

APLICACIÓN DE THIABENDAZOLE, HYMEXAZOL Y FLUDIOXONIL PARA EL CONTROL PREVENTIVO DE *Lasiodiplodia* sp. EN PALTO 'HASS'

Tadey, Sharon; Escobedo, Víctor

Departamento Técnico de la Asociación de Productores y Exportadores de Palta 'Hass' del Perú – PROHASS. Correo-e: stadey@prohass.com.pe

Resumen

El principal problema fitosanitario que aqueja al cultivo de palto 'Hass' en condiciones de costa en Perú son los hongos de madera, que ocasionan canchros y/o lesiones, y que reducen el potencial productivo de los árboles. En esta investigación se evaluó la eficacia de tres productos químicos *in vitro* e *in vivo*: Hymexazol, fludioxonil y thiabendazole. La prueba de eficacia *in vitro* se realizó Clínica de Diagnóstico de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), bajo la técnica de alimento envenenado, y se evaluó el porcentaje de la inhibición del crecimiento micelial. Posteriormente, se realizó la prueba de eficacia una parcela experimental del Programa de Frutales de la UNALM, donde se realizó la aplicación de productos químicos en ramas de 1.5 – 2.5 cm de diámetro, y posterior inoculación del hongo. Ambas pruebas se realizaron para el control de dos aislamientos: *Lasiodiplodia theobromae* y *Lasiodiplodia pseudotheobromae*. Adicionalmente, se realizó aplicaciones de estos productos para conocer el tiempo de degradación de estas moléculas en la palta 'Hass'. Se colectaron entre 6 a 10 frutos por muestra y se analizaron usando cromatografía gaseosa MS y líquida LC-MS. Los resultados mostraron que el producto fludioxonil tanto para la prueba *in vitro* como *in vivo*, presentó un control sobre ambas especies de *Lasiodiplodia*; sin embargo, el producto hymexazol es la molécula que se degrada en menor tiempo, a los 12 días después de su aplicación ya no es detectado en la fruta.

Palabras claves: Hongos de madera, Prueba *in vitro*, Prueba *in vivo*, Inoculación, Curvas de degradación.

APPLICATION OF THIABENDAZOLE, HYMEXAZOL AND FLUDIOXONIL FOR THE PREVENTIVE CONTROL OF *Lasiodiplodia* sp. IN 'HASS' AVOCADO

Abstract

One of the main phytosanitary issues in 'Hass' avocado crop under Peruvian coast conditions is wood canker fungi, which causes canker or wounds, and reduce tree production potential. In this research *in vitro* and *in vivo* efficacy of three chemicals: Hymexazol, fludioxonil y thiabendazole was evaluated. *In vitro* testing was carried out at the Clínica de Diagnóstico de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), under poisoned food technique, and percentage of inhibition mycelial growth was assessed. Then, efficacy trial in experimental orchard of the Programa de Investigación y Proyección Social en Frutales at UNALM was done, where application of the chemical products on 1.5 – 2.5 cm branches one day prior fungi inoculation. Both trials were tested for two isolations: *Lasiodiplodia theobromae* and *Lasiodiplodia pseudotheobromae*. In addition, spraying of the chemical products was done to know the degradation of these molecules in the fruit over time. Six to 10 avocados were collected per sample and were analyzed using gas (MS) and liquid (LC-MS) chromatography. Results show that product fludioxonil for both *in vitro* and *in vivo* trials controlled *Lasiodiplodia* species; however, hymexazol is the active ingredient that degrades in the shorter time, 12 days after spraying is no longer detected on the fruit.

Key words: Wood canker fungi, *In vitro* assay, *In vivo* assay, Inoculation, Degradation curves

Introducción

La Asociación de Productores y Exportadores de Palta Hass del Perú- ProHass viene desarrollando desde el año 2017 el proyecto “Hongos de madera”, esto incluye desde la identificación del patógeno hasta el control de las diferentes especies de *Lasiodiplodia*, que causan una decoloración vascular, canchros en la madera y muerte regresiva en las ramas. En este proceso de identificación, se tomaron muestras por toda la Costa del país y se logró identificar ciertas especies de *Lasiodiplodia*: *L. theobromae*, *L. pseudotheobromae*, *L. egypticae* y *L. parva* (reporte y descripción en proceso). El próximo paso fue trabajar en el control y proponer un manejo integrado sobre todo de las especies más predominantes: *L. theobromae* y *L. pseudotheobromae*. Por ese motivo, se realizó la prueba de eficacia de control *in vitro* e *in vivo* de tres productos: Thiabendazole, fludioxonil e hymexazol, los dos primeros son productos que cuentan con LMRs permisibles en los principales mercados de destino, y el último con LMR más estricto pero usado en los últimos años para el control de hongos en otros cultivos principalmente. La tendencia, estos últimos años, es utilizar moléculas con valores de LMRs menos estrictos que nos generen más confianza al momento de su aplicación y sobre los residuos que pueda dejar en la fruta. Por lo tanto, esta investigación incluye pruebas de eficacia, así como el análisis de curvas de degradación de los tres productos químicos utilizados y su relación con el manejo de los hongos de madera en el cultivo de palto ‘Hass’.

