de azul de metileno. Con un asa o aguja se tomó un poco de la muestra del hongo y se la puso sobre la gota de azul de metileno, y se mezcló bien. Se observó al microscopio con los objetivos de 10X, y 40X y se comparó el micelio y las esporas con las claves y gráficas taxonómicas (Ver anexo 7).

### **6.7. Cultivo monospórico**

Se hizo el cultivo monospórico de las muestras de la Tabla 1 (estas muestras presentaron esporulación). En 7 tubos eppendorf se colocó 900µl de agua destilada estéril hasta tener una dilución de  $10^{-6}$ . Con mucho cuidado se puso 5000µl de agua destilada estéril sobre el medio de cultivo que contenía esporas de *Monilinia*. Se movió lentamente la caja hasta que las esporas quedaron distribuidas homogéneamente en el agua; se tomó 100µl de esta muestra y se depositó en el primer tubo eppendorf. Posteriormente se tomó 100µl del primer tubo eppendorf y se puso en el segundo tubo para obtener la dilución  $10^{-1}$  y así sucesivamente hasta que se llegó a la dilución  $10^{-6}$ . Se tomó 50µl de cada dilución y

se los depositó en el medio de cultivo V8+MA, y con una asa estéril se esparció las esporas por toda la caja. Luego se colocó las cajas en la incubadora a 25°C por 5 días. Se observó la dilución en la que las esporas germinaban individualmente, se tomó una colonia aislada del resto y se subcultivó en otra caja petri con V8+MA, en una incubadora a 25°C por 7 días.

### **6.8. Preparación de medio Agar JugoV8+MA + fungicidas**

Para la preparación de medios Agar JugoV8+MA+fungicida se procedió de la misma manera como se explicó en la sección 6.2. A este medio se le añadió los fungicidas que se muestran en la Tabla 2. Se utilizó una solución stock de 10000 µg/ml, por cada fungicida. La fórmula que se aplicó para determinar el volumen de fungicida que se debía poner en 100ml de agua destilada estéril para crear la solución stock de 10000µg/ml fue:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Esta misma fórmula se usó para determinar el volumen de la solución stock que debía mezclarse con 100 µl de Jugo V8+MA, para obtener las distintas concentraciones que iban a ser evaluadas. Por último, se usó cinco distintas concentraciones de 0, 1, 10,100 y 1000µg/ml.

### **6.9. Conteo de esporas**

El conteo de esporas se hizo para sembrar un número determinado de esporas en cada caja petri con medio de cultivo más los diferentes fungicidas utilizados. Para determinar el número de conidias por volumen, se utilizó un hematocitómetro o cámara de Neubauer. En cuatro tubos eppendorf se puso 900µl de agua destilada estéril y se rotuló. Al mismo tiempo en una caja petri, en la que el hongo estaba esporulando se puso 1000µl de agua destilada estéril para obtener una solución concentrada de esporas la cual se transfirió a un tubo eppendorf. Posteriormente, del tubo eppendorf se tomó 100µl de la solución de esporas y se colocó en el primer tubo que contenía 900µl de agua destilada estéril; luego se tomó 100µl del primer tubo eppendorf y se colocó en el segundo tubo así sucesivamente hasta que se tuvo una dilución de 10<sup>-3</sup>. Luego de cada una de las diluciones se sacó 40 µl y se los colocó en la cámara de Neubauer para su conteo.

Se tomó cinco lecturas de las esporas que se encontraban en los cinco grandes cuadrados de la cámara de Neubauer, se los promedió y se calculó la densidad de esporas por volumen usando la siguiente fórmula:

Total # de esporas de los 5 cuadrados / profundidad de la cámara de Neubauer (mm)

$$\text{Resultado} / \text{Superficie Total} = \text{esporas/mm}^3$$

Siguiendo el procedimiento de Everett y Timudo-Torrevilla, 2007, se ajustó la concentración a  $10^5$  esporas/ml.

### **6.10. Siembra de los aislamientos del hongo en los medios con fungicidas**

Antes de comenzar con la siembra de las esporas se tuvo listo los medios V8+MA+fungicida. Para el experimento final se utilizó las siguientes concentraciones de fungicidas: 0, 1, 10, 100 y  $1000\mu\text{g/ml}$  y se realizó tres replicas por concentración. Siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 6.9, se preparó dos diluciones de esporas  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$ .

