

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA**

**FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**Departamento Académico de Ciencias Agrarias**



**“EFECTO DEL PROPÓLEO, *Trichoderma harzianum* E  
IPRODIONE SOBRE LA MANCHA PARDA CAUSADA  
POR *Alternaria alternata* (Fr, Fr) Keiss pv. *citri* EN EL  
HÍBRIDO TANGELO MINNEOLA A NIVEL IN VITRO Y  
CAMPO EN TINGO MARÍA”**

**TESIS**

Para optar al título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO**

**CARRANZA DÍAZ, Joiler Adilson**

**PROMOCIÓN II - 2007**

**“Unasinos liderando el cambio para el desarrollo del País”**

**TINGO MARÍA - PERÚ**

**2012**



**H20**

**C26**

**Carranza Díaz, Joiler Adilson**

“Efecto del propóleo, *Trichoderma harzianum* e Iprodione sobre la mancha parda causada por *Alternaria alternata* (Fr, Fr) pv. citri en el híbrido Tangelo Minneola a nivel in vitro y campo en Tingo María”

81 páginas; 17 cuadros; 04 fgrs.; 68 ref.; 30 cm.

Tesis (Ing. Agrónomo) Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María, Facultad de Agronomía

**1. CITRICO**

**2. PRODUCCION**

**3. ENFERMEDAD**

**4. PROPOLEO**

**5. TAXONOMIA**

**6. CONTROL**

## DEDICATORIA

A mí querida madre Asunciona Díaz  
Barturén y mi querido padre Floro  
Carranza Chilcón, con eterna gratitud, por  
ser quienes me enseñaron a luchar y  
conseguir lo que uno desea.

A mis hermanos: Marisol Eulalia,  
Juver Idelson, Lourdes Gissela,  
Pamela Marilín por su constante  
apoyo para mi desarrollo tanto  
personal como profesional, por  
ser mi fuerza de lograr algo más  
en la vida.

A mí querida familia, en especial  
mis tíos, primos, abuelitos, y  
todos los que me apoyaron en mi  
formación profesional.

Con amor a Mary Janeth Pisco  
Peña, por ser mi compañera en mi  
formación profesional y brindarme  
gratos e inolvidables momentos en  
mi vida.

## **AGRADECIMIENTO**

Expreso mi sincero agradecimiento a las siguientes instituciones y personas que colaboraron y apoyaron para la realización del presente trabajo de investigación.

- A la Universidad Nacional Agraria de la Selva por haberme dado la oportunidad de lograr mi formación profesional.
- Al Ing. Oscar CABEZAS HUAYLLAS, asesor del presente trabajo por su apoyo en la ejecución y redacción del presente trabajo de investigación.
- A los miembros integrantes del Jurado de Tesis, Dr. Rolando RÍOS RUIZ, Ing. Carlos MIRANDA ARMAS e Ing. M. Sc. Gianfranco EGOAVIL JUMP, por su valiosa colaboración en la mejora y culminación del presente trabajo.
- Al Med. Vet. Lizandro TAFUR ZEVALLOS, por su valiosa colaboración en la mejora y culminación del presente trabajo.
- A Michel AVENDAÑO RUBIO, Técnico del Laboratorio de Fitopatología de la UNAS-FA, por las facilidades brindadas.
- A mis amigos, Bach. Alexander Becerra Solano, Ing. Elmer Campos Acuña, Bach. Fiorella Cruzado Morales y Bach. Jhim Santos Espinoza, compañeros quienes me brindaron su apoyo incondicional.
- A los ingresantes de la promoción 2002, por todos los momentos gratos compartidos.

## ÍNDICE

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN.....	12
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1. Del cultivo del cítrico Tangelo Minneola.....	14
2.1.1. Centro de origen.....	14
2.1.2. Características del árbol.....	14
2.1.3. Características del fruto.....	14
2.1.4. Producción de cítricos en el Perú.....	15
2.2. De la enfermedad.....	15
2.2.1. “Mancha parda”.....	15
2.2.1.1. Etiología y epidemiología.....	15
2.2.1.2. Clasificación taxonómica.....	16
2.2.1.3. Síntomas en brotes, hojas y frutos.....	17
2.2.1.4. Historia y distribución geográfica de la “mancha parda”.....	18
2.2.1.5. Cítricos afectados.....	19
2.2.1.6. Estado fenológico de mayor susceptibilidad.....	19
2.2.1.7. Condiciones que favorecen la enfermedad.....	20
2.2.1.8. Control.....	22
2.3. Del extracto etanólico de propóleo.....	25
2.3.1. El propóleo.....	25

2.3.2.	Acción antimicrobiana del propóleo.....	29
2.4.	Del <i>Trichoderma</i> sp.....	32
2.4.1.	Mecanismos de acción.....	32
2.4.1.1.	Competencia.....	32
2.4.1.2.	Antibiosis.....	33
2.4.1.3.	Micoparasitismo.....	33
2.4.2.	Rango de hospederos.....	34
2.4.3.	Biocontrol con <i>Trichoderma</i> sp.....	34
2.5.	Del fungicida.....	36
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
3.1.	Lugar de ejecución.....	39
3.1.1.	Fase de laboratorio.....	39
3.1.2.	Fase de campo.....	40
3.2.	Metodología.....	40
3.2.1.	Fase de laboratorio.....	40
3.2.1.1.	Preparación del extracto de propóleo.....	40
3.2.1.2.	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).....	42
3.2.1.3.	Extracto etanólico de propóleo sobre la tasa de crecimiento micelial.....	44
3.2.1.4.	Extracto hidro-etanólico de propóleo (EHEP) e Iprodione sobre la tasa de crecimiento micelial.....	44

3.2.1.5. Antagonismo de <i>Trichoderma harzianum</i> frente a <i>Alternaria alternata</i> .....	46
3.2.2. Fase de campo.....	47
3.2.2.1. Componentes en estudio.....	49
3.2.2.2. Tratamientos en estudio.....	49
3.2.2.3. Diseño experimental.....	50
3.2.2.4. Características del campo experimental.....	51
3.2.2.5. Parámetros a evaluar.....	52
3.2.3. Ensayo complementario.....	53
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	56
4.1. Fase de laboratorio.....	56
4.1.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de propóleo.....	56
4.1.2. Extracto etanólico de propóleo sobre la tasa de crecimiento micelial.....	60
4.1.3. Extracto hidro-etanólico de propóleo e Iprodione sobre la tasa de crecimiento micelial.....	62
4.1.4. Antagonismo de <i>Trichoderma harzianum</i> frente a <i>Alternaria</i> <i>alternata</i> .....	65
4.2. Fase de campo.....	66
4.3. Ensayo complementario.....	73
4.4. Costos de la preparación de los tratamientos en estudio.....	75

V. CONCLUSIONES.....	78
VI. RECOMENDACIONES.....	79
VII. RESUMÉN.....	80
VIII.BIBLIOGRAFÍA.....	82
IX. ANEXO.....	93



## ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
1. Datos meteorológicos registrados durante el periodo de ejecución de la fase de campo realizada de Marzo a Junio del 2008.....	40
2. Soluciones madres de extracto etanólico de propóleo (EEP) en diferentes niveles de dilución en agua para la determinación del CMI sobre las conidias de <i>A. alternata</i> .....	43
3. Diferentes diluciones de extracto etanólico de propóleo al 15% (solución madre) sobre la tasa de crecimiento micelial de <i>Alternaria alternata</i> .....	45
4. Tasa de crecimiento micelial de <i>A. alternata</i> en 3 diluciones de extracto hidro-etanólico de propóleo (EHEP) al 15% de solución madre.....	46
5. Dos diluciones de extracto hidro-etanólico de propóleo (EHEP) procedente de una solución madre al 15%, <i>T. harzianum</i> e Iprodione en el control de <i>A. alternata</i> .....	49
6. Análisis de variancia para los tratamientos en estudio.....	51
7. Extracto de propóleo al 15% (solución madre), <i>T. harzianum</i> e Iprodione sobre el control de <i>A. alternata</i> en brotes extraídos de Tangelo.....	55
8. Porcentaje de germinación de conidias de <i>A. alternata</i> horas después de incubación en medio PDA (Duncan $\alpha=0.05\%$ ).....	58

9.	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del EEP sobre la germinación de conidias de <i>A. alternata</i> .....	59
10.	Tasa de crecimiento micelial de <i>A. alternata</i> en diferentes concentraciones de alcohol etílico en medio PDA.....	61
11.	Tasa de crecimiento micelial de <i>A. alternata</i> en diferentes diluciones de una solución madre al 15% de extracto etanólico de propóleo (EEP).....	62
12.	Tasa de crecimiento micelial de <i>A. alternata</i> en tres diluciones de EHEP al 15% (solución madre), alcohol etílico e iprodione (Duncan $\alpha=0.05\%$ ).....	63
13.	Tasa de crecimiento micelial <i>A. alternata</i> en siembra dual (vs) <i>T. harzianum</i> y mecanismo de control ejercido.....	66
14.	Análisis de variancia para la incidencia acumulada brotes enfermos, brotes sanos, brotes muertos, hojas enfermas/brote, hojas sanas/brote.....	71
15.	Número e incidencia acumulada de brotes totales, brotes enfermos, brotes sanos, brotes muertos, hojas/brote, hojas enfermas/brote, hojas sanas/brote (Duncan $\alpha=0.05\%$ ).....	72
16.	Extracto (hidro-etanólico y etanólico) de propóleo, <i>T. harzianum</i> , Iprodione sobre el porcentaje de lesiones de <i>A. alternata</i> en hojas de Tangelo Minneola (Duncan $\alpha=0.05\%$ ).....	73
17.	Costo de preparación de los productos empleados para los	

tratamientos en estudio.....	77
18. Porcentaje de germinación de conidias de <i>A. alternata</i> horas después de la incubación.....	94
19. Análisis de variancia del tiempo de germinación de conidias de <i>A. alternata</i> .....	94
20. Análisis de variancia del extracto hidro-etanólico de propóleo e Iprodione en la tasa de crecimiento micelial de <i>A. alternata</i> .....	95
21. Análisis de variancia del extracto (hidro-etanólico y etanólico) de propóleo, Iprodione y <i>T. harzianum</i> sobre <i>A. alternata</i> en brotes extraídos de Tangelo minneola 36 horas después del ensayo.....	95

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
1. Siembras duales de <i>Trichoderma harzianum</i> (Th) vs. <i>Alternaria alternata</i> (Aa) en medio PDA.....	47
2. Porcentaje de germinación de conidias de <i>A. alternata</i> horas después de la incubación en medio PDA.....	57
3. Antagonismo (micoparasitismo y antibiosis) de <i>Trichoderma harzianum</i> frente a <i>Alternaria alternata</i> en medio PDA.....	67
4. Grado de lesiones causadas por <i>A. alternata</i> en brotes extraídos de tangelo tratadas previamente con diferentes concentraciones de EHEP, <i>T. harzianum</i> e Iprodione.....	75
5. Detalle del campo experimental (cuatro bloques con cinco tratamientos).....	96

## I. INTRODUCCIÓN

El Tangelo minneola es una de las variedades de cítricos (*Citrus sinensis*) de mayor importancia económica; sin embargo, su producción en el Perú en los últimos años ha sido seriamente limitado por el patógeno *Alternaria alternata* (Fr, Fr) Keiss pv. *citri*; agente causal de la “mancha parda”. En algunas regiones su presencia ha significado una severa reducción de los rendimientos en un rango del 30 al 90% (SOLEL, 1991).

Se ha descrito que este hongo infecta tejidos en proceso de crecimiento y desarrollo (hojas, brotes y frutos) causando lesiones necróticas que aparecen a las 24 horas después de la infección. La gravedad de esta enfermedad radica en que causa la muerte de los brotes, situación que limita significativamente la floración; además, de causar la caída prematura de frutos y afectar la cantidad y calidad de las frutas que llegan a la cosecha (KOHMOTO *et al.*, 1993).

En el Perú fue reportada en el año 2003 en el valle de Satipo (SENASA, 2004); desde entonces se ha diseminado a todas las zonas productoras de este cultivo de la región amazónica. Las medidas de control recomendados para el manejo de esta enfermedad son la ejecución oportuna de las prácticas culturales como: podas, control eficiente de malezas a través de la siembra de coberturas, remoción de tejido enfermo, fertilización balanceada y aplicación de fungicidas en la época de brotamiento (FERRARI, 2006). Sin embargo, estas

medidas de control no han tenido un efecto significativo en la reducción de la severidad de esta enfermedad; además, significan un alto costo que no puede ser asumidos por los productores.

Bajo este contexto es necesario buscar formas alternativas al uso de fungicidas de origen sintético para el control de esta enfermedad; varios estudios realizados han demostrado que el empleo de extracto etanólico de propóleo tiene actividad antifúngica; sobre *Alternaria* sp. y otros hongos patogénicos a nivel in vitro y bajo condiciones de campo (BONILLO, 2005). En el propóleo se ha identificado la presencia de compuestos fenólicos tipo flavonas, flavones y las flavononas, que le confieren propiedades antifúngicas a este producto natural elaborado por las abejas (ASÍS, 1989). Además, numerosas enfermedades se ha logrado controlar mediante la aplicación de antagonistas como *Trichoderma* sp. en sistemas de producción convencional y orgánica (SANDOVAL *et al.*, 2006). Bajo estas consideraciones el presente trabajo plantea el objetivo siguiente:

Evaluar el efecto del propóleo de abeja, el antagonista *Trichoderma harzianum* y el fungicida Iprodione en el control de *Alternaria alternata* pv. *citri* agente causal de la “mancha parda” en el híbrido Tangelo Minneola a nivel in vitro y campo.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Del cultivo del cítrico Tangelo Minneola

#### 2.1.1. Centro de origen

AMOROS (2003), sostiene que el Tangelo Minneola es un híbrido resultante del cruce del híbrido pomelo Duncan y mandarina Dancy (*C. paradisi* x *C. reticulata*), obtenida en 1931, en el Estado de Florida (E.E.U.U.) por Luit Swingle, T.R. Robinson y E.M. Savage.

#### 2.1.2. Características del árbol

AMOROS (2003), describe que el Tangelo es un árbol de gran porte, hojas grandes, así como el fruto; en Israel se utiliza como polinizador de la variedad 'Ortonique o Topaz' que tiene su maduración a finales de Febrero.

#### 2.1.3. Características del fruto

AMOROS (2003), sostiene que el fruto es una fruta ovoide, grande, algo resaltada en la zona peduncular denominado mamelón, fácilmente reconocible; en ocasiones esta característica no se presenta en algunos frutos. La cáscara es relativamente delgada y de un color naranja-rojiza, que destaca grandemente en relación a otros frutos de cítricos; de fácil pelado, se aplasta con relativa facilidad debido a que su cáscara es blanda y delgada, pulpa suave y aromática, de sabor agradable con abundante jugo y con muy pocas semillas.

#### **2.1.4. Producción de cítricos en el Perú**

VILELA (2004), reporta que en el Perú, existen alrededor de 48 734 hectáreas distribuidas de la siguiente manera: naranjas con 22 087 hectáreas que representa el 43%, mandarinas con 6 612 hectáreas (20%), limas y limones con 19 688 hectáreas (36%) y toronja con 347 hectáreas (1%), de las cuales dentro de las mandarinas se encuentra el híbrido Tangelo Minneola con una producción de 2 000 hectáreas los cuales 560 hectáreas se encuentra en la selva central.

## **2.2. De la enfermedad**

### **2.2.1. “Mancha parda”**

SIMMONS (1999), sostuvo que esta enfermedad es causada por *Alternaria alternata* (Fr, Fr) Keiss pv. *citri*. Existen serias dudas si todas las cepas de *Alternaria* que causan esta enfermedad se encuentran dentro de esta especie.

MARÍN *et al.* (2006), reportaron oficialmente la presencia de esta enfermedad en el Perú.

#### **2.2.1.1. Etiología y epidemiología**

SOLEL (1991), indica que *Alternaria alternata* es un hongo que forma conidióforos solitarios o en grupos de tres o cuatro. Las conidias son de color café; solitarias o en cadenas y de forma elipsoidal u



obclavata. El tamaño de conidias puede variar de 8-16 x 10-65  $\mu\text{m}$ , a partir de 1 a 6 septos transversales, y de 0 a 3 septos longitudinales.

SOLEL (1991) y PEEVER *et al.* (2000), sostienen que el necrosamiento de los tejidos infectados es producida por una toxina específica denominada la ACT-toxina, este tipo de toxina solo es producido pv. tangerina, por tanto, sólo afectan a las variedades tangerinas y a sus híbridos, tales como Tangelo Minneola, Orlando, Tangor Murcott.

KOHMOTO *et al.* (1993), reportan que la ACT-toxina, el primer sitio de acción se produce en la membrana plasmática e induce la necrosis en las nervaduras y un rápido aumento en la pérdida de electrolitos en las hojas susceptibles.

#### **2.2.1.2. Clasificación taxonómica**

De acuerdo a MENEZES (2001), el hongo causante de la “macha parda” de los cítricos se clasifica de la siguiente manera:

Reino	:	Fungí
División	:	Deuteromycota
Clase	:	Hyphomycetes
Subclase	:	Hyphomycetidae
Orden	:	Moniliales

Familia	:	Dematiaceae
Género	:	<i>Alternaria</i>
Especie	:	<i>A. alternata</i> (Fr, Fr) Keiss pv. <i>citri</i>

### **2.2.1.3. Síntomas en brotes, hojas y frutos**

#### **a. En brotes y hojas**

TIMMER y PEEVER (1997) indican que uno de los primeros síntomas observables es la fuerte defoliación que sufren los árboles, debido al necrosamiento de los brotes. Sobre las hojas aparecen pequeñas áreas necrosadas de tamaño variable que producen una curvatura lateral de la hoja; la necrosis suele extenderse siguiendo las nervaduras de la hoja por la rápida difusión a través de ellos de la toxina en la zona necrosada. Se ha determinado que la toxina producida es específica y sólo se produce en híbridos de los Tangelo Minneola, SOLEL (1991) la describió como ACT-toxina.

SOLEL (1991), sostiene que las lesiones en hojas jóvenes varían de 3-6 mm de diámetro y 1-3 mm de profundidad, en las hojas maduras aparecen una mancha de color marrón, rodeado por un halo amarillo. Las lesiones pueden llegar a medir de 3-8 mm de diámetro. Sin embargo, el tamaño de las lesiones en las hojas depende de la cantidad de inóculo, la edad y el grado de susceptibilidad (GARDNER *et al.*, 1986; REIS *et al.*, 2006).

### **b. En frutos**

TIMMER y PEEVER (1997), mencionan que en frutos recién cuajados pueden aparecer pequeñas lesiones a modo de puntos negros sobre la cáscara. Estas lesiones pueden evolucionar necrosando totalmente el fruto. Las lesiones sobre la cáscara de los frutos puede avanzar formando zonas deprimidas, con un halo amarillento a su alrededor en las que los frutos muestran un cambio de color precoz, posteriormente se forman unas depresiones circulares de color marrón oscuro con un tamaño que puede llegar hasta unos 10 mm de diámetro.

#### **2.2.1.4. Historia y distribución geográfica de la “mancha parda”**

HERRERA (1992), sostuvo que la “mancha parda” de los cítricos fue descrita por primera vez en Australia sobre la mandarina Emperor en el año 1903, pero ha sido en los últimos 15 años cuando se ha producido su expansión, habiendo sido detectada en Florida (EE.UU.), Cuba, Israel, Turquía, España, Sudáfrica, Colombia e Italia.

VINCENT *et al.* (2000), sostienen que esta enfermedad fue reportada en 1974, en el Estado de la Florida, (EE.UU.) sobre mandarina Dancy. En 1989 fue reportada en Israel afectando al Tangelo Minneola; en España, Brasil y Argentina fue reportada en 1998 sobre la mandarina Fortune.

MARIN (2004), reporta que inicialmente esta enfermedad se observó en los distritos de San Martín de Pangoa y Mazamari de la provincia de Satipo, Región Junín, en agosto del 2003 por el Instituto Nacional Investigaciones de la Amazonía (INIEA); sin embargo, fue reportada oficialmente en agosto del 2004 por el Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA, 2004).

#### **2.2.1.5. Cítricos afectados**

CANIHOS *et al.* (1999), sostienen que la variante de *A. alternata* que ocasiona esta enfermedad afecta fundamentalmente a la mandarina Dancy y sus híbridos; entre ellos el Tangelo Minneola, Orlando, Nova y Fortune. Además, ataca a Tangerina, Sunsburt, Nova, Lee y a las mandarinas Emperador, Ponkan y al Tangor Murcott que es un híbrido de origen desconocido. En el Perú, el híbrido más afectado es el Tangelo Minneola y en menor medida la mandarina Nova.

#### **2.2.1.6. Estado fenológico de mayor susceptibilidad**

WHITESIDE (1976), indica que las hojas de Tangelo y Tangerina sólo son sensibles a la enfermedad en sus primeras fases de desarrollo, mostrándose resistentes en su madurez; respecto a los frutos, en algunas de las variedades afectadas por esta enfermedad, como la mandarina

Dancy, se asume que el fruto es resistente cuando alcanza los 30 mm de diámetro.

TIMMER (2000), sostiene que el fruto de Tangelo Minneola permanece plenamente receptivo a la enfermedad en todos sus estadios, aunque en sus primeras fases de desarrollo es cuando muestra una mayor susceptibilidad.

#### **2.2.1.7. Condiciones que favorecen la enfermedad**

VINCENT *et al.* (2000), indican que un aspecto fundamental en el control de cualquier enfermedad de planta es el conocimiento preciso de las condiciones ambientales que favorecen su expansión y desarrollo. Esto es particularmente importante en esta enfermedad, ya que su desarrollo está altamente ligado a las condiciones variables del clima, y tanto la disponibilidad del inóculo como la presencia de material vegetal susceptible que pueden mantenerse constantes a lo largo de todo el ciclo del cultivo.

SOLEL y KIMCHI (1998); CANIHOS *et al.* (1999), sostienen que la temperatura óptima para el desarrollo de la enfermedad en estudio es de 24 a 27°C, pero prospera entre 18 y 28°C, requiere alta humedad ambiental, las lluvias permiten que la superficie de la hoja y otros órganos de la

planta se mantengan humedecidos al menos por 10 horas para el desarrollo de la enfermedad, pero los niveles superiores ocurren con 15 a 36 horas.

TIMMER *et al.* (1998), indican que *A. alternata* produce sus conidias sobre las lesiones de las hojas maduras que se mantienen en los árboles, en hojas caídas al suelo y en las ramillas necrosadas. Las conidias son diseminadas por el viento y son depositados en las hojas, frutos y ramillas jóvenes, la germinación ocurre si existe humedad y temperatura adecuadas, el ciclo se repite, dando lugar a muchas infecciones en hojas, ramillas y frutos jóvenes, así mismo, influyen otros factores como:

#### **a. La edad del cultivo**

TIMMER y PEEVER (1997), sostienen que las plantaciones menores de 5 años brotan más profusamente que las de mayor edad, por lo cual presentan abundante cantidad de tejido joven donde la enfermedad puede ser muy severa.

#### **b. Densidad de siembra**

BELLA *et al.* (2001), indican que en plantaciones muy densas no hay una buena circulación del aire y por lo tanto la humedad que se forma sobre las hojas como consecuencia de las lluvias y del rocío se

mantiene por mayor tiempo, favoreciendo la germinación de las conidias en los tejidos susceptibles.

#### **c. Estado nutricional**

VINCENT *et al.* (1999), indican que este es un factor muy importante que condiciona la respuesta de la planta frente al ataque de enfermedades; la fertilización excesiva con nitrógeno induce el brotamiento excesivo y determina el desarrollo de tejidos con mayor susceptibilidad al patógeno.

#### **d. Riego**

VINCENT *et al.* (1999), sostienen que los riegos frecuentes ocasionan brotamiento múltiples que permiten la presencia permanente de tejidos en estado susceptibles durante un mayor periodo de tiempo. Por otro lado, el uso del sistema de riego que alcanza a la copa de los árboles crea condiciones favorables para la germinación y penetración de la conidias del patógeno.

#### **2.2.1.8. Control**

FERRARI (2006), indica que en casi todas las regiones productoras de mandarinas y sus híbridos, los investigadores buscan la forma más adecuada y racional para controlar la mancha parda. Sin embargo, debido

a la alta susceptibilidad de los cultivares, períodos relativamente cortos para la producción de conidias, los factores ambientales y el control de la enfermedad, ya sea mediante el uso de fungicidas, cultivares resistentes o medidas culturales para reducir la severidad de la enfermedad no ha sido una tarea fácil.

MARIN (2004), reporta que el control de la “mancha parda” en Tangelo y Tangerina puede ser extremadamente difícil en zonas tropicales lluviosas, como la selva peruana; y para conseguir una medida de control adecuada de esta enfermedad se debe adoptar una estrategia global, integrando diferentes métodos de control.

FERRARI (2006), indica que adecuadas prácticas culturales pueden ayudar a reducir la gravedad de mancha parda, entre ellos están: (1) evitar el riego aéreo para reducir duración de la humedad de la hoja y, por tanto, reducir la producción conidial, (2) utilizar más espacio entre plantas para una mayor circulación de aire y, disminuir la humedad relativa, (3) podar las plantas, una forma de eliminar fuente de inóculo y (4) evitar una excesiva fertilización nitrogenada, a fin de no fomentar constantes brotes.

SOLEL *et al.* (1997), sostienen que el control químico ha sido el más desarrollado en los países donde es endémica esta enfermedad. En Florida, se realizan aplicaciones frecuentes de Iprodione o



cúpricos con una frecuencia de 10 a 14 días. En regiones semiáridos de Israel y Sudáfrica, son necesarios de 6 a 8 aplicaciones. En Colombia, donde las precipitaciones y temperaturas son elevadas se requieren hacer aplicaciones semanales para lograr niveles eficientes de control (CASTRO y MONTOYA, 1996).

TIMMER *et al.* (1998) y TIMMER (2000), indican que los fungicidas a base de cobre, Iprodione, Procimidona, Mancozeb y Clorotalonil han sido eficaces en el control de la enfermedad, pero no todos de estos fungicidas están registrados en las distintas regiones productoras. Sin embargo, el uso excesivo de Iprodione ha mostrado resistencia de los patógenos en Israel (SOLEL *et al.*, 1996).

TIMMER y BHATIA (2001), mencionan que evaluaron fungicidas en un campo de 6 años de edad de Tangelo y de Murcott, con cuatro aplicaciones, usaron diversos fungicidas que tuvieron efectos diferentes en los tratamientos para controlar la “mancha parda”, el fungicida Strubilurina fue muy eficaz si era aplicado exclusivamente con el aceite derivado de petróleo.

ALKA y TIMMER (2002), indican que del mismo modo, las aplicaciones con el fungicida a base de cobre, tuvieron un nivel alto de control de la enfermedad, pero es menos eficaz que las Strubilurina o

tratamientos de combinación de Strobilurina-cobre que dieron control aceptable.

MONDAL *et al.* (2005), sostienen que Azoxystrobin no inhibió el crecimiento micelial de *A. alternata* incluso a la dosis de 100 µg/ml. Este hongo puede estar empleando una ruta alternativa a la inhibición del citocromo b en el proceso de respiración a nivel *in vitro*. La respiración alternativa normalmente no está reportada para los hongos en la planta; así, muchos hongos son más sensibles a nivel *in vitro*. En el campo, Azoxystrobin y los Pyraclostrobin son muy eficaces para control de *Alternaria*.

### **2.3. Del extracto etanólico de propóleo**

#### **2.3.1. El propóleo**

BIANCHI (1996), sostiene que el propóleo se define como un conjunto de sustancias resinosas, gomosas y balsámicas, de consistencia viscosa, recogidas por las abejas (*Apis mellifera*) de ciertas partes de especies vegetales, que transportan al interior de la colmena donde se modifican con las ceras y secreciones salivares.

KUJUMGIEV *et al.* (1999), indican que las abejas utilizan el propóleo para recubrir todas las grietas y abertura de las colmenas, el cual no

sólo cumple con esa finalidad, sino que también debido a su acción fungicida y antibiótica, no permite que se propaguen en ella las enfermedades.

GRANGE y DAVEY (1990), indican que el propóleo es una sustancia compleja, constituida por una gran variedad de compuestos químicos, su composición no es estable y varía según la fuente de procedencia, se caracteriza por tener un 55% de resinas y bálsamos aromáticos, 30% de ceras, 10% de aceites esenciales y 5% de granos de polen.

PROPRAVKO (1975), indica que los principales compuestos del propóleo son de tipo flavonoide, tales como, las flavonas, flavones y las flavononas.

WALKER y CRANE (1987).reportan alrededor de 38 flavonas, 12 derivados del ácido benzoico, 14 derivados del alcohol cinámico y el ácido cinámico, 12 componentes entre alcoholes, cetonas y fenoles, 7 terpenos, 11 esteroides, 7 azúcares y 2 aminoácidos; así mismo, ASIS (1996), sostuvo que en su composición se han identificado ácidos alifáticos y ésteres que provienen de las ceras de las abejas. También ácidos aromáticos (ácidos benzoicos, ferúlico, cafeico) y sus ésteres. Estos tienen su origen en las yemas vegetales y muchos de sus componentes tienen propiedades antifúngicas y

antibacterianas, fitoinhibidora o antigerminativa (ac. benzoico y ác. p-cumárico), acción hemostática o coagulante (ác. ferúlico); sin embargo BEDASCARRASBURE *et al.* (1999), sostienen que la composición del propóleo depende básicamente de las fuentes vegetales donde se originaron y de la función específica dentro de la colonia. Trabajos preliminares han encontrado mayor porcentaje de compuestos fenólicos en el propóleo que recubre los panales que en el destinado a reducir el ingreso a la colmena.

BIANCHI (1996), indica que se han identificado más de 160 compuestos, de los cuales un 50% son compuestos fenólicos, los principales fenoles identificados son: flavonoides, ácidos aromáticos y sus ésteres, aldehídos aromáticos, cumarinas, triglicéridos fenólicos. BEDASCARRASBURE *et al.* (1999), en términos de acción farmacológica, los principales constituyentes del propóleo son los compuestos fenólicos.

LEVY (1999), sostiene que el mecanismo de la actividad antimicrobiana del propóleo es complejo y puede ser atribuido al sinergismo entre algunos de sus compuestos, tales como flavonoides, ácidos aromáticos, ácidos grasos, ésteres, hidroxiácidos, sesquiterpenos y otros compuestos fenólicos presentes en su composición.

LEFKOVITS *et al.* (1997), sostienen que las propiedades antimicrobianas de esta resina pueden ser atribuidas, principalmente, a los flavonoides, como la pinocembrina, galangina, pinobanskina y al éter bencil del éster fenetil de ácido caféico, el cual es un componente activo del propóleo que ejerce gran variedad de cambios biológicos en diversos sistemas, como las respuestas inmunomoduladoras, antiinflamatorias, y antimutogénicas.

ASÍS (1989), indica que una de las propiedades más importante del propóleo es su actividad antimicrobiana, la cual se le atribuye fundamentalmente a los flavonoides. Lo cual los flavonoides aparte de tomar una acción antigénica absorben radiación ultravioleta del sol cuando son asperjados sobre las plantas lo que actúan como una barrera química de defensa contra microorganismos: hongos, bacterias y virus.

TOLOSA y CAÑIZARES (2002), indican que al realizar un análisis del propóleo preparado en etanol y acuosos encontró que los rendimientos en sólidos solubles totales son superiores al realizar la extracción en etanol al 80% que al emplear agua destilada. Los metabolitos predominantes en ambos extractos son lactonas, saponinas, fenoles, triterpenos, esteroides, taninos, flavonoides, alcaloides y en menor grado grupos aminos. Tanto los extractos etanólicos como los acuosos presentan actividad antimicrobiana.

### **2.3.2. Acción antimicrobiana del propóleo**

KUJUMGIEV *et al.* (1999), indican que han analizado muestras de propóleo de diferentes orígenes geográficos demostrando las actividades antibacterianas (sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*), antifúngicas (sobre *Candida albicans*) y antivirales (sobre Avian influenza virus).

SOSA *et al.* (2000), indican que al realizar un estudio del efecto de control de propóleo proveniente de 3 zonas de Argentina frente a *Colletotrichum gloeosporoides*; encontraron que existen diferencias numéricas en la eficiencia de control de acuerdo a la zona de origen. Esto se fundamenta que en algunos propóleos existió una mayor concentración de flavonoides. Esto se debe a las especies vegetales de donde la abeja extrae la sustancia resinosa. Sin embargo, MAIDANA (1998), no halló diferencias al analizar propóleos de distintas zonas por lo que opina que no hay “propóleos malos”.

BONILLO (2005), sostiene que la actividad antifúngica de extracto etanólico de propóleo a nivel in vitro al 1% de dilución de una solución madre al 10% de extracto etanólico de propóleo sobre *Alternaria* sp., *Phytophthora* sp., *Sclerotinia* sp., *Sclerotium* sp. y *Fusarium* sp. En los patógenos de *Sclerotinia* y *Sclerotium* existió desarrollo micelial, sin embargo, éstos no formaron esclerotes que son sus estructuras conservativas y propagativas.

CAFARCHIA *et al.* (1999), indican que las propiedades antimicótico del propóleo han sido estudiadas por numerosos investigadores, esta actividad depende del origen del propóleo y del solvente usado para su extracción.

SOSA *et al.* (2001), indican que con el propóleo (en extracto etanólico) preparado al 50% para el control de *Fulvia fulva* en el cultivo de tomate en invernadero; observaron que el propóleo detuvo la enfermedad en las plantas ya infectadas e impidió el desarrollo de la enfermedad y en las plantas inoculadas no desarrollaron la enfermedad.

BONILLO (2005), indica que el extracto etanólico de propóleo al 10% de solución madre preparado a la dilución 0.1, 1 y 10% en el control *Phytophthora infestans* y *Alternaria* sp. aplicados a una frecuencia de 10 días sobre el cultivo de tomate; obtuvo que la dilución al 1% controló mejor los patógenos, no difiriendo significativamente de las demás diluciones, pero ligeras diferencias con el testigo.

LÓPEZ y UBILLÚS (2004), manifiestan que en el 2004 se ha estandarizado el propóleo del Valle de Oxapampa, departamento de Pasco, denominándolo propóleo Peruano, comprobando que su producción es de alta

calidad; además mostrando actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *C. albicans* y *Aspergillus niger*.

EGUIZÁBAL y MOROMI (2007), sostienen que la acción antibacteriana del extracto etanólico del propóleo Peruano (EPPP) proveniente del Valle de Oxapampa (Pasco); preparado al 0.8, 20 y 30% y con alcohol al 70% como testigo sobre *Streptococcus mutans* muestra una mayor tendencia de actividad inversamente proporcional a su concentración y caso del *Lactobacillus casei*; tal acción antibacteriana en las concentraciones estudiadas es significativa en comparación al testigo.

TRABE (2004), indica que el fungicida en forma de solución hidroalcohólica a base de propóleo, llamado propolis, el contenido de este producto son los flavonoides, expresados como Galangina 20 mg/ml, controla patógenos en una acción obstaculizante que evita que se reproduzcan. Demostrándose la eficacia de su acción en el control de: *Oidio* sp., *Fusarium* sp., *Phytophthora* sp., *Alternaria* sp., *Esclerosis* sp., *Bacteriosis* sp., *Peronospora* sp., *Botrytis* sp., etc. indicado para todo tipo de cultivos, la dosis aplicación 2 a 3 ml por litro, la cual debe de repetirse el tratamiento según necesidad.



## **2.4. Del *Trichoderma* sp.**

CUNDOM y MAZZA (2001), sostienen que el género *Trichoderma* se encuentra presente en forma natural en casi todos los suelos y otros hábitats del planeta. Su desarrollo se ve favorecido por la presencia de altas densidades de raíces, las cuales son colonizadas rápidamente por estos microorganismos.

### **2.4.1. Mecanismos de acción**

VELÁSQUEZ y PINEDA (1995), indican que aparte de su facilidad para colonizar las raíces de las plantas, *Trichoderma* ha desarrollado mecanismos para parasitar a otros hongos, siendo esta una fuente nutricional adicional. Se ha demostrado que el hongo *Trichoderma* actúa por mecanismos como: micoparasitismo, antibiosis, competencia por nutrientes y espacio, tolerancia al estrés por parte de la planta, al ayudar al desarrollo del sistema radicular, solubilización, y absorción de nutrientes inorgánicos, resistencia inducida (SIR) y desactivación de las enzimas de los patógenos.

#### **2.4.1.1. Competencia**

CHET *et al.* (1997), indican que las cepas de *Trichoderma* crecen rápidamente cuando se inoculan en suelo ya que son naturalmente resistentes a muchos compuestos tóxicos incluyendo herbicidas y fungicidas.

#### **2.4.1.2. Antibiosis**

HOWELL (1998), indica que la antibiosis ocurre durante la interacción de los compuestos difusibles de bajo peso molecular o antibióticos producidos por cepas de *Trichoderma* que inhiben el crecimiento de otros microorganismos. *Trichoderma* produce metabolitos tóxicos volátiles y no volátiles que impiden colonización del sustrato por otros microorganismos, entre los metabolitos reportados están: el ácido harzianico, alameticinas, tricholinas, peptaiboles, antibióticos, 6-penthylpirona, massoilactona, viridina, gliovirina, glisoperonas, ácido heptéldico entre otros.

#### **2.4.1.3. Micoparasitismo**

FERNÁNDEZ-LARREA (2001), sostiene que se trata de la acción directa de un microorganismo parasitando a otro, donde el patógeno es utilizado como alimento por su antagonista. Este tipo de mecanismo se basa en la producción, por parte del antagonista, de enzimas extracelulares, como la quitinasa, la celulasa, la  $\beta$ ,1-3-glucanasa y la proteasa, que utilizará para romper las estructuras del patógeno, y poderlo parasitar. El parasitismo puede ocurrir mediante la penetración, el engrosamiento de hifas, la producción de haustorios y la desorganización del contenido celular.

CHET y BAKER (1981), indican que el proceso de micoparasitismo ejercido por *Trichoderma* se produce en varias etapas

sucesivas. Comienza por el crecimiento quimiotrófico de *Trichoderma* hacia el hospedante, estimulado por moléculas procedentes del mismo, de naturaleza desconocida. Las únicas que se han detectado hasta ahora son aminoácidos y azúcares, por lo que no cabe esperar que la inducción sea específica del hospedante.

#### **2.4.2. Rango de hospederos**

GONZALES (1999), sostiene que las diferentes cepas de *Trichoderma* pueden controlar a cada hongo patógeno. Sin embargo, la mayoría de cepas de *Trichoderma* son más eficientes para controlar a ciertos patógenos, pudiendo ser ineficaces contra algunos hongos. Se ha descubierto que algunas cepas pueden inducir a la planta para que “inicien” su mecanismo natural de defensa, esto hace pensar que se podrían controlar a otros patógenos a parte de los hongos. Generalmente, *Trichoderma* controla a los hongos del suelo, como *Phytium*, *Rhizoctonia*, *Altemaria*, *Phytophthora*, etc.

#### **2.4.3. Biocontrol con *Trichoderma* sp.**

ALCANO *et al.* (2001), indican que para el biocontrol se realizaron enfrentamientos entre *Altemaria alternata* causante de canchros en frutos de tomate y *Trichoderma harzianum* a través de siembras duales en medio PDA, sin embargo, en el control del patógeno no se obtuvieron resultados satisfactorios.

BONILLO (2005), indica que aislamientos de *Trichoderma