Materiales y métodos

Prueba de eficacia *in vitro*

El ensayo se realizó en el laboratorio de la Clínica de Diagnóstico de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional Agraria La Molina, se realizó la prueba de eficacia *in vitro*, mediante la técnica de alimento envenenado que consistió en verter la dosis correspondiente en el recipiente que contenía 100 ml de PDA (papa dextrosa agar). Una vez obtenido el medio envenenado, se vació a las placas Petri y estas fueron llevadas a la incubadora a 24 °C para su posterior solidificación. Una vez obtenido el PDA sólido, se colocó en el centro de cada placa un disco de medio PDA de ~5 mm de diámetro conteniendo micelio de los aislamientos de *Lasiodiplodia theobromae* y *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, y fueron incubados a 24 °C. El diseño experimental para este ensayo fue un diseño completamente al azar.

Se evaluó tomando las medidas (radios) de crecimiento micelial a los seis días después de la siembra, para poder hallar el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (PIC). Los tratamientos y dosis empleada para cada producto se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Tratamientos para la prueba de eficacia *in vivo* e *in vitro* contra *Lasiodiplodia*.

Tratamiento	Ingrediente activo	Concentración del producto	Concentración (%)	Prueba
T0	Testigo absoluto	-	-	<i>In vivo</i>
T1	Testigo	-	-	<i>In vivo</i> e <i>in vitro</i>
T2	Hymexazol	360 g L ⁻¹	0.40	<i>In vivo</i> e <i>in vitro</i>
T3	Thiabendazole	500 g L ⁻¹	0.10	<i>In vivo</i> e <i>in vitro</i>
T4	Fludioxonil	230 g L ⁻¹	0.20	<i>In vivo</i> e <i>in vitro</i>

Prueba de eficacia *in vivo*

Esta prueba se realizó en el campo experimental del Programa de Investigación y Proyección Social en Frutales de la UNALM, fueron 5 tratamientos, incluido dos tratamientos testigos, un testigo inoculado y uno absoluto (Cuadro 1).

Las colonias se reactivaron en laboratorio y pasaron a una solución de Caldo Papa Dextrosa (CPD); de tal manera, que dos discos de cada hongo fueron introducidos en un matraz Erlenmeyer conteniendo 250 ml de la solución de CPD. Luego se incubó el caldo inoculado a 25 °C en un agitador rotatorio a 100 rpm por tres semanas aproximadamente. Para obtener la suspensión micelial, se filtró el caldo y así solo nos quedamos con el micelio que se formará en la superficie de la solución. Este micelio fue licuado en un litro de agua estéril y una vez obtenido la solución se añadió una gota de Tween 20 (Sigma-Aldrich). Se extrajo una alícuota y luego fue ingresado a cámara “Neubauer” para el conteo de fragmentos de micelios, hasta obtener la concentración de 3×10^5 fragmentos miceliales/ml.

En la parcela experimental de palto ‘Hass’, se escogieron ramas con un diámetro de 1.5 – 2.5 cm, seleccionadas aleatoriamente y se podó en un extremo distal y se aplicó el producto químico de inmediato a la herida. 24 horas después de la aplicación se inoculó cada rama con la suspensión micelial. Los tratamientos testigos fueron aplicados solo con agua estéril. Luego de la inoculación se cubrió con papel aluminio cada rama inoculada (Twiseymana et al., 2013). El diseño experimental para este ensayo fue un diseño completamente al azar.

12 semanas después de la aplicación del fungicida y la inoculación de patógenos, se “cosecharon” (cortaron) las ramas y se llevaron al laboratorio para su evaluación, que consistió en realizar un corte transversal para medir el avance de la enfermedad; posteriormente, se

tomaron fotografías y fueron procesadas en el programa ASSESS con la finalidad de determinar el área afectada.

