



Scientia Agropecuaria

Web page: <http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/scientiaagrop>

Facultad de Ciencias
Agropecuarias

Universidad Nacional de
Trujillo

RESEARCH ARTICLE



Causal agent of anthracnose in the pea crop (*Pisum sativum* L.) in northern of Perú: Symptomatology, isolation and identification, pathogenicity and control

Agente causal de la antracnosis en el cultivo de arveja (*Pisum sativum* L.) en el norte de Perú: Sintomatología, aislamiento e identificación, patogenicidad y control

René Aguilar^{1*} ; Robert Rafael-Rutte² ; Henry Martínez-Santos¹ ; Silverio Apaza-Apaza³ 

¹ Universidad Nacional de Piura, Campus Universitario s/n. Urb. Miraflores, Piura. Peru.

² Universidad Nacional Tecnológica de Lima Sur, Facultad de Ingeniería y Gestión, Sector 3 Grupo 1A 03 (Av. Central y Av. Bolívar) Villa El Salvador C.P. 15834, Lima. Peru.

³ Universidad Nacional del Altiplano. Av. Floral 1153. Puno. Peru.

* Corresponding author: raaccota@hotmail.com (R. Aguilar).

Received: 2 August 2020. Accepted: 19 December 2020. Published: 8 February 2021.

Abstract

Pea (*Pisum sativum* L.) is an economically important crop and of great demand in the national and international market, due to the considerable number of families that depend on its cultivation, especially in the northern and central highlands of Peru. However, the anthracnose is one of the limiting factors for low productive and causes economic losses. The aim of this study was to describe the symptoms, culturally and morphometrically identify the causal agent and to evaluate under *in vitro* the efficacy of fungicides. Isolation was made from samples of leaves and pods with anthracnose symptoms collected in the crop field. Healthy pea was used in the pathogenicity test, and discs of PDA medium containing isolated fungi were inoculated into them. The poisoned food technique was used, and colony growths were measured to evaluate the effects of fungicides. The results based on the symptoms, morphological and cultural characteristics described, the isolates were identified as *Colletotrichum lindemuthianum*, *C. truncatum* y *Ascochyta pisi*, which was confirmed with Koch's postulates. Trifloxystrobin+tebuconazole was found to be the most effective fungicide followed by tebuconazole, procloraz and mancozeb completely inhibited mycelial growth (100%) of identified fungi. These results are useful for the control of *Colletotrichum lindemuthianum*, *C. truncatum* y *Ascochyta pisi* in the pea crop.

Keywords: *Pisum sativum*; anthracnose; *Colletotrichum* spp.; fungicides; pathogenicity.

Resumen

La arveja (*Pisum sativum* L.) es un cultivo económicamente importante y de gran demanda en el mercado nacional e internacional, debido al considerable número de familias que dependen de su cultivo, especialmente en la sierra norte y centro del Perú. Pero, la antracnosis es uno de los factores limitantes para la baja productividad y ocasiona pérdidas económicas. El objetivo del estudio fue describir la sintomatología, identificar cultural y morfométricamente al agente causal y evaluar la eficacia de fungicidas *in vitro*. El aislamiento se hizo a partir de hojas y vainas con síntomas de antracnosis colectadas en campo. En la prueba de patogenicidad se emplearon vainas sanas de arveja y en ellas se inocularon discos de medio PDA que contenían los hongos aislados. Para evaluar el efecto de los fungicidas se usó la técnica del alimento envenenado y se midió el crecimiento de la colonia. Los resultados según los síntomas y las características culturales y morfométricas descritas, los aislamientos se identificaron como *Colletotrichum lindemuthianum*, *C. truncatum* y *Ascochyta pisi*, el cual se confirmó con los postulados de Koch. El fungicida más efectivo fue trifloxystrobin+tebuconazole, seguido de tebuconazole, procloraz y mancozeb que inhibieron completamente el crecimiento micelial (100%) de los hongos identificados. Estos resultados son útiles para el control de *Colletotrichum lindemuthianum*, *C. truncatum* y *Ascochyta pisi* en el cultivo de arveja.

Palabras clave: *Pisum sativum*; antracnosis; *Colletotrichum* spp.; fungicidas; patogenicidad.

DOI: <https://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2021.001>

Cite this article:

Aguilar, R., Rafael-Rutte, R., Martínez-Santos, H., & Apaza-Apaza, S. (2021). Agente causal de la antracnosis en el cultivo de arveja (*Pisum sativum* L.) en el norte de Perú: Sintomatología, aislamiento e identificación, patogenicidad y control. *Scientia Agropecuaria*, 12(1), 7-14.