De la dilución de esporas  $10^{-2}$  se tomó  $14\mu\text{l}$  más  $86\mu\text{l}$  de agua destilada estéril; esto se distribuyó en las cajas petri con el medio de cultivo conteniendo las diferentes concentraciones de fungicidas. Finalmente se incubó a  $25^\circ\text{C}$  por 7 días. Se contó el número de esporas que germinaron en las distintas concentraciones de fungicida a los 3, 5 y 7 días. Usando un estereoscopio, y en tres campos ópticos. Un valor constante de 0,01 fue añadido para los datos con valores de 0 a 1000. La fórmula utilizada para determinar la concentración a la cual el 50% de las esporas dejaron de germinar ( $\text{EC}_{50}$ ) fue la siguiente:

$$\text{Logit} = \ln(p/(1-p))$$

$$p = \text{Probabilidad}$$

Luego de tener los datos se obtuvo los resultados y se hizo las gráficas. Para determinar el  $\text{EC}_{50}$  en las gráficas se utilizó una regresión lineal.

### 6.11. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se usó el programa de Microsoft Excel (2007), y se usó una regresión lineal para determinar la concentración a la cual el 50% de las esporas dejan de crecer.

## 7. Resultados

### 7.1. Colección de muestras, aislamiento e identificación de *Monilinia*

Se obtuvo un total de 22 frutos de durazno que presentaban la podredumbre parda y dos frutos momificados procedentes de las cuatro provincias de la sierra ecuatoriana (Ver Tabla 1). Las 22 muestras fueron sembradas en el medio de PDA y en el medio de JugoV8+MA, y se registró el tipo de crecimiento, el tipo de micelio, el color del micelio y la forma de las conidias (Ver Figura 1). En un primer intento se seleccionó las muestras que tuvieron un micelio blanco o grisáceo en el medio de PDA (Agrios, 2005). Pues en este medio de PDA solo se observaba crecimiento de micelio. Entonces, a las muestras seleccionadas en base a su micelio blanco o grisáceo se les sembró en los medios de PDA y de Jugo V8+MA. Con esto se pudo determinar que el medio de Agar Jugo V8+MA inducía la esporulación del hongo. Después de hacer una identificación molecular en el laboratorio, de las 22 muestras se identificó varias de ellos como *Monilinia*, y para este estudio solo se seleccionó tres muestras positivas de *Monilinia* que provenían de Imbabura, Carchi y Tungurahua (Ver Tabla 1). El micelio de la muestra del Tungurahua al comienzo era de color blanco pero cuando fue creciendo se tornó anaranjado (Ver Figura 1). En cambio el micelio de las muestras del Carchi e Imbabura su micelio era de color grisáceo (Ver Figura 1).

La esporulación de los tres aislamientos al principio fue de color verde oscuro y con el tiempo se tornó un poco café (Ver Figura 1). Al comparar las esporas de los tres aislamientos con las claves taxonómicas, se pudo ver que las esporas eran similares y concuerda con las características de *Monilinia* (Agrios, 2005). Sus esporas eran en forma de limón, pequeñas y abundantes (Ver Anexo 5 y Figura 1). Por estas características se determinó que el hongo aislado era *Monilinia* y mediante un análisis molecular se pudo confirmar que el hongo aislado correspondía a *Monilinia*. La identificación molecular fue realizada usando 3 pares de primers que amplificaron la región ITS de cada especie y

además se utilizó un PCR múltiple usando primers específicos. Los resultados revelaron que las muestras aisladas e identificadas al microscopio Reichert/Austria, solo 11 correspondieron en realidad al género *Monilinia*. Las muestras que resultaron ser *Monilinia* fueron de la provincia de Imbabura, Cachi y Tungurahua (Ver Anexo 34 y 35).

Las cámaras húmedas se hicieron para verificar si los 21 aislamientos provocaban la podredumbre parda en frutos sanos. De todos los aislamientos solo 10 muestras provocaron una podredumbre parda similar a la que se produce en el campo.

## **7.2. Determinación del EC<sub>50</sub> de los cinco fungicidas**

Para la determinación de la concentración a la cual el 50% de las esporas dejan de germinar, se utilizó cinco concentraciones por cada fungicida (0, 1, 10, 100 y 1000 µg/ml). En cada medio con fungicida se sembró los tres aislamientos de *Monilinia* (Imbabura, Carchi y Tungurahua) y se hizo tres repeticiones por concentración. Por cada fungicida se usó 15 cajas y en el experimento global se utilizaron 225 cajas. En cada concentración de fungicida se sembró 10<sup>5</sup> esporas/ml de cada muestra. El número de esporas que germinaron en las cuatro concentraciones de los cinco fungicidas se registró al tercer, quinto y séptimo días, pero para los resultados solo se tomó en cuenta los datos obtenidos en el séptimo día, porque para la mayoría de los aislamientos el crecimiento fue claramente evidente al séptimo día. Con la ayuda de un estereoscopio Reichert/Austria se leyó tres campos en la caja Petri y se contó las esporas que se encontraban germinando en cada uno de los tres campos de las cajas Petri. También se les tomó una fotografía para ilustrar la germinación de las esporas al tercer, quinto y séptimo día. (Ver Anexos 13, 14, y 15).