Análisis de curvas de degradación

El ensayo de curvas de degradación se realizó en huertos comerciales ubicados en el distrito de Quilmaná – Cañete. Se aplicaron los productos hymexazol, fludioxonil y thiabendazole a concentraciones de 0.5 L, 0.5 L y 0.2 L en 200 L de agua, respectivamente. Para cada uno de los productos, las aplicaciones se hicieron en 10 plantas, en el mes de marzo, en estado de crecimiento de fruto. Se recolectaron muestras compuestas por 1 fruto/árbol, un total entre 6 a 10 muestras por producto químico en un periodo de tiempo determinado. Las muestras fueron llevadas al laboratorio y la fruta fue analizada mediante la metodología de análisis de multiresiduos de pesticidas por QuEChERS en frutas y vegetales, jugos, vinos y comida con alto contenido de grasa usando Cromatografía gaseosa-MS y cromatografía líquida- MS/MS. (Samsidar et al., 2017).

Resultados y Discusión

Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial en la prueba de eficacia *in vitro*

Los resultados obtenidos a los seis días de realizar la siembra indicaron que ambas especies de *Lasiodiplodia* el testigo presentó un porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (PIC) del 0 %, ya que llenó totalmente la placa (Cuadro 2). Para *Lasiodiplodia theobromae* el resto de los tratamientos obtuvo un 100 %, lo que significó que a los 6 días no se presentó crecimiento alguno sobre el medio envenenado. El producto Fludioxonil, fue el mejor tratamiento con un PIC del 100 % sobre el control de ambos hongos.

Cuadro 2. Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial (PIC) de la prueba de eficacia *in vitro* de *L. theobromae* y *L. pseudotheobromae*.

Fungicidas	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>		<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	
	Diámetro	PIC (%)	Diámetro	PIC (%)
Testigo	85.00	0.00	85.0	0.00
Hymexazol	0.00	100.00	10.8	87.36
Thiabendazole	0.00	100.00	23.5	72.35
Fludioxonil	0.00	100.00	0.00	100.00

Prueba de eficacia de productos químicos *in vivo*

Para *Lasiodiplodia theobromae*, se forman dos grupos, el testigo con un promedio de área enferma del 32.56 % presentó diferencia significativa con el resto de los tratamientos (Cuadro 3). Los tratamientos con Hymexazol, Thiabendazole y Fludioxonil, respondieron de forma adecuada a la prueba de eficacia, no hay diferencias significativas, pero el producto Thiabendazole, tuvo el menor porcentaje de área enferma de estos tratamientos. Para *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, el tratamiento testigo con un porcentaje promedio de área enferma del 36.69 %, tuvo los valores más altos de porcentaje de área enferma.

El tratamiento testigo absoluto para ambas especies, solo obtuvo un 2.11 %, el menor valor en comparación al resto de tratamientos, a pesar de no presentar diferencias significativas, numéricamente es el valor más bajo. Los tratamientos Hymexazol, Thiabendazole y Fludioxonil, respondieron de forma óptima a la prueba de eficacia, entre estos no hay diferencias significativas, pero el producto Fludioxonil, tuvo el menor porcentaje de área enferma de estos tratamientos.

Según Tamayo (2007), se recomienda la utilización de fungicidas a base cobre, benomil, metil tiofanato, carbendazim o thiabendazole en forma rotativa a fin de evitar la aparición de poblaciones del patógeno resistente a los fungicidas.

Cuadro 3. Porcentaje promedio de área enferma de ramas de aguacate 'Hass' por *Lasiodiplodia theobromae* y *L. pseudotheobromae* conforme a tratamientos con fungicidas.

Tratamiento	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>
	Área enferma (%)	Área enferma (%)
Testigo absoluto	2.11 b ^z	2.11 b
Testigo	32.56 a	36.69 a
Hymexazol	4.19 b	3.87 b
Thiabendazole	3.41 b	3.43 b
Fludioxonil	4.07 b	2.35 b
	CV = 20.43 %	CV = 31.64 %

^z Los valores con letras diferentes dentro de cada columna, por cada hongo, son estadísticamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

CV: Coeficiente de variación.

Análisis de curvas de degradación

El producto hymexazol presentó un valor de 0.076 ppm, correspondiente a la muestra que se tomó a las 3 horas después de la aplicación (Figura 1). Posteriormente la cantidad de la molécula en la fruta disminuyó progresivamente hasta los 12 días y se presentó traza; sin embargo, se encuentra por debajo de LOQ (0.05).