1. Introducción

El cultivo de arveja (*Pisum sativum* L.) conocido también como guisante o chícharo, forma parte de la dieta alimenticia de la población peruana y del mundo, se consume como grano fresco, cuyo contenido de proteínas es de 7% y como grano seco contiene 21% (Camarena et al., 2014). Además, posee minerales como Ca, Fe, P, Zn, K, Mg, y son una excelente fuente de vitaminas A, B₁ y C. Así mismo, su alto contenido de fibra permite la reducción de colesterol y la regulación del azúcar en la sangre (Maiza et al., 2015; Watson et al., 2017). El cultivo se adapta mejor en climas templados como los valles interandinos, sembrándose hasta los 3,300 msnm (Camarena et al., 2014). También, esta leguminosa se cultiva en la mayoría de las zonas altas de los trópicos del mundo como China, India, Estados Unidos, Francia, Reino Unido y Brasil (Liu et al., 2016; Owati et al., 2019; Bellé et al., 2020). En el Perú, las zonas productoras de arveja se encuentran en los departamentos de Cajamarca, Ancash, Junín, Huancavelica, Arequipa, Cusco, Lambayeque y Piura (Valladolid-Chiroque, 2016). En Piura, la provincia de Huancabamba es la principal zona productora de arveja, siendo la variedad criolla la más comercializada en el mercado local y es la principal fuente de ingreso económico de los agricultores. En los últimos años el área cultivada de arveja en Piura se ha incrementado desde 396 ha (2018) hasta 545 ha (2019) (MINAGRI, 2019). Sin embargo, el cultivo es afectado por la enfermedad de la antracnosis, cuyos síntomas son manchas necróticas en el tallo, hojas y vainas y es la responsable de importantes pérdidas económicas. Liu et al. (2016) en China, Tadjia et al. (2018) en Argelia, Owati et al. (2019) en Montana, Estados Unidos, Jevtic et al. (2019) en Bosnia y Herzegovina y Bellé et al. (2020) en Brasil, reportan que la enfermedad de la antracnosis o tizon de ascochyta es devastadora en el cultivo de arveja, y que es causado por un complejo de hongos que llegan a ocasionar pérdidas en el rendimiento entre 20% a 50% de la producción. Por otro lado, Dias et al. (2016) y Rogério et al. (2019) manifiestan que la antracnosis en diferentes cultivos es un sistema complejo, para implementar un programa de manejo integrado de control, se debe de

conocer la identidad del agente causal, ciclo de vida, diversidad genética, recombinación sexual de los patógenos, efecto de fungicidas y epidemiología; en el Perú existe poca información disponible. Por la importancia de la enfermedad y el desconocimiento de la etiología, se realizó el presente trabajo de investigación y se plantearon como objetivos describir la sintomatología, identificar los agentes causales y evaluar el efecto de los fungicidas *in vitro* frente a los hongos fitopatógenos aislados e identificados.

2. Materiales y métodos

2.1 Muestreo y recolección

Se recolectaron plantas y vainas de arveja con síntomas de antracnosis de diferentes parcelas de arveja de las comunidades y caseríos de la provincia de Huancabamba (Hbba), departamento de Piura (Tabla 1), que se encuentra ubicado a una altitud de 2538 msnm, las condiciones climáticas promedios que se registraron fueron 18,5 °C, 80,6% de humedad relativa y 581,3 mm de precipitación anual. Las muestras debidamente codificadas se colocaron en bolsas de papel kraft y fueron llevadas al laboratorio para su análisis. El trabajo se realizó en el laboratorio de Fitopatología de la Universidad Nacional de Piura.

2.2 Aislamiento e identificación de hongos

A partir de muestras de campo con síntomas de antracnosis, se cortaron porciones de tejido infectado de aproximadamente 3*3 mm (región comprendida entre tejido sano y enfermo) esto fueron desinfectadas con una solución de NaOCl al 1% por un minuto, se enjuagaron dos veces con agua destilada, secadas con papel toalla estéril y sembradas en placas de Petri conteniendo medio de cultivo PDA más estreptomycin (50 mg). Las placas sembradas fueron cubiertas con parafilm e incubadas a 19 ± 1 °C (Rubiales et al., 2018) hasta obtener el crecimiento del hongo y luego, se realizaron siembras sucesivas hasta obtener el cultivo puro. Los aislamientos purificados fueron entubados e incubados en refrigeración a 5 °C con la finalidad de mantener la viabilidad y patogenicidad (French & Hebert, 1980; Padder et al., 2012).

Tabla 1
Zonas de recolección de muestras de *Pisum sativum* L. con síntomas de antracnosis

Distritos	Zonas de muestreo			Código de muestras	
	Localización		Latitud S		Longitud O
	Comunidad	Caseríos			
Sondorillo	Sargento Segundo	Mitupampa	5°19'50.48"	79°28'55.82"	SSM1
			5°20'18.89"	79°29'03.21"	SSM2
	Santa-Cruz Huamán	Ulpamache	5°20'15.70"	79°29'41.21"	SCU1
		Lanche	5°20'38.07"	79°28'39.90"	SCL1
Hbba	Quispampa		5°20'37.79"	79°27'56.06"	SCL2
		N. Esperanza	5°18'30.65"	79°29'01.12"	HQNE
		Juzgara	5°18'06.85"	79°27'50.66"	HQJ
		Cascamache	5°14'40.76"	79°30'59.46"	HQC
Sapalache	Segunda y Cajas	Ñangaly	5°09'34.18"	79°26'49.43"	SaSN
		Salala	5°08'14.95"	79°27'23.39"	SaSSl
		Sapun	5°08'38.23"	79°27'04.89"	SaSSp

La identificación se realizó a través de la clave propuesta por **Sutton (1980)**. Se prepararon montajes para observar a través del microscopio compuesto con aumento de 40X (Carl Zeiss Mod. KF 2, Oberkochen, Germany) las características morfológicas de las estructuras asexuales de los aislamientos. Asimismo, se observó y se describieron las características culturales de los aislamientos, como crecimiento y desarrollo micelial, borde y coloración de la colonia.

2.3 Prueba de patogenicidad

La prueba de patogenicidad se realizó de acuerdo con los postulados de Koch (**Agrios, 1995; Bellé et al., 2020**). Se emplearon vainas de arveja var. criolla, se desinfectaron con NaOCl al 1% por un minuto, se enjuagaron con agua destilada estéril y luego fueron colocadas sobre papel toalla estéril para su secado. La inoculación se realizó en la superficie de las vainas con discos de medio PDA de 7 mm de diámetro más el desarrollo micelial de los hongos, empleándose diez vainas por cada aislamiento. Las vainas inoculadas se colocaron en bandejas plásticas transparentes y herméticas de 20*30 cm e internamente estuvieron cubiertas con papel toalla húmeda y se incubaron a 19 ± 1 °C por diez días. La evaluación se realizó diariamente (**Rubiales et al., 2018**).

