

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS
ESCUELA DE AGRONOMÍA

**ALTERNATIVAS AL FUNGICIDA PROCLORAZ EN EL CONTROL
POSCOSECHA DE ANTRACNOSIS (*COLLETOTRICHUM* SPP.) EN PAPAYA
(*CARICA PAPAYA*) HÍBRIDO POCOCÍ.**

**TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN
INGENIERÍA AGRONÓMICA CON ÉNFASIS EN FITOTECNIA**

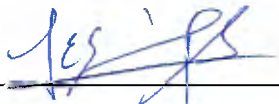
ANTHONY MOLINA CHAVES

2014

TESIS PRESENTADA A LA ESCUELA DE AGRONOMÍA COMO REQUISITO
PARCIAL PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIATURA EN INGENIERÍA
AGRONÓMICA CON ENFASIS EN FITOTECNIA



Dra. Gerardina Umaña Rojas
Directora de Tesis



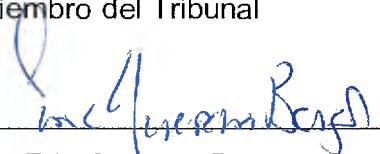
Dr. Luis Gómez Alpizar
Miembro del Tribunal



M. Sc. Marco Vinicio Sáenz Murillo
Miembro del Tribunal



M. Sc. Eric Mora Newcomer
Miembro del Tribunal



Dr. Eric Guevara Berger
Presidente del Tribunal



Anthony Molina Chaves
Sustentante

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	v
RECONOCIMIENTOS.....	vi
INDICE DE CUADROS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ABREVIACIONES.....	ix
RESUMEN.....	x
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Objetivo general.....	1
1.2 Objetivos específicos.....	2
2. REVISIÓN LITERARIA.....	2
2.1 Etiología.....	2
2.2 Epidemiología.....	2
2.3 Sintomatología.....	3
2.4 Identificación de especies del género <i>Colletotrichum</i> spp.....	4
2.5 Combate químico.....	4
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
3.1 Ubicación.....	7
3.2 Fase I. Caracterización de la sintomatología de antracnosis e identificación del agente causal a nivel de especie mediante técnicas moleculares.....	7
3.2.1 Caracterización de sintomatología y aislamientos asociados.....	7
a) <i>Recolección de fruta y caracterización de síntomas de antracnosis</i>	7
b) <i>Obtención de aislamientos</i>	7
c) <i>Obtención de aislamientos monoconidiales</i>	8
3.2.2. Identificación de las especies de <i>Colletotrichum</i> spp. a nivel molecular.....	8
3.2.3. Caracterización morfológica de los aislamientos.....	9
3.2.4. Prueba de patogenicidad.....	9
3.3 Fase II. Determinación de sensibilidad de aislamientos de <i>Colletotrichum</i> a diferentes fungicidas.....	10
3.3.1 Determinación de sensibilidad a fungicidas por medio de la técnica de diámetro de colonia.....	10
3.3.2. Determinación de sensibilidad por medio de germinación de esporas.....	12

3.4 Fase III. Evaluación de fungicidas en frutos	12
4. RESULTADOS	14
4.1 Fase I. Caracterización de la sintomatología de antracnosis e identificación del agente causal a nivel de especie mediante técnicas moleculares	14
4.1.1 Caracterización de síntomas y aislamientos asociados	14
4.1.2 Identificación de las especies de <i>Colletotrichum</i> spp. a nivel molecular	18
4.1.3 Patogenicidad de aislamientos	19
4.2 Fase II. Determinación de la sensibilidad de los aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp. a diferentes fungicidas	20
4.2.1 Determinación de sensibilidad a fungicidas por medio de la técnica de diámetro de colonia	20
4.2.2 Determinación de la sensibilidad a fungicidas por medio de la técnica de germinación de esporas	24
4.3 Fase III. Evaluación de fungicidas en frutos	25
5. DISCUSIÓN GENERAL	27
6. CONCLUSIONES	32
7. RECOMENDACIONES	33
8. LITERATURA CITADA	34
9. ANEXOS	41

DEDICATORIA

A mi mamá,
por toda la paciencia y apoyo
que con amor siempre me ha brindado...

RECONOCIMIENTOS

A mi directora de tesis, Dra. Gerardina Umaña, por su harta paciencia y la disposición de siempre enseñar sin recelo, de la cual aprendí mucho tanto en la parte académica como personal.

Al magister Marco Vinicio Sáenz, por ser un gran profesor y amigo.

Al Dr. Luis Gómez por toda la ayuda y consejos brindados en la realización de este trabajo.

Al magister Eric Mora por toda la ayuda brindada.

Al personal, compañeros y asistentes del Laboratorio de Biotecnología de Plantas y del Laboratorio de Tecnología Poscosecha por la colaboración en la realización de este trabajo, en especial a Johenny, Johanny, y Cristofher.

A Andrea, mis compañeros y amigos que estuvieron conmigo en toda la carrera.

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Fungicidas y dosis evaluadas en frutos de papaya.....	13
Cuadro 2. Síntomas identificados en el período de los meses de agosto y diciembre 2012 en frutas de papaya híbrido Pococí de la zona de Guácimo.	15
Cuadro 3. Morfología de aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp. correspondientes a diferentes síntomas de antracnosis recolectados de frutos de papaya.	17
Cuadro 4. Similitud de las secuencias amplificadas de las regiones ITS1-5.8S e ITS-2 del ADN ribosomal de los aislamientos con el GeneBank.	18
Cuadro 5. Porcentaje de eficacia de los fungicidas evaluados sobre la disminución del diámetro de micelio de tres especies del género <i>Colletotrichum</i> spp.....	21
Cuadro 6. Concentraciones efectivas medias (CE ₅₀) de los fungicidas sobre el crecimiento micelial de tres especies del género <i>Colletotrichum</i> spp.	22
Cuadro 7. Porcentaje de eficacia de los tratamientos evaluados sobre la disminución de la germinación de esporas de tres especies del género <i>Colletotrichum</i> spp.	24
Cuadro 8. Concentraciones efectivas medias (CE ₅₀) promedio de los fungicidas sobre las especies de <i>Colletotrichum</i> en la evaluación de crecimiento micelial.....	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR para los aislamientos de *Colletotrichum* spp. con los imprimadores CgInt para *C. gloeosporioides* (a), e imprimadores GmF y GmR para *C. magna* (b).....19

Figura 2. Diámetro promedio (mm) de la lesión de diferentes especies de *Colletotrichum* inoculadas en frutas de papaya.....20

Figura 3. Diámetro de micelio de especies del género *Colletotrichum*: *C. gloeosporioides* silvestre, *C. gloeosporioides*, *C. magna* y *C. capsici*, en presencia de diferentes concentraciones de fungicidas.....23

Figura 4. Área bajo la curva de la incidencia de antracnosis en frutas de papaya tratadas con fungicidas en la etapa poscosecha. Letras distintas indican diferencias significativas según prueba LSD Fisher ($p \leq 0,05$).25

Figura 5. Área bajo la curva de la severidad de antracnosis en frutos tratados a diferentes concentraciones de fungicidas, en la etapa poscosecha. Letras distintas indican diferencias significativas según prueba LSD Fisher ($p \leq 0.05$).26

Figura 6. Área bajo la curva de la pudrición peduncular en frutos tratados a diferentes concentraciones de fungicidas, en la etapa poscosecha. Letras distintas indican diferencias significativas según prueba LSD Fisher ($p \leq 0.05$).26

ABREVIACIONES

CE₅₀: Concentración efectiva media.

C. g.: *Colletotrichum gloeosporioides*.

C. m.: *Colletotrichum magna*.

C. c.: *Colletotrichum capsici*.

PDA: Papa Dextrosa Agar.

RESUMEN

En un periodo de aproximadamente 6 meses se recolectaron frutas de papaya híbrido Pococí de plantaciones ubicadas en la zona de Guácimo, en las cuales se identificaron 7 síntomas distintos de antracnosis, a partir de los cuales se obtuvieron aislamientos en medio de cultivo PDA, luego fueron separados en tres grupos por similitudes en sintomatología y morfología de colonia. Los aislamientos DE cada síntoma se identificaron mediante la secuenciación de la región espaciadora interna transcrita del ADN ribosomal, correspondiendo a 3 especies del género *Colletotrichum*: *C. gloeosporioides*, *C. magna* y *C. capsici*. La identificación de las especies fue confirmada con imprimadores taxón específico para *C. gloeosporioides* y *C. magna* respectivamente. Estas especies en condición *in vitro*, presentaron diferencias ante la presencia de diferentes fungicidas, obteniéndose la mayor sensibilidad al fungicida procloraz con una CE_{50} en la evaluación de diámetro de colonia de 0,190, 0,288, 0,288 mg/L para las especies *C. gloeosporioides*, *C. magna* y *C. capsici* respectivamente, seguidamente por el pyraclostrobin con CE_{50} de 0,084, 0,422 y 5,436 mg/L y por último el fludioxonil con CE_{50} de 1,02, 0,716 y 0,288 mg/L. Sin embargo, para la evaluación de germinación de esporas las CE_{50} , por las concentraciones evaluadas, no fue posible determinarse, pero los resultados obtenidos sugieren que son menores a 0,1 mg/L. En la evaluación de los fungicidas, en la fruta de papaya tratada con procloraz, presentó la menor incidencia y severidad de antracnosis en fruto. Por el contrario, la mayor incidencia y severidad se obtuvo con el fungicida pyrimethanil en las dos concentraciones evaluadas. Para el control de pudrición peduncular no se obtuvieron diferencias significativas, no obstante se observó una tendencia de menor incidencia en los tratamientos con procloraz. Los tratamientos evaluados no presentaron influencia sobre los parámetros de calidad, ni manchas, ni fitotoxicidad.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, el cultivo de papaya en Costa Rica ha tenido un crecimiento acelerado principalmente a partir del 2006, con la introducción del híbrido “Pococi” que ha tenido una buena aceptación tanto en el mercado nacional, como en el internacional. Para el 2009, las exportaciones fueron de 1217.3 toneladas, equivalentes a US\$807 mil, y ya para el 2013, llegó alcanzar las 3775,9 toneladas, para un equivalente de US\$ 2962,7 mil (PROCOMER, 2014). Sin embargo, el cultivo de papaya así como muchas otras frutas tropicales, es susceptible a enfermedades poscosecha, entre ellas la antracnosis es la principal enfermedad y causa pérdidas en papaya, hasta de un 62% en la vida anaquel (Capellini *et al.*, 1988).

La antracnosis es causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Durán y Mora, 1987) que infecta la fruta de papaya desde el campo, durante la floración y se mantiene latente durante el llenado de la fruta, y es hasta en el momento que empieza el proceso de maduración que se observan los síntomas (Dickman y Álvarez, 1983). Para contrarrestar las pérdidas por antracnosis, se ha utilizado el tratamiento químico con fungicidas benzimidazoles en el campo (Solano y Arauz, 1995) e imidazoles como el procloraz en poscosecha.

Sin embargo, el uso intensivo y prolongado de estos fungicidas, ha originado la pérdida de sensibilidad de *C. gloeosporioides* a estos productos. Adicionalmente el aumento en las exigencias del mercado internacional, sobre los límites residuales de productos químicos en fruta fresca, reducen las opciones para el combate de la enfermedad, por lo que es importante estudiar productos químicos relativamente nuevos alternativos al procloraz, que controlen la antracnosis, que sean eficaces y se ajusten a las exigencias del mercado internacional.

1.1 Objetivo general

Evaluar alternativas al fungicida procloraz para el control de antracnosis (*Colletotrichum* spp.) en papaya (*Carica papaya*) híbrido Pococi, durante el período poscosecha.

1.2 Objetivos específicos

- Identificar mediante técnicas moleculares, las especies del género *Colletotrichum*, causantes de diferentes síntomas de antracnosis en frutas provenientes de plantaciones comerciales y silvestres de papaya.
- Determinar la sensibilidad *in vitro* de las especies del género *Colletotrichum*, previamente identificadas a nivel de especie por técnicas moleculares, a los fungicidas pirimethanil, fludioxonil, azoxystrobin, pyraclostrobin y trifloxystrobin.
- Evaluar alternativas químicas al procloraz en poscosecha de papaya y su efecto sobre los parámetros de calidad.

2. REVISIÓN LITERARIA

La antracnosis es la enfermedad más importante y la que más daño causa en la vida poscosecha de frutas frescas en los trópicos y subtropicos, como el mango y la papaya (Bailey y Jeger, 1992).

2.1 Etiología

El principal agente causal de la antracnosis en papaya es *Colletotrichum gloeosporioides*, que es la fase reproductiva asexual de *Glomerella cingulata*, perteneciente al orden Phyllachorales (Rodríguez *et al.*, 2009), "el cual se caracteriza por la producción de esporas asexuales o conidios en un acérvulo formado de hifas, que se localiza por debajo de la epidermis o cutícula del tejido infectada" (Agrios 2005; Manners citado por Baquero, 2000).

2.2 Epidemiología

La infección se da en varias fases, que incluye la germinación de la espora en presencia de agua, el desarrollo de un tubo germinativo, formación de los apresorios y la penetración del tejido (Barquero, 2000), donde puede permanecer en un periodo de latencia, hasta que por efectos químicos por parte del fruto, como la producción de etileno (Rodríguez, *et al.*, 2009) y cambios de pH en el ambiente celular a inicios de la maduración (Miyara *et al.*, 2010), "se da un crecimiento micelial y esporulación durante el desarrollo de la colonia" (Tong y

Ooi-choi, 1989 citado por Barquero, 2000), que es cuando se observa las lesiones en el fruto.

2.3 Sintomatología

Los síntomas iniciales de la antracnosis en papaya son descritos como "lesiones circulares, hundidas, blandas y limitadas con un halo café claro, y traslúcido, que se desarrolla en la epidermis de la fruta, que va incrementando en tamaño, hasta observarse lesiones húmedas con colonias de esporas de color naranja o rosado, en la parte central de la lesión" (Alvarez y Nishijima, 1987 citado por Citrali *et al.*, 2005).

Duran y Mora (1987), caracterizaron diferentes sintomatologías de la antracnosis en Costa Rica, en papaya proveniente de Cañas, Guanacaste. Señalan que la mayoría de las lesiones iniciales como superficiales y con bordes definidos como manchas de color rojizo, y en algunos casos, se observan exudados de látex. Al avanzar las lesiones se notan diferencias en la profundidad y en el color, que puede abarcar diferentes tonos del café en la totalidad de la lesión, o solo un oscurecimiento en el centro de la misma que pueden llegar a ser negro, algunas tienen un halo de color café mientras que otras no la presentan. La consistencia de la lesión también puede variar, algunas de consistencia seca y dura, mientras que otras son suaves y húmedas. También, observaron diferencias en la esporulación de las lesiones aquellas que se mantienen de forma individual y de mayor tamaño producen una gran cantidad de acérvulos de color rosado o anaranjado.

La variabilidad observada en la sintomatología de antracnosis en frutas de papaya, ha sido atribuida tanto a diferentes especies del género *Colletotrichum* spp. identificadas (Simmonds, 1965) como a la variabilidad genética del hospedante (Durán y Mora, 1987).

2.4 Identificación de especies del género *Colletotrichum* spp.

La identificación de especies del género *Colletotrichum* spp. como agentes causales de la antracnosis en papaya, usualmente se ha realizado con base en características morfológicas como el tamaño y el color de las colonia, la forma de acérvulos y conidios producidos, la presencia o ausencia de setas y/o por la especificidad con el hospedante (*C. capsici* en Chile), además de la prueba de sensibilidad al benomil, que ha demostrado ser una prueba para la separación de especies (Torres *et al.*, 2013). Sin embargo, las características morfológicas son muy variables y depende mucho de las condiciones en las que se mantengan los aislamientos, además, la extensiva gama de hospedantes y la variabilidad de la patogenicidad de las especies complican la identificación certera de las especies de este género (Cai *et al.*, 2009 y Rampersad, 2011).

Debido a esta complejidad con base a caracteres morfológicos, en los últimos años se han adicionado análisis de datos de secuencia de ácidos nucleicos, por medio de la utilización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en 6 regiones o genes. Estos genes son; "el espaciador interno transcrito de la región del ADNr nuclear (ITS), actina parcial (ACT), β -tubulina (TUB2), calmodulina (CAL), glutamina sintetasa (GS) y el gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GPDH)". (Cai *et al.*, 2009).

