

Tolerancia *in-vitro* de *Lasiodiplodia theobromae* aislado de *Musa paradisiaca* y *Rubus niveus* a cinco fungicidas de diferente modo de acción

In-vitro tolerance of *Lasiodiplodia theobromae* isolated from *Musa paradisiaca* and *Rubus niveus* to five fungicides of different mode of action

Luis Fernando Jácome Quiroz¹, Carlos Andrés Bolaños Carriel^{1,2}, Eliana Granja Guerra¹, Tannya Elizabeth Llanos Proaño¹, Antonio León Reyes^{1,3}, Noelia Nathaly Barriga Medina³

¹Universidad Técnica de Cotopaxi, Ecuador.

²Universidad Central del Ecuador, Ecuador

³Universidad San Francisco de Quito, Ecuador

Autor de correspondencia: luis.jacome1570@utc.edu.ec

Recibido: 16/02/2024. Aceptado: 10/04/2024

Publicado el 11 de julio de 2024

Resumen

La enfermedad muerte regresiva es causada por el fitopatógeno *Lasiodiplodia theobromae* que afecta la producción de los agricultores; se caracteriza por su capacidad de sobrevivir a través de picnidios y clamidosporas en el suelo y en residuos de cultivos, se dispersa hacia tejidos vegetales para permanecer endófito hasta que el hospedero se vuelve vulnerable por daños mecánicos o deficiencia de nutrientes que conlleva a la muerte de ramas jóvenes, momificación y pudrición de frutos. Debido al modo persistente de *L. theobromae*, la investigación se centró en la depuración simultánea de cepas del fitopatógeno aisladas de *Musa paradisiaca* y *Rubus niveus* con el objetivo de detectar la inhibición de crecimiento micelial frente a fungicidas de diferentes modos de acción, estableciendo por medio de una escala de toxicidad a una de las concentraciones 10; 1; 0,1; 0,01; y 0,001 µg mL⁻¹ como eficiente en propiconazol, mancozeb, iprodione, difenoconazol y ciproconazol, respectivamente en su orden. Existió un 100% de inhibición de crecimiento con propiconazol y difenoconazol a una concentración de 10 µg mL⁻¹ que les permite ser efectivos en el control del fitopatógeno, mientras que mancozeb, iprodione y ciproconazol fueron inofensivos para *L. theobromae*, debido a que, no interrumpieron el crecimiento micelial en la investigación.

Palabras clave: cepas, control, fungicidas, depuración, picnidios.

Abstract

The dieback disease is caused by the phytopathogen *Lasiodiplodia theobromae* that affects farmer's production; it is characterized by its ability to survive through pycnidia and chlamydospores in soil and crop residues, it spreads to plant tissues to remain endophytic until the host crop becomes vulnerable by mechanical damage or nutrient deficiency leading to death of young branches, mummification and fruit rot. Due to the persistent mode of *L. theobromae*, the research focused on the simultaneous depuration of strains of the phytopathogen isolated from banana and raspberry with the objective of detecting the mycelial growth rate against fungicides of different mode of action, establishing by means of a toxicity scale at one of the concentrations 10; 1; 0,1; 0,01 and 0,001 µg mL⁻¹ as efficient with propiconazole, mancozeb, iprodione, difenoconazole and cyproconazole, respectively in their order. There was 100% growth inhibition with propiconazole and difenoconazole at a concentration of 10 µg mL⁻¹ that allows them to be effective fungicides in the control of the phytopathogen, while mancozeb, iprodione and cyproconazole were harmless to *L. theobromae*, because they allowed its mycelial growth in the research.

Keywords: strains, control, fungicides, depuration, pycnidia.

Introducción

El fitopatógeno *L. theobromae* pertenece a la familia *Botryosphaeriaceae* que comprende varios hongos necrótrofos; su temperatura de crecimiento es de 15 °C mínimo, 28 °C óptimo y 40 °C máximo, lo que le permite desarrollar su ciclo biológico en una amplia serie de condiciones térmicas; además es cosmopolita con un rango diverso de hospederos que habitan en regiones tropicales y subtropicales. Es un microorganismo endófito en tejidos vegetales sanos (Moreira *et al.*, 2021), que logra generar daños cuando el hospedero se encuentra debilitado y pierde su vigor debido a heladas o deficiencia nutricional. La presencia de este fitopatógeno puede desencadenar diversos síntomas en las plantas afectadas, como muerte descendente en brotes y ramas (Rusin *et al.*, 2020), tizón y clorosis foliar, pudrición de raíz en plantas leñosas y marchitamiento de los frutos, generando pérdidas económicas en cultivos como mango, aguacate, papaya, plátano, uva, cítricos y duraznos (Flores *et al.*, 2021).

La sobrevivencia de *L. theobromae* es a través de un modo de alimentación saprófita en forma de picnidios en el suelo y en residuos de cosecha, incluso persiste como clamidosporas para resistir en tejidos vegetales infectados. En condiciones favorables las esporas son liberadas por el viento o diseminadas por herramientas no desinfectadas. En análisis *in vitro* en laboratorio, los micelios de *L. theobromae* inicialmente son blancos, luego cambian a una coloración ceniza o gris (Moreira *et al.*, 2021) y finalmente adquieren un tono oscuro, además forma picnidios de color negro de 55 µm de ancho. Las hifas son septadas formando conidióforos cortos que son capaces de crear conidios que miden 15 µm de ancho y 23 a 28 µm de largo.

El cultivo de *Rubus niveus* (mora) en Ecuador tiene una superficie de 5247 hectáreas en monocultivo y en asociación con otras especies vegetales y su producción anual es de 11869 toneladas, siendo la provincia de Tungurahua la de mayor producción con el 70% de la superficie cultivada (Feicán *et al.*, 2019). Además llegó a las Islas Galápagos y con el paso del tiempo ésta planta se considera como invasora por su capacidad de adaptarse a varios tipos de suelo (Barriga, 2020); sin embargo *R. niveus* está expuesto a pudrición del fruto, antracnosis, mildiu polvoso y veloso entre otras enfermedades que alteran su calidad y rentabilidad.

El banano en el Ecuador tiene una superficie de 165080 hectáreas, genera un ingreso cercano a los 3700 millones USD. La producción de banano se realiza en las provincias de Los Ríos, El Oro, Manabí, Guayas y en pequeñas superficies de Esmeraldas, Santo Domingo de Los Tsáchilas, Santa Elena, Sucumbíos, Napo y Orellana (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias [INIAP], 2021). Contribuye económicamente con el 35% del producto interno bruto (PIB) agrícola nacional y es preferido por países de la Unión Europea (Prado y Garzón, 2022).