2.4 Efecto de fungicidas *in vitro*

Se realizó mediante la técnica del medio de cultivo envenenado (**French & Helbert, 1980**), los fungicidas de acuerdo a la dosis de los tratamientos (**Tabla 2**), se agregaron a erlenmeyers que contenían medio de cultivo PDA a punto de plaqueo (45 a 50 °C), los cuales se agitaron, obtenida la mezcla fue vertida 20 mL a las placas de Petri estériles y se dejó solidificar; sobre ello se sembraron discos de agar de 6 mm de diámetro más el desarrollo micelial de los aislamientos fúngicos, teniendo cuidado de poner en contacto el micelio del hongo con la superficie del medio envenenado. El tratamiento testigo solo contenía medio PDA sin fungicidas. Las placas sembradas fueron incubadas a 19±1 °C (**Rubiales et al., 2018**). Para las evaluaciones, en la base de las placas se marcó dos líneas perpendiculares entre sí, en cada extremo de las líneas se escribió letras a-b y c-d y se realizaron mediciones diarias del diámetro (cm) del crecimiento micelial de los hongos. Las evaluaciones culminaron cuando el testigo cubrió toda la superficie del medio (**Padder et al., 2012**). La eficacia de los fungicidas

se determinó por cálculo del porcentaje de inhibición en el crecimiento micelial de la colonia usando la siguiente fórmula:

Inhibición (%) = $(C-T/C)*100$ (donde T: crecimiento micelial (cm) del diámetro en cada tratamiento; y C: crecimiento micelial del diámetro en el testigo).

2.5 Diseño estadístico

Se empleó el Diseño Completamente al Azar (DCA) con nueve tratamientos (ocho fungicidas y un testigo) con cuatro repeticiones (**Tabla 2**), los resultados se sometieron al análisis de varianza (ANVA) y a la prueba de comparación de medias de Tukey ($\alpha = 0,05$), los datos se procesaron en el programa SAS (*Statistical Analysis System*).

3. Resultados y discusión

3.1 Sintomatología

En hojas de arveja *C. truncatum* y *C. lindemuthianum* produjeron manchas necróticas de forma redondeada a irregulares de color marrón, rodeadas de un halo de color amarillo (**Figura 1A**), al inicio se presentó en las hojas del tercio inferior, luego fue avanzando hasta alcanzar al tercio medio, estos síntomas coinciden con lo reportado por **Bellé et al. (2020)** ocasionado por *C. coccodes* en hojas de arveja. En las vainas se observaron manchas necróticas redondeadas, oblongas y hundidas, con borde marrón oscuro y en las manchas necróticas se observó la formación de pequeños cuerpos fructíferos de reproducción asexual llamados acervulos y esporulación de conidias de coloración salmón (**Figura 1B**). **Padder et al. (2017)** indican que las salpicaduras del agua de lluvia dispersan las conidias de *C. lindemuthianum* y provocan la propagación de la enfermedad. En ataques severos se observó necrosis en la cáscara y las semillas presentaron manchas necróticas (**Figura 1C**). Al respecto **Sivachandra-Kumar and Banniza (2017)** y **Rodríguez-Ortega et al. (2018)** manifiestan que las semillas de arveja y frijol se comportan como fuentes de inóculo de la enfermedad y son la principal vía de diseminación a grandes distancias. Esto se corrobora con **Sewedy et al. (2019)** quienes en semillas de frijol y soya encontraron a *C. lindemuthianum* y *C. dematium*. Las condiciones ambientales registradas durante la investigación, como temperatura media de 18,5 °C, humedad relativa media de 81,6% y precipitación anual de 581,3 mm, fueron favorables para el desarrollo de la antracnosis en Hbba.

Tabla 2

Evaluación de fungicidas *in vitro* para el control de hongos asociados a la antracnosis en el cultivo de *Pisum sativum* L.

Tratamientos	Fungicidas	Ingrediente Activo	Dosis (g o mL/100 mL)
T1	Antracol 70 PM	Propineb	0,25
T2	Cupravit 21 PM	Oxicloruro de Cu cobre	0,30
T3	Rovral PM	Iprodione	0,20
T4	Stroby DF	Kresomix-metil	0,03
T5	Nativo WP	Tri+tebuconazole	0,10
T6	Horizon 25 WP	Tebuconazole	0,10
T7	Sportak 450 EC	Procloraz	0,04
T8	Sancozeb WP	Mancozeb	0,25
T9	Testigo	Agua destilada	0,00

Tri=Trifloxystrobin.

Estos resultados coinciden con otros trabajos como lo reportado por **Rodríguez-Ortega et al. (2018)**, que señalan que el hongo *C. lindemuthianum* infecta con mayor frecuencia al frijol cuando la temperatura oscila de 13 a 26 °C y HR mayor a 80% y **He et al. (2016)** y **De-Silva et al. (2017)** quienes afirman que *C. truncatum* es un hongo fitopatógeno importante que infecta varios cultivos y prospera en zonas templadas y húmedas del mundo. Los síntomas observados en campo son el resultado de la acción de varias enzimas como la cutinasa que son segregados por los fitopatógenos para romper la cutícula y penetrar en forma directa a su hospedante (**Agrios, 1995; Auyong et al., 2015**). **Armesto et al. (2019)** detectaron enzimas como la Poligalacturonasas (PG) en *C. gloeosporioides* y observaron mayor intensidad de antracnosis en café. Esto nos indica que existe una relación entre las PG de los hongos fitopatógenos y la patogenicidad en el hospedante (**Nakamura & Iwai, 2019**). Asimismo, se demostró que el gen *pecCl1* de *C. lindemuthianum* está involucrado en la virulencia del patógeno (**Crossen-Fassoni et al., 2013**).