Este análisis de secuencias de diferentes regiones del ADN, ha generado la inclusión de nuevas especies del género *Colletotrichum*, como los trabajos de Tapia *et al.* (2008) en México y Nascimento *et al.* (2010) en Brasil, que reportaron a *Colletotrichum capsici* y *Colletotrichum magna* respectivamente, como agentes causales de antracnosis en papaya.

2.5 Combate químico

El medio de combate más utilizado para la antracnosis es el uso de fungicidas, del tipo protectante y sistémico, como los pertenecientes al grupo de los benzimidazoles, para los cuales desde 1994 en Costa Rica, Astúa *et al.* (1994) y Sanders *et al.* (2000), informaron una disminución de sensibilidad del hongo al tiabendazol.

Actualmente y con base al mercado de destino de los frutos, uno de los tratamientos poscosecha empleados para el combate de la antracnosis en papaya es el procloraz, que es un "*fungicida no sistémico perteneciente al grupo de los imidazoles, que inhibe la biosíntesis del ergosterol, con propiedades de contacto y translaminar, con actividad protectante y erradicante, para el control de ascomicetes y hongos imperfectos*" (FAO, 2009). Sin embargo, en estudios realizados por Madrigal (1997) demostraron una alta variabilidad en la sensibilidad de *C. gloeosporioides* al procloraz, proveniente de los cultivos de mango y papaya. Los aislamientos de papaya fueron menos sensibles al fungicida.

La generación de nuevas moléculas, posibilita la búsqueda de alternativas a este fungicida que tiene varias décadas de utilizarse, como los fungicidas del grupo de las estrobilurinas, "*que inhiben la respiración mitocondrial bloqueando la transferencia de electrones, entre el citocromo b y el citocromo c*" (FAO, 2009), "*impidiendo la producción de ATP y provocando una disminución de energía en las células del hongo*" (Barlett, et al., 2002, mencionado por López, 2010). Sin embargo, las estrobilurinas tienen la desventaja que presentan moderado riesgo de resistencia según Brent y Hollomon (1998).

Entre los fungicidas del grupo de las estrobilurinas se encuentra el azoxystrobin que "*inhibe la germinación de esporas y el crecimiento micelial, con propiedades sistémicas y translaminares*" (Fernández et al., 2008 y Hamdy, 2007, mencionados por López, 2010). En estudios realizados por Sundradavana (2007), se obtuvo una inhibición total del crecimiento de micelio de *C. gloeosporioides* aislado de mango y el combate de la enfermedad en campo. Gutiérrez et al. (2003) por su parte, observaron hasta un 96% de disminución de las pudriciones en poscosecha con este fungicida. Otro fungicida que forma parte de este grupo es el trifloxystrobin, que ha sido eficiente en el combate de sigatoka en plátano (Chin et al., 2001, mencionado por López, 2010), mildiú y oidio de la vid (Miller y Gluber, 2004; Moshe, 2001, citados por López, 2010) y *C. gloeosporioides* aislado de papaya (Santamaría et al., 2011), así como el pyraclostrobin para el combate de antracnosis en fresa poscosecha (Turechek et al., 2006, citados por López, 2010).

Un fungicida relativamente nuevo es el fludioxonil, "*perteneciente al grupo de los fenilpirroles, que inhibe la histidina quinasa*" (Serey et al., 2007), "*su acción bioquímica está ligada a los procesos de intercambio celular dependientes de la membrana, perturbando el intercambio de materiales y bloqueando el crecimiento de las células del hongo, por una estimulación en exceso de la síntesis de glicerol, que es un compuesto que regula la presión osmótica intercelular*" (Vademecum 2008), por lo que "*inhibe la germinación de esporas y tubo germinativo y el crecimiento micelial*" (Rosslénbroich, 2000, citado por Kanetis et al. (2007). Xiao y Boal (2009) obtuvieron buenos resultados con la actividad residual de fludioxonil para el combate de *Penicillium expansum* en manzana y Kanetis et al. (2007) para *Penicillium digitatum* en cítricos por aplicaciones poscosecha.

Otro fungicida reciente, que se utiliza para el combate de enfermedades poscosecha es el pyrimethanil, que pertenece al grupo de los anilino pirimidina (Kanetis et al., 2007), "*el cual induce una reducción de los niveles de enzimas hidrolíticas, impidiendo la secreción de proteínas por parte del patógeno en el proceso de infección, e inhibe la elongación del tubo germinativo y el crecimiento micelial*" (Milling et al., (1996) mencionados por Díaz et al., 2007).

Para determinar la sensibilidad de los hongos a los fungicidas se realizan técnicas como a) la germinación de esporas en agar + fungicida, b) el recuento de conidios germinados en portaobjetos, que consiste en colocar una suspensión de concentración conocida de conidios en fungicida y colocarla en una cámara húmeda por un tiempo determinado, para posteriormente determinar el porcentaje de germinación, y c) crecimiento micelial en fungicida, que consiste evaluar el crecimiento del diámetro de una colonia en un medio con fungicida y compararla con el diámetro de la colonia de un testigo y con base a esa información calcular el porcentaje de reducción de crecimiento (Barquero, 2000).

El cambio de sensibilidad por parte de un hongo a un fungicida, se determina por medio de la creación de una línea base, que consiste en "*obtener información o un punto de referencia de sensibilidad de un individuo o una población en determinada región o zona, a una determinada molécula al inicio de su uso que*

permite la posibilidad de monitorear a través del tiempo, si hay un cambio” (Russell, 2004).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Tecnología Poscosecha del Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA) de la Universidad de Costa Rica y se desarrolló en tres fases.

3.2 Fase I. Caracterización de la sintomatología de antracnosis e identificación del agente causal a nivel de especie mediante técnicas moleculares

3.2.1 Caracterización de sintomatología y aislamientos asociados

a) Recolección de fruta y caracterización de síntomas de antracnosis

Durante un periodo de seis meses, se recolectaron frutos de papaya híbrido Pococí de plantaciones ubicadas en la zona de Guácimo. Las frutas fueron llevadas al Laboratorio de Tecnología Poscosecha del Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica (CIA-UCR) y se seleccionaron las frutas que presentaron diferentes síntomas de antracnosis para su caracterización. Para la caracterización se utilizaron caracteres como forma, color de la colonia y esporulación, secreciones, cantidad y distribución de las estructuras de reproducción, y forma de las esporas.

b) Obtención de aislamientos

Del tejido sintomático se aisló el microorganismo asociado, para ello se desinfectó con alcohol al 95% en la superficie de la zona de avance de la lesión y se realizó un corte con el objetivo de levantar la epidermis de la fruta y tomar pequeñas porciones del tejido afectado de la pulpa. El tejido se colocó en cajas Petri que contenían medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) + ácido láctico y

se almacenaron en una cámara de incubación a una temperatura de 22 ± 2 °C aproximadamente, hasta que se observaron estructuras de reproducción.

c) Obtención de aislamientos monoconidiales

Posteriormente se procedió a obtener aislados monoconidiales a partir de una suspensión madre de conidios, que se preparó colocando aproximadamente 20 mL de agua destilada estéril con una gota de Tween 80 sobre la superficie de la colonia del hongo, y se rayó con la ayuda de un asa las estructuras reproductivas. Luego la suspensión fue filtrada a través de una gasa y recolectada en un beaker y colocada en un agitador magnético, para homogenizar la suspensión de esporas, para luego tomar un volumen de aproximadamente 0,3 mL y colocarlo sobre una cámara Neubauer para con ayuda del microscopio contar la cantidad de esporas en la suspensión madre, y a partir de esta, se tomó una alícuota que permitió obtener una suspensión con una concentración de 10000 conidios/mL. De esta suspensión se colocó 0,1 mL sobre un medio de cultivo de PDA+ ácido láctico que se distribuyó homogéneamente en la placa, y se incubó por aproximadamente 24 horas a una temperatura de 22 ± 2 °C. Con la ayuda de un estereoscopio se identificaron las esporas con desarrollo del tubo germinativo, las cuales fueron transferidas con la ayuda de un ansa-espátula, a una nueva placa con medio de cultivo de PDA para su crecimiento. Luego de aproximadamente una semana de incubación a 22 ± 2 °C, las colonias se enviaron al Laboratorio de Biotecnología de Plantas del Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA-UCR) para la identificación molecular de las especies de *Colletotrichum*.

3.2.2. Identificación de las especies de *Colletotrichum* spp. a nivel molecular

La extracción de ADN se realizó según el método de Rogers y Bendich (1988), con modificaciones realizadas en el Laboratorio de Biotecnología de Plantas del Centro de Investigaciones Agronómicas.

Posteriormente se realizó la amplificación mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) de las región espaciadora interna transcrita del ADN ribosomal (ITS1-5.8S e ITS-2) con los iniciadores universales ITS-4 (5'-

TCCTCCGCTTATTGATATGC-3`) e ITS-5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'). El producto de PCR se purificó y se envió a a secuenciar en ambas direcciones a la compañía Macrogen, Corea del Sur. Con los imprimadores utilizados para la amplificación las secuencias obtenidas se analizaron en el programa BioEdit y se realizó una búsqueda en Blastsearch, en la base de datos del Banco de Genes del National Center for Biotechnology Information (NCBI), USA (www.ncbi.nlm.nih.gov).

La identificación de las especies de *Colletotrichum*, asociadas a la antracnosis de papaya, se confirmó mediante PCR con imprimadores taxón específico CgInt: 5'-GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG-3' para la especie *C. gloeosporioides* (Salazar *et al.*, 2012) y los imprimadores GmF: 5'-GTGAACATACCTCAAACGTTGCC-3' y GmR: 5'-GGAGGGTCCGCCACTGTATT TCG-3' para *C. magna* (Tsay *et al.*, 2010).

La especie *C. capsici*, no se corroboró por no contarse con imprimadores específicos para esta especie.

3.2.3. Caracterización morfológica de los aislamientos

Simultáneamente, en el Laboratorio de Tecnología Poscosecha del Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA-UCR), duplicaciones de las colonias que se enviaron a identificar por medio de secuenciación de ADN, se caracterizaron morfológicamente. Las variables evaluadas fueron el hábito de crecimiento (superficial o aéreo), coloración de colonia en la parte aérea y basal, cantidad, tamaño y distribución de estructuras de reproducción, presencia y ausencia de setas y forma de los conidios. Las colonias que presentaron uno o más caracteres en común, fueron agrupadas para ser comparados con los resultados de la identificación por secuenciación de ADN.

3.2.4. Prueba de patogenicidad

Se recolectaron frutas de papaya en la zona de Guácimo, con un grado 2 de maduración, (< 20% de amarillo), según escala de madurez establecida por

Salazar (2012), las cuales fueron lavadas con agua para eliminar residuos de fungicidas e impurezas. Posteriormente, la fruta fue desinfectada en agua clorada 100 mg/L durante 30 segundos y se dejó secar. A cada papaya, se le realizaron 6 orificios con un sacabocados de aproximadamente 5 mm de diámetro, en cada uno de los cuales se colocó un disco de 5 mm de diámetro de medio con crecimiento de micelio de cada uno de los siete aislamientos previamente identificados, el tratamiento testigo consistió de un disco que contenía únicamente PDA+AL. Las frutas inoculadas se colocaron en cámaras húmedas por 24 horas a 22 ± 2 °C y a una HR cercana al 100%. Posteriormente, se trasladaron a cámaras con una temperatura de 22 ± 2 °C, durante el resto del ensayo. Se evaluó el diámetro de cada lesión a los 4, 8 y 11 días después de inoculación. A los 11 días se realizó el patógeno y se identificó por técnicas moleculares, para constatar que se recuperaron las especies inoculadas. De los datos obtenidos se realizó ANDEVA y separación de medias por medio de Tukey ($p \leq 0,05$).

3.3 Fase II. Determinación de sensibilidad de aislamientos de *Colletotrichum* a diferentes fungicidas

Para la determinación de sensibilidad de los diferentes aislados a fungicidas en concentraciones crecientes (0, 0,1, 1, 10 y 100 mg/L) se utilizaron dos técnicas de evaluación: Diámetro de colonia y germinación de esporas. Los aislamientos seleccionados para esta prueba fueron los que presentaron el mayor crecimiento de la lesión en la evaluación de patogenicidad, los aislamientos T5 y T4 de las especies de *C. gloeosporioides* y *C. magna* respectivamente y un aislamiento en el caso de *C. gloeosporioides* silvestre y *C. capsici*.

3.3.1 Determinación de sensibilidad a fungicidas por medio de la técnica de diámetro de colonia

Para la determinación de sensibilidad por medio de la técnica de diámetro de colonia, se adicionó una alícuota de la solución madre del fungicida en un balón conteniendo el medio, para luego ser aforado para obtener las concentraciones de 0, 0,1, 1, 10, y 100, mg/L de ingrediente activo del fungicida. Los fungicidas utilizados fueron: procloraz, pyrimethanil, fludioxonil, azoxystrobin, pyraclostrobin y

trifloxystrobin, preparados a partir de una solución madre de aproximadamente 5000 mg/L de ingrediente activo.

Posteriormente, se tomaron discos de aproximadamente 4 mm del medio de cultivo de la periferia de la colonia del hongo, y se colocaron con la cara del disco con micelio en contacto con el medio de cultivo que contenía PDA + ácido láctico + fungicida en las cajas de Petri que se sellaron con papel Parafilm y se almacenaron dentro de una cámara que se acondicionó a $22 \pm 2^\circ \text{C}$ y un fotoperiodo de 12 horas de oscuridad y 12 horas de luz. Las condiciones de almacenamiento se fueron monitoreadas durante el experimento con un registrador de datos de temperatura y luminosidad (Flux) (HOBO® Data Logger).

Transcurrida una semana, se evaluó el crecimiento de los hongos, midiendo el diámetro menor y el diámetro mayor de la colonia para luego obtener las medias de estos diámetros, y mediante la fórmula de Abbot, calcular la eficacia de los fungicidas (Barquero 2000).

$$ET = \frac{RT - rt}{RT} * 100$$

Donde:

ET= Eficacia del tratamiento

RT = Diámetro en cm del crecimiento micelial en el testigo (PDA + ácido láctico)

rt = Diámetro promedio en cm de cada tratamiento (PDA + ácido láctico + fungicida)

El diseño experimental utilizado fue un irrestricto al azar de 30 tratamientos constituidos por 6 fungicidas a 5 dosis crecientes, para las tres especies encontradas, más la especie silvestre de *Colletotrichum gloeosporioides*, con 4 repeticiones por tratamiento, para un total de 480 unidades experimentales, cada unidad experimental consistió de una caja Petri.

3.3.2. Determinación de sensibilidad por medio de germinación de esporas

Para la determinación de sensibilidad por medio de la técnica de germinación de esporas en medio de cultivo, se prepararon los tratamientos tal como se describió en el apartado 3.3.1., para la preparación de la suspensión de esporas se usó la técnica detallada en el apartado c para aislamientos monoconidiales, para obtener una suspensión con una concentración de 100 000 conidios/mL.

Pasadas las 24 horas, con la ayuda de un microscopio se evaluaron 50 esporas por repetición, las cuales se clasificaron como germinadas o no germinadas y si se observaban malformaciones en el tubo germinativo y plasmólisis de las esporas. Con los datos se obtuvo el porcentaje de germinación, y mediante la fórmula de Abbot ya descrita, se calculó la eficacia de los fungicidas.

El diseño experimental utilizado fue un irrestricto al azar de 30 tratamientos constituidos por 6 fungicidas a 5 dosis crecientes, para las tres especies encontradas, más la especie silvestre de *Colletotrichum gloeosporioides*, con 4 repeticiones por tratamiento, para un total de 480 unidades experimentales, cada unidad experimental consistió de una caja Petri.

Los datos generados con las dos técnicas de evaluación: diámetro de colonia y germinación de esporas fueron analizados mediante un análisis de ANDEVA, la comparación de medias mediante la prueba de Fisher ($p \leq 0,05$) y un análisis de regresión entre la eficacia de los tratamientos y el logaritmo natural de las dosis con el que se calculó la concentración efectiva media (CE_{50}).

3.4 Fase III. Evaluación de fungicidas en frutos

Se cosecharon frutos de papaya correspondientes al estado 2 de maduración (< 20% de amarillo), según escala de madurez propuesta por Salazar (2012), de la zona de Pococí, para luego ser trasladados a las instalaciones de Laboratorio de Tecnología Poscosecha, del Centro de Investigaciones Agronómicas, para la aplicación de tratamientos poscosecha y la simulación de transporte en cámaras de frío.