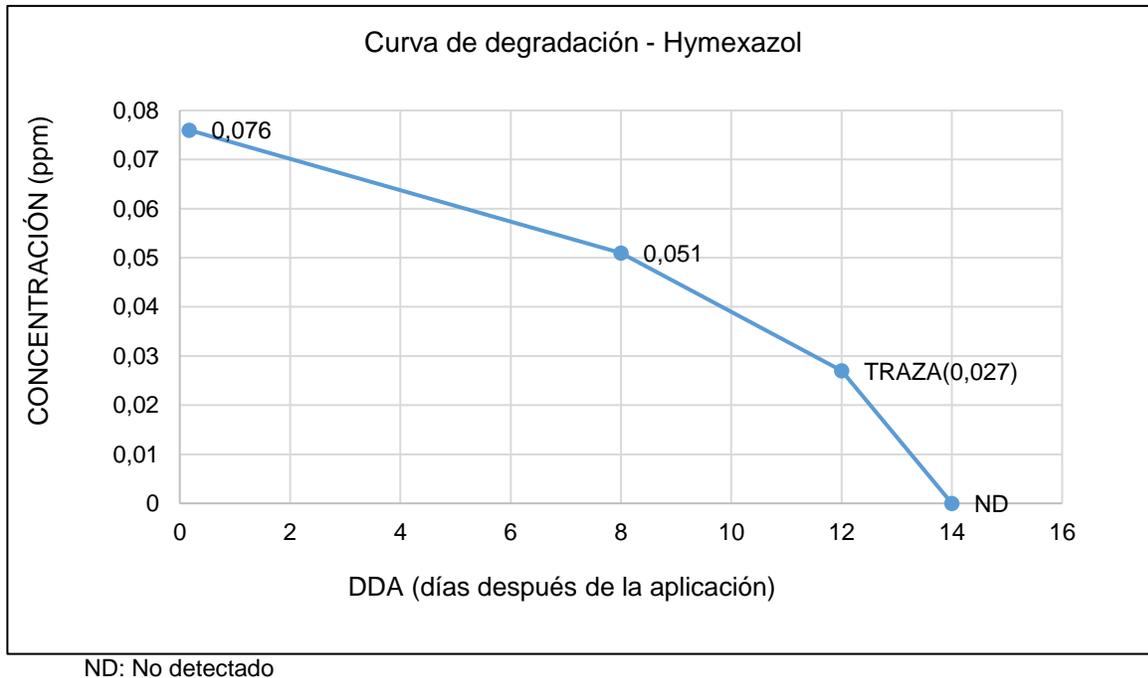
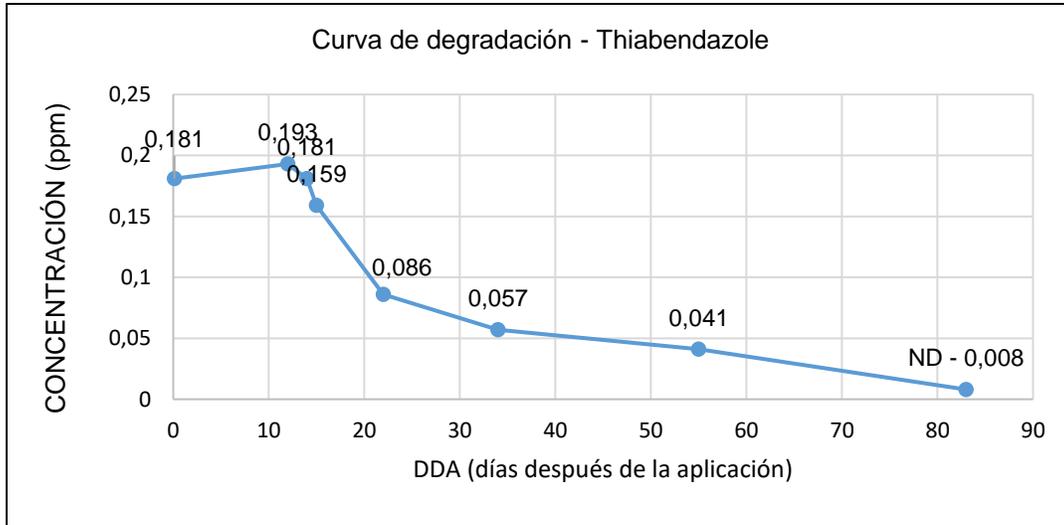


Figura 1 Curva de degradación del producto Hymexazol aplicado a la concentración de 0.5 L en 200 L de agua en el mes de marzo en crecimiento de fruto de aguacate 'Hass' en la ciudad de Quilmaná – Cañete, Perú.