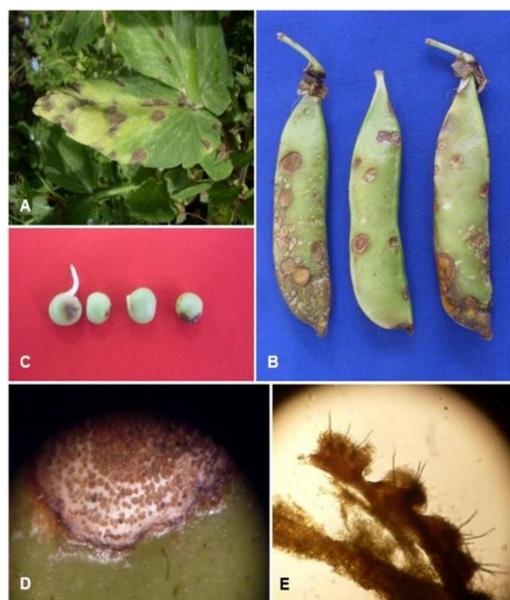


Figura 1. Sintomatología por *Colletotrichum* spp. en arveja A) lesiones necróticas en las hojas B) en vainas se observó manchas necróticas hundidas de forma ovalada y redondeada C) manchas necróticas en semillas D) acervulos del hongo *C. truncatum* inmersos en las manchas necróticas en las vainas E) Acervulos con varias setas, observadas en el microscopio compuesto (40x).

La antracnosis es una enfermedad destructiva y responsable de pérdidas significativas de rendimiento en pimiento, tomate, papaya, mango, leguminosas y frutales (**Liu et al., 2016; He et al., 2016; Torres-Calzada et al., 2018; Almaraz et al., 2019**). Además, los tallos y vainas infectadas de frijol por *C. lindemuthianum* pueden sobrevivir de 9 a 18 meses en el suelo, por lo que es importante eliminar los restos de tejido infectado y realizar rotación de cultivos con gramíneas (**Conner et al., 2019**). Los síntomas observados en las vainas de arveja ocasionados por *C. truncatum* y *C. lindemuthianum* son iguales, ambos causaron lesiones necróticas hundidas con centro pajiso

con borde de coloración marrón oscura y formación de acervulos (**Figura 1D**).

A. pisi ocasionó necrosis en hojas, tallos y vainas; en hojas presentó manchas necróticas de forma redondeada a irregulares de coloración marrón, como síntoma avanzado se observó amarillamiento, defoliación y necrosis de las hojas. En tallo se observó manchas necróticas ubicadas en sentido longitudinal de tamaño variable (**Figura 2A**). En vainas se presentaron manchas necróticas hundidas de forma ovalada a circulares con borde de coloración marrón oscuro (**Figura 2B**); en las manchas necróticas se observó la formación de cuerpos fructíferos llamados picnidios y no se observaron síntomas en las flores de arveja. En países como China, Argelia, Estados Unidos, Canadá, Bosnia, entre otros, la enfermedad es conocida como tizón de Ascochita, ocasionado por *Ascochyta pisi*, *Phoma medicaginis* (*A. pinodella*) and *Mycosphaerella pinodes* (*A. pinodes*), estos patógenos producen lesiones necróticas en hojas, tallos, flores y frutos de arveja ocasionando reducción del rendimiento (**Liu et al., 2016; Tadjia et al., 2018; Owati et al., 2019; Jevtic et al., 2019**). **Riccioni et al. (2019)** indican que el tizón de *Ascochyta* en arveja es una enfermedad importante a nivel mundial y es una gran amenaza en la agricultura orgánica.



Figura 2. Síntomas por *Ascochyta pisi* A) manchas necróticas de forma alargada en el tallo B) lesiones necróticas hundidas de forma ovoide, centro pajiso con borde de color marrón oscuro.

3.2 Aislamiento e identificación de hongos

A partir de cultivos monospóricos se obtuvieron 18 aislamientos, nueve fueron identificados como *Colletotrichum truncatum* (Sacc. & Magn.), seis *C. lindemuthianum* (Schwein) y tres *Ascochyta pisi* (Berk). Los hongos identificados se aislaron a partir de las vainas infectadas.

3.2.1 Características culturales y morfométricas

En medio de cultivo PDA, el hongo *C. lindemuthianum* desarrolló micelio semirastro de coloración cremoso con margen uniforme, luego a los cuatro a seis días formó anillos concéntricos alrededor del disco de siembra, en cada anillo se observó masas conidiales de coloración naranja (**Figura 3A**). Las conidias fueron unicelulares, hialinas de forma cilíndrica obtusa en los ápices (**Figura 3B**), con un tamaño osciló de 9,5 - 11,5 x 3,5 - 4,5 µm LxA, los apresorios fueron esféricos a obclavados, pálidos a marrón oscuro de 8 x 6 - 7 µm, las

características, según la clave de **Sutton (1980)** coinciden para la especie *C. lindemuthianum*.

Rodríguez-Guerra et al. (2005) en México, observaron peritecios con asca y ascosporas de *Glomerella lindemuthiana* (fase sexual) de *C. lindemuthianum* (fase asexual) en frijol, por lo que taxonómicamente pertenece a la clase Ascomycetes.

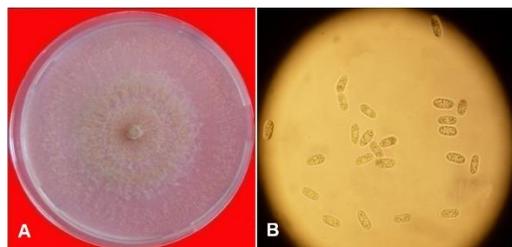


Figura 3. A) *C. lindemuthianum*, micelio con crecimiento superficial y semirastro, esporulación de color salmon B) conidias unicelulares hialinas de forma cilíndrica obtusa en los ápices, observados en el microscopio compuesto (40x).

