

EVALUACIÓN IN VITRO DE COMPATIBILIDAD DE AGROQUÍMICOS, BIOINSUMOS Y ACEITE ESENCIAL SOBRE EL CONTROL DE *Colletotrichum gloeosporioides* AISLADO DE AJÍ

IN VITRO EVALUATION OF COMPATIBILITY OF AGROCHEMICALS, BIOINPUTS AND ESSENTIAL OIL ON THE CONTROL OF *Colletotrichum gloeosporioides* ISOLATED FROM PEPPER

TOFIÑO-RIVERA, A^{1,2}; CHINCHILLA- SÁNCHEZ, K²; ORTEGA-CUADROS, M³

RESUMEN

Antecedentes: El ají (*Capsicum annuum*) es una hortaliza de gran interés en el mundo debido a su calidad condimentaria y contenido en vitamina C. En el país, las zonas de cultivo priorizadas son costa norte, zona cafetera, y Valle del Cauca aunque la producción promedio puede alcanzar 9 t/ha/año, la baja aplicación de BPM resta competitividad del sistema productivo. Adicionalmente, el diagnóstico del sector en Colombia no registra cifras de manejo fitosanitario por la escases de productos específicos al cultivo para el control de plagas y enfermedades. No obstante, un problema limitante es la incidencia de antracnosis, causada por *Colletotrichum spp*, que ocasiona grandes pérdidas antes y después de la cosecha. Por lo tanto, es necesaria la búsqueda de alternativas sostenibles para su control. **Objetivo:** validar el efecto *in vitro* del aceites esencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf y su interacción con agroquímicos y bioinsumos para el control de *Colletotrichum gloeosporioides*. **Metodos:** el aceite esencial se extrajo de *C. citratus* (mediante destilación por arrastre con vapor. Se aisló e identifico el patógeno en plántulas de ají. Se halló la concentración mínima de aceite y se realizaron ensayos *In vitro* aplicando agroquímicos y el aceite esencial para analizar su compatibilidad con Trichol® y el efecto sobre el control del patógeno. Se hicieron mediciones de crecimiento radial a los 2, 5 y 7 días, y en el último día se midió esporulación en cámara de Neubauer.

Resultados: La concentración mínima inhibitoria fue de 1000 uL. El uso de fungicidas inhiben en alto porcentaje a *C. gloeosporioides* hasta el 88%. La mezcla de agroquímicos y aceite esencial aumenta la inhibición del patógeno. El tratamiento con Trichol, controla el patógeno 100%, pero es incompatible con aceite esencial *C. citratus* y Colizym® **Conclusión:** los fungicidas aplicados fueron efectivos contra el Fitopatógeno, pero no hubo compatibilidad entre agroquímicos y bioinsumos en aplicación simultánea. Se recomiendan estudios de vida del efecto del aceite para articular su uso con bioinsumos

Palabras clave: *Capsicum annuum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, aceites esenciales, biocontrol, agroquímicos.

ABSTRACT

Background: The pepper (*Capsicum annuum*) is a vegetable of great interest in the world because of its spice quality and vitamin C content. In the country, cultivation areas prioritized are north coast, coffee area, and Valle del Cauca although the average production can reach 9 t/ha/year, the low implementation of MGP reduces the competitiveness of the productive system. Additionally, the diagnosis of the sector in Colombia does not record figures phytosanitary management by the scarcity of specific products to control crop pests and diseases. However, a limiting problem is the incidence of anthracnose caused by *Colletotri-*

¹ Investigador PhD, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA), C. I. Motilonia, Codazzi, Cesar. atofino@corpoica.org.co

² Investigador grupo CINBIOS, Universidad Popular de Cesar. kschinchilla@unicesar.edu.co

³ Microbióloga, Estudiante de Maestría en Microbiología y Bio-análisis, Universidad de Antioquia. Mailen.ortega@udea.edu.co