La resistencia hacia los fungicidas constituye una disminución de la sensibilidad de un hongo frente a un ingrediente activo específico, gracias a la capacidad que tienen los microorganismos fúngicos para adaptarse a distintas condiciones desfavorables que les permite sobrevivir y multiplicarse. Un fitopatógeno desarrolla resistencia debido a la variabilidad genética de la población del hongo, el cual, llega a tener una mayor tolerancia a los fungicidas para reproducirse; creando un incompleto control de un determinado fungicida y dejando en incertidumbre su influencia en el desarrollo de un microorganismo fúngico (Dong *et al.*, 2022) y (Fungicide Resistance Action Committee [FRAC], 2019).

La ejecución de bioensayos *in-vitro* con aislamientos susceptibles a diferentes concentraciones con productos químicos o naturales, es crucial para establecer un control no solo preventivo, sino curativo a los síntomas asociados a la muerte regresiva y de esa manera asegurar el desarrollo fenológico de diversos cultivos de clima tropical y subtropical, con el propósito de reducir las grandes pérdidas económicas que provoca *L. theobromae*. Previamente a la evaluación de los fungicidas se realizó una depuración simultánea de cepas del fitopatógeno aisladas de los cultivos de *Musa paradisiaca* y *Rubus niveus*.

Los objetivos fueron determinar el porcentaje de inhibición de crecimiento micelial en los distintos aislados de *L. theobromae* al ser expuestos a propiconazol, mancozeb, iprodione, difenoconazol y ciproconazol con la técnica de dilución seriada en PDA (Abdulkadir y Tae, 2022) a 10; 1; 0,1; 0,01 y 0,001 µg mL⁻¹, para establecer la concentración eficiente de los ingredientes activos utilizados en los subcultivos desarrollados, mediante una clasificación a escala de toxicidad (Romero *et al.*, 2022).

Materiales y métodos

Aislados del fitopatógeno

En la investigación se utilizaron cepas de *L. theobromae* que fueron caracterizadas según el estudio de (Barriga, 2020) a partir de muestras foliares de mora (*R. niveus*) considerada como especie invasora y de muestras del fruto de banano (*M. paradisiaca*), según lo detallado en la Tabla 1. Las cepas se encontraban anticipadamente almacenadas en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Universidad San Francisco de Quito.

Área de estudio

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología Vegetal de la Universidad Técnica de Cotopaxi, ubicada en el cantón Latacunga, Ecuador, cuyas coordenadas geográficas son: 0° 59' 57" latitud sur, 78° 37' 23" longitud oeste, a una altitud de 2727 m.s.n.m.

Tabla 1. Cepas aisladas del fitopatógeno

Nº	Especie	Origen vegetal	Nº de acceso NCBI
1	<i>L. theobromae</i>	<i>Rubus niveus</i>	OQ879511
2	<i>L. theobromae</i>	<i>Musa paradisiaca</i>	L05032024

Fuente: (National Center for Biotechnology Information [NCBI], 2022)

Subcultivos del fitopatógeno

Antes de la implementación del ensayo; desde las cepas caracterizadas se realizó la depuración simultánea del fitopatógeno descrita en la Figura 1 y Tabla 2, para su identificación morfológica de acuerdo a Moreira *et al.* (2021). El aislamiento *in-vitro* inició siguiendo el protocolo de González *et al.* (2023) y se utilizó el medio de cultivo PDA (Potato Dextrosa Agar). El agar se vertió en cajas Petri esterilizadas de 90 mm de diámetro por 16,5 mm de alto, luego de enfriarse el medio de cultivo se repicaron discos miceliales de 0,5 cm de diámetro para colocarlos en el centro de las cajas Petri con nuevo medio de cultivo. Se añadió una dosis de 2000 microlitros de gentamicina por cada 100 mL de PDA para prevenir el crecimiento de bacterias contaminantes en cada uno de los subcultivos.

Previo a sembrar el fitopatógeno para purificación y con la finalidad de reducir el pH del medio de cultivo, se agregaron diferentes dosis en micro litros de ácido cítrico ($C_6H_8O_7$) en cada subcultivo, como se detalla en la Tabla 2; donde se determinó un efecto bacteriostático a una dosis de 200 μ L de $C_6H_8O_7$, bloqueando el desarrollo de bacterias, que contribuyó a la depuración de las cepas, asegurando que *L. theobromae* se desarrolle en el medio de cultivo PDA. Después de añadir ácido cítrico, las cajas Petri fueron incubadas a 28 °C por un período mínimo de 7 días para que el fitopatógeno desarrolle su fase micelial.

Tolerancia *in-vitro*

Se evaluó el desarrollo de los subcultivos de *L. theobromae* utilizando la técnica de dilución en agar con cinco fungicidas, que se especifican en la Tabla 3. El protocolo utilizado fue de (Abdulkadir y Tae, 2022) con modificaciones de extracción y siembra en medio de cultivo PDA. A través del uso de filtros de jeringa se realizó una esterilización a cada ingrediente activo a concentraciones de 10; 1; 0,1; 0,01 y 0,001 μ g mL⁻¹ que fueron calculadas de acuerdo a la concentración comercial de cada producto químico, mediante la fórmula $C1 * V1 = C2 * V2$. Donde **C1**: concentración inicial; **V1**: volumen inicial; **C2**: concentración final; **V2**: volumen final; para crear condiciones fungicidas y afectar a cada medio de cultivo que contenía al fitopatógeno (Baldiga *et al.*, 2013).

Tabla 2. Depuración simultánea de los subcultivos de *L. theobromae*

Subcultivo Nº	Ácido cítrico μ L (micro litros)	Depuración simultánea de cepas	
		Mora	Banano
1	0	x	✓
2	0	x	✓
3	0	x	✓
4	0	x	x
5	0	✓	x
6	500	x	x
7	300	x	✓
8	250	x	x
9	400	✓	x
10	100	x	x
11	200	✓	✓
12	200	✓	✓

x = infestado de bacterias.

✓ = libre de bacterias.