Para calcular el EC<sub>50</sub> se promedió el número de esporas que germinaron hasta el séptimo día en las tres repeticiones (Ver Anexos 8, 9, 10, 11, y 12). Para obtener la curva de regresión lineal primero se calculó el Logit de las tres muestras sembradas en los cinco fungicidas, y estos datos sirvieron para graficar la curva de regresión lineal y se obtuvo la ecuación de regresión, en la cual se despejó la x para encontrar el EC<sub>50</sub> de cada aislamiento (Ver Anexos 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, y 30). En la Tabla 3 se muestran las concentraciones de los cinco fungicidas en las cuales el 50% de las esporas de cada aislamiento dejan de germinar.



Los fungicidas con mayor efectividad y que mayor consistencia tuvieron para inhibir la germinación de los tres aislamientos de *Monilinia* fueron: Mertect, Bravo y Tilt. Respecto al fungicida Mertect, el aislamiento más sensible a su principio activo Tiabenzanol fue el de la provincia de Imbabura (I03) porque su  $EC_{50}$  fue de  $1,15 \times 10^{-5} \mu\text{g/ml}$ , seguido por el aislamiento de la provincia del Carchi (C03) con un  $EC_{50}$  fue de  $1,16 \times 10^{-5} \mu\text{g/ml}$  y el aislamiento de la provincia de Tungurahua (T04) con un  $EC_{50}$  fue de  $1,18 \times 10^{-5} \mu\text{g/ml}$  (Ver Tabla 3 y Figura 2). En cambio para el fungicida Bravo los resultados fueron diferentes, el aislamiento más sensible al principio activo de Bravo (clorotalonil) fue el aislamiento de la provincia de Tungurahua (T04) donde su  $EC_{50}$  fue de  $1,11 \times 10^{-5} \mu\text{g/ml}$ , seguido por el aislamiento de la provincia del Carchi (C03) con un  $EC_{50}$  de  $1,13 \times 10^{-5} \mu\text{g/ml}$  y el aislamiento de la provincia de Imbabura (I03) con un  $EC_{50}$  de  $1,133 \times 10^{-5} \mu\text{g/ml}$  (Ver Tabla 3 y Figura 3).

Otro fungicida efectivo para el control de los tres aislamientos de *Monilinia* fue Tilt. Aquí el aislamiento más sensible al Propiconazole que es el principio activo del fungicida Tilt fue el aislamiento de la provincia del Carchi (C03) con un  $EC_{50}$  de  $1,08 \times 10^{-5} \mu\text{g/ml}$ , seguido por el aislamiento de la provincia de Imbabura (I03) con un  $EC_{50}$  de  $1,09 \times 10^{-5} \mu\text{g/ml}$  y el  $EC_{50}$  del aislamiento de la provincia de Tungurahua (T04) fue de  $1,13 \times 10^{-5} \mu\text{g/ml}$  (Ver Tabla 3 y Figura 4).

La Tabla 3 muestra que el fungicida Switch es el cuarto fungicida más efectivo con un  $EC_{50}$  menor a  $0,029 \mu\text{g/ml}$ . En la Figura 5 se observó que el aislamiento más sensible a los principios activos Fludioxinil y Ciprodinil fue el de la provincia de Imbabura (I03) porque su  $EC_{50}$  fue de  $0,0015 \mu\text{g/ml}$ , seguido por el aislamiento de la provincia del Carchi (C03) que presentó un  $EC_{50}$  fue de  $0,0016 \mu\text{g/ml}$ , y el aislamiento de la provincia de Tungurahua (T04) fue un poco más tolerante con un  $EC_{50}$  de  $0,026 \mu\text{g/ml}$  (Ver Tabla 3 y Figura 5).