* Autor a quien se debe dirigir la correspondencia atofino@corpoica.org.co

chum spp, which causes large losses before and after harvest. Therefore, the search for sustainable alternatives for its control is necessary. **Objective:** To validate the *in vitro* effect of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf and its interaction with agrochemicals and bio-input to control *Colletotrichum gloeosporioides*. **Methods:** The essential oil is extracted from *C. citratus* by steam stripping distillation. It was isolated and identified the pathogen in pepper seedlings. The minimum concentration of oil was found and *in vitro* assays were performed by applying agrochemicals and essential oil for analyzing its compatibility with Trichol® and the effect on the control of the pathogen. Radial growth measurements at 2nd, 5th and 7th days were made, and on the last day, the sporulation was measured in a Neubauer chamber. **Results:** The minimum inhibitory concentration was 1000uL. The use of fungicides inhibit on a high percentage to *C. gloeosporioides* to 88%. The mixture of agrochemicals and essential oil increased inhibition of the pathogen. Trichol® treatment controls the pathogen 100%, but it is incompatible with *C. citratus* essential oil and Colizym®. **Conclusion:** Fungicides applied were effective against plant pathogen, but there was no compatibility between agrochemicals and bio-inputs in simultaneously application. It is recommended life studies of the effect of oil to joint its use with bio inputs.

Keywords: *Capsicum annuum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, essential oils, biocontrol, agrochemicals.

INTRODUCCIÓN

El ají (*Capsicum annuum*), es una hortaliza de gran interés mundial debido a su alto contenido en fenoles, flavonoides, carotenoides y ácido ascórbico, sus cualidades culinarias y beneficios a la salud (1, 2). El análisis de mercado de ají plantea alta demanda mundial y en crecimiento (3). En Colombia, las zonas de cultivo priorizadas son Costa Atlántica, Santander, zona cafetera y Valle del Cauca, cuya producción promedio puede alcanzar 9 t/ha/año, que podría incrementarse a 25 t/ha/año si se siguen buenas prácticas de manejo del cultivo (BPM) (4). El comercio mundial de ají, se basa en el cumplimiento del Codex Alimentario que asegura la obtención de productos con calidad (5). Sin embargo, el diagnóstico nacional no registra cifras de manejo fitosanitario, aunque el mal manejo del

agua, nutrientes y las condiciones climáticas, intervienen en la proliferación de plagas y enfermedades (6). Entre los limitantes de la producción están las enfermedades fúngicas, como la antracnosis, causada por *Colletotrichum spp*, que afectan el fruto (7).

En la Costa Caribe no se registran estudios que revelen la incidencia de antracnosis y las pérdidas sobre ají, tampoco se refieren tecnologías que mejoren el manejo del suelo y reduzcan estreses bióticos. Sin embargo, se ha registrado que el mayor rendimiento se consigue con aplicaciones de una fuente química completa, materia orgánica y micorrizas arbusculares (6). Igualmente, el uso de bioinsumos como *Trichoderma sp* es una alternativa viable para el control de patógenos (8). Aunque en ají, el manejo convencional es el más utilizado, la transformación productiva hacia exportación requiere la aplicación de estrategias de manejo integrado de cultivos (MIC), con inclusión de agroquímicos de baja residualidad y bioinsumos que controlen con precisión el agente causal y actúen de forma integrada con las buenas prácticas de manejo (9). En este ensayo se incluyeron resultados preliminares en Costa Atlántica, en la que se identificaron agroquímicos compatibles con bioinsumos (10).