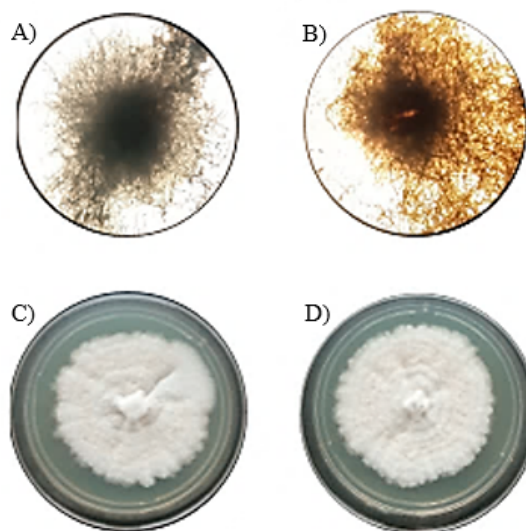


Figura 1. Picnidios y cepas de *L. theobromae* libres de contaminación. A) picnidio en cepa de mora, B) picnidio en cepa de banano, C) cepa purificada de mora y D) cepa purificada de banano

Los picnidios se obtuvieron a los 80 días del primer subcultivo y permitieron conseguir las cepas purificadas.

Tabla 3. Fungicidas evaluados

Tratamiento	Ingrediente activo	Concentración comercial (g L ⁻¹)	Concentración evaluada (µg mL ⁻¹)
1			10
2	F1. Propiconazol		1
3	(2RS,4RS;2RS,4SR)-1-[2-(2,4-diclorofenil)-	250	0,1
4	4-propil-1,3-dioxolan-2-ilmetil]-1H-1,2,4-		0,01
5	triazol		0,001
6			10
7	F2. Mancozeb		1
8	Complejo (polimérico) de etilenbis	600	0,1
9	(ditiocarbamato) de manganeso con sal de		0,01
10	zinc		0,001
11			10
12	F3. Iprodione		1
13	3-(3,5-diclorofenil)-N-isopropil-2,4-	500	0,1
14	dioximidazolidina-1-carboxamida		0,01
15			0,001
16			10
17	F4. Difenconazol		1
18	3-cloro-4-((2RS,4RS;2RS,4SR)-4-metil-2-	250	0,1
19	(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil)-1,3-dioxolan-2-		0,01
20	il)fenilo Éter de 4-clorofenilo.		0,001
21			10
22	F5. Ciproconazol		1
23	(2RS,3RS;2RS,3SR)-2-(4-clorofenil)-3-	100	0,1
24	ciclopropil-1-(1H-1,2,4-triazol-1-il)butan-		0,01
25	2-ol		0,001
26	Control Propiconazol		0,00
27	Control Mancozeb		0,00
28	Control Iprodione		0,00
29	Control Difenconazol		0,00
30	Control Ciproconazol		0,00

Nombres químicos de los fungicidas extraídos de <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/> (Lewis *et al.*, 2016).

La siembra del fitopatógeno consistió en colocar discos de micelio con el lado fúngico hacia abajo en el medio PDA, las cajas Petri con fungicida fueron utilizadas como tratamientos repitiéndolos 3 veces y se almacenaron en incubadora a 28 °C, mientras que, el medio de cultivo de 0 µg mL⁻¹ sirvió como control.

En los subcultivos con distintas concentraciones de fungicidas se realizó la medición del radio de la colonia desde el primer día. La inhibición de crecimiento de micelio en cada concentración se valoró comparando el radio de la colonia en el tratamiento con PDA más fungicida y el control

sin fungicida, mediante la fórmula descrita por Romero *et al.* (2022): $I \% = [(C-T) \div C] \times 100$. Donde **I %**: Porcentaje de inhibición de crecimiento de *L. theobromae*; **C**: Radio de la colonia en el control (sin fungicida); **T**: Radio de la colonia en el tratamiento (con fungicida). La fórmula cuantificó la reducción porcentual en el crecimiento de micelio debido a la presencia del fungicida. Con los porcentajes de inhibición obtenidos se determinó la toxicidad mediante una escala de clasificación (Romero *et al.*, 2022), donde el porcentaje inferior al 30% se considera inofensivo (no controlado) para el fitopatógeno e implica un impacto limitado de inhibición,

mientras que, un rango entre 30 y 75% es ligeramente tóxico (parcialmente controlado). Si el porcentaje de inhibición va entre 75 y 90% es considerado como moderadamente tóxico (altamente controlado) y finalmente si existe el 100% de inhibición, el ingrediente activo es tóxico (control total) para *L. theobromae*.

Análisis estadístico

El experimento se realizó bajo un Diseño Completamente al Azar (DCA) con arreglo factorial (AxBxC) (2 cepas de *L. theobromae* x 5 fungicidas x 5 concentraciones). El método de diferencia mínima significativa (LSD) fue usado para separar las medias de los tratamientos. Todos los análisis fueron realizados con el software SAS (Statistical Analysis System).

Resultados

Tolerancia de *L. theobromae* a los fungicidas de diferente modo de acción

El valor obtenido de ($p < 0,0001$) en las interacciones, tanto del crecimiento del radio de colonia como del porcentaje

de inhibición; denotó el rechazo de la hipótesis nula de que ningún fungicida influye en el crecimiento del fitopatógeno (Tabla 4). Finalmente se observó que dos ingredientes activos con la concentración más alta ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) provocaron un mínimo desarrollo de radio de colonia (1 mm) en *L. theobromae*, (Figuras 2 a 6).

Los resultados del análisis de varianza para las interacciones dobles (fungicida * cepa) y (fungicida * concentración) y la interacción triple (fungicida * cepa * concentración), tanto para el radio de colonia como el porcentaje de inhibición, demostraron significancia estadística, deduciendo que existieron ingredientes activos capaces de inhibir el crecimiento de micelio de *L. theobromae* en medio de cultivo.

Eficacia de los tratamientos

Solo la concentración de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ presentó el 100% de inhibición de crecimiento utilizando propiconazol y difenoconazol (Tabla 5), los demás tratamientos tuvieron un rango por debajo de la recomendación comercial, $< 75\%$ (amplitud 2 - 64%).

Tabla 4. Análisis de varianza para el radio de colonia y porcentaje de inhibición.