Los frutos fueron lavados con agua con 100 mg/L de cloro, luego fueron secados con un ventilador para posteriormente ser inoculados por inmersión por un minuto en una suspensión de conidios de *C. gloeosporioides* y *C. magna*, en una mezcla con una concentración de 5000 esporas/mL de cada especie y así tener una suspensión final con una concentración de 10 000 esporas/mL. Posteriormente, se colocaron 6 frutas en una caja plástica con papel periódico húmedo y se introdujo la caja en una bolsa plástica, para crear una cámara húmeda durante 24 horas, para luego aplicar los tratamientos con fungicidas por inmersión durante un minuto. Los tratamientos evaluados fueron: trifloxystrobin, pyrimethanil, fludioxonil y el procloraz (Cuadro 1) en las dosis mínima y promedio comercial recomendadas de cada fungicida, excepto para el fludioxonil, para el que solo se evaluó la dosis mínima), además, se incluyó como tratamiento comercial el fungicida procloraz. Luego de aplicarse los tratamientos, las cajas con los frutos se colocaron en una cámara con frío a 12 °C durante 15 días, para simular el tiempo de transporte marítimo a Europa.

Cuadro 1. Fungicidas y dosis evaluadas en frutos de papaya.

Tratamiento	Dosis comercial/100L de agua	Dosis evaluada (mL/L)
Fludioxonil	200-250 mL	2 mL/L
Pyrimethanil	50-70 mL	0,5 mL/L
		0,6 mL/L
Pyraclostrobin	200-300 mL	2 mL/L
		2,5 mL/L
Procloraz	55-100 mL	0,5 mL/L
		0,77 mL/L
		Dosis comercial 1 mL/L
Testigo absoluto	-	Agua

Transcurrido las 2 semanas de almacenamiento a 12°C, se evaluó la cantidad de frutos sanos y enfermos por tratamiento, y con la ayuda de una escala propuesta por Navarro y Arauz (1999), se midió la severidad de la antracnosis.

Simultáneamente se evaluó el efecto que tuvieron los tratamientos sobre la calidad de las frutas, mediante el color y la firmeza de la cáscara y de la pulpa, y los azúcares solubles.

La evaluación de firmeza se realizó en la zona ecuatorial del fruto, usando un penetrómetro Chatillon modelo DPPH-110, considerando para las mediciones la zona de la papaya expuesta al sol, la zona en la sombra y un punto intermedio entre estas dos, las cuales se obtuvo un promedio de la firmeza de la fruta.

Para la determinación de los azúcares solubles, se extrajo de la mitad de la fruta una rodaja de aproximadamente 3 cm de ancho, y se maceró para la extracción del jugo, el cual fue filtrado a través de una gasa para luego medir con un refractómetro ATAGO PAL-1, los azúcares solubles.

El diseño experimental utilizado fue un irrestricto al azar de 10 tratamientos con 5 repeticiones, con 6 frutas por repetición. Con los datos de incidencia y severidad se calculó el área bajo la curva de desarrollo de la enfermedad (Arauz, 2009), se hizo un ANDEVA y la comparación de medias se realizó mediante la prueba de Fisher ($p \leq 0,05$).

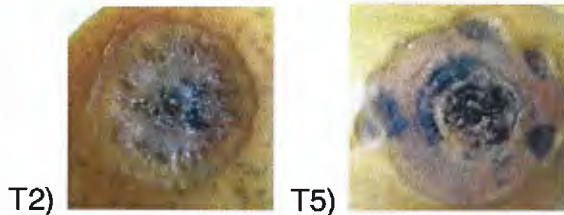
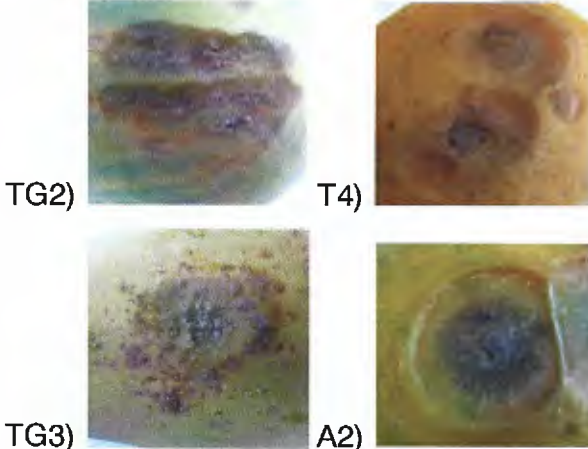
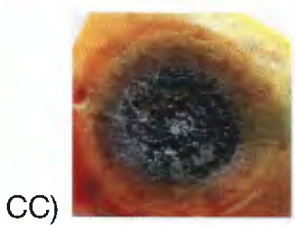
4. RESULTADOS

4.1 Fase I. Caracterización de la sintomatología de antracnosis e identificación del agente causal a nivel de especie mediante técnicas moleculares

4.1.1 Caracterización de síntomas y aislamientos asociados

Se lograron identificar 7 síntomas de antracnosis en los frutos recolectados de la zona de Guácimo (Cuadro 2), en el periodo de los meses de agosto a diciembre del 2012. Por similitudes en una o más de las características observadas como profundidad de la lesión, presencia o ausencia de secreciones y color de la esporulación, los síntomas se separaron en 3 grupos.

Cuadro 2. Síntomas identificados en el período de los meses de agosto y diciembre 2012 en frutas de papaya híbrido Pococí de la zona de Guácimo.

Grupo	Síntoma	Descripción
1	 <p>T2) T5)</p>	Lesión circular ligeramente hundida, con producción de acervulos anaranjados y negros y esporulación brillante de color naranja.
2	 <p>TG2) T4) TG3) A2)</p>	Lesión circular ligeramente hundida de color café, con poca producción de acervulos de color café oscuro, secreciones de látex, agrietamientos de la cáscara y coalescencia de lesiones.
3	 <p>CC)</p>	Lesión circular ligeramente hundida con formación abundante de acervulos y esporulación de color crema, arrugamientos de la cáscara en el borde de la lesión.

El primer grupo incluyó los síntomas T2 y T5, que presentaron una lesión circular ligeramente hundida, con producción de acervulos anaranjados y negros y esporulación abundante, brillante, de color anaranjada.

Los siguientes cuatro síntomas (TG2, T4, TG3 y A2) correspondieron al grupo 2, con lesiones circulares, de consistencia seca, en algunos casos con secreción de látex y con poca producción de acérvulos y escasa esporulación, con coalescencia de lesiones y agrietamientos de la cáscara.


















Por último, el grupo 3, incluyó un síntoma (CC) de lesión circular, ligeramente hundida, con bastante formación de acérvulos y esporulación de color crema, con arrugamientos de la cáscara en los bordes de la lesión. Además, los aislamientos realizados a cada uno de los síntomas presentaron diferencias en color, tanto de la parte aérea y reverso de la colonia, por la presencia o ausencia de setas, cantidad de acérvulos y forma de esporas (Cuadro 3).

Los aislamientos T2 y T5 (Cuadro 3) correspondientes a los síntomas del grupo 1, presentaron un color de colonia blanca, con crecimiento aéreo de aspecto algodonoso, con coloración crema en el reverso de la colonia y con una producción escasa de acérvulos pequeños de color negro, sin setas y con una esporulación de color parda, y conidios de forma cilíndrica ovoide. El crecimiento a los 8 días, es intermedio en comparación con los otros grupos de aislamientos.

Los aislamientos TG2, T4, TG3, y A2 del grupo 2, presentaron una coloración de la colonia café oliváceo, con un crecimiento superficial, con micelio blanco en la periferia de algunas de las colonias y formación de estroma observado como masas irregulares en el centro, confiriéndole una coloración oscura en el reverso de la colonia. La esporulación es abundante, de color naranja, en acérvulos de color negro, sin setas y conidios de forma cilíndrica- ovoide. Es el grupo que presenta el mayor crecimiento a los 8 días.

El aislamiento CC correspondiente al grupo 3, presentó una colonia con un hábito de crecimiento muy superficial y denso, de color blanco en la periferia, y color crema en el centro de la colonia, el reverso de la colonia es de color crema, con anillos concéntricos de color grisáceo, acérvulos de color negro con presencia de setas y conidios de forma falcada. Es el grupo que presenta el crecimiento más lento en comparación con los otros grupos de aislamientos.

Cuadro 3. Morfología de aislamientos de *Colletotrichum* spp. correspondientes a diferentes síntomas de antracnosis recolectados de frutos de papaya.

Especie	Cultivo (Parte aéreo)	Cultivo (Parte basal)	Conidios
Grupo 1	<p>T2) </p> <p>T5) </p>	<p>T2) </p> <p>T5) </p>	
Grupo 2	<p>TG2) </p> <p>T4) </p> <p>TG3) </p> <p>A2) </p>	<p>TG2) </p> <p>T4) </p> <p>TG3) </p> <p>A2) </p>	
Grupo 3	<p>g) </p>	<p>g) </p>	 <p>Seta ↓</p>

4.1.2 Identificación de las especies de *Colletotrichum* spp. a nivel molecular

La secuenciación de la región ITS del ADN ribosomal de los aislamientos de los síntomas anteriormente descritos, separados por diferencias en sintomatología y características de colonia, correspondieron a tres especies del género *Colletotrichum*, los cuales se separaron en los grupos 1, 2 y 3. Las especies identificadas fueron: *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum magna* y *Colletotrichum capsici*, con base en su homología con secuencias depositadas en el GenBank (Cuadro 4).

Cuadro 4. Similitud de las secuencias amplificadas de las regiones ITS1-5.8S e ITS-2 del ADN ribosomal de los aislamientos con el GeneBank.

Grupo	Código	Especie	Similitud GeneBank (%)	Número de accesión	
1	T2	<i>C. gloeosporioides</i>	100	KC493156	JQ814365
	T5	<i>C. gloeosporioides</i>	100	KC493156	JQ814365
2	T4	<i>C. magna</i>	99	DQ003103	HM163177.1
	TG2	<i>C. magna</i>	99	DQ003103	HM163177.1
	TG3	<i>C. magna</i>	99	DQ003103	HM163177.1
	A2	<i>C. magna</i>	99	DQ003103	HM163177.1
3	CC	<i>C. capsici</i>	99	JX258749	JQ685752.1

Los resultados de la electroforesis de productos de PCR ribosomal con los imprimadores específicos CgInt para *C. gloeosporioides* y GmF y GmR para *C. magna*, corroboraron la presencia de las dos especies para los aislamientos de los diferentes síntomas (Figura 1). Para *C. capsici* no se utilizó imprimadores específicos, por lo que no se pudo corroborar. De la figura 1.a, los aislamientos que amplificaron positivamente con el imprimador específico CgInt para *C. gloeosporioides*, fueron T2 y T5 (Cuadro 4), que mostraron la banda correspondiente de aproximadamente 400 pb. Las bandas T4, TG2, TG3 y A2 no se obtuvo producto de amplificación con el imprimador específico CgInt, pero sí para los aislamientos con los imprimadores GmF y GmR (Figura 1.b) para *C. magna*. El producto de PCR fue del tamaño esperado de cerca de 320 pb.

Consecuentemente, se corrobora la presencia de *C. gloeosporioides* (Figura 1.a) y *C. magna* (Figura 1.b), para los síntomas de los grupos 1 y 2, respectivamente.

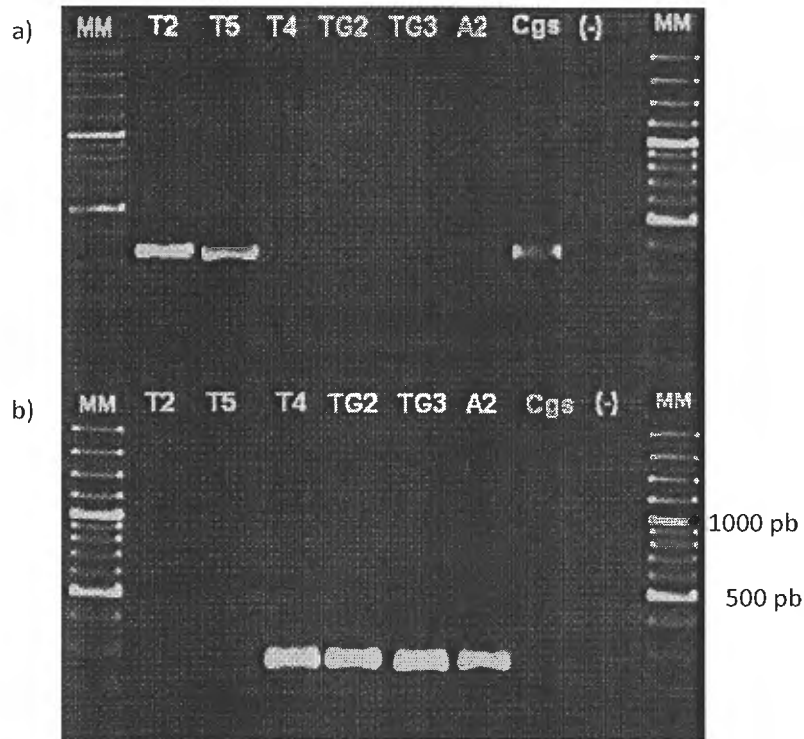


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR para los aislamientos de *Colletotrichum* spp. con los imprimadores CgInt para *C. gloeosporioides* (a), e imprimadores GmF y GmR para *C. magna* (b).

4.1.3 Patogenicidad de aislamientos

Los frutos a los que se hicieron heridas para la inoculación de los aislados, presentaron un 100% de incidencia, y las variaciones se dieron en el tamaño de las lesiones. Se observó que todas las especies encontradas tuvieron la capacidad de infectar el tejido vegetal, por lo que se concluye que son especies patogénicas. Como se observa en la Figura 2, los aislamientos que presentaron un mayor diámetro de lesión fueron T4 y TG2, correspondientes a *C. magna*, seguidos por el aislamiento T5 identificado como *C. gloeosporioides*. Con base en estos resultados, se escogieron los aislamientos T4 y T5 correspondientes a *C. magna* y *C. gloeosporioides* respectivamente, para la evaluación de su sensibilidad *in vitro* a los fungicidas.

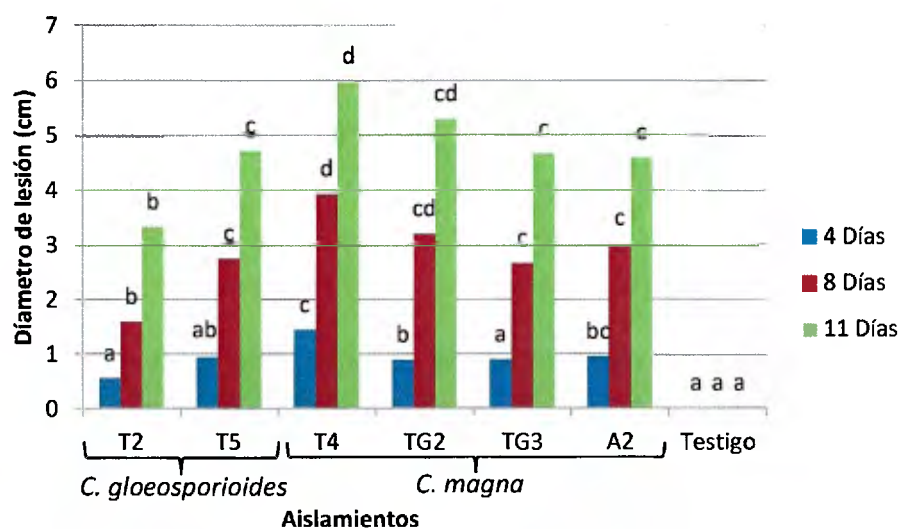


Figura 2. Diámetro promedio (mm) de la lesión de diferentes especies de *Colletotrichum* inoculadas en frutas de papaya.

4.2 Fase II. Determinación de la sensibilidad de los aislamientos de *Colletotrichum* spp. a diferentes fungicidas

4.2.1 Determinación de sensibilidad a fungicidas por medio de la técnica de diámetro de colonia

La eficacia de los tratamientos con fungicida, varió significativamente en la reducción del crecimiento de la colonia de las especies de *C. gloeosporioides* silvestre, *C. gloeosporioides*, *C. magna* y *C. capsici* (Cuadro 5).