Dentro de las alternativas sostenibles estudiadas, están los aceites esenciales y extractos vegetales, por su potencial antifúngico y antibacteriano, (11); control de enfermedades en plantas como antracnosis (12) y actividad biológica de metabolitos implicados en el control de plagas y enfermedades (13). Específicamente, el aceite de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, ha sido evaluado en el control de antracnosis y otras enfermedades (14; 13). El objetivo de esta investigación fue validar el efecto *in vitro* del aceite de *C. citratus* y su interacción con agroquímicos y bioinsumos sobre el control de *C. gloeosporioides* aislado de ají.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y extracción de aceite esencial de *C. citratus*

El material vegetal de *C. citratus* cultivado en parcelas orgánicas en el Centro de investigación Motilonia de CORPOICA, Codazzi, Cesar, (100 msnm). Se cosechó manualmente durante época seca. El aceite esencial se extrajo mediante destilación por arrastre con vapor en el laboratorio de la Universidad de Córdoba.

Aislamiento e Identificación de patógeno, producción de Inoculo y conservación de cepas

C. gloeosporioides, se aisló de muestras de plantas sintomáticas de ají. El hongo se mantuvo en agar Papa Dextrosa Agar (PDA) a 25°C y luego en suspensión de conidios a $1,7 \times 10^6$ UFC/mL en agua destilada estéril (12).

Evaluación de la actividad antifúngica del aceite esencial de *C. citratus* sobre *C. gloeosporioides* y determinación de concentración mínima inhibitoria

Se evaluó la actividad antifúngica del aceite esencial sobre el patógeno, a concentraciones de 473.5, 750 y 1000 $\mu\text{g/mL}$ de aceite añadidas a matraces con PDA fundido estéril para obtener concentraciones en $\mu\text{L/mL}$ de medio. Se utilizaron discos de agar de 6 mm de diámetro de micelio de *C. gloeosporioides* en crecimiento activo y se colocaron en el centro de cada placa de Petri, se incubaron por 7 días a 28 °C. Se midió el diámetro de la colonia y se expresó como porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (MGI) con la fórmula, $\text{MGI} (\%) = [(dc-dt)/dc] \times 100$, donde dc= es el diámetro crecimiento del micelio en el control de la caja de Petri y dt= es el diámetro crecimiento del micelio con aceite esencial. La concentración mínima inhibitoria (MIC) del aceite se considera como la concentración más baja del aceite que dio 100% de inhibición en el crecimiento del micelio.

Prueba de compatibilidad de agroquímicos y bioinsumos

La metodología se realizó siguiendo lo propuesto por Melo et al., 2015 (10) con algunas modificaciones. El patógeno se sometió a medios envenenados bajo diferentes tratamientos: insecticida (Lorsban®),

herbicida (Glifosato®), fungicidas (Colizym® y Mertect®), utilizando las dosis comerciales recomendadas. Además, se utilizó la mezcla de los agroquímicos con las dosis recomendadas y Trichol®. De la misma forma, se utilizó el aceite esencial de *C. citratus*. Posteriormente, se hizo la evaluación de compatibilidad de los agroquímicos con aceite esencial, utilizando las concentraciones recomendadas más la concentración de aceite esencial con mayor porcentaje de inhibición. Se hicieron las mezclas con Trichol® en PDA (tabla 1) y se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial y Trichol®.

Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar, con cinco repeticiones. Los datos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Tukey al 5%.

RESULTADOS

Evaluación de la actividad antifúngica del aceite esencial de *C. citratus* sobre *C. gloeosporioides* y determinación de concentración mínima inhibitoria

La concentración de 473.5 $\mu\text{g/mL}$ a los 7 días presento una inhibición de 9,8% lo que indica bajo efecto contra el patógeno. La concentración de 750 $\mu\text{g/mL}$ tuvo un efecto inhibitorio de 44,8% a los 7 días. El ensayo con la concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$ demostró una inhibición del 100% lo cual se considera como la concentración mínima inhibitoria (CMI).

Prueba de compatibilidad de agroquímicos y bioinsumos en el control de *C. gloeosporioides*

Tabla 1. Crecimiento radial del patógeno en diferentes tratamientos.