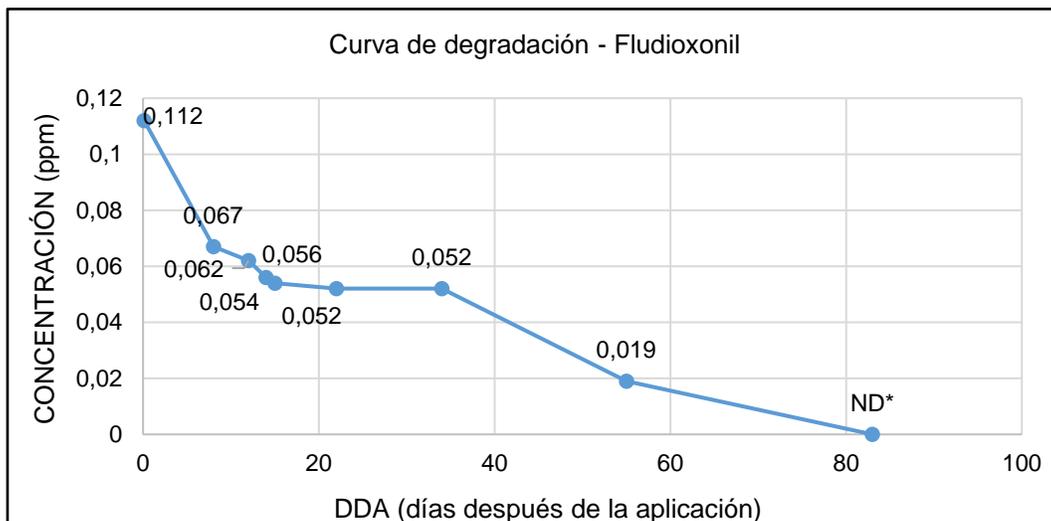
Respecto a thiabendazole, el valor encontrado a las 3 horas después de la aplicación fue de 0.181; sin embargo, a los 22 días ya se ha degradado más del 50 % del depósito inicial (Figura 2). Luego a los 83 días se presentó una traza de 0.008, sin embargo, se considera un valor no detectado ya que está por debajo de LOQ (0.01).

Con fludioxonil, a las 3 horas después de la aplicación se presentó un depósito inicial de 0.112 ppm, y se degradó progresivamente de manera lenta hasta los 34 días (Figura 3). A los 55 días se notó un descenso hasta 0.019, los muestreos continuaron y a los 83 días ya no se registró residuos de fludioxonil en la fruta.



ND: No detectado

Figura 2. Curva de degradación del producto Thiabendazole aplicado a la concentración de 0.5 L en 200 L de agua en el mes de marzo en crecimiento de fruto de aguacate 'Hass' en la ciudad de Quilmaná – Cañete, Perú.



ND: No detectado

Figura 3. Curva de degradación del producto Fludioxonil aplicado a la concentración de 0.5 L en 200 L de agua en el mes de marzo en crecimiento de fruto de aguacate 'Hass' en la ciudad de Quilmaná – Cañete, Perú.

Las aplicaciones de Hymexazol, Thiabendazole y Fludioxonil se realizaron en crecimiento de fruto, a inicios de marzo. Estos productos son comúnmente utilizados para el control de hongos de madera; y suelen ser aplicados posterior a la poda; sin embargo, estudios realizados por ProHass sobre el monitoreo de trampas de esporas de *Lasiodiplodia* indicó que la cantidad de esporas reportadas es mayor en los meses donde hay incremento de temperaturas; por lo tanto,

es importante realizar aplicaciones preventivas, las cuales se harían cuando se tenga carga frutal a inicios de verano entre diciembre y enero. Por tal, el producto hymexazol, sería una herramienta importante en el control de estos hongos, por su rápida degradación en la fruta; sin embargo, los productos Thiabendazole y Fludioxonil, son productos que presentan LMRs permisibles, para el mercado de Europa, 20 ppm y 1.50 ppm, respectivamente, estas moléculas pueden incluirse en el manejo integrado y no dejaría residuos en la fruta.

Literatura Citada

- Twizeyimana, M., V. McDonald, J. Mayorquin, D. Wang, F. Na, D. Akgül, and A. Eskalen. 2013. Effect of fungicide application on the management of avocado branch canker (formerly *Dothiorella* canker) in California. *Plant Dis.* 97(7):897-902.
- Samsidar, A., S. Siddiquee, & S. M. Shaarani. 2018. A review of extraction, analytical and advanced methods for determination of pesticides in environment and foodstuffs. *Trends Food Sci. Technol.* 71:188-201.
- Tamayo Molano, P. J. (2007). Enfermedades del aguacate. *Rev. Politécnica* 3(4):51-70.