El tratamiento con procloraz presentó los valores más altos de eficacia en la disminución del crecimiento de todas las especies evaluadas (*C. gloeosporioides* silvestre: 78,6%; *C. gloeosporioides*: 82,7%; *C. magna*: 76,9% y *C. capsici*: 81,6%). El fludioxonil no mostró diferencias significativas con el procloraz, con excepción para la especie *C. gloeosporioides* silvestre, con la que obtuvo uno de los valores más bajos de eficacia, 18,7%, sin diferenciarse con el trifloxystrobin, que fue el tratamiento que menos redujo el crecimiento de las colonias de las especies evaluadas (*C. g* silvestre: 16,3%; *C. g*: 23,5%; *C. m*: 40,7% y *C. c*: 11,2%).

Entre los fungicidas del grupo de las estrobilurinas, el pyraclostrobin demostró valores de eficacia mayores que los fungicidas azoxystrobin y trifloxystrobin, sin diferencias significativas con el procloraz sobre las especies *C. gloeosporioides* y *C. magna*, pero sí para *C. capsici*. Y por último, el tratamiento con pyrimethanil presentó valores intermedios de eficacia, con excepción para la especie *C. capsici*, para la cual no tuvo diferencias significativas con el procloraz y el fludioxonil.

Cuadro 5. Porcentaje de eficacia de los fungicidas evaluados sobre la disminución del diámetro de micelio de tres especies del género *Colletotrichum* spp.

Fungicida	Especie			
	<i>C. g. silvestre</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. magna</i>	<i>C. capsici</i>
Procloraz	78,6 abc*	82,7 a	76,9 abcd	81,6 ab
Fludioxonil	18,7 ijk	63,5 abcde	67,8 abcd	76,9 abcd
Pyrimethanil	11,2 k	34,3 ghij	37,9 fghij	70,1 abcd
Pyraclostrobin	58,1 cdef	79,6 abc	72,3 abcd	43,8 efgh
Azoxystrobin	37,3 fghij	54,7 defg	59,4 bcdef	57,3 cdef
Trifloxystrobin	16,3 jk	23,5 hijk	40,7 fghi	11,2 k

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes LSD Fisher ($p \leq 0,05$).

Debido a que las concentraciones efectivas medias (CE_{50}), calculadas mediante la regresión lineal del logaritmo natural de la concentración del fungicida y el porcentaje de la eficacia de reducción del diámetro de la colonia presentaron una baja confiabilidad (Anexos 7), se analizó el rango entre las concentraciones donde se observó un efecto mayor del fungicida sobre el crecimiento en el diámetro de micelio de las especies. Sin embargo, solo fue posible obtener valores de concentraciones efectivas medias con una confiabilidad aceptable (celdas coloreadas en amarillo) para todas las especies evaluadas para los tratamientos con los fungicidas procloraz, fludioxonil y pyraclostrobin.

Para los fungicidas pyrimethanil y azoxystrobin solo fue posible obtener las CE_{50} en las especies *C. gloeosporioides* y *C. capsici*. Para el fungicida trifloxystrobin no fue posible obtener una confiabilidad estadística en ninguno de los ámbitos de las concentraciones evaluadas para ninguna de las especies.

Con base en estas regresiones, se obtuvieron los valores más bajos de concentración efectiva media (CE₅₀) con el fungicida procloraz (Cuadro 6), comprendidos entre los 0,190 y 0,288 mg/L, seguidos por el pyraclostrobin con una CE₅₀ entre los 0,08 y 5,436 mg/L y por último, el fludioxonil con valores de CE₅₀ entre los 0,288 y 65,369 mg/L, que serían los ámbitos de CE₅₀ para todas las especies evaluadas. Para los fungicidas azoxystrobin y pyrimethanil se obtuvieron valores de CE₅₀ de 0,259 y 14,156 mg/L respectivamente para la especie de *C. gloeosporioides* y para *C. capsici* valores de 0,273 y 0,188 mg/L.

Cuadro 6. Concentraciones efectivas medias (CE₅₀) de los fungicidas sobre el crecimiento micelial de tres especies del género *Colletotrichum* spp.

	<i>C. g. silvestre</i>	R ²	<i>C. g</i>	R ²	<i>C. m</i>	R ²	<i>C. c</i>	R ²
Procloraz	0,260	0,9804	0,190	0,9232	0,288	0,9790	0,288	0,9725
Fludioxonil	65,369	0,7743	1,027	0,8619	0,716	0,7143	0,288	0,9725
Pyrimethanil	>100	0,2387	14,156	0,6549	0,570	0,4472	0,188	0,7990
Pyraclostrobin	1,589	0,7895	0,084	0,6642	0,422	0,5322	5,436	0,6449
Azoxystrobin	0,420	0,3544	0,259	0,8640	0,003	0,0172	0,273	0,5955
Trifloxystrobin	>100	0,1452	24,857	0,1728	4,292	0,3488	>100	0,1168

* Celdas coloreadas en amarillo representan que la regresión es estadísticamente existente (Anexos 7).

C. g: *Colletotrichum gloeosporioides*

C. m: *Colletotrichum magna*

C. c: *Colletotrichum capsici*

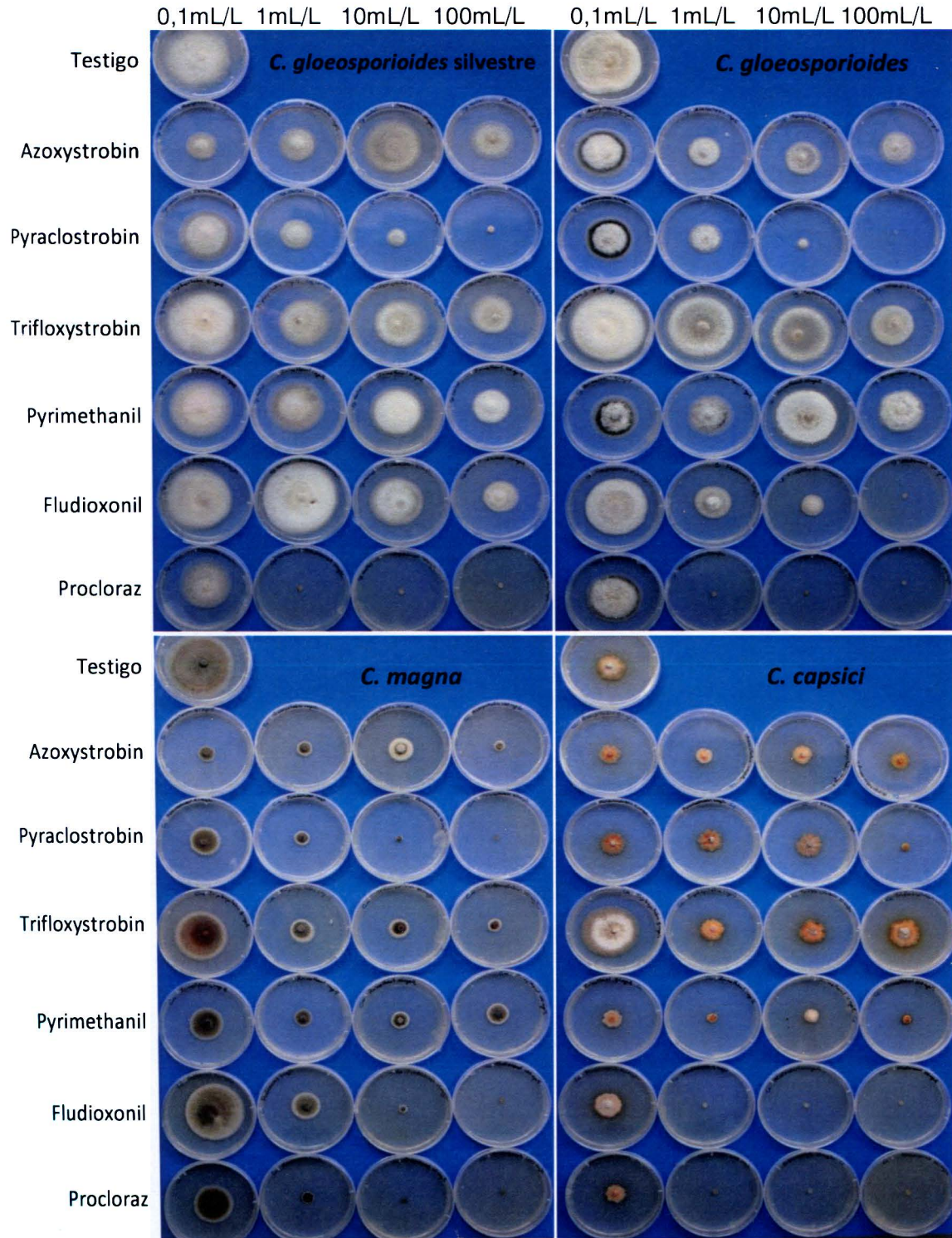


Figura 3. Diámetro de micelio de especies del género *Colletotrichum*: *C. gloeosporioides silvestre*, *C. gloeosporioides*, *C. magna* y *C. capsici*, en presencia de diferentes concentraciones de fungicidas.

4.2.2 Determinación de la sensibilidad a fungicidas por medio de la técnica de germinación de esporas

En la evaluación de germinación de esporas, los tratamientos que presentaron la mayor eficacia en todas las especies evaluadas fueron: el procloraz, fludioxonil y el pyraclostrobin con valores entre el 91,5 y el 100% de eficacia y sin diferencias estadísticas significativas. Por el contrario, el fungicida que presentó los valores más bajos de eficacia fue el pyrimethanil sobre las especies de *C. gloeosporioides* y *C. magna*. Sin embargo, tuvo un mayor efecto en la disminución de la germinación de la especie *C. capsici*, sin diferencias significativas con el procloraz, el fludioxonil y el pyraclostrobin. El azoxystrobin y el trifloxystrobin presentaron mayores eficacias para las especies de *C. gloeosporioides* silvestre, *C. magna* y *C. capsici*, con la especie *C. gloeosporioides* los valores fueron de 43,5 y 38,3% respectivamente. Por las dosis consideradas para ser evaluadas en este ensayo, no fue posible determinar la CE₅₀ exactas, sin embargo, por los resultados obtenidos, estos sugieren que las CE₅₀ para la germinación de esporas son menores a 0,1 mg/L.

Cuadro 7. Porcentaje de eficacia de los tratamientos evaluados sobre la disminución de la germinación de esporas de tres especies del género *Colletotrichum* spp.

Fungicida	Especie			
	<i>C. g. silvestre</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. magna</i>	<i>C. capsici</i>
Procloraz	99,1 a *	100 a	100 a	100 a
Fludioxonil	98,9 a	100 a	100 a	99,2 a
Pyrimethanil	67,8 b	24,3 c	54,4 b	88,0 a
Pyraclostrobin	100 a	99,6 a	100 a	91,5 a
Azoxystrobin	100 a	43,5 b	100 a	89,7 a
Trifloxystrobin	100 a	38,3 bc	100 a	92,40 a

*Letras comunes en la misma fila no son significativamente diferentes según prueba LSD Fisher ($p \leq 0,05$).

4.3 Fase III. Evaluación de fungicidas en frutos

En el análisis del área bajo la curva de desarrollo de la enfermedad, las papayas que presentaron la menor incidencia de antracnosis fueron las tratadas con procloraz en las concentraciones de 0,55 mL/L y 1 mL/L (testigo comercial), sin diferencias significativas entre ellas (Figura 4), pero sí con pyraclostrobin (2 mL/L) y pyrimethanil (0,6 mL/L), que tuvieron la mayor incidencia. Los tratamientos con procloraz (0,77 mL/L), fludioxonil (2 mL/L), pyraclostrobin (3 mL/L), pyrimethanil (0,5 mL/L) y el testigo presentaron valores intermedios de incidencia de la enfermedad.

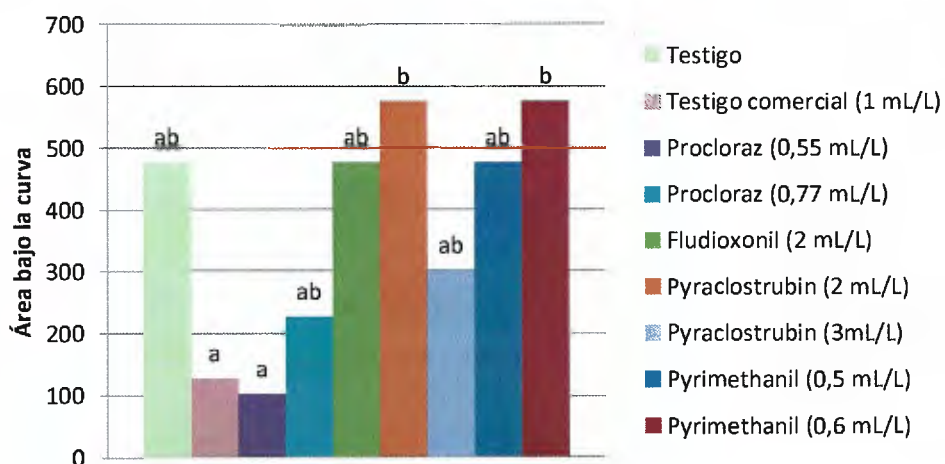


Figura 4. Área bajo la curva de la incidencia de antracnosis en frutas de papaya tratadas con fungicidas en la etapa poscosecha. Letras distintas indican diferencias significativas según prueba LSD Fisher ($p \leq 0,05$).

Los tratamientos que presentaron la menor severidad de antracnosis (Figura 5), fueron los de las dosis de 0,55 mL/L y 1 mL/L de procloraz, sin diferencias significativas entre estas. Los tratamientos que tuvieron el menor efecto fueron el pyraclostrobin (2 mL/L) y el pyrimethanil (0,6 mL/L), con valores para esta variable mayores a lo se obtuvo en las papayas del tratamiento testigo.

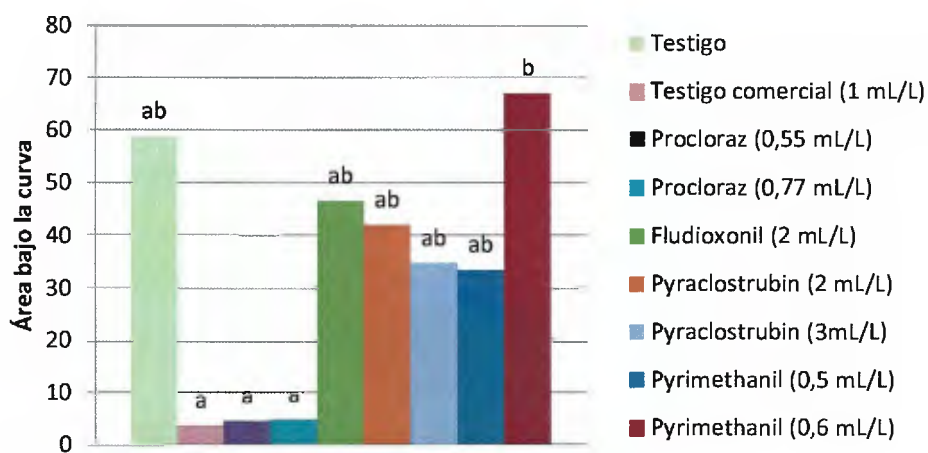


Figura 5. Área bajo la curva de la severidad de antracnosis en frutos tratados a diferentes concentraciones de fungicidas, en la etapa poscosecha. Letras distintas indican diferencias significativas según prueba LSD Fisher ($p \leq 0.05$).

La pudrición peduncular no varió significativamente entre los fungicidas evaluados (Figura 6), aunque se observó una tendencia a una menor incidencia para los tratamientos de procloraz y una mayor incidencia para los tratamientos de pyrimethanil en las dos concentraciones utilizadas.

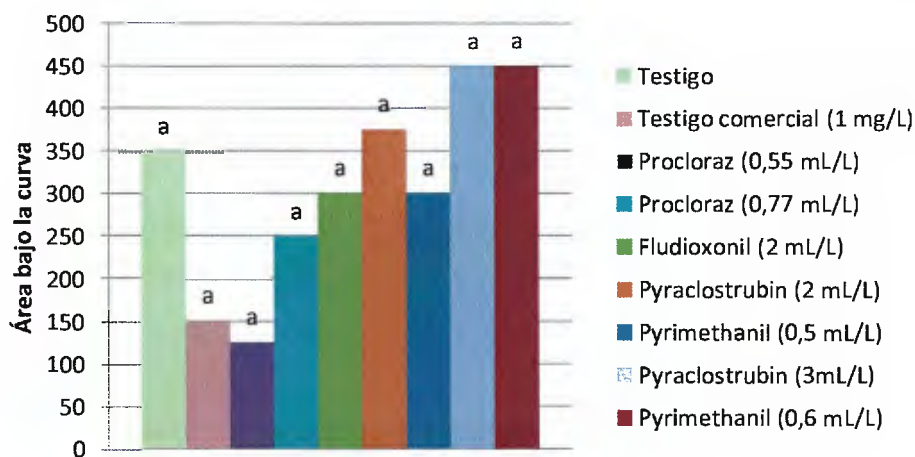


Figura 6. Área bajo la curva de la pudrición peduncular en frutos tratados a diferentes concentraciones de fungicidas, en la etapa poscosecha. Letras distintas indican diferencias significativas según prueba LSD Fisher ($p \leq 0.05$).

El cambio de color de cáscara de verde a amarillo se dio de manera normal para el híbrido Pococí a través del tiempo (Anexo 8), y el cambio de color de la pulpa de rosado a naranja tuvo un aumento considerable, llegando a un 100% a los 12 días de salida de cámara (Anexo 9). La firmeza de la cáscara (Anexos 11-13) y de pulpa (14-16) presentaron una disminución en los diferentes puntos seleccionados para la evaluación: parte expuesta del fruto durante el crecimiento a la luz, parte del fruto en sombra y parte en zona intermedia. Sin embargo, se encontraron diferencias en la firmeza entre los lados de evaluación, presentándose valores más altos en la parte de la fruta que está expuesta a la luz durante el desarrollo de la papaya en el campo.

Los azúcares solubles no sufrieron cambios significativos debido a los tratamientos durante todo el periodo de evaluación, con valores entre los 10 y 12 de grados brix. Los tratamientos no causaron manchas ni toxicidad visibles en la superficie de la fruta.

5. DISCUSIÓN GENERAL

En el presente trabajo se observó 3 tipos de síntomas asociados a la antracnosis de frutos de papaya, híbrido Pococí. En Costa Rica, esta variabilidad de sintomatología de la antracnosis fue descrita en los trabajos de Durán y Mora en 1987, con materiales de papaya criolla que diferían genotípicamente y que en ese momento, fue una de las razones que explicaba las diferencias en síntomas conjuntamente con la posibilidad de la presencia de otras especies. Sin embargo, en esta investigación se utilizó el híbrido "Pococí", por lo que el genotipo de esta papaya se presume que es muy homogéneo, lo que descartaría la variabilidad de respuesta del hospedero al patógeno, aún así, se presentaron diferencias en las lesiones de antracnosis, que hizo indicar, que distintas especies del género *Colletotrichum* provocaban las diferencias de síntomas, como los obtenidos por Tarnowski y Ploetz (2010) en Florida, Tapia *et al.*, (2008) y Torres *et al.*, (2013) en México y que las diferencias en la magnitud de la sintomatología de una misma especie, se debía a la capacidad patogénica de la cepa, como se observó en las pruebas de patogenicidad en este trabajo (Figura 2). En trabajos realizados por

varios autores como Walton en 1994 y Reignault *et al.*, en el 2008, sugieren que las diferencias en síntomas, se deben a la secreción de enzimas degradadoras de la pared celular por parte del patógeno sobre el hospedero, y que las diferencias en la producción de pectinasas, no solo determinarían la patogenicidad de las cepas, sino también la extensión de las lesiones y la naturaleza de la síntomas observados (Reignault *et al.*, 2008).

Los resultados obtenidos en este trabajo, con la identificación de tres especies del género *Colletotrichum*: *C. gloeosporioides sensu lato*, *C. magna* y *C. capsici*, serían el primer reporte para las dos últimas especies mencionadas como patogénicas en papaya producidas en Costa Rica. Estos resultados coincidirían con los obtenidos en Brasil (Nascimento *et al.*, 2010, Viera *et al.* 2013), Estados Unidos, en el estado de la Florida (Tarnowski y Ploetz, 2010), México (Tapia *et al.*, 2008 y Torres *et al.*, 2013) y Trinidad y Tobago (Rampersad, 2011) con la identificación de diferentes especies como agentes causales de la antracnosis en papaya, (Simmonds, 1965).

En Estados Unidos, México y Trinidad y Tobago, se ha identificado a *C. gloeosporioides* y *C. truncatum* (sinónimo *C. capsici*), mientras que en Brasil se ha identificado a *C. brevisporum*, *C. magna* y *C. truncatum* (sinónimo *C. capsici*) como patógenos de papaya. Por tanto, *C. gloeosporioides* y *C. truncatum* (sinónimo *C. capsici*) presentan una amplia distribución geográfica y es interesante que *C. magna*, una especie conocida como patógena de cucurbitáceas (Redman *et al.*, 2001; Tsay *et al.*, 2010), infecte papaya tanto en Brasil como en Costa Rica. Cabe señalar que morfológicamente, *C. gloeosporioides* y *C. magna* son indistinguibles, por lo que es posible que haya ocurrido en el pasado una incorrecta identificación de las especies (Nascimento *et al.*, 2010).

Como se mencionó anteriormente, *C. gloeosporioides* ha sido considerada la especie causante de la antracnosis de papaya en Costa Rica y otros países alrededor del mundo. Sin embargo, estudios moleculares recientes indican que *C. gloeosporioides* es en realidad un complejo de especies, es decir un grupo de especies, al menos 22 especies y una subespecie, con similitudes morfológicas y

genéticas (Weir *et al.*, 2012, Xu *et al.*, 2014). Actualmente se denomina al complejo *C. gloeosporioides sensu lato* y a la especie *C. gloeosporioides sensu stricto*. En el presente trabajo se identificó a *C. gloeosporioides* como una de las especies causantes de antracnosis en papaya. La identificación se basó en la secuencia de la región espaciadora interna transcrita de los genes del ARN ribosomal (ITS por sus siglas en inglés) y la amplificación mediante PCR con los imprimadores CgInt e ITS4, diseñados en la misma región. En años recientes, se ha demostrado que únicamente 10 de las 22 especies del complejo *C. gloeosporioides* pueden ser claramente identificadas mediante la secuencia de la región ITS y que el imprimador CgInt, inicialmente diseñado como específico para *C. gloeosporioides* es en realidad taxón específico, es decir identifica a *C. gloeosporioides sensu lato* (Afanador-Kafuri *et al.*, 2014). De manera, que varias especies del complejo *C. gloeosporioides*, incluida *C. gloeosporioides sensu stricto* podrían causar antracnosis en frutos de papaya en Costa Rica. Para establecer si otras especies del complejo *C. gloeosporioides sensu lato* causan antracnosis de papaya en Costa Rica se requiere el análisis de otras regiones del genoma o análisis multilocus (Prihastuti *et al.*, 2009) o bien un estudio polifásico (Cai *et al.*, 2009).

La presencia de grupos intraespecíficos o de diferentes especies que conforman el complejo *C. gloeosporioides* podría explicar las diferencias obtenidas en la sensibilidad a fungicidas. Barquero *et al.* (2013), determinaron la sensibilidad al benomil, de aislamientos de papaya identificados como *C. gloeosporioides* por medio de la secuenciación de la región ITS, pero como *C. acutatum* por la prueba de sensibilidad, así que existe la posibilidad de que otras especies del complejo *C. gloeosporioides* con diferencias en sensibilidad al benomil estuvieran presentes. De igual forma, el aislamiento de *C. gloeosporioides* denominado silvestre, obtenido de una región sin la presión de selección por fungicidas, presentó una menor sensibilidad a los tratamientos con fungicida, en comparación con los aislamientos identificados como *C. gloeosporioides* que se obtuvieron de fincas productoras. Sin embargo, los valores promedio de la CE₅₀, para el procloraz en este estudio fue igual a la determinada por Madrigal en 1997, para aislamientos de

la especie de *C. gloeosporioides* provenientes de distintas zonas de Costa Rica que sugiere que no ha ocurrido una disminución en la sensibilidad por parte de *C. gloeosporioides*.

Cuadro 8. Concentraciones efectivas medias (CE₅₀) promedio de los fungicidas sobre las especies de *Colletotrichum* en la evaluación de crecimiento micelial.

Fungicida	CE ₅₀ Promedio (mg/L)	CE ₅₀ <i>C. g. silvestre</i> (mg/L)
Procloraz	0,255	0,260
Fludioxonil	0,677	65,369
Pyrimethanil	7,172 *	>100
Pyraclostrobin	1,981	1,589
Azoxystrobin	0,266 *	0,420
Trifloxystrobin	4,290 **	>100

* Valor calculado con solo las dos especies (*C. gloeosporioides* y *C. capsici*) que fue posible determinar la CE₅₀.

** Valor calculado con solo la especie *C. magna* que fue posible determinar la CE₅₀.

En este trabajo, el tratamiento con procloraz fue el que presentó los mayores valores de eficacia promedio y los menores valores de CE₅₀ (Cuadro 8), en comparación con los tratamientos de fludioxonil y el pyraclostrobin para las especies *C. gloeosporioides* y *C. magna*, sin diferencias significativas entre estos tratamientos.

Para los tratamientos con pyrimethanil, azoxystrobin y trifloxystrobin, los valores de CE₅₀, fueron variables entre las especies, y con niveles de confianza muy bajos por lo que sería necesario evaluarse nuevamente, en dosis con intervalos más continuos que los seleccionados en esta investigación, para no descartarlos como posibles fungicidas en el combate de la antracnosis en papaya.

En las evaluaciones de sensibilidad por medio de la técnica de germinación de esporas, los datos muestran que las esporas son más sensibles a la presencia de fungicida que el micelio de las colonias, pues en la concentración más baja utilizada (0,1 mg/L) se presentaron eficacias del 100% de inhibición de la germinación, por ende, las CE₅₀ no pudieron ser determinadas con las concentraciones evaluadas.

Estos resultados muestran que los fungicidas como en el caso del fludioxonil y pyrimethanil son productos potenciales para ser utilizados en precosecha, por tener efecto sobre la germinación y elongación de tubo germinativo de los conidios (Rosslénbroich, 2000, citado por Kanetis *et al.*, 2007), ya que en aplicaciones poscosecha podrían no tener mucho efecto, debido a las infecciones latentes y/o esporas que ya habrían iniciado el proceso de germinación, tal como lo reportan autores como López (2010) y Barquero (2000), quienes encontraron que a las 24 horas se puede obtener porcentajes de germinación del 78% hasta del 91% en aislamientos de *C. gloeosporioides*, lo que pudo afectar la eficacia de estos fungicidas en esta investigación.

La presencia de las especies *C. gloeosporioides*, *C. magna* y *C. truncatum* (sinónimo *C. capsici*) asociadas a la antracnosis de papaya en la zona de Guácimo, Limón, plantea la interrogante sobre la distribución, abundancia y fluctuaciones de población (por factores ambientales: estación seca y lluviosa, así como factores biológicos) de estas especies en las zonas de producción de papaya en Costa Rica, tales como Parrita, San Carlos y Guácimo. Esta información es relevante para el planeamiento y precisión del manejo de la enfermedad tanto en campo, como en poscosecha. Incluso, para los programas de mejoramiento para resistencia genética a la antracnosis en papaya (Bogantes y Mora, 2013), para que los nuevos genotipos puedan ser evaluados en zonas con una mayor diversidad genética del patógeno, o bien a nivel de laboratorio con cada especie o la mezcla de ellas.

6. CONCLUSIONES

- Las diferencias en la sintomatología de antracnosis en papaya pueden deberse a diferentes especies del género *Colletotrichum* y a la virulencia del aislado.
- En este trabajo se identificaron tres especies diferentes: *C. gloeosporioides sensu lato*, *C. magna* y *C. capsici*, siendo el primer informe para las dos últimas especies como patógenas en papaya en Costa Rica.
- Las especies de *Colletotrichum* spp. presentaron diferencias en la sensibilidad *in vitro* a los fungicidas.
- Los fungicidas procloraz, fludioxonil y pyraclostrobin fueron eficaces en la inhibición de la germinación de esporas en todas las especies, en las concentraciones evaluadas.
- No se determinó una disminución de la sensibilidad *in vitro* de *C. gloeosporioides* al fungicida procloraz, en comparación con las determinadas por Barquero (2000)
- El fungicida procloraz presentó la mayor reducción de la antracnosis en las frutas de papaya en poscosecha.

7. RECOMENDACIONES

- Se requiere realizar un análisis de secuenciación de ADN en otras regiones a la utilizada, para precisar en la identificación de *C. gloeosporioides sensu lato*, que pertenece al denominado complejo *gloeosporioides* y del cual está conformado por 22 especies.
- Se debe de evaluar los fungicidas a concentraciones más continuas y de ámbitos más cortos en la evaluaciones *in vitro*, tanto en la técnica de crecimiento micelial como la de germinación de esporas, para precisar las concentraciones efectivas medias (CE₅₀) y así poder definir el comportamiento de las diferentes especies a la presencia de los distintos fungicidas.
- Sería oportuno, realizarse determinaciones de sensibilidad y de frecuencia de poblaciones de especies del género *Colletotrichum* en distintas zonas del país, productoras de papaya y con condiciones climáticas contrastantes, con el objetivo de proponer un manejo adecuado de la enfermedad.
- El fludioxonil y el pyraclostrobin podrían ser fungicidas interesantes de evaluar en el control de la antracnosis en campo, por los resultados obtenidos en la evaluación de germinación de esporas.

8. LITERATURA CITADA

- AFANADOR, L.; GONZÁLEZ, A.; GAÑÁN, L.; MEJÍA, J.; CARDONA, N.; ALVAREZ, E. 2014. Characterization of the *Colletotrichum* species causing anthracnose in Andean blackberry in Colombia. *Plant Diseases* 98: 1503-1513 p.
- AGRIOS, G. 2005. *Plant pathology*. 5 Ed. USA. Elsevier Academic Press. 948 p.
- ARAUZ, L.F. 2011. *Fitopatología: un enfoque agroecológico*. 2da edición. San José, C.R. Editorial UCR. 519 p.
- ASTÚA, G.; ARAÚZ, F.; UMAÑA, G. 1994. Sensibilidad reducida al tiabendazole en *Colletotrichum gloeosporioides* aislado de papaya. *Agronomía Costarricense* 18(1): 35-39 p.
- BARQUERO, C. 2000. Determinación de la sensibilidad a benomil en poblaciones de *Colletotrichum gloeosporioides* aislado de mango (*Mangifera indica*) en Costa Rica. Tesis Lic. Ing. Agr. San José, Costa Rica. Escuela de Fitotecnia, Facultad de Agronomía. Universidad de Costa Rica. 45 p.
- BARQUERO, M.; PERES, N.; ARAUZ, L. 2013. Presencia de *Colletotrichum acutatum* y *C. gloeosporioides* en helecho hoja de cuero, limón criollo, papaya, carambola y mango en Costa Rica y Florida (Estados Unidos). *Agronomía Costarricense* 37(1): 23-38 p.
- BRENT, K.; HOLLOMON, D. 1998. Fungicide resistance: The assessment of risk. Fungicide Resistance Action Committee (FRAC) Monograph No.2. 53 p.
- BOGANTES, A; MORA, E. 2013. Incidencia y severidad de la antracnosis en líneas e híbridos de papaya (*Carica papaya*). *Agronomía Mesoamericana* 24(2): 411-417.
- CAI, L.; HYDE, K.; TAYLOR, P.; WEIR, B.; WALLER, J.; ABANG, M.; ZHANG, J.; YANG, Y.; PHOULIVONG, S.; LIU, Z.; PRIHASTUTI, H.; SHIVAS, R,

- MCKENZIE, E.; JOHNSTON, P. 2009. A poliphasic approach for studying *Colletotrichum*. Fungal Diversity 39:183-204.
- CAPELLINI, R. A.; CEPONIS, M. J.; LIGHTNER, G. W. 1988. Disorders in apricot and papaya shipments to the New York market 1972-1985. Plant Disease 72: 366-368 p.
- CITLALI, R.; BRAVO, L.; CORONA, M.; VILLA, P. BAUTISTA, S.; BARRERA, L. 2005. Caracterización morfo-cultural y sintomatológica de dos aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. de papayo (*Carica papaya* L.). Revista Mexicana de Fitopatología. 223-231 p.
- DÍAZ, B.; SAAVEDRA, O.; BORKOSKY, S.; BOVI, M. 2007. Degradación de residuos de pyrimethanil en frutilla (*Fragaria x Ananassa* Duch.) Información Tecnológica 18(2): 49-52 p.
- DICKMAN, M.; ALVAREZ. A. 1983. Latent infection on papaya caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. Plant Disease 67(7): 748-750 p.
- DURÁN, A; MORA, D. 1987. Variabilidad en la sintomatología de la antracnosis (*Colletotrichum* sp.) en papaya postcosecha en Costa Rica. Agronomía Costarricense 11(2): 155-161 p.
- FAO (Food and Agriculture Organization). 2009. FAO Specifications and evaluations for Agricultural Pesticides: Azoxystrobin. FAO Specification 571/TC: 1-35 p.
- FAO (Food and Agriculture Organization). 2009. FAO Specifications and evaluations for Agricultural Pesticides: Prochloraz. FAO Specification 407/TC: 1-21 p.
- GUTIÉRREZ, A.; GUTIÉRREZ, O.; NIETO, D.; ORTÍZ, T.; ZAVALETA, E.; DELGADILLO, F.; VAQUERA, H. 2003. Evaluación de resistencia a imazalil, prochloraz y azoxystrobin en aislamientos de *Colletotrichum*

gloeosporioides (Penz) penz. y sacc. y control de la antracnosis del mango. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21(3): 379-383 p.