Codificación	Tratamientos	Ingrediente activo	Dosis	Crecimiento radial
I01	Lorsban® 2.5% DP	Clorpirifós	100g/m2	1,8b
H02	Roundup Brio®	Glifosato	250mL/18L	4,2d
F03	Colizym® 500 SC	Carbendazim	0,8mL/L	0,5b
F04	Mertect® 500 SC	Tiabendazol	0,9mL/L	0,5b
M05	Mezcla Agroquímicos		SA	0,4b
T06	Trichol®	Trichoderma viride	1g/L	0,0a
M07	Mezcla Agroquímicos + AE		SA + CMI	0,3ab
M08	Mezcla Agroquímicos + Trichol®		SA + Tri	0,4b
M09	Trichol® + AE		Tri + CMI	0,4ab

Prueba de Tukey ($P \leq 0,05$). SA: suma de concentraciones de agroquímicos; AE: Aceite esencial; CMI: concentración mínima inhibitoria Tri: concentración de Trichol®. Mediante las letras en la columna de crecimiento radial, se hace referencia a las diferentes significancias de acuerdo con la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

Las dosis evaluadas de los fungicidas Colizym® y Mertec®, inhibieron significativamente el patógeno con porcentajes de 100 y 86,7% respectivamente. Por otra parte, el tratamiento aplicado con Roundup Brio® no presentó efecto inhibitorio mientras que Lorsban®, inhibió el 55,2%. La mezcla de agroquímicos, aumentó el efecto inhibitorio sobre el patógeno con porcentaje del 89% mientras la mezcla de agroquímicos con aceite esencial presento un 92,9% de inhibición. El tratamiento con Trichol®, presento crecimiento del patógeno el día 2, pero en los días 5 y 7 afectó el crecimiento y evidenció una alta inhibición del 100%. La aplicación de mezcla de agroquímicos más Trichol®, mostró inhibición del patógeno del 84,93%. Sin embargo, no hubo crecimiento del bioinsumo, lo que indica incompatibilidad con los agroquímicos. De igual forma, la mezcla de Trichol® más aceite inhibe el crecimiento del patógeno pero al mismo tiempo inhibe el crecimiento del bioinsumo *Trichoderma*.

DISCUSIÓN

El tratamiento con aceite esencial *C. citratus* a una concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$, tiene efecto inhibitorio del 100% sobre *C. gloeosporioides*, resultados similares a los reportados por Vivas *et al.*, 2011 (15) sobre *Colletotrichum acutatum*. Respecto a los agroquímicos evaluados y el bioinsumo (Trichol®), se obtuvo inhibición del crecimiento de *C. gloeosporioides*, excepto el Roundup Brio®. Colizym® presentó inhibición significativa similares a las reportadas (9). La combinación de los agroquímicos y Trichol® potenció la actividad inhibitoria del patógeno, sin embargo, se presentó compatibilidad entre Trichol® con Lorsban® y Mertect®, e incompatibilidad con Colizym®, resultados similares se han registrado en sistemas productivos de fríjol en el Caribe Seco (10). En este sentido, el bioinsumo, los agroquímicos y el aceite esencial utilizados individualmente son efectivos para el control de *C. gloeosporioides*. Aunque, no hay compatibilidad entre el aceite y el Trichol®, situación que amerita atención e implementación de estudios *in vitro* sobre el patógeno y en el cultivo,

que propicien la compatibilidad de estos productos naturales manipulando el momento de aplicación de acuerdo al tiempo de acción y/o vida media de cada compuesto activo; dado los registros de toxicidad de fungicidas, insecticidas y herbicidas utilizados (8).

CONCLUSIÓN

A pesar que los agroquímicos evaluados (excepto Roundup Brio®), el aceite esencial *C. citratus* y Trichol®, son efectivos en el control de *C. gloeosporioides* cuando son utilizados individualmente, el uso combinado con Trichol® no resultó compatible, pues inhiben su crecimiento; lo cual sugiere que la implementación de una estrategia MIC requiere un conocimiento de los tiempo de vida media de los metabolitos implicados en la bioactividad.