Fuente	gl	Radio de colonia pr > F	% de Inhibición pr > F
Total	149		
Fungicida	4	< 0,0001	< 0,0001
Cepa	1	< 0,0001	< 0,0001
Concentración	4	< 0,0001	< 0,0001
Fungicida x cepa	4	0,0068	0,0133
Fungicida x concentración	16	< 0,0001	< 0,0001
Cepa x concentración	4	0,091	0,1577
Fungicida x cepa x concentración	16	0,0047	0,011
Error	100		

Tabla 5. Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial

Tratamiento	Concentración ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Rango de % Inhibición	Clasificación	Denominación en <i>L. theobromae</i>
	10	100	Tóxico	Control total
Propiconazol	1	50 – 64	Ligeramente tóxico	Parcialmente controlado
	0,1	14 – 61	Ligeramente tóxico	Parcialmente controlado
	0,01	14 – 24	Inofensivo	No controlado
	0,001	7 – 10	Inofensivo	No controlado
	10	7 – 13	Inofensivo	No controlado
Mancozeb	1	10 – 22	Inofensivo	No controlado
	0,1	3 – 9	Inofensivo	No controlado
	0,01	5 – 11	Inofensivo	No controlado
	0,001	2 – 7	Inofensivo	No controlado
	10	11 – 51	Ligeramente tóxico	Parcialmente controlado
Iprodione	1	9 – 16	Inofensivo	No controlado
	0,1	4 – 18	Inofensivo	No controlado
	0,01	5 – 18	Inofensivo	No controlado
	0,001	5 – 10	Inofensivo	No controlado
	10	100	Tóxico	Control total
Difenoconazol	1	45 – 59	Ligeramente tóxico	Parcialmente controlado
	0,1	15 – 37	Ligeramente tóxico	Parcialmente controlado
	0,01	10 – 29	Inofensivo	No controlado
	0,001	3 – 19	Inofensivo	No controlado
	10	16 – 39	Ligeramente tóxico	Parcialmente controlado
Ciproconazol	1	6 – 35	Ligeramente tóxico	Parcialmente tóxico
	0,1	8 – 32	Ligeramente tóxico	Parcialmente tóxico
	0,01	7 – 28	Inofensivo	No controlado
	0,001	2 – 21	Inofensivo	No controlado

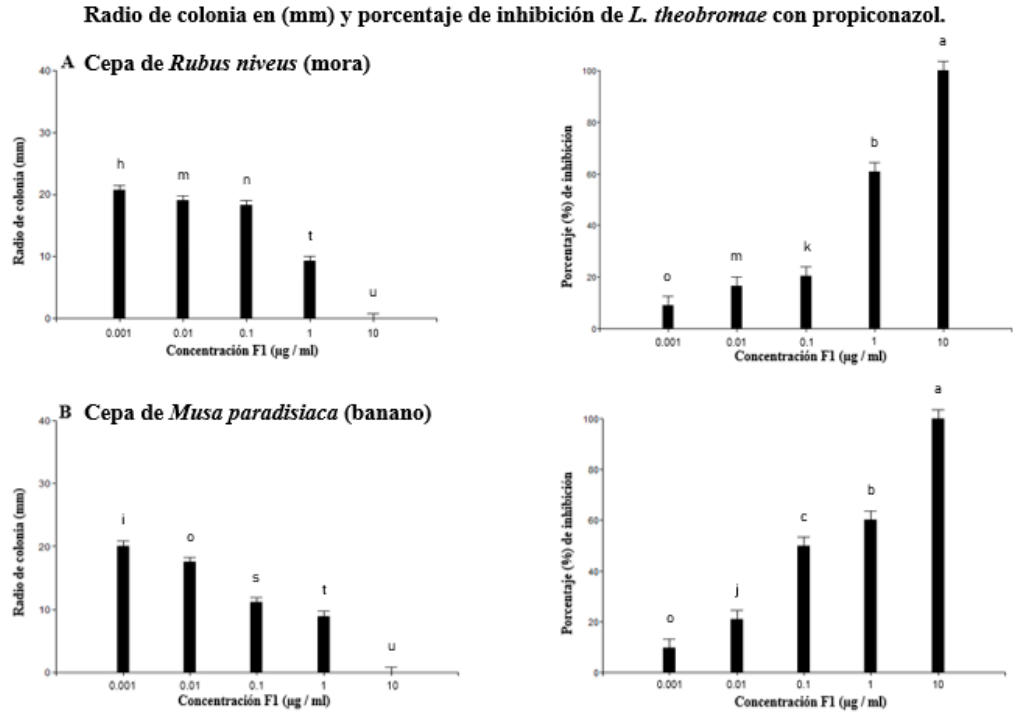


Figura 2. Control de cepas de *L. theobromae* con propiconazol. Medias seguidas por la misma letra no representan diferencias estadísticas

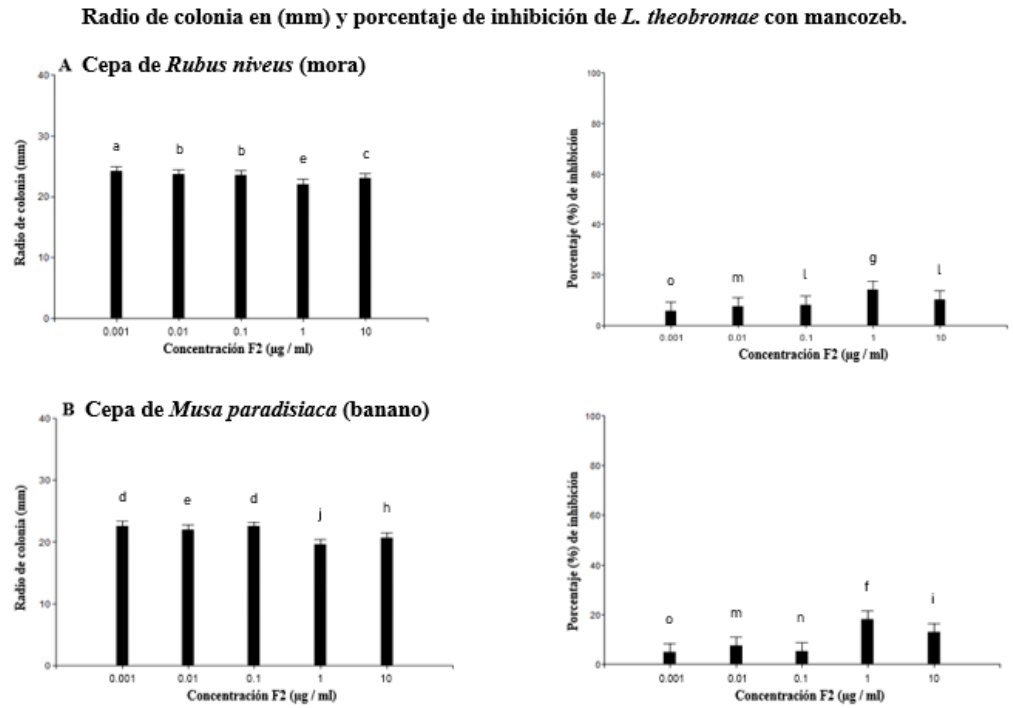


Figura 3. Ausencia de control de cepas de *L. theobromae* con mancozeb. Medias seguidas por la misma letra no representan diferencias estadísticas

Radio de colonia en (mm) y porcentaje de inhibición de *L. theobromae* con iprodione.