KANETIS, L.; FÖRSTER, H.; ADASKAVEG, J. 2007. Comparative efficacy of the new postharvest fungicide azoxystrobin, fludioxonil and pyrimethanil for managing citrus green mold. *Plant Disease* 91(11): 1502-1511 p.

LÓPEZ, M. 2010. Tratamientos postcosecha en el control de la antracnosis y calidad de frutas de papaya "Maradol". Tesis Mag. Sc. Texcoco, Edo de México. Instituto de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas. 77 p.

MADRIGAL, R. 1997. Evaluación de la sensibilidad del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* al prochloraz, en cultivos de mango y papaya. Tesis Lic. Ing. Agr. San José, Costa Rica. Escuela de Fitotecnia, Facultad de Agronomía. Universidad de Costa Rica. 62 p.

MIYARA, I.; SHAFRAN, H.; DAVIDZON, M.; SHERMAN, A.; PRUSKY, D. 2010. pH regulation of ammonia secretion by *Colletotrichum gloeosporioides* and its effect on appressorium formation and pathogenicity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23(3):304-316 p.

NASCIMENTO, R. J.; MIZUBUTI, E.S.G. CÂMARA, M. P. S.; FERREIRA, M. F.; MAYMON, M.; FREEMAN, S.; MICHEREFF, S. J. 2010. First report of papaya fruit rot caused by *Colletotrichum magna* in Brazil. *Plant Disease*. 94(12): 1506p.

NAVARRO, J.; ARAUZ, F. 1999. Exactitud y repetibilidad de dos métodos para la evaluación de la severidad de enfermedades fungosas en el fruto de la papaya (*Carica papaya*). *Agronomía Costarricense* 23(1): 89-96 p.

PROCOMER, 2014. Portal Estadístico de Comercio Exterior. Disponible en: <http://servicios.procomer.go.cr/estadisticas/inicio.aspx>

- PRIHASTUTI, H; CAI, L; CHEN, H; MCKENZIE, E; HYDE, K. 2009. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. *Fungal Diversity* 39: 89-109 p.
- RAMPERSAD, S. N. 2011. Molecular and phenotypic characterization of *Colletotrichum* species associated with antracnose disease of papaya in Trinidad. *Plant Disease*. 95(10): 1244 p.
- REDMAN, R.; DUNIGAN, D.; RODRIGUEZ, R. 2001. Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader? *New Phytologist* 151; 705-716 p.
- REIGNAULT, P.; VALETE-COLLET, O.; BOCARRA, M. 2008. The importance of fungal pectinolytic enzymes in plant invasión, host adaptability and symptom type. *Europe Journal Plant Pathology* 120:1-11 p.
- RODRIGUEZ, E.; GONZÁLEZ, J.; MAYEK, N. 2009. La infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. en aguacatero (*Persea americana* Mill.): Aspectos bioquímicos y genéticos. *Revista Mexicana de fitopatología* 27(1): 53-63 p.
- RUSSELL, P. 2004. Sensitivity baselines in fungicides resistance research and management. *Fungicide Resistance Action Committee (FRAC) Monograph No. 3*.
- SALAZAR, D. 2012. Establecimiento de la escala de madurez y potencial de vida útil durante el almacenamiento de papaya (*Carica papaya* L.) híbrido "Pococi". Tesis Ing. Agr. San José, CR. Escuela de Agronomía, Facultad de Ciencias Agroalimentaria, Universidad de Costa Rica. 91 p.
- SALAZAR, E.; HERNÁNDEZ, R.; TAPIA, A.; GÓMEZ, L. 2012. Identificación molecular del hongo *Colletotrichum spp.*, aislado de banano (*Musa spp*) de altura en la zona de Turrialba y determinación de su

sensibilidad a fungicidas poscosecha. *Agronomía Costarricense* 36(1): 53-68 p.

SANDERS, G.; KORSTEN, L.; WEHNER, F. 2000. Survey of fungicide sensitivity in *Colletotrichum gloeosporioides* from different avocado and production areas in South Africa. *European Journal of Plant Pathology* 106: 745-752 p.

SANTAMARÍA, F.; DIAZ, R.; GUTIÉRREZ, J.; LARQUÉ, A. 2011. Control de dos especies de *Colletotrichum* causantes de antracnosis en frutos de papaya Maradol. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 2(5): 631-643 p.

SEREY, R.; TORRES, R.; LATORRE, B. 2007. Pre- and post-infection activity of new fungicides against *Botrytis cinerea* and other fungi causing decay of table grapes. *Ciencia e Investigación Agraria* 34(3): 215-224 p.

SIMMONDS, J. 1965. Papaw diseases. *Queensland Agricultural Journal* 91 (11): 666-677 p.

SOLANO, V. 1995. Combate químico de antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* P.) en frutos de papaya (*Carica papaya* L). Tesis Lic. Ing. Agr. San José, Costa Rica. Escuela de Fitotecnia, Facultad de Agronomía. Universidad de Costa Rica. 56 p.

SOLANO, V.; ARAUZ, F. 1995. Combate de antracnosis en frutos de papaya mediante aplicaciones de fungicidas en el campo en la zona atlántica de Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 19(2): 25-30 p.

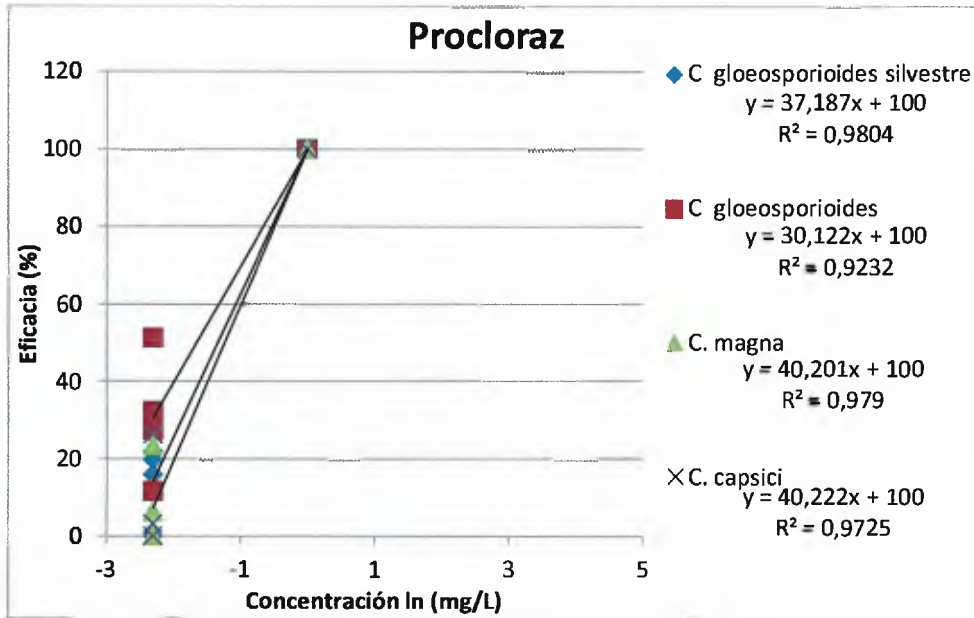
SUNDRAVADANA, S.; ALICE, D.; KUTTALAM, S.; SAMIYAPPAN, R. 2007. Efficacy of azoxystrobin on *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. growth and on controlling mango anthracnose. *Journal of Agricultural and Biological Science*. 2(3): 10-15 p.

- TAPIA, R.; QUIJANO, A.; CORTES, A.; LAPPE, P.; LARQUE, A.; PEREZ, D. 2008. PCR-Based detection and characterization of the fungal pathogens *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum capsici* causing anthracnose in papaya (*Carica papaya* L.) in the Yucatan Peninsula. *Mol Biotechnol* 40:293-298p.
- TARNOWSKI, T.; PLOETZ, R. 2010. First report of *Colletotrichum capsici* causing postharvest anthracnose on papaya in South Florida. *Plant Disease* 94 (8): 1065p.
- TORRES, C.; TAPIA, R.; HIGUERA, I.; PEREZ, D. 2013. Morphological, pathological and genetic diversity of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose in papaya (*Carica papaya* L). *Europe Journal Pathology* 135:67-79.
- TSAY, J.; CHEN, R.; WANG, W.; WENG, B. 2010. First report of anthracnose on cucurbitaceous crops caused by *Glomerella magna* in Taiwan. *Plant Disease* 94(6): 787p.
- VADEMECUM, 2008. Fludioxonil. Base de datos Vademecum. Madrid, España. Consultado el 14/9/12. Disponible en: http://www.terraia.com/vademecum_de_productos_fitosanitarios_y_nutricionales/index.php?proceso=registro&numero=1169.
- WALTON, J. 1994. Deconstructing the cell wall. *Plant Physiology* 104:1113-1118 p.
- WEIR, B.; JOHNSTON, P.; DAMM, U. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Micology* 73: 115-180 p.
- XIAO, C.; BOAL, R. 2009. Residual Activity of fludioxonil and pyrimethanil against *Penicillium expansum* on apple. *Plant Disease*. 93:1003-1008
- Xu, X.; LIN, T.; YUAN, S.; DAI, D.; SHI, H. 2014. Characterization of baseline sensitivity and resistance risk of *Colletotrichum gloeosporioides*

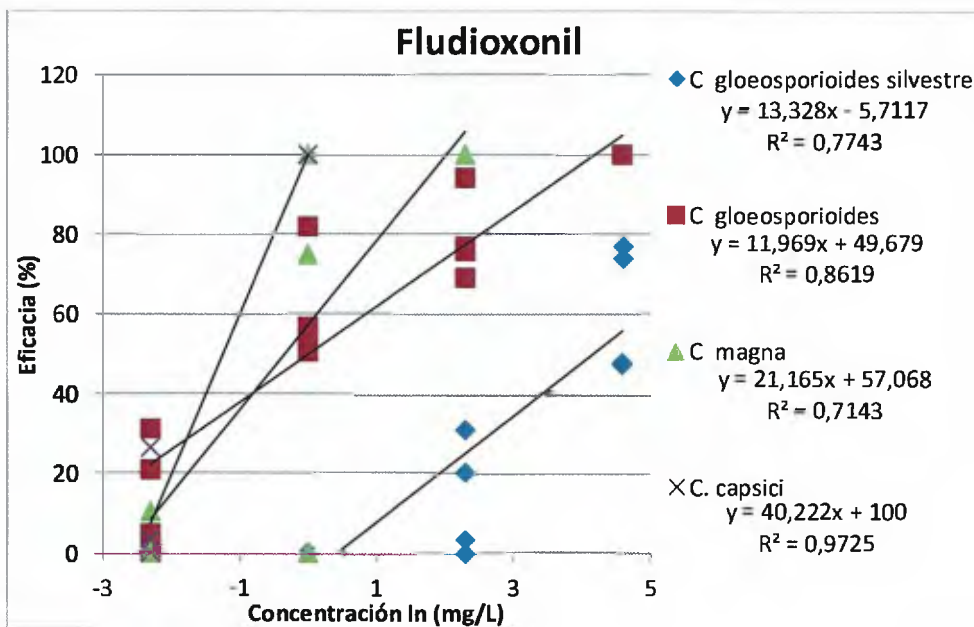
complex isolates from strawberry and grape to two demethylation-inhibitor fungicides, prochloraz and tebuconazole. Australasian Plant Pathology Society.

ZAVALA, M.; TUN, J.; CRISTÓBAL, J.; RUIZ, E.; GUTIÉRREZ, O.; VÁSQUEZ, M. MÉNDEZ, R. 2005. Control postcosecha de la antracnosis y sensibilidad de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Sacc. a fungicidas organosintéticos. Revista Chapingo Serie Horticultura 11(2): 251-255 p.

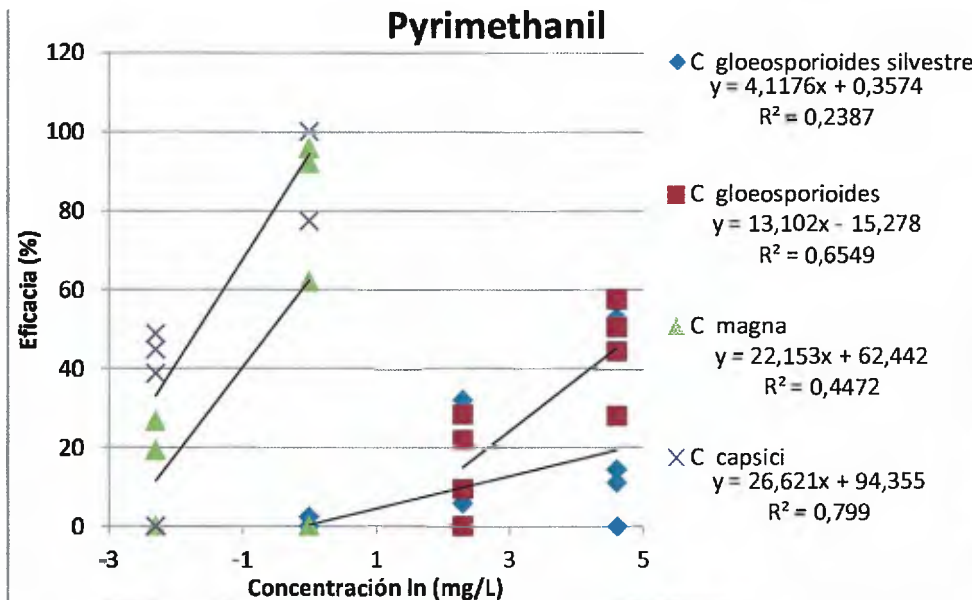
9. ANEXOS



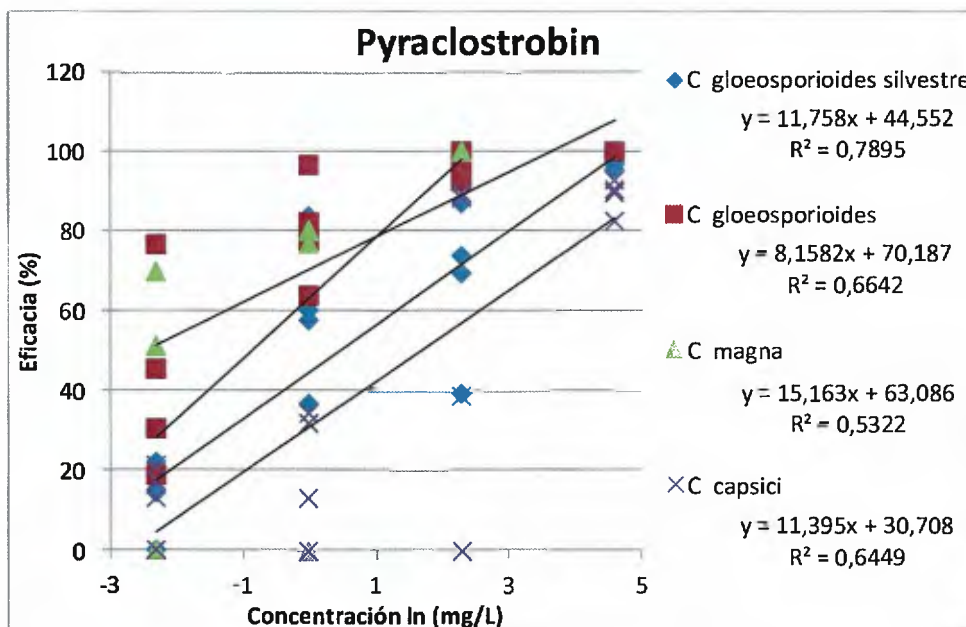
Anexos 1. Eficacia del fungicida procloraz en la reducción del crecimiento de micelio de *C. gloeosporioides silvestre*, *C. gloeosporioides*, *C. magna* y *C. capsici*.



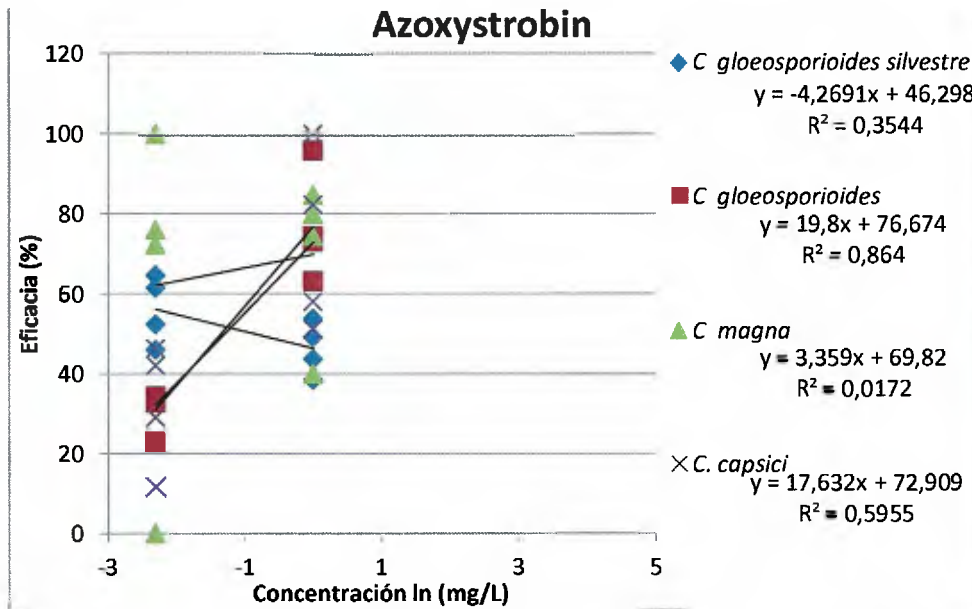
Anexos 2. Eficacia del fungicida fludioxonil en la reducción del crecimiento de micelio de *C. gloeosporioides silvestre*, *C. gloeosporioides*, *C. magna* y *C. capsici* al fungicida fludioxonil.



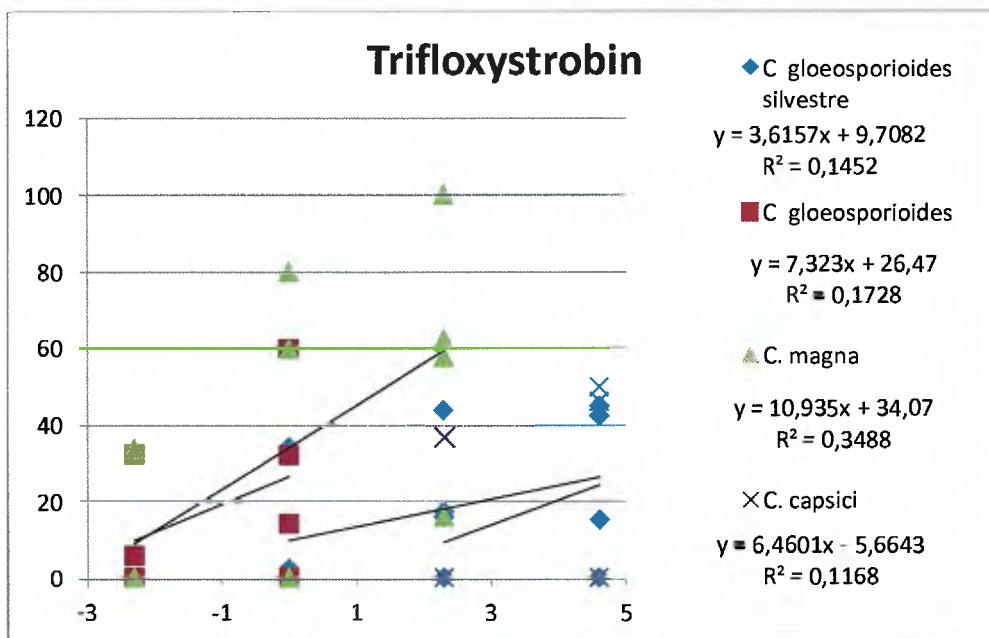
Anexos 3. Eficacia del fungicida pyrimethanil en la reducción del crecimiento de micelio de *C. gloeosporioides silvestre*, *C. gloeosporioides*, *C. magna* y *C. capsici*.



Anexos 4. Eficacia del fungicida pyraclostrobin en la reducción del crecimiento de micelio de *C. gloeosporioides silvestre*, *C. gloeosporioides*, *C. magna* y *C. capsici*.



Anexos 5. Eficacia del fungicida azoxystrobin en la reducción del crecimiento de micelio de *C. gloeosporioides silvestre*, *C. gloeosporioides*, *C. magna* y *C. capsici*.



Anexos 6. Eficacia del fungicida trifloxystrobin en la reducción del crecimiento de micelio de *C. gloeosporioides silvestre*, *C. gloeosporioides*, *C. magna* y *C. capsici*.

Anexo 7. Análisis de regresión de las eficacias de 6 fungicidas sobre la reducción del crecimiento de micelio de 3 especies del género *Colletotrichum*.

Fungicida	Especie	Ecuación	R ²	
Procloraz	<i>C. gloeosporioides</i> silvestre	$y = 37,187x + 100$	0,98	2,38E ⁻⁶
	<i>C. gloeosporioides</i>	$y = 30,122x + 100$	0,92	1,45E ⁻⁴
		$y = 40,201x + 100$	0,98	2,90E ⁻⁶
	<i>C. capsici</i>	$y = 40,222x + 100$	0,91	1,99E ⁻⁴
Fludioxonil	<i>C. gloeosporioides</i> silvestre	$y = 13,328x - 5,7117$	0,77	1,60E ⁻⁴
	<i>C. gloeosporioides</i>	$y = 11,969x + 49,679$	0,86	2,14E ⁻⁷
	<i>C. magna</i>	$y = 21,165x + 57,068$	0,71	5,37E ⁻⁴
	<i>C. capsici</i>	$y = 40,222x + 100$	0,97	6,55E ⁻⁶
Pyrimethanil	<i>C. gloeosporioides</i> silvestre	$y = 4,1176x + 0,3574$	0,24	0,11
	<i>C. gloeosporioides</i>	$y = 13,102x - 15,278$	0,65	0,01
	<i>C. magna</i>	$y = 22,153x + 62,442$	0,45	0,07
	<i>C. capsici</i>	$y = 26,621x + 94,355$	0,80	2,76E ⁻³
Pyraclostrobin	<i>C. gloeosporioides</i> silvestre	$y = 11,758x + 44,552$	0,80	4,25E ⁻⁶
	<i>C. gloeosporioides</i>	$y = 8,1582x + 70,187$	0,66	1,20E ⁻⁴
	<i>C. magna</i>	$y = 15,163x + 63,086$	0,53	7,08E ⁻³
	<i>C. capsici</i>	$y = 11,395x + 30,708$	0,64	1,80E ⁻⁴
Azoxystrobin	<i>C. gloeosporioides</i> silvestre	$y = -4,2691x + 46,298$	0,35	0,12
	<i>C. gloeosporioides</i>	$y = 19,8x + 76,674$	0,86	8,29E ⁻⁴
	<i>C. magna</i>	$y = 3,359x + 69,82$	0,02	0,76
	<i>C. capsici</i>	$y = 17,632x + 72,909$	0,60	0,02
Trifloxystrobin	<i>C. gloeosporioides</i> silvestre	$y = 3,6157x + 9,7082$	0,15	0,22
	<i>C. gloeosporioides</i>	$y = 7,323x + 26,47$	0,17	0,31
	<i>C. magna</i>	$y = 10,935x + 34,07$	0,35	0,04
	<i>C. capsici</i>	$y = 6,4601x - 5,6643$	0,12	0,41

Anexos 8. Comparación de medias LSD Fisher ($P \leq 0.05$) de la determinación de inhibición de micelio.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Eficiencia corregida	384	0,36	0,32	61,50

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	211379,47	23	9190,41	8,90	<0,0001
Tratamiento	125706,69	5	25141,34	24,34	<0,0001
Especie	31422,19	3	10474,06	10,14	<0,0001
Tratamiento*Especie	54250,59	15	3616,71	3,50	<0,0001
Error	371925,45	360	1033,13		
Total	583304,92	383			

Test: LSD Fisher Alfa = 0,05 DMS = 11,17409

Error: 1033,1263 gl: 360

Tratamiento	Medias	n	E.E.		
Procloraz	79,92	64	4,02	A	
Pyraclostrobin	63,45	64	4,02		B
Fludioxonil	56,71	64	4,02		B C
Azoxystrobin	52,18	64	4,02		C
Pirimethanil	38,39	64	4,02		D
Trifloxystrobin	22,91	64	4,02		E

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Test: LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=9,12361

Error: 1033,1263 gl: 360

Especie	Medias	n	E.E.	
<i>C. magna</i>	59,16	96	3,28	A
<i>C. capsici</i>	56,82	96	3,28	A
<i>C. gloeosporioides</i>	56,36	96	3,28	A
<i>C. gloeosporioides silvestre</i>	36,70	96	3,28	B

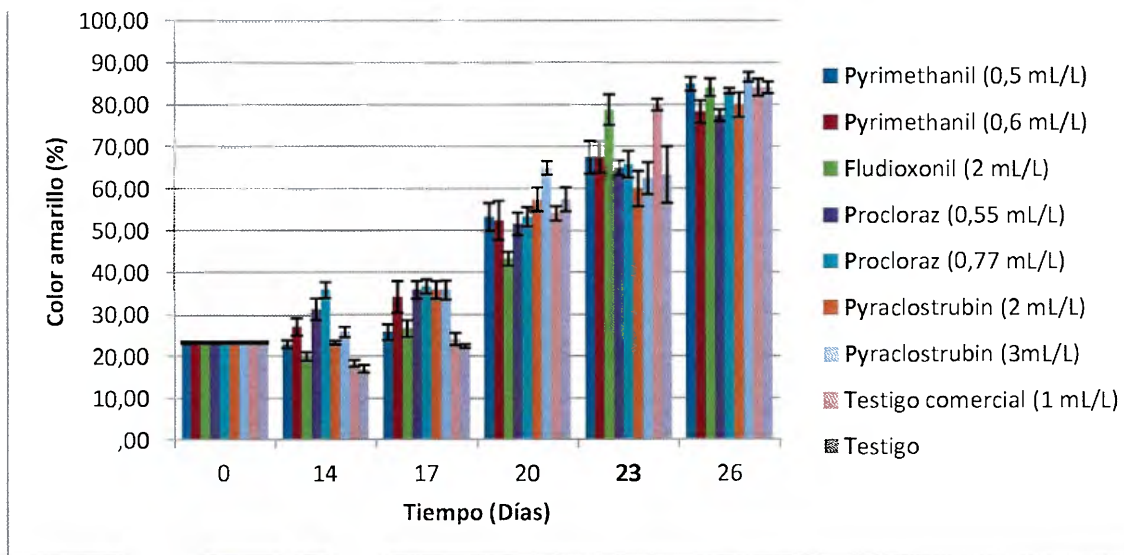
Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DM5=22,34819

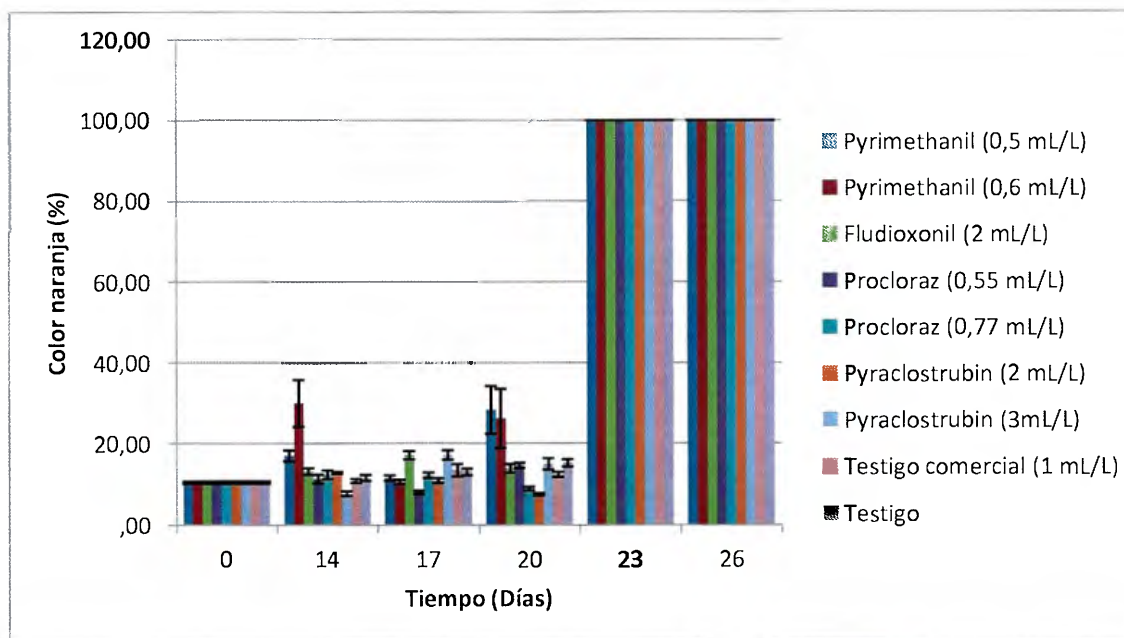
Error: 1033,1263 gl: 360

Tratamiento	Especie	Medias	n	E.E.	
Procloraz	<i>C. gloeosporioides</i>	82,66	16	8,04	A
Procloraz	<i>C. capsici</i>	81,58	16	8,04	A B
Pyraclostrobin	<i>C. gloeosporioides</i>	79,58	16	8,04	A B C
Procloraz	<i>C. gloeosporioides silvestre</i>	78,59	16	8,04	A B C
Procloraz	<i>C. magna</i>	76,86	16	8,04	A B C D
Fludioxonil	<i>C. capsici</i>	76,85	16	8,04	A B C D
Pyraclostrobin	<i>C. magna</i>	72,31	16	8,04	A B C D
Pyrimethanil	<i>C. capsici</i>	70,12	16	8,04	A B C D
Fludioxonil	<i>C. magna</i>	67,80	16	8,04	A B C D
Fludioxonil	<i>C. gloeosporioides</i>	63,46	16	8,04	A B C D E
Azoxystrobin	<i>C. magna</i>	59,39	16	8,04	B C D E F
Pyraclostrobin	<i>C. gloeosporioides silvestre</i>	58,09	16	8,04	C D E F
Azoxystrobin	<i>C. capsici</i>	57,34	16	8,04	C D E F
Azoxystrobin	<i>C. gloeosporioides</i>	54,69	16	8,04	D E F G
Pyraclostrobin	<i>C. capsici</i>	43,83	16	8,04	E F G H
Trifloxystrobin	<i>C. magna</i>	40,65	16	8,04	F G H I
Pyrimethanil	<i>C. magna</i>	37,95	16	8,04	F G H I J
Azoxystrobin	<i>C. gloeosporioides silvestre</i>	37,32	16	8,04	F G H I J
Pyrimethanil	<i>C. gloeosporioides</i>	34,27	16	8,04	G H I J
Trifloxystrobin	<i>C. gloeosporioides</i>	23,53	16	8,04	H I J K
Fludioxonil	<i>C. gloeosporioides silvestre</i>	18,73	16	8,04	I J K
Trifloxystrobin	<i>C. gloeosporioides silvestre</i>	16,26	16	8,04	J K
Pyrimethanil	<i>C. gloeosporioides silvestre</i>	11,21	16	8,04	K
Trifloxystrobin	<i>C. capsici</i>	11,21	16	8,04	K

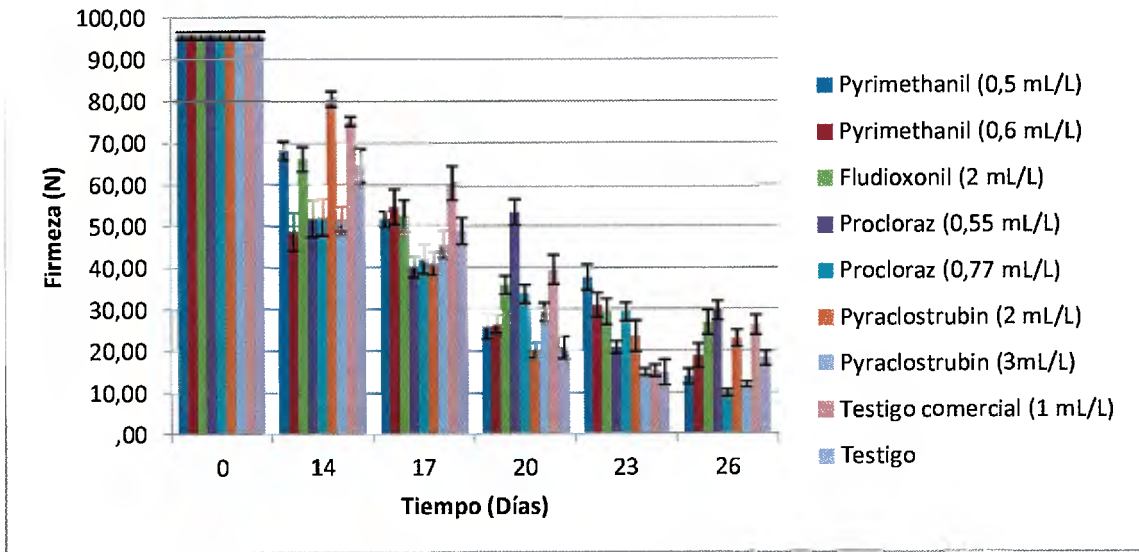
Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)



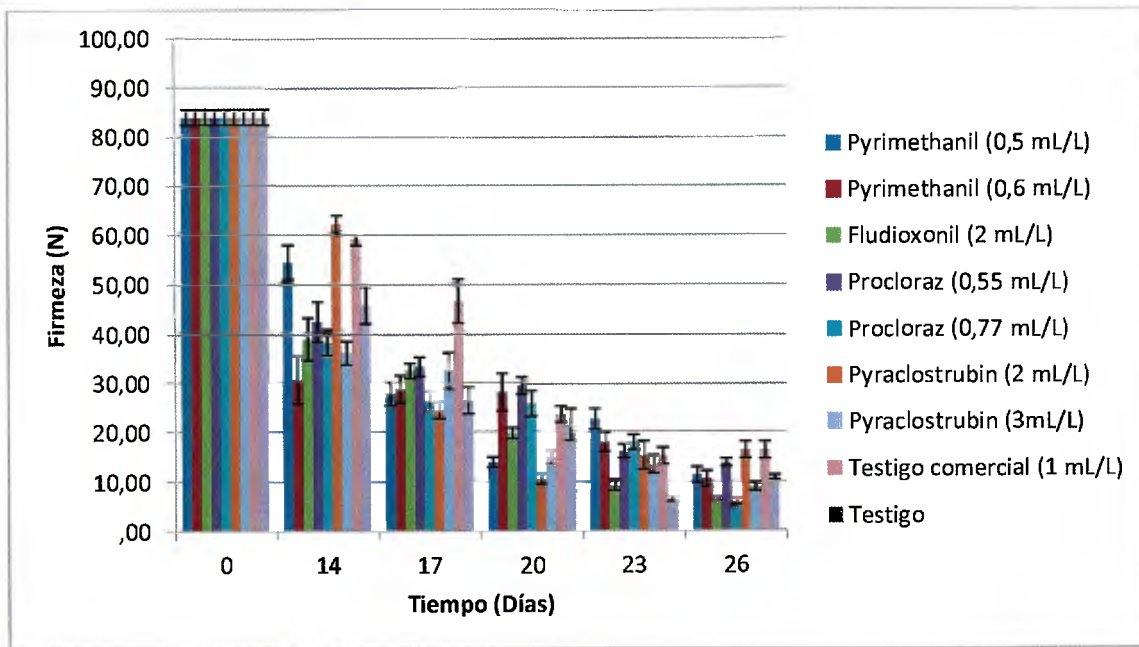
Anexos 9. Porcentaje de color amarillo de cáscara en frutos de papaya con diferentes tratamientos poscosecha.



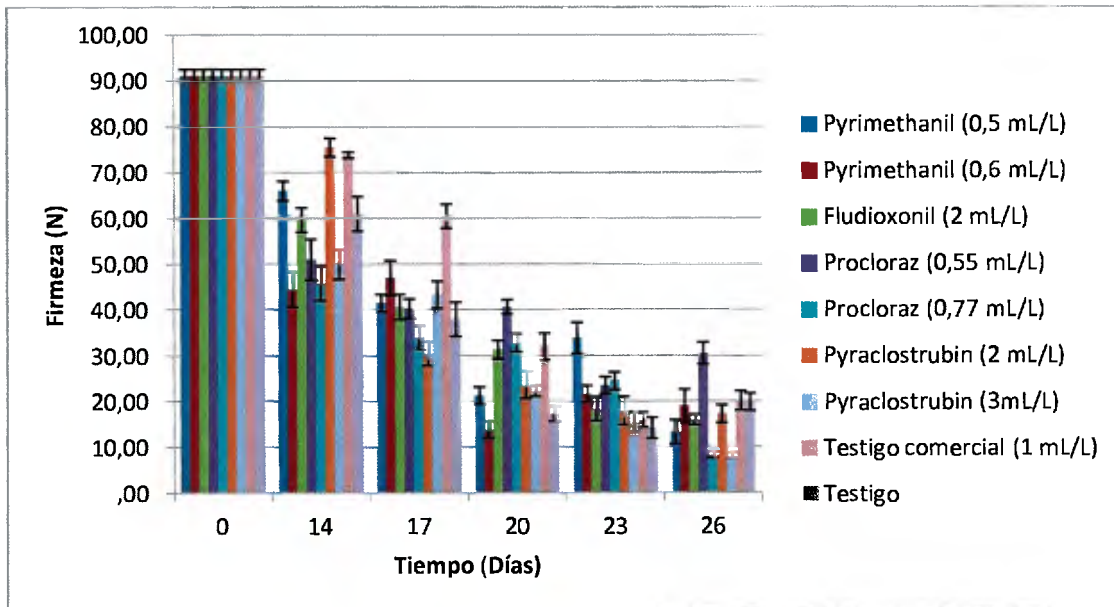
Anexo 10. Porcentaje de color naranja en la pulpa de frutos de papaya con diferentes tratamientos poscosecha.



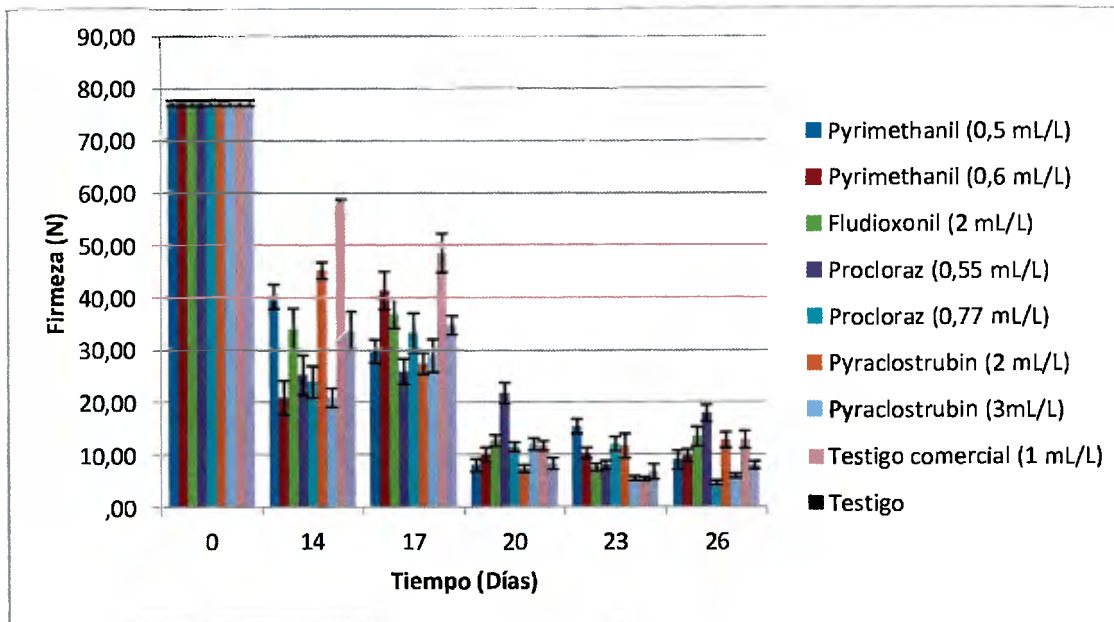
Anexo 11. Firmeza de cáscara lado expuesto a la luz cáscara en frutos de papaya con diferentes tratamientos poscosecha.



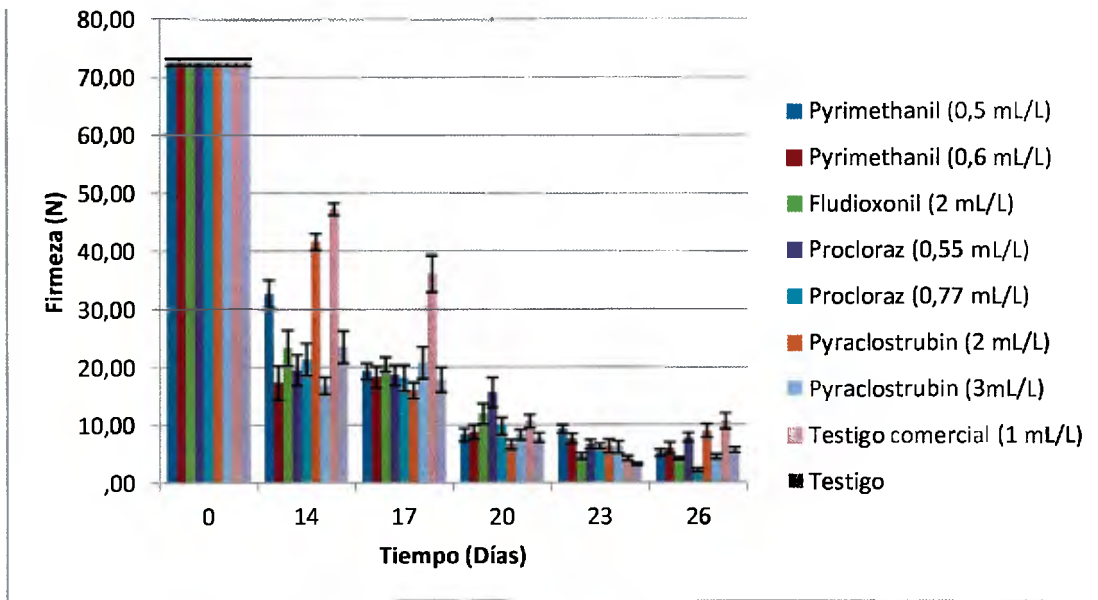
Anexo 12. Firmeza de cáscara lado de sombra en frutos de papaya con diferentes tratamientos poscosecha.



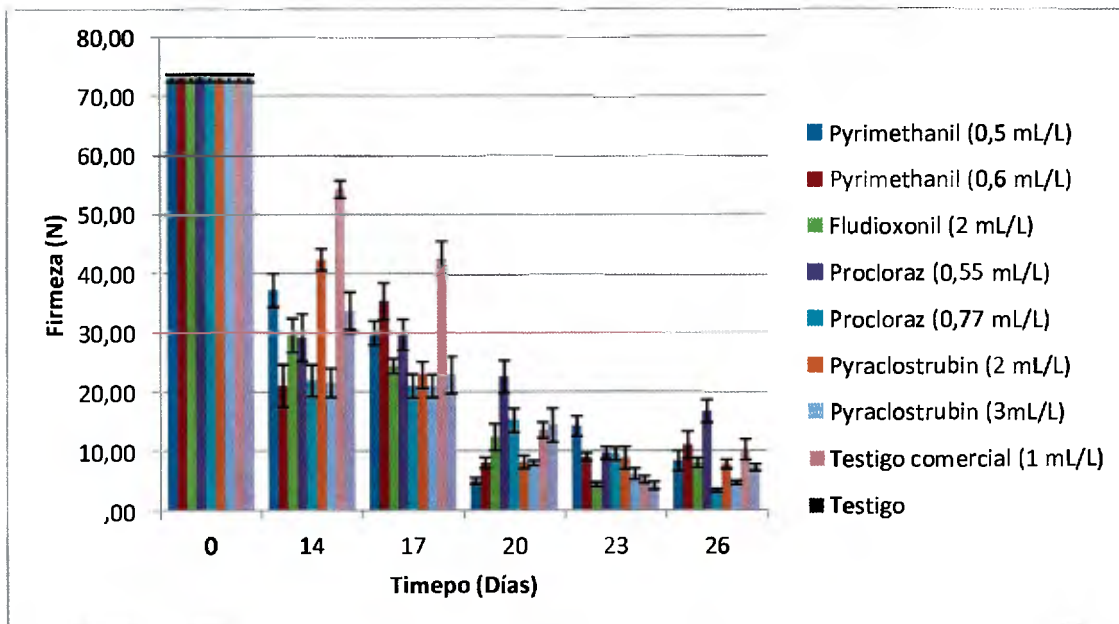
Anexo 13. Firmeza de cáscara intermedio entre luz y sombra en frutos de papaya con diferentes tratamientos poscosecha.



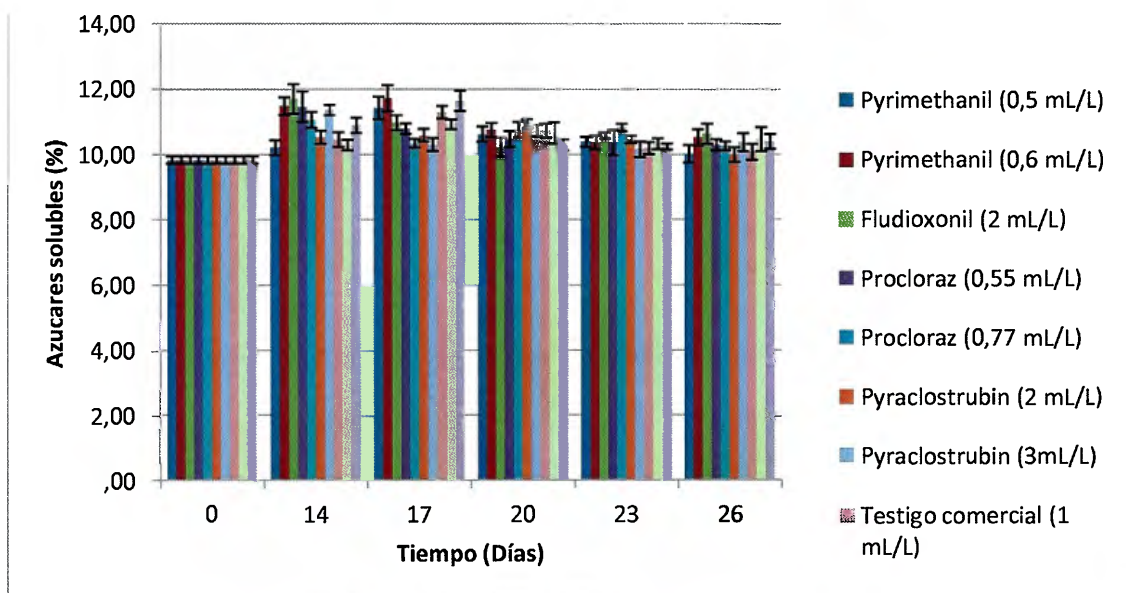
Anexo 14. Firmeza de pulpa expuesta a la luz en frutos de papaya con diferentes tratamientos poscosecha.



Anexo 15. Firmeza de pulpa lado de sombra en frutos de papaya con diferentes tratamientos poscosecha.



Anexo 16. Firmeza de pulpa lado intermedio entre luz y oscuridad en frutos de papaya con diferentes tratamientos poscosecha.



Anexo 17. Contenido de azúcares solubles (Brix) en frutas de papaya con diferentes tratamientos poscosecha.