REFERENCIAS

- Zhuang Y, Chen L, Sun L, Cao J. Bioactive characteristics and antioxidant activities of nine peppers. *J Funct Foods*. 2012; 4(1): 331-338
- Quipo-Muñoz FE, Rojas-Pérez JA, Ramírez-Muñoz AM, Ordoñez-Santos LE. Cambios en la Vitamina C y el Color durante la Cocción del Pimentón Verde (*Capsicum Annuum* L). *Tecno Lógicas*. 2013; 141-150
- Ministerio de comercio industria y turismo, Asohfrucol. Plan de Negocios de Ají, [Internet]. Bogota: Programa de Transformación Productiva. 2013. [Citado 20 de noviembre de 2015]. Disponible en: <https://www.ptp.com.co/documentos/PLAN%20DE%20NEGOCIO%20AJ%20C3%8D%20diciembre.pdf>
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia. Apuesta Exportadora Agropecuaria [Internet]. Bogota: MADR. 2006. [Citado 20 de noviembre de 2015]. Disponible en: 207.239.251.110:8080/jspui/bitstream/11348/6004/1/006.pdf
- Organización mundial de la salud. Las nuevas normas de las Naciones Unidas sobre inocuidad de los alimentos y nutrición beneficiarán los consumidores. [Internet]. Ginebra: OMS. 2013. [Citado 15 de diciembre de 2015]. Disponible en: http://www.who.int/mediacentre/news/notes/2013/codex_alimentarius_20130708/es
- Rodríguez Araujo EA, Bolaños Benavides MM., Menjivar Flores JC. Efecto de fertilización en la nutrición y rendimiento de ají. *Acta Agron*. 2010; 59(1): 55-64
- Harp TL, Pernezny K, Lewis-Ivey ML, Miller SA, Kuhn PJ, Datnoff L. The etiology of recent pepper anthracnose outbreaks in Florida. *Crop Protection*. 2008; 27: 1380-1384
- Martínez B, Infante Danay, Reyes Yusimy. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Rev. Protección Veg*. 2013; 28(1): 1-11
- Gaviria-hernández V, Patiño-hoyos LF, Saldarriaga-cardona A. Evaluación *in vitro* de fungicidas comerciales para el control de *Colletotrichum* spp en mora de castilla. *Corpoica cienc. tecnol. Agropecu*. 2013; 14(1): 67-75
- Melo A, Ariza P, Lissbrant S, Tofiño, A. Evaluation of agrochemicals and bioinputs for sustainable bean management on the Caribbean coast of Colombia. *Agron. Colomb*. 2015; 33(2): 203-211
- Nguefack J, Leth V, Amvam-Zollo PH, Mathur SV. Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for

- controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. *Int J Food Microbiol.* 2004; 94: 329-334
12. Hong J K, Yang HJ, Jung H, Yoon DJ, Sang MK, Jeun Y. Application of Volatile Antifungal Plant Essential Oils for Controlling Pepper Fruit Anthracnose by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Pathol J.* 2015; 31(3): 269-277
 13. Pérez-Leal R, Soto-Parra JM, Villa-Martínez A, Morales-Morales HA, Martínez-Escudero E, Basurto-Sotelo M. Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agron* 2015; 64: 194-205
 14. Anaruma ND, Schmidt FL, Duarte MCT, Figueira GM., Delarmelina C, Benato EA et al. Control of *Colletotrichum gloeosporioides* (penz.) Sacc. In yellow passion fruit using *Cymbopogon citratus* essential oil. *BJM.* 2010; 41(1): 66-73
 15. Vivas M, Gomes D, Pereira AJ, Silva JM. Inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum acutatum* por extrato aquoso e óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf e *Corymbia citriodora* Hill & Johnson. *Biologia e farmacia.* 2011; 05(02): 83-88