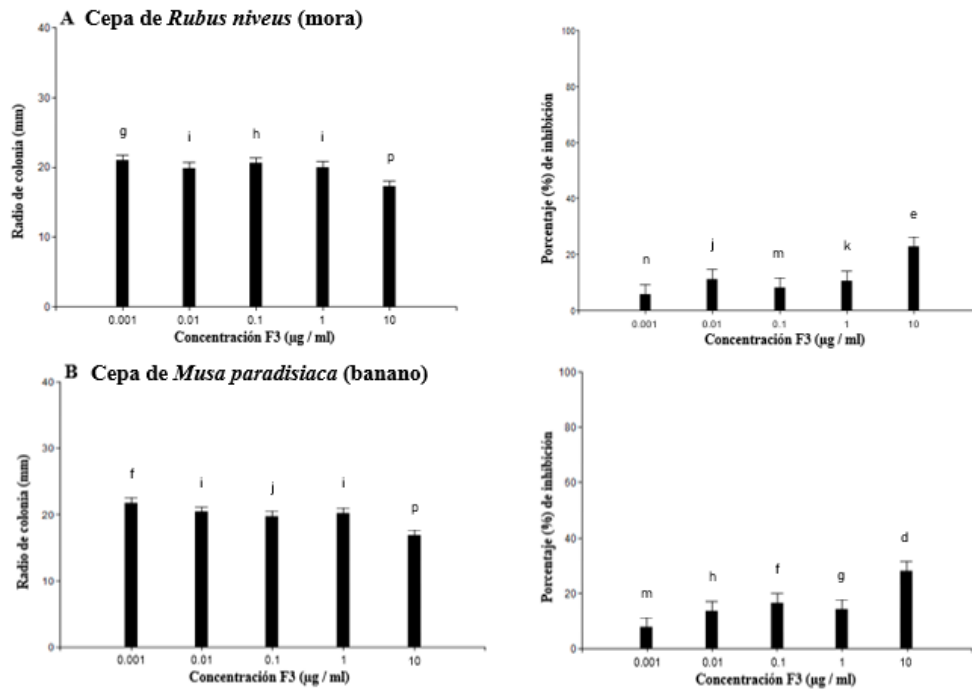


Figura 4. Ausencia de control de cepas de *L. theobromae* con iprodione. Medias seguidas por la misma letra no representan diferencias estadísticas

Radio de colonia en (mm) y porcentaje de inhibición de *L. theobromae* con difenoconazol.

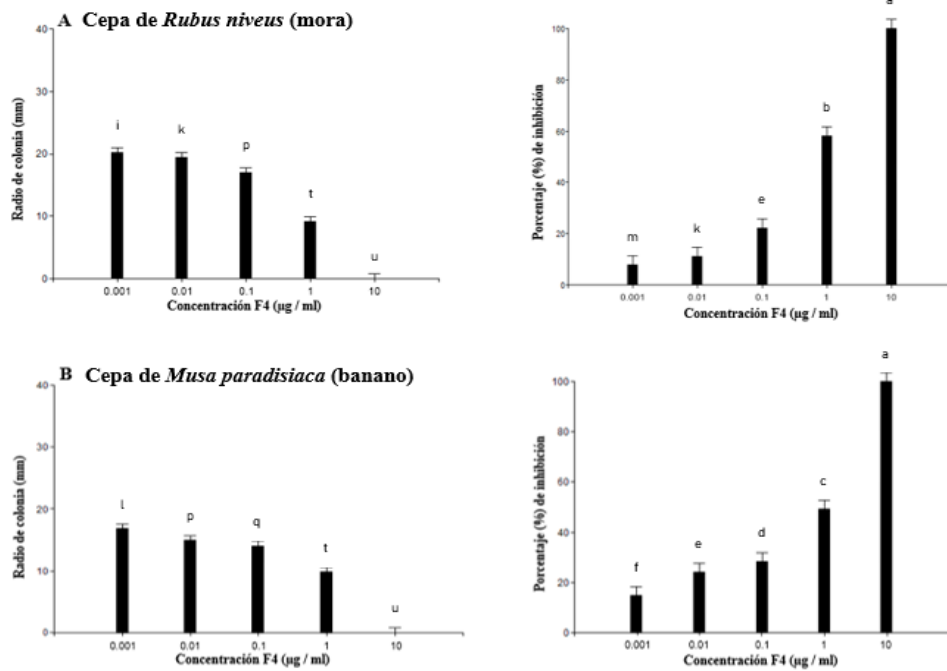


Figura 5. Control de cepas de *L. theobromae* con difenoconazol. Medias seguidas por la misma letra no representan diferencias estadísticas

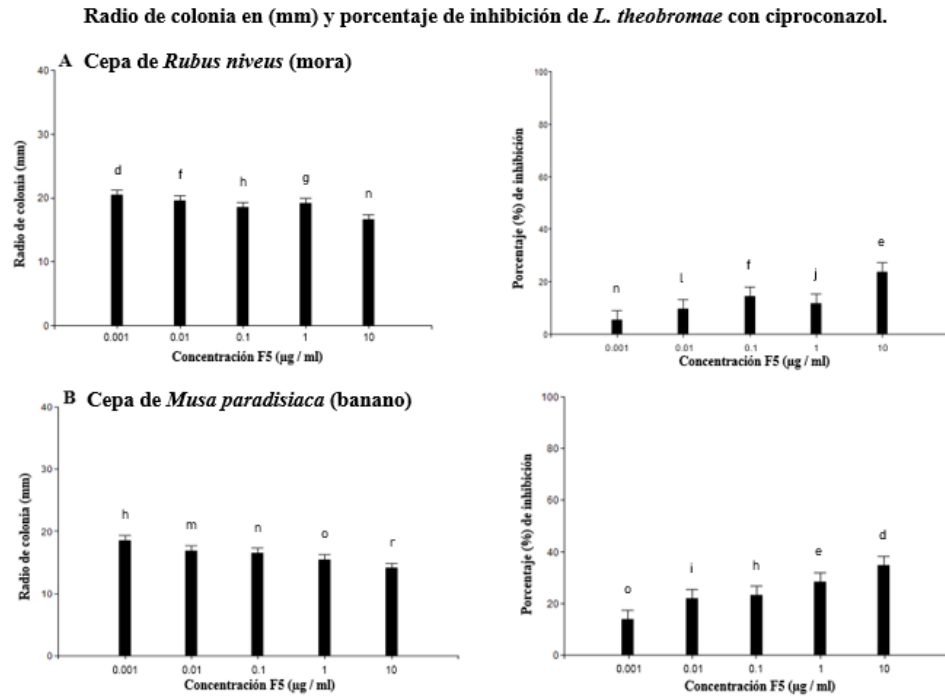


Figura 6. Ausencia de control de cepas de *L. theobromae* con ciproconazol. Medias seguidas por la misma letra no representan diferencias estadísticas