C. truncatum desarrolló colonias algodonosas de color crema tornándose a negrozco en el centro de la colonia, el crecimiento fue lento, con borde irregular y redondeado (**Figura 4A**). En medio PDA se observó la formación de masas conidiales de coloración naranja. Los conidióforos fueron cortos y simples, las conidias fueron de forma falcada con los ápices obtusos, unicelulares, hialinas, con presencia de glúntulas en su interior, cuyo tamaño promedio fue de 15,5 - 24 x 3,5 - 4 μm LxA (**Figura 4B**). Los apresorios fueron de forma obclavada a circulares de 11 - 16 x 8 - 9,5 μm , de coloración marrón oscuro. El tamaño de las conidias y apresorios observados en el presente trabajo coincide con los reportes de **Almaraz et al. (2019)** para *C. truncatum* aislado del tomate. Los acervulos fueron de color oscuro, con 10 a 15 setas tabicadas (**Figura 1E**), largas con un tamaño promedio de 144 μm y delgadas que sobresalieron claramente sobre la masa de conidias. Las características culturales y morfológicas observadas coinciden para la especie *C. truncatum* según la clave de **Sutton (1980)**. La fase sexual de *C. truncatum* es *Glomerella truncata* (**Armstrong-Cho & Banniza, 2006**). Apartir de la recombinación sexual de los hongos, se genera una mayor diversidad genética de una población (**Moges et al., 2016**).

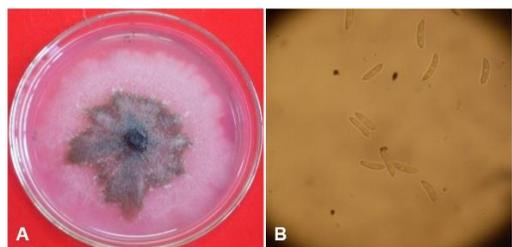


Figura 4. A) *C. truncatum*, colonia algodonosa con borde irregular y pigmentación oscura en el centro B) conidias de forma falcada, hialianas y unicelulares, visto por microscopio compuesto (40x).

En medio PDA, *A. pisi* desarrolló micelio algodonoso semirastro de color blanco cremoso, a los seis a ocho

ddi se fue tornando de color negro el centro de la colonia (**Figura 5A**) y a los diez ddi se observó la formación de cuerpos fructíferos asexuales (picnidios) inmersos en el medio de cultivo. Estos cuerpos fructificantes fueron de forma esférica, de color gris, con un tamaño promedio de 100 μm de diámetro (**Figura 6**) y se encontraron distribuidos en pequeños grupos en toda el área y conglomerados sobre la superficie de los discos de siembra. Los conidióforos simples midieron 7 - 10 x 5 - 8 μm , las conidias fueron de forma cilíndrica, oblonga a elipsoide, algunas de forma ovoide con un tamaño promedio de 12,3 x 3,6 μm de LxA, generalmente bicelulares y algunas unicelulares (**Figura 5B**). Estas características determinadas según la clave de **Sutton (1980)** corresponde a la especie *Ascochyta pisi*. Asimismo, coincide con los resultados obtenidos por **Tadja (2018)** que reporta en Argelia a *A. pisi* como el agente causante del tizón de *Ascochyta*. Por otro lado, **Owati et al. (2019)** y **Jevtic et al. (2019)** identificaron como *Didymella pisi* la fase sexual de *A. pisi*. *D. pisi* es un hongo heterotalico y en una recombinación sexual puede aparecer nuevos genotipos con características muy virulentas que los progenitores (**Taylor et al., 2017**).

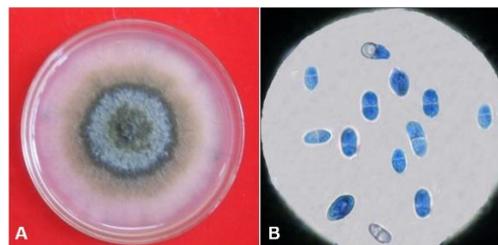


Figura 5. Hongo *Ascochyta pisi* A) en placas de Petri con medio PDA desarrolló colonia algodonosa de coloración blanco cremoso con pigmentación grisácea en el centro, B) conidias de forma cilíndrica, oblongas y bicelulares en su mayoría.



Figura 6. Picnidio del hongo *Ascochyta pisi* de forma globosa, observadas en el microscopio compuesto (40x).

3.2.2 Prueba de patogenicidad

En las vainas de arveja inoculadas con los aislamientos *C. lindemuthianum*, *C. truncatum* y *A. pisi* a los tres días después de la inoculación (ddi) se reprodujeron los síntomas de necrosis, a los cuatro ddi se observó desarrollo micelial algodonoso en la zona de inoculación, luego, a los seis ddi en la lesión necrótica se

observó esporulación de color naranja inoculadas con *C. lindemuthianum* y *C. truncatum*, y a los ocho ddi se observó la formación de picnidios del hongo *A. pisi* (Figura 7). Los resultados obtenidos coinciden con los trabajos anteriores de Rojo-Báez et al. (2017a) y Rojo-Báez et al. (2016) quienes en frutos de papaya inoculadas con *C. truncatum* observaron los primeros síntomas a los tres (ddi) y los acérvulos a los 5 ddi; y en arveja a los 4 ddi. Asimismo, Rojo-Báez et al. (2017b) reportan que *C. gloeosporioides* y *C. truncatum* poseen amplio rango de hospedantes y que su colonización es intramural subcuticular e intracelular. Estos resultados nos muestran que debemos de implementar diferentes estrategias de manejo de la enfermedad.