El fungicida con menor efectividad para los tres aislamientos fue el fungicida Rovral. (Ver Tabla 3). La mayoría de las esporas de los tres aislamientos germinaron hasta  $1 \mu\text{g/ml}$ . En la Tabla 3 se observó que el  $EC_{50}$  de los tres aislamientos es menor a  $0,03 \mu\text{g/ml}$ . En la Figura 6 se pudo ver que los tres aislamientos tuvieron un  $EC_{50}$  mayor que en los otros fungicidas. El aislamiento de la provincia de Tungurahua (T04) fue el más sensible al fungicida Rovral porque su  $EC_{50}$  fue de  $0,0023 \mu\text{g/ml}$ , seguido por el aislamiento de la

provincia de Imbabura (I03) donde su  $EC_{50}$  fue de  $0,004\mu\text{g/ml}$ , y el aislamiento de la provincia del Carchi (C03) tuvo un  $EC_{50}$  de  $0,039\mu\text{g/ml}$ .

En la Figura 7 se muestra el  $EC_{50}$  del aislamiento de la provincia de Tungurahua (T04). Aquí se puede ver que el aislamiento es más tolerante al fungicida Switch ya que su  $EC_{50}$  es menor a  $0,03\mu\text{g/ml}$ , luego es más tolerante al fungicida Rovral con un  $EC_{50}$  menor a  $0,005\mu\text{g/ml}$ . El aislamiento de Tungurahua (T04) es muy sensible a los fungicidas Mertect, Bravo y Tilt.

En la Figura 8 se muestra el  $EC_{50}$  del aislamiento de Imbabura (I03). Aquí se puede ver que el aislamiento es más tolerante al fungicida Rovral ya que su  $EC_{50}$  es menor a  $0,0045\mu\text{g/ml}$ , luego es más tolerante al fungicida Switch con un  $EC_{50}$  menor a  $0,0015\mu\text{g/ml}$ . El aislamiento de Imbabura (I03) es muy sensible a los fungicidas Mertect, Bravo y Tilt.

En la Figura 9 se muestra el  $EC_{50}$  del aislamiento del Carchi (C03). Aquí se puede ver que el aislamiento es más tolerante al fungicida Rovral ya que su  $EC_{50}$  es menor a  $0,04\mu\text{g/ml}$ , luego es un poco sensible al fungicida Switch con un  $EC_{50}$  menor a  $0,0005\mu\text{g/ml}$ . El aislamiento del Carchi (C03) es muy sensible a los fungicidas Mertect, Bravo y Tilt.

## 8. Discusión

### 8.1. Colección de duraznos y aislamiento de *Monilinia sp.*

Se recolectaron 22 frutos de durazno que aparentaban tener una infección con podredumbre parda. Cuando se realizó el aislamiento del hongo, no se sabía con exactitud que hongos podían crecer en los medios de cultivos. Por eso se hizo un análisis morfológico y se seleccionó las muestras que parecían ser *Monilinia*. Para confirmar los resultados obtenidos a partir de la morfología del hongo se realizó un análisis molecular. Cuando se confirmó que las muestras eran *Monilinia* se hizo cultivos monospóricos para obtener una muestra más pura. Cuando se realizó este tipo de cultivos se pudo detectar problemas de contaminación, ya que algunas muestras presentaron crecimiento de otro tipo de hongo. Seguramente durante este proceso en algún momento se perdió el aislamiento

original detectado como *Monilinia* y éste fue suplantado con otro hongo contaminado no determinado.

De los 22 frutos de duraznos infectados que se recolectaron en cuatro provincias de la sierra ecuatoriana, se seleccionó tres aislamientos procedentes de las provincias de Imbabura, Carchi y Tungurahua para este estudio porque estos aislamientos fueron confirmados morfológicamente y molecularmente como *Monilinia*. Las características morfológicas que presentaron los tres aislamientos fueron: micelios de color blanco a grisáceo, y sobre el micelio una esporulación de color verde que con el pasar del tiempo se tornó café. La forma de las esporas fueron parecidas a un limón, lo cual coincide con las claves taxonómicas de *Monilinia* (Agrios, 2005) (Ver Anexo 7). Desde el punto de vista molecular los tres aislamientos mostraron bandas del tamaño correspondiente a 500pb (Ver Anexo 35 y 36).

Otra razón por la cual se escogió los aislamientos de Imbabura y Carchi, es que estas muestras fueron recolectadas de zonas cercanas donde el productor interesado en este estudio cultiva durazno. La tercera muestra que se seleccionó, fue la de Tungurahua, porque en esta provincia se ha cultivado durazno aproximadamente hace 80 años atrás, esto significa que los productores de duraznos han tenido que afrontar la podredumbre parda durante mucho tiempo (Agrios, 2005).

## **8.2. Inducción de esporulación de *Monilinia sp.***

Al principio de este estudio, a los 22 aislamientos de *Monilinia* se los sembró en medio de PDA ya que es el más apropiado y el más utilizado en los cultivos de hongos (Agrios, 2005), pero después de varias pruebas in vitro no se logró tener esporulación del hongo, solo se lograba tener una gran cantidad de micelio. Por esta razón se comenzó a probar con otros medios para lograr la esporulación del hongo. Había el antecedente que en el Ecuador ya se habían hecho estudios con un hongo similar a este estudio (Ruales, et al, 2003). Estos estudios buscaban justamente ver que medios eran los mejores para hacer esporular a *Monilinia* del cacao. Después de varias pruebas se llegó a la conclusión que el mejor medio era el Agar Jugo V8+MA. Al probar con este medio se logró la esporulación de los aislamientos de *Monilinia* colectados del durazno en las tres provincias de la sierra ecuatoriana. Esto, sirvió posteriormente para establecer la identidad de los aislamientos

mediante observación de sus esporas y para preparar las diluciones para luego ser evaluadas con los fungicidas.

### **8.3. Determinación del EC<sub>50</sub> de los cinco fungicidas**

El principal objetivo de este experimento fue evaluar in vitro la efectividad de los cinco fungicidas para inhibir la germinación de las esporas de *Monilinia* que ataca al durazno. Los resultados obtenidos permitieron saber cuál de los cinco fungicidas es el más efectivo y ver si los aislamientos de *Monilinia* son muy susceptibles o no a los cinco fungicidas utilizados.

Se esperaba que los fungicidas más efectivos fueran Bravo (Clorotalonil), Rovral (Iprodione) y Tilt (Propiconazole), porque en un estudio realizado por Teviotdale (2005), se encontró que los principios activos más efectivos para el control de la podredumbre parda eran el IBE (Inhibidores de Biosíntesis del Ergosterol), el captan, los dicarboximidas, los triazoles y los benzimidazoles. Estos principios activos no corresponden a los principios activos utilizados en este estudio pero corresponden al mismo grupo químico. Aparte, estos fungicidas son los que más exitosamente se los ha utilizado en la etapa de floración y maduración del fruto en los árboles, que es cuando el ataque del hongo es más severo (Tobar José, comunicación personal).

Para saber si los fungicidas eran efectivos o no para el control de *Monilinia*, los valores de EC<sub>50</sub> nos basamos en un estudio hecho en Nueva Zelanda, los científicos Obanor, Walter, y otros autores que consideran un fungicida efectivo cuando su EC<sub>50</sub> < 1 μg/ml y no efectivo cuando su EC<sub>50</sub> > 4 μg/ml, según estos datos se determinó nuestros resultados (F.O. Obanor, et al, 2005).

Los resultados obtenidos confirmaron que los fungicidas Tilt, y Bravo fueron los más efectivos para inhibir la germinación de las esporas de *Monilinia* en este estudio. En el Anexo 15 se observa que ninguno de los tres aislamientos germinó en 1 μg/ml, y en las Figura 3 y 4 se puede observar que los tres aislamientos sembrados en los dos fungicidas mencionados tuvieron un EC<sub>50</sub> menor a 1,1x10<sup>-5</sup> μg/ml. Esto indica que los tres aislamientos de *Monilinia* son muy sensibles al clorotalonil y al Propiconazole, que son los principios activos de Tilt y Bravo respectivamente.

El fungicida Tilt no es tan específico para el control de *Monilinia* pero su uso ha aumentado en los últimos años en las plantaciones de durazno en el Ecuador (Tobar José, comunicación personal). El principio activo de Tilt es el Propiconazole que proviene del mismo grupo químico de los triazoles (W.T Thomson, 1997). En los resultados se pudo ver que el Propiconazole es muy efectivo porque inhibió la germinación de las esporas de *Monilinia*, su  $EC_{50}$  es menor a  $1,15 \times 10^{-5} \mu\text{g/ml}$  (Ver Figura 4), los resultados son similares a los descritos en *Phaeomoniella chlamydospora* (M.V. Jaspers, 2001). Tilt es un fungicida sistémico, preventivo y tiene acción curativa, y es absorbido por toda la planta, inhibiendo el crecimiento y la formación de esporas (F.O. Obanor, et al, 2005), aparte este fungicida tiene la capacidad de acumular esteroides en las células de los hongos, haciendo que se detenga o disminuya el crecimiento del hongo, previniendo efectivamente nuevas infecciones (W. T. Thomson, 1997).

El fungicida Bravo es específico para el control de *Monilinia* (Syngeta, 2011). El principio activo del fungicida Bravo es el clorotalonil. El fungicida clorotalonil fue muy efectivo previniendo la germinación de las esporas aisladas de *Monilinia* con un  $EC_{50}$  menor a  $1,14 \times 10^{-5} \mu\text{g/ml}$  (Ver Figura 3). Este fungicida también fue muy efectivo en Nueva Zelanda para el control de *Spilocaea oleagina*, aquí el  $EC_{50}$  fue menor a  $0,06 \mu\text{g/ml}$  (F.O. Obanor, et al, 2005). Bravo es un fungicida de contacto, de amplio espectro de control, que tiene acción preventiva y evita la generación de resistencia. El clorotalonil tiene la capacidad de intervenir en la síntesis de las enzimas provocando que el hongo no se desarrolle y muera (W. T. Thomson, 1997).

Otro fungicida muy efectivo para inhibir la germinación de las esporas de *Monilinia* en este estudio fue Mertect. Mertect es un fungicida sistémico y su principio activo es el Tiabendazol. El Tiabendazol viene del grupo químico de los benzimidazoles. Con este fungicida se obtuvo un  $EC_{50}$  menor a  $1,19 \times 10^{-5} \mu\text{g/ml}$  (Ver Figura 2), los valores del  $EC_{50}$  fueron similares a lo descrito en un reporte para *Sclerotinia homeocarpa* and *Botrytis cinerea* (Burpee 1997; Grindle 1981). La efectividad del Tiabendazol puede deberse a que es un fungicida relativamente nuevo en el mercado ecuatoriano, y se lo utiliza muy poco para la fumigación de los cultivos de durazno (José Tobar, comunicación personal). Este fungicida es sistemático, actúa inhibiendo la división celular provocando la muerte del

hongo, y puede permanecer en el fruto como dos semanas más protegiendo al fruto (W. T. Thomson, 1997).

Se esperaba que el fungicida Rovral fuera el más eficaz de los cinco fungicidas utilizados en este estudio, porque ha estado en el mercado ecuatoriano por mayor tiempo y por su constante uso en las plantaciones de durazno (José Tobar, comunicación personal). Sin embargo esto no se pudo observar en esta investigación. Los tres aislamientos (Imbabura, Carchi y Tungurahua) germinaron hasta una concentración de  $1\mu\text{g/ml}$  (Ver Anexo 13), y el  $\text{EC}_{50}$  del fungicida Rovral fue menor a  $4 \times 10^{-2}\mu\text{g/ml}$  (Ver Figura 6). En otro estudio realizado por varios autores se tuvo valores de sensibilidad del hongo parecidos a lo que se obtuvo en este estudio con *Monilinia* (Burpee 1997; Grindle 1981; Liggitt et al. 1997; Herman & Gisi 1994; Parker & Sutton 1993). Rovral es un fungicida de contacto, su principio activo es el iprodione que proviene del grupo dicarboximidias. La baja efectividad que tuvo el iprodione para inhibir la germinación de esporas es porque inhibe el desarrollo del tubo germinativo de las esporas y bloquea al micelio, provocando la muerte del hongo (W. T. Thomson, 1997). El aislamiento que no fue tan susceptible al fungicida Rovral fue el de la provincia del Carchi, porque el 50% de sus esporas germinaron a una concentración de  $0,03\mu\text{g/ml}$  (Ver figura 6).

En el Ecuador al fungicida Switch no es utilizado mayormente para inhibir la germinación de *Monilinia*, se lo usa más para control de la *Botritis* (Syngenta, 2009). Se sabe que este fungicida se lo aplica para hacer lavados de postcosecha (José Tobar, comunicación personal). A pesar que es un fungicida usado para otro tipo de hongo se pudo determinar que si es un fungicida eficaz para inhibir el crecimiento de *Monilinia*. Igual que el fungicida Rovral no son tan efectivos como Mertect, Bravo y Tilt, porque las esporas de los tres aislamientos de *Monilinia* germinaron a una concentración de  $1\mu\text{g/ml}$  (Ver Anexo 14) y su  $\text{EC}_{50}$  fue menor a  $2,8 \times 10^{-2}\mu\text{g/ml}$  (Ver gráfica 2). Los valores obtenidos se parecen a la susceptibilidad de *Botritis* hacia el fungicida Switch (Hilber & Schuepp 1996). La efectividad del fungicida Switch se pudo dar porque es un fungicida de contacto y sistemático con función preventiva y curativa que no permite que esporas, ni micelio ingresen a la planta. Aparte los principios activos del Switch alteran la síntesis de algunos aminoácidos y evita la esporulación (W. T. Thomson, 1997).

Los tres aislamientos de *Monilinia*, fueron sensibles a los cinco fungicidas utilizados en este experimento, porque durante el año del 2010 al 2011 los agricultores de durazno no fumigaron sus plantaciones durante ese tiempo por varias circunstancias. Cuando se hizo la colecta de los duraznos infectados en las provincias de Imbabura, Carchi, Pichincha y Tungurahua, se nos indicó que no se había fumigado sus cultivos porque estaban en un época de sequía y para que los hongos se desarrollen necesitaban humedad. También, en la provincia de Tungurahua, no se había fumigado porque tenían constantemente caída de cenizas en sus cultivos, esto no permitió el desarrollo de ningún hongo. La Figura 10 muestra la sensibilidad de los tres aislamientos de *Monilinia* hacia los cinco fungicidas utilizados.

Para verificar la eficacia del fungicida, se utilizan normalmente las pruebas de germinación de esporas para verificar si hay algún indicio del desarrollo de alguna resistencia del hongo hacia el fungicida (Burpee 1997; Grindle 1981). Las pruebas in vitro no siempre predicen con exactitud el rendimiento del fungicida en el campo, porque influyen otros eventos como: viento, agua, humedad, temperatura, y insectos. Estos eventos pueden hacer que el fungicida funcione de una u otra manera (Burpee 1997; Grindle 1981).

Al realizar las pruebas de germinación de esporas se pudo determinar que los fungicidas utilizados en este experimento resultaron ser buenos para inhibir la germinación de esporas de *Monilinia*, llegando a tener un  $EC_{50}$  menor a 0,01  $\mu\text{g/ml}$ . También se pudo verificar que los tres aislamientos de *Monilinia* fueron susceptibles a los cinco fungicidas utilizados en el proyecto.

## 9. Conclusiones

- Se aisló *Monilinia* de frutos de duraznos infectados recolectados de cuatro provincias de la Sierra Ecuatoriana.
- El mejor medio de cultivo para inducir la germinación de las esporas de *Monilinia* fue el Agar Jugo V8+MA, en cambio el medio de PDA induce la formación de micelio.

- Se estableció y se estandarizó un protocolo para hacer pruebas de germinación de esporas de *Monilinia*.
- Los fungicidas más efectivos para el control de *Monilinia* fueron Mertect, Bravo y Tilt pues inhibieron la germinación de esporas en concentraciones sumamente bajas.
- Los aislamientos de *Monilinia* utilizados en este estudio resultaron ser bastante sensibles a los cinco fungicidas analizados.

## 10.Recomendaciones

- Ampliar el estudio a otras áreas incluyendo sitios donde se han usado estos fungicidas con anterioridad.
- Hacer pruebas en el campo con las concentraciones obtenidas en el laboratorio
- Para tener resultados confiables es esencial tener un respaldo molecular de la identificación de las cepas con las que se trabaja.

## 11.Bibliografía:

- Agrios, George N. 2005 Plant Pathology. United State of America: Elsevier Academic.
- APS. 2000 Plagas y enfermedades de los frutales de hueso. Madrid: Mundi- Prensa
- Beach, Joan; Muñoz, Zaida; Moret Assumpció. 2007. Caracterización morfológica y molecular de aislados de *Monilinia spp.* y pruebas de patogenicidad sobre manzana. *Agrociencias*. 42:119-12
- Burpee, L.L. 1997: Control of dollar spot of creeping bentgrass caused by an isolate of *Sclerotinia homeocarpa* resistant to benzimidazole and the demethylation-inhibitor fungicides. *Plant Disease* 81: 1259-1263.
- Caicedo Betty, Páez Tatiana y Ruales Carlos. 2003. Evaluación del crecimiento y esporulación de *Moniliophthora roreri* en diferentes medios de cultivo. E.S.P.E, 1-5.
- Cañedo, Veronica y Teresa Ames. 2004 Medios de cultivos de laboratorio "Manual de Laboratorio para el manejo de Hongos Entomatógenos". Cañedo, Veronica y Teresa Ames. Peru: Centro Internacional de la papa (CIP), 18-22.
- CASAFE, 2008. Fungicidas. Buenos Aires, 2065-2067.
- EPA.2005 "Pesticidas". Fungicidas. USA, s.f. 150-161.



- Everett K.R. y Timudo-Torrevilla O.E., 2007. In vitro fungicide testing for control of Avocado fruit rots. *New Zealand Plant Protection* 60:99-103.
- F.O. obanor<sup>1,2</sup>, M. Walter<sup>2</sup>, E.E. Jones<sup>1</sup> and M.V. Jaspers<sup>1</sup>. 2005. In vitro effects of fungicides on conidium germination of *spilocaea oleagina*, the cause of olive leaf spot. *New Zealand Plant Protection* 58:278-282
- Grindle, M. 1981: Variations among field isolates of *Botrytis cinerea* in their sensitivity to antifungal compounds. *Pesticide Science* 12: 305-312.
- Hartman, John R. 2007. Peach Fruit Diseases. *Plant Pathology*, University of Kentucky, PPFS-FR-T-09
- Hermann, D.; Gisi, U. 1994: Cross-resistance among DMI fungicides and sensitivity distributions of *Septoria tritici* populations. *Brighton Crop Prot. Conf. - Pests and Diseases*: 487-492.
- Hilber, U.W; Schuepp, H. 1996: A reliable method for testing sensitivity to *Botryotinia fuckeliana* to anilopyrimidines in vitro. *Pesticide Science* 47: 241-247.
- INIAP.1992 El cultivo del duraznero en las zonas altas del Ecuador. Quito: Manual No. 23 Programa de Fruticultura
- INTA. 2007 Monilinia un problema para la exportación de frutas de carozo argetinas. Buenos Aires: Fruticultura&Diversificación
- INTA. 2003 Enfermedades del durazno. Argentina
- INTA. 2001 Manejo de la resistencia a fungicidas. Cursos de agronomía. Buenos Aires: Universidad de la republica de Argentina
- Keith, J. Brent 1995. Fungicide resistance in crop pathogens: How can it be managed? FRAC Monograph N° 1. GCPF Brussels. UK.
- Keith, J. Brent & Derek W. Hollomon 1998. Fungicide resistance: The assessment of risk FRAC Monograph N° 2. GCPF Brussels. UK.
- Liberato, Jose R. y A. Miles. Pest and Diseases Image Library. 2 de Octubre de 2009. 23 de Septiembre de 2010 <<http://www.padil.gov.au/pbt/index.php?q=node/23&pbtID=79>>.
- Liggitt, J.; Jenkinson, P.; Parry, D.W. 1997: The role of saprophytic microflora in the development of *Fusarium* ear blight of winter wheat caused by *Fusarium culmorum*. *Crop Protection* 16: 679-685.
- Made in Argentina. 2010. 7 de Noviembre de 2010 <<http://www.made-in-argentina.com/alimentos/frutas/de%20carozo/temas%20relacionados/produccion%20mundial%20de%20durazno.htm>>.

- M. Mari, O. Leoni, R. Bernardi, F. Neri, S. Palmieri. 2007. Control of brown rot on stonefruit by synthetic and glucosinolate-derived isothiocyanates. *Postharvest Biology and Technology* 47 (2008) 61–67
- Mitidieri, M. 2006 Control de podredumbre morena en duraznero. Buenos Aires: INTA
- Mondino, Pedro. 2002 Enfermedades fúngicas del duraznero. Montevideo: Facultad de Agronomía
- Naranjo O, Carlos y Armando Sarmiento S. 1007 "Frutales Caducifolios" Campos Espinosa, Tarmin de Jesus. Historia de los frutales caducifolios en Colombia. PRODUMEDIOS, 8.
- Ogawa, Joshep M. 2000 «Plagas y enfermedades de los frutales de hueso.» Madrid: Mundi- Prensa, 8-9.
- Parker, K.C.; Sutton, T.B. 1993: Effect of temperature and wetness duration on apple fruit infection and eradicant activity of fungicides against *Botryosphaeria dothidea*. *Plant Disease* 77:181-185.
- Popenoe, Wylson. 1924 Economic Fruit-Bearing plants of Ecuador, United States National Herbarium. Vol. 24; Parte: 5.
- Society, American Phytopathological. 2002 Plagas y enfermedades del manzano y del peral. Madrid: Mundi - Prensa
- Neerlandés (Países Bajos), Teviotdale, B.L.; Gubler, W.D. 1995. Brown Rot. UC Pest Management Guidelines, University of California Statewide Integrated Pest Management Project
- W. T. Thomson. 1997. *Agricultural Chemicals*. Book IV: Fungicides. 12th edition. Thomson Publications, Fresno, CA