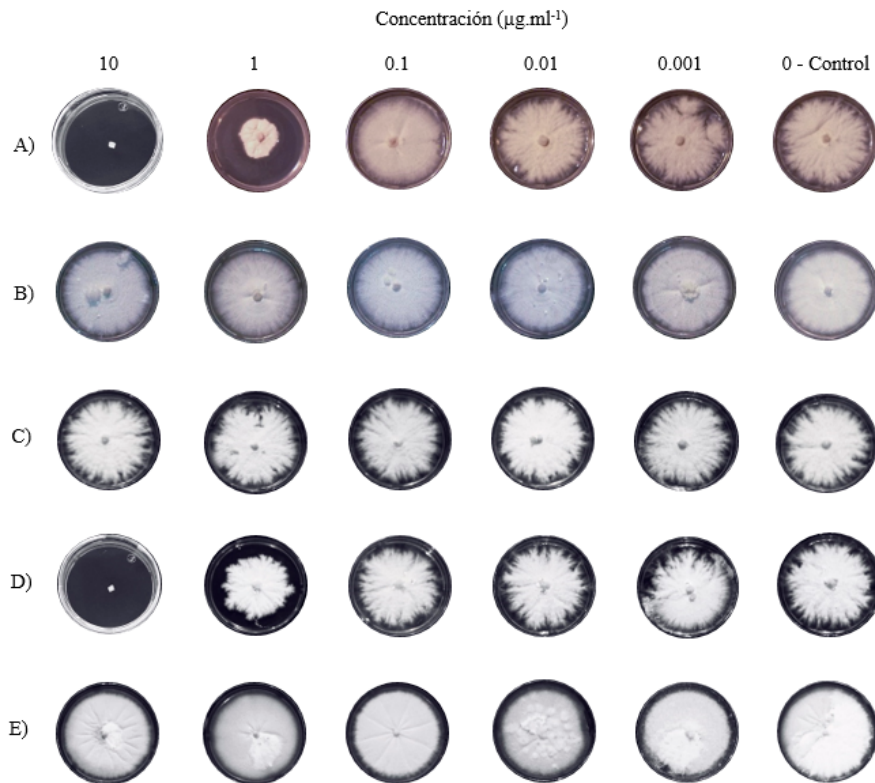


Figura 7. Cepa de mora de *L. theobromae* en PDA con fungicida y control. A) Propiconazol; B) Mancozeb; C) Iprodione; D) Difenconazol; E) Ciproconazol

Discusión

Con la morfología de *L. theobromae* del estudio de Jiménez *et al.* (2022) y Moreira *et al.* (2021) se corroboró que las cepas utilizadas pertenecen a la misma especie del fitopatógeno y el crecimiento en medio de cultivo registrado en esta investigación (Figuras 7 y 8), es similar a los análisis *in-vitro* realizados por Alforja *et al.* (2021) donde los micelios son de coloración blanquecina y de Morales-Pizarro *et al.* (2024) que controló *L. theobromae* con sulfato de cobre pentahidratado a concentración de 0,35 mL por cada 100 mL de PDA, teniendo semejanza con el control alcanzado en ésta investigación utilizando 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de propiconazol y difenoconazol en las cepas de banano y mora.

Los aislados del fitopatógeno de mora y banano mostraron tolerancia *in-vitro* a tres ingredientes activos (mancozeb, iprodione y ciproconazol), a concentraciones de 10; 1; 0,1; 0,01 y 0,001 $\mu\text{g mL}^{-1}$ permitiendo su crecimiento micelial, mientras que, dos fungicidas (propiconazol y difenoconazol) a concentración de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ fueron tóxicos por provocar inhibición total de crecimiento (Figuras 2 y 5), que se asemejan al estudio de Murciano *et al.* (2021) que controló al ascomiceto *Cladosporium ramotenellum* con propiconazol a 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$. La concentración tóxica descubierta en éste análisis de laboratorio tiene semejanza en las investigaciones de Khuong *et al.* (2023) y Olmedo *et al.* (2023) donde *Trichoderma asperellus* y el vapor de timol a concentración de 16 mg L⁻¹, impidieron el desarrollo de *L. theobromae* en

medios de cultivo.

El fitopatógeno puede variar su adaptabilidad frente a un determinado ingrediente activo y una evidencia de aquello fue en el estudio de Bachkar *et al.* (2021) realizado en laboratorio, donde mancozeb inhibió el crecimiento de *Fusarium solani* a una concentración de 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a pesar de que ambos son ascomicetos.

Inhibición de *L. theobromae* frente a otras concentraciones

En un estudio de Leal *et al.* (2023) para controlar otros fitopatógenos fúngicos se evidencian los mismos principios de control con propiconazol y difenoconazol utilizados en ésta investigación, debido a que, a través del uso de extracto etanólico de *Croton zehntneri*, *Lippia lasiocalycina* y *Copaifera luetzelburgii* a concentraciones de 2; 20; 200 y 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para evaluar el crecimiento de micelio en *Fusarium sacchari*, *F. udum*, *Colletotrichum siamense*, *C. truncatum*, *L. theobromae* y *Thielaviopsis ethacetica*; dónde se demostró que la concentración de 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ del extracto provocó el 100% de inhibición de crecimiento micelial.