Figura 7. Prueba de patogenicidad en vainas de arveja, inoculadas con los hongos a) testigo b) *C. lindemuthianum* c) *C. truncatum* d) *Ascochyta pisi* se observa manchas necróticas y desarrollo micelial sobre el tejido infectado.

3.2.3 Efecto de fungicidas *in vitro*

En la Tabla 2 se presenta los resultados del efecto de los fungicidas, según las comparaciones de medias múltiples de Tukey ($\alpha \leq 0,05$) hubo diferencia estadística entre los tratamientos evaluados. Los fungicidas tebuconazole,

trifloxystrobyn+tebuconazole, procloraz y mancozeb, inhibieron en un 100% el crecimiento micelial de los hongos *C. lindemuthianum*, *C. truncatum* y *A. pisi* superando significativamente ($\alpha \leq 0,05$) al testigo y a los otros tratamientos. Latorre (1989) y Mont (2002) indican que mancozeb es un ditiocarbamato que interfiere los compuestos metabólicos de la respiración de los hongos, procloraz y tebuconazole son triazoles que alteran la membrana protoplasmática de los Ascomycetos y Deuteromycetos. La estrobilurina y triazol, inhiben la respiración y la biosíntesis de ergosterol de los hongos, probablemente todos estos mecanismos de acción hayan influenciado en la inhibición al 100% del crecimiento micelial de los hongos. Resultados similares fueron obtenidos por Sewedy et al. (2019) quienes al combinar iprodione+ tebuconazole lograron inhibir en un 90% el crecimiento micelial de los hongos *C. lindemuthianum* y *C. dematium*. Mientras que Dias et al. (2016) redujo la incidencia de antracnosis en soya ocasionada por *C. truncatum* con la aplicación de los fungicidas azoxistrobina+ciproconazol. McCreary et al. (2016) y Boersma et al. (2020) obtuvieron menor severidad de pudrición de raíces y corona ocasionada por *Sclerotinia sclerotiorum* y antracnosis en frijol (*C. lindemuthianum*) con la aplicación de estrobilurina, fluzazinam y tiofanato de metilo. Para evitar la resistencia a fungicidas, se recomienda rotar las aplicaciones de productos con diferentes modos de acción, para maximizar la vida útil y la eficiencia de los principios activos, garantizando la sustentabilidad económica y ambiental (Kitchen et al., 2016; Carmona & Sautua, 2017; Boersma et al., 2020). Al conocer los agentes causales, su biología, su etiología, nos ayuda a implementar algunas medidas preventivas de control. Según, Rojo-Báez et al. (2016) recomiendan emplear semillas libres de enfermedad, rotación de cultivos, remoción de tejidos infectados y fungicidas permitidos. Otra alternativa de control es la propuesta por Landero-Valenzuela et al. (2016); Liu et al. (2016) y Shafique et al. (2017) con aplicaciones de extractos vegetales y *Bacillus subtilis* redujeron el crecimiento de los hongos del tizón de ascochyta y la severidad de antracnosis en frutos de papaya, palto y mango por el ataque de *Colletotrichum* spp.

Tabla 3

Medias en la inhibición del crecimiento micelial (%) en condiciones de *in vitro* de los hongos asociados a la antracnosis en el cultivo de arveja a diferentes fungicidas

N° tratamiento	Fungicidas	Inhibición (%) del crecimiento micelial de los hongos Tukey ($\alpha \leq 0,05$)		
		<i>C. lindemuthianum</i>	<i>C. truncatum</i>	<i>Ascochyta pisi</i>
1	Propineb	43,60 e ¹	59,85 e	71,82 d
2	Oxicloruro de Cu	91,87 c	69,75 d	34,91 e
3	Iprodione	95,37 b	93,27 b	93,27 b
4	Kresomix-metil	61,58 d	74,51 c	89,29 c
5	Trifloxy+Tebuco	100 a	100 a	100 a
6	Tebuconazole	100 a	100 a	100 a
7	Procloraz	100 a	100 a	100 a
8	Mancozeb	100 a	100 a	100 a
9	Testigo	0,00 f	0,00 f	0,00 f
Coeficiente de variabilidad		6,60 %	3,84 %	6,58 %

¹Promedios en columnas con letras diferentes difieren estadísticamente (Tukey $\alpha \leq 0,05$).

4. Conclusiones

La caracterización fenotípica nos permitió determinar que los agentes causales de la antracnosis en el cultivo de arveja son *Colletotrichum lindemuthianum*, *C. truncatum* y *Ascochyta pisi* y los fungicidas tebuconazole, trifloxystrobin+tebuconazole, procloraz y mancozeb inhibieron completamente el crecimiento micelial de los hongos. Trabajos futuros deben utilizar técnicas moleculares para identificar los hongos asociados a la antracnosis e implementar diferentes estrategias de manejo de la enfermedad.

ORCID

R. Aguilar-Ancota  <https://orcid.org/0000-0002-3965-6096>

R. Rafael-Rutte  <https://orcid.org/0000-0003-2411-0223>

H. Martínez-Santos  <https://orcid.org/0000-0003-1222-6843>

S. Apaza-Apaza  <https://orcid.org/0000-0003-1279-9342>

Referencias bibliográficas

- Agrios, G. (1995). *Fitopatología*. S.A. de C. V. México, Mexico: Limusa.
- Almaraz, S. A., Ayala, E. V., Landero, V. N., Tlatilpa, S. I., & Nieto, A. D. (2019). First Report of *Colletotrichum truncatum* of *Solanum lycopersicum* in Mexico. *Plant Disease*, 103(7), 1782-1782.
- Armesto, C., Maia, F. G. M., Monteiro, F. P., & Abreu, M. S. (2019). Exoenzymes as a pathogenicity factor for *Colletotrichum gloeosporioides* associated with coffee plants. *Summa Phytopathologica*, 45(4), 368-373.
- Armstrong-Cho, C. L., & Banniza, S. (2006). *Glomerella truncata* sp. nov., the teleomorph of *Colletotrichum truncatum*. *Mycol Res*, 110, 951-956.
- Auyong, A. S., Ford, R., & Taylor, P. W. (2015). The role of cutinase and its impact on pathogenicity of *Colletotrichum truncatum*. *Journal Plant Pathology & Microbiology*, 6(3), 259.
- Bellé, C., Ramos, R. F., Moccellini, R., & Jacobsen de Farias, C. R. (2020). Detección de *Colletotrichum coccodes* causantes de antracnosis foliar en *Pisum sativum* en el sur de Brasil. *Journal of Plant Pathol*, 102, 255.
- Boersma, S. J., Depuydt, D. J., Vyn, R. J., Gillard, Ch. L. (2020). Fungicide efficacy for control of anthracnose of dry bean in Ontario. *Crop protection*, 127.
- Camarena, F., Huaranga, A., & Osorio, U. (2014). *Innovación fitotecnica del haba (Vicia faba L.), arveja (Pisum sativum L.) y lenteja (Lens culinaris Medik.)*. (1ª ed.). Lima, Perú: Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Carmona, M. & Sautua, F. (2017). La problemática de la resistencia de hongos a fungicidas. causas y efectos en cultivos extensivos. *Agronomía & Ambiente*, 37(1), 1-19.
- Cnossen-Fassoni, A., Bazzoli, D. M., Brommonschenkel, S. H., Fernandes de Araújo, E., & Vieira de Queiroz, M. (2013). The pectate lyase encoded by the pecCI gene is an important determinant for the aggressiveness of *Colletotrichum lindemuthianum*. *J Microbiol*, 51, 461-470.
- Conner, R. L., Gillard, Ch. L. Mcrae, K. B., Hwang, S. F., Chen, Y.Y., Hou, A., Penner, W. G., & Turnbull, G. D. (2019). Survival of the bean anthracnose fungus (*Colletotrichum lindemuthianum*) on crop debris in Canada. *Can J Plant Path*, 41(2), 209-217.
- De-Silva, D. D., Ades, P., Crous, P. W., & Taylor, P. W. J. (2017). *Colletotrichum* species associated with chili anthracnose in Australia. *Plant Pathol*, 66, 254-267.
- Dias, M. D., Pinheiro, V. F., & Café-Filho, A. C. (2016). Impact of anthracnose on the yield of soybean subjected to chemical control in the north region of Brazil. *Summa Phytopathol*, 42, 18-23.
- French, E. R. & Hebert, T. T. (1980). *Métodos de investigación fitopatológica*. San José, Costa Rica: IICA.
- He, Y., Chen, Q., Shu, C., Mei Yang, M., & Zhou, E. (2016). *Colletotrichum truncatum*, a new cause of anthracnose on Chinese flowering cabbage (*Brassica parachinensis*) in China. *Trop Plant Pathol*, 4, 183-192.
- Jevtic, R., Nagl, N., Lalošević, M., Taški-Ajduković, K., Stojšin, V., & May, Ch. L. (2019). First report of ascochyta blight on field pea (*Pisum sativum*) caused by *Didymella pisi* in Bosnia and Herzegovina. *Plant Disease, American Phytopathological Society*, 103(6), 1427-1428.
- Kitchen, J. L., Van den Bosch, F., Paveley, N. D., Helps, J., & Van den Berg, F. (2016). The evolution of fungicide resistance resulting from combinations of foliar-acting systemic seed treatments and foliar-applied fungicides: a modeling analysis. *PLoS ONE*, 11, e0161887.
- Landero-Valenzuela, N., Lara-Viveros, F. M., Andrade-Hoyos, P., Aguilar-Pérez, L. A., & Aguado-Rodríguez, G. J. (2016). Alternatives for the control of *Colletotrichum* spp. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(5), 1189-1198.
- Latorre, G. (1989). *Fungicidas y nematocidas. Avances y aplicabilidad*. Santiago de Chile, Chile: Facultad de Agronomía de la Pontificia Universidad de Chile.
- Liu, N., Xu, S., Yao, X., Zhang, G., Mao, W., Hu, Q., Feng, Z., & Gong, Y. (2016). Studies on the control of Ascochyta blight in field peas (*Pisum sativum* L.) caused by *Ascochyta pinodes* in Zhejiang Province, China. *Front Microbiol*, 7, 481.
- Maiza, B., Siles, M., Ríos, R. & Gabriel, J. (2015). Comportamiento de catorce líneas mejoradas de arveja (*Pisum sativum* L.) en la zona de Challapata, Oruro. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 6(1), 10-22.
- McCreary, C. M., Depuydt, D., Vyn, R. J., & Gillard, C. L. (2016). Fungicide efficacy of dry bean white mold *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, and economic analysis at moderate to high disease pressure. *Crop Protect*, 82, 75-81.
- Ministerio de Agricultura y Riego-MINAGRI. (2019). *Encuesta nacional de intenciones de siembra 2019*. Lima, Perú: Dirección general de seguimiento y evaluación de políticas dirección de estadística agraria.
- Moges, A. D., Admassu, B., Belew, D., Yesuf, M., Njuguna, J., Kyalu, M., & Sita, R. Ghimire, S. R. (2016). Development of microsatellite markers and analysis of genetic diversity and population structure of *Colletotrichum gloeosporioides* from Ethiopia. *PLoS One* 11(3): e0151257.
- Mont, R. M. (2002). *Manejo integrado de enfermedades de las plantas*. Lima, Peru: Ministerio de Agricultura, Servicio Nacional de Sanidad Agraria.
- Nakamura, M., & Iwai, H. 2019. Functions and mechanisms: polygalacturonases from plant pathogenic fungi as pathogenicity and virulence factors. *J Gen Plant Pathol*, 85, 243-250.
- Owati, A., Agindotan, B., & Burrows, M. (2019). First microsatellite markers developed and applied for the genetic diversity study and population structure of *Didymella pisi* associated with ascochyta blight of dry pea in Montana. *Fungal Biology*, 123, 384-392.
- Padder, B. A., Kapoor, V., Kaushal, R. P. & Sharma, P. N. (2012). Identification and genetic diversity analysis of ascochyta species associated with blight complex of pea in a northwestern hill state of India. *Agric Res*, 1(4), 325-337.
- Padder, B. A., Sharma, P. N., Awale, H. E., Kelly, J. D. (2017). *Colletotrichum lindemuthianum*, the causal agent of bean anthracnose. *Journal of Plant Pathology*, 99(2), 317-330.
- Riccioni, L., Orzali, L., Romani, M., Annicchiarico, P., & Pecetti, L. (2019). Organic seed treatments with essential oils to control ascochyta blight in pea. *Eur J Plant Pathol*, 155, 831-840.
- Rodríguez-Guerra, R., Ramírez-Rueda, M. T., Cabral-Enciso, M. García-Serrano, M., Lira-Maldonado, Z., Guevara-González, R. G., González-Chavira, M., & Simpson, J. (2005). Heterothallic mating observed between Mexican isolates of *Glomerella lindemuthiana*. *Mycologia*, 97(4), 793-803.
- Rodríguez-Ortega, D., Vega-Jiménez, L., Murillo-Ilbay, Á., Peralta-Ildrovo, E., & Rosas-Sotomayor, J. C. (2018). Variabilidad patogénica de *Colletotrichum lindemuthianum* y resistencia en germoplasma de *Phaseolus vulgaris* L. de Ecuador. *Agronomía Mesoamericana*, 29(1), 19-28.
- Rogério, F., Gladioux, P., Massola, N. S., & Ciampi-Guillardi, M. (2019). Multiple introductions without admixture of *Colletotrichum truncatum* associated with soybean anthracnose in Brazil. *Phytopathology*, 109, 681-689.
- Rojo-Báez, I., García-Estrada, R. S., León-Félix, J., Sañudo-Barajas, A., & Allende-Molar, R. (2016). Histopatología del proceso de infección de *Colletotrichum truncatum* en papaya y chicharo. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 34(3), 316-325.
- Rojo-Báez, I., García-Estrada, R. S., Sañudo-Barajas, A. J., León-Félix, J., & Allende-Molar, R. (2017a). Proceso de infección de Antracnosis por *Colletotrichum truncatum* en papaya Maradol. *Rev Bras Frutic*, 39, 1-5.
- Rojo-Báez, I., Álvarez-Rodríguez, B., García-Estrada, R. S., León-Félix, J., Sañudo-Barajas, A., & Allende-Molar, R. (2017b). Current status of *Colletotrichum* spp. in Mexico: Taxonomy, characterization, pathogenesis and control. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 35(3), 549-570.
- Rubiales, D., Araújo, S. S., Vaz Patto, M. C., Rispaill, N., & Valdés-López, O. (2018). Editorial: Advances in Legume Research. *Frontiers in Plant Science*, 9, 501.
- Shafique, S., Shafique, S., & Ahmed, A. (2017). Defense response of *Eucalyptus camaldulensis* against black spot pathogen of *Pisum sativum*. *South African Journal of Botany*, 113, 428-436.
- Sewedy, M. E., Atia, M. M., Zayed, M. A., & Ghoniem, M. (2019). Molecular detection and controlling of seed-borne *Colletotrichum* spp. in common bean and soybean. *Zagazig J Agric Res*, 46, 6A.
- Sivachandra-Kumar, N. T., & Banniza, S. (2017). Assessment of the effect of seed infection with *Ascochyta pisi* on pea in western Canada. *Front Plant Sci*, 8, 933.
- Sutton, B. C. (1980). *The Coelomycetes: Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli, and Stromata*. Surrey, UK: Commonwealth Mycological Institute – Kew.
- Tadja, A. 2018. Morphological and genotypic characterization of fungi associated with the Ascochyta blight complex in western regions of Algeria. *European Scientific Journal*, 14 (9), 276-284.
- Taylor, J. W., Branco, S., Gao, Ch., Hann-Soden, Ch., Montoya, L., Sylvain, I., & Gladioux, P. (2017). Sources of fungal genetic variation and associating it with phenotypic diversity. *Microbiol Spectr*, 5(5): 1-21.

- Torres-Calzada, C., Tapia-Tussell, R., Higuera-Ciapara, I., Huchin-Poot, E., Martín-Mex, R., Nexticapan-Garcez, A., & Pérez-Brito, D. (2018). Characterization of *Colletotrichum truncatum* from papaya, pepper and physic nut based on phylogeny, morphology and pathogenicity. *Plant Pathol*, 67, 821-830.
- Valladolid-Chiroque, A. R. (2016). *Leguminosas de grano cultivares y clases comerciales del Perú*. Lima, Perú: Ministerio de Agricultura y Riego.
- Watson, Ch. A., Reckling, M., Preissel, S., Bachinger, J., Bergkvist, G., Kuhlman, T., Lindstrom, K., Nemecek, T., Topp, C. F. E., Vanhatalo, A., Zander, P., Murphy-Bokern, D., & Stoddard, F. L. (2017). Grain legume production and use in European agricultural systems. *Adv Agron*, 144, 235-303.