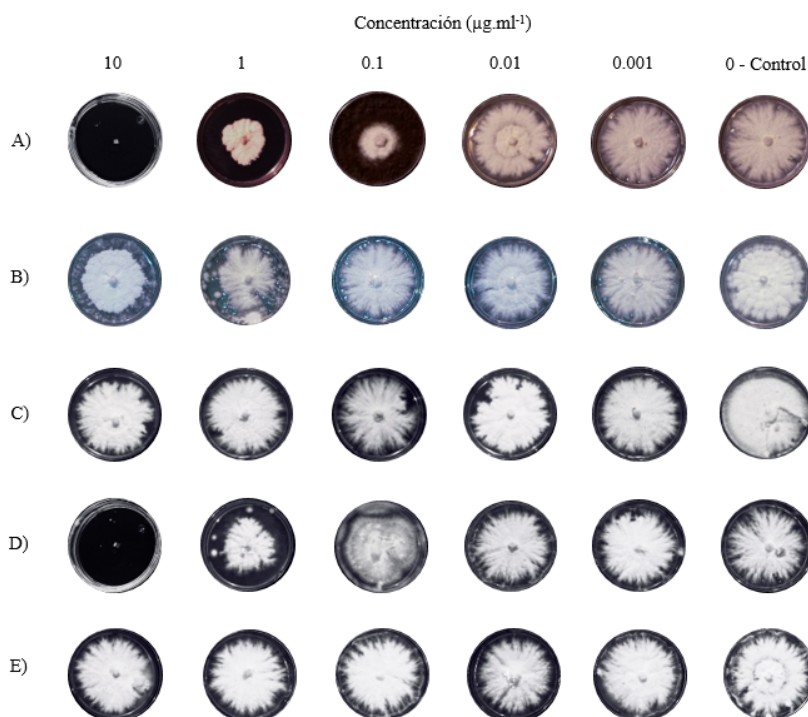


Figura 8. Cepa de banano de *L. theobromae* en PDA con fungicida y control. A) Propiconazol; B) Mancozeb; C) Iprodione; D) Difenoconazol y E) Ciproconazol

Un ensayo realizado para controlar *L. theobromae* de Rusin *et al.* (2020) utilizando 300 g kg⁻¹ de ingrediente activo, impidió el crecimiento de micelio con mancozeb, mientras que, el mismo fitopatógeno logró tolerar a difenoconazol a 3 g L⁻¹. En ésta investigación sucedió lo contrario a los resultados mencionados, dado que, ninguna concentración de mancozeb controló al fitopatógeno, pero difenoconazol a 10 µg mL⁻¹ fue suficiente para inhibir el crecimiento de micelio, éste comportamiento surgió debido a que, *L. theobromae* en la investigación solamente desarrolló hifas y micelios que mancozeb no inhibe, por su mecanismo de acción que solo controla la esporulación de un fitopatógeno, por otra parte, difenoconazol es capaz de inhibir la síntesis de ergosterol para bloquear el desarrollo fúngico (Lewis *et al.*, 2016).

En un control de Zhong *et al.* (2021) hubo inhibición de crecimiento micelial con 0,5 g de mezcla granular generadora de dióxido de cloro (ClO₂) sin frutos cítricos, por otra parte, los investigadores utilizaron tratamientos que incluían frutos, en los que, consiguieron bloquear por completo el desarrollo de discos de micelio aplicando 2 g de mezcla granular. Además, el dióxido de cloro colocado a 43,7 µg mL⁻¹ durante 24 horas no permitió que *L. theobromae* se desarrolle en los tratamientos colocados en PDA; éstos resultados se asemejan parcialmente con la dosis inhibitoria de propiconazol y difenoconazol que se ejecutó en este ensayo.

El análisis *in vitro* de Valle *et al.* (2019) evaluó la sensibilidad de *L. theobromae* con iprodione y tiabendazol; con iprodione a 20 µg mL⁻¹ no logró una inhibición de crecimiento de micelio, además la concentración de 10 µg mL⁻¹ de iprodione en éste ensayo tampoco alcanzó una inhibición total de crecimiento; concluyendo que es un ingrediente activo ineficiente de control, por otro lado, utilizando tiabendazol a 10 µg mL⁻¹ no hubo inhibición del crecimiento del fitopatógeno, a diferencia de los fungicidas propiconazol y difenoconazol que a 10 µg mL⁻¹ provocaron un control total hacia *L. theobromae*.

Conclusiones

Se determinó que propiconazol y difenoconazol a una concentración de 10 µg mL⁻¹, mostraron el 100% de inhibición de crecimiento de micelio de *L. theobromae* y difieren de los fungicidas mancozeb, iprodione y ciproconazol en todas las concentraciones que resultaron inofensivos en el control del fitopatógeno. Se observó una disminución significativa en la tasa de crecimiento micelial a partir de la concentración de 10 µg mL⁻¹ para propiconazol y difenoconazol, alcanzando un 0% de crecimiento del fitopatógeno. En contraste, mancozeb, iprodione y ciproconazol mostraron variaciones en las tasas de crecimiento, entre 2 y 64%. Independientemente de la concentración utilizada, estos resultados destacan la sensibilidad diferencial del patógeno a diferentes fungicidas a partir de ciertas concentraciones, lo que sugiere la necesidad de considerar cuidadosamente la elección y dosificación de los fungicidas en futuras estrategias de control.

Agradecimiento

Los autores agradecen al Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Universidad San Francisco de Quito por proporcionar el material biológico. De igual modo al Laboratorio de Microbiología Vegetal de la Universidad Técnica de Cotopaxi por proveer de las instalaciones y equipos para la investigación.

Referencias bibliográficas

- Abdulkadir, D. y Tae, H. (2022). Detection of *Colletotrichum* spp. Resistant to Benomyl by Using Molecular Techniques. *Plant Pathology Journal*, 38(6), 629–636. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.05.2022.0069>
- Alforja, S., Rico, P., Caoili, B. y Latina, R. (2021). Two Philippine *Photorhabdus luminescens* strains inhibit the *in vitro* growth of *Lasiodiplodia theobromae*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, and *Colletotrichum* spp. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31(1), 2–6. <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00454-x>
- Bachkar, D., Kolase, S., Bhujbal, M., Thakare, C., Doltade, S., Khatal, M. y Daingade, N. (2021). *In vitro* efficacy of different fungicides against *Fusarium solani* isolate causing root rot of papaya (*Carica papaya* L.). *International Journal of Chemical Studies*, 9(1), 1485–1488. <https://doi.org/10.22271/chemi.2021.v9.i1u.11437>
- Baldiga, R., Avozani, A., Durante, A., Melo, E., Zoldan, S. y Garcés-Fiallos, F. (2013). *In vitro* mycelial sensitivity of *Macrophomina phaseolina* to fungicides. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 43(4), 460–466. <https://doi.org/10.1590/s1983-40632013000400014>
- Barriga, N. (2020). Exploring fungal pathogens to control invasive raspberry (*Rubus niveus*) in Galapagos Islands. [Tesis de Maestría, Universidad San Francisco de Quito]. <https://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/9162/1/133141.pdf>
- Dong, G., Zhang, Y., Liang, X., Wang, M., Ye, Q., Xian, X. y Yang, Y. (2022). Resistance characterization of the natural population and resistance mechanism to pyraclostrobin in *Lasiodiplodia theobromae*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 188. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2022.105232>
- Feicán, C., Huaraca, H., Martínez, A. y Viteri, P. (2019). Guía para facilitar el aprendizaje en el manejo integrado de mora. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. <https://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/5476>
- Flores, H., Flores, J., Varela, E., Pérez, A., Azuara, A. y Monteon, A. (2021). Reporte de *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon y Maubl. en árboles cítricos de Tamaulipas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 12(3), 499–511. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-

- 09342021000300499&lang=es
Fungicide Resistance Action Commite. (2019). Resistencia. <https://frac-argentina.org/resistencia/#::~:~:text=La resistencia es un cambio,la etiqueta para dicho patógeno.>
- González, J., Raya, B., Piña, F., Enríquez, F. y Velázquez, E. (2023). Hongos asociados a la pudrición del tronco en cítricos. *Revista Biológico Agropecuaria Tuxpan*, 10(2), 147–154. <https://doi.org/10.47808/revistabioagro.v10i2.437>
- Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. (2021). Desarrollo de agrotecnologías como estrategia ante la amenaza de enfermedades que afecten la producción de Musáceas en el Ecuador. https://www.iniap.gob.ec/wp-content/uploads/2022/01/Proyecto_COE_2021_12_29.pdf
- Jiménez, W., Ramírez, A., López, J. y Alvarez, A. (2022). Análisis filogenético de aislamientos patogénicos de la familia botryosphaeriaceae en cacao (*Theobroma cacao* L.) en la zona de Los Ríos. *Ciencia y Tecnología*, 15(2), 45–54. <https://doi.org/10.18779/cyt.v15i2.583>
- Khuong, N. Q., Nhien, D. B., Thu, L. T. M., Trong, N. D., Hiep, P. C., Thuan, V. M., Quang, L. T., Thuc, L. V. y Xuan, D. T. (2023). Using *Trichoderma asperellum* to Antagonize *Lasiodiplodia theobromae* Causing Stem-End Rot Disease on Pomelo (*Citrus maxima*). *Journal of Fungi*, 9(10), 2–15. <https://doi.org/10.3390/jof9100981>
- Leal, L., Arcanjo, B., Silva, E., Rodrigues, E., Gonçalo de Lima, S. y Aguiar, J. (2023). Ethanolic extract of *Copaifera*, *Croton* and *Lippia* on the control of phytopathogenic fungi. *Pesquisa Agropecuaria Tropical*, 53, 2–8. <https://doi.org/10.1590/1983-40632023v5375126>
- Lewis, K. A., Tzilivakis, J., Warner, D. y Green, A. (2016). *An international database for pesticide risk assessments and management. Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 22(4), 1050–1064. <https://doi.org/10.1080/10807039.2015.1133242>
- Morales-Pizarro, A., Roja, I., Saavedra, E., Zapatel, K., Álvarez, L., Peña, R., Aguilar, R., Galecio, M. y Alva, J. (2024). Alternativas Sostenibles para el control de *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl en mango. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 27(021), 2–8. <https://www.revista.ccba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/view/4839/2166>
- Moreira, A., Cedeño, Á., Canchignia, F. y Garcés, F. (2021). *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl [(syn.) *Botryodiplodia theobromae* Pat] in the cocoa crop: Symptoms, biological cycle, and strategies management. *Scientia Agropecuaria*, 12(4), 653–662. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2021.068>
- Murciano, C., Oliver - Chirito, J. y Orihuel-Iranzo, B. (2021). Pathogen identification and control of sooty spot caused by *Cladosporium ramotenellum*, appearing on fresh easy peeler mandarins from Perú. *Journal of Plant Science and Phytopathology*, 5(2), 044–052. <https://doi.org/10.29328/journal.jpssp.1001059>
- National Center for Biotechnology Information. (2022). *GenBank Overview* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
- Olmedo, G. M., Zhang, J., Zhao, W., Mattia, M., Roskopf, E. N., Ritenour, M., Plotto, A. y Bai, J. (2023). Application of Thymol Vapors to Control Postharvest Decay Caused by *Penicillium digitatum* and *Lasiodiplodia theobromae* in Grapefruit. *Foods*, 12(19), 2–13. <https://doi.org/10.3390/foods12193637>
- Prado-Ocampo, J. y Garzón-Montealegre, V. (2022). Evolución económica y productiva del sector bananero de la provincia de El Oro en el periodo 2011 – 2020. *593 Digital Publisher CEIT*, 7(2), 260–270. <https://doi.org/10.33386/593dp.2022.2.1035>
- Romero, O., Cruz, A., Parraguirre, C., Pacheco, Y., Santiago, O. y Rivera, A. (2022). Efficacy of Four *In Vitro* Fungicides for Control of Wilting of Strawberry Crops in Puebla-Mexico. *Applied Sciences (Switzerland)*, 12(7), 2–15. <https://doi.org/10.3390/app12073213>
- Rusin, C., Cavalcanti, F., de Lima, P., Duarte, C., Kurtz, M. y Vasconcelos, R. (2020). Control of the fungi *Lasiodiplodia theobromae*, the causal agent of dieback, in cv. Syrah grapevines. *Acta Scientiarum - Agronomy*, 43, 1–9. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v43i1.44785>
- Valle, M., Guillén, D., Alia, I., López, V., Juárez, P., Martínez, E., Hernández, M. y Ariza, R. (2019). Control *in vitro* de *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl y *L. citricola* Abdollahz aislados de lima Persa (*Citrus latifolia* Tanaka) en Morelos, México. *Acta Agrícola y Pecuaria*, 5(1), 5–10. <https://doi.org/10.30973/aap/2019.5.0051001>
- Zhong, T., Zhang, J., Sun, X., Kou, J., Zhang, Z., Bai, J. y Ritenour, M. A. (2021). The Potential of Gaseous Chlorine Dioxide for the Control of Citrus Postharvest Stem-End Rot Caused by *Lasiodiplodia theobromae*. *Plant Disease*, 105(11), 3426–3432. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-20-0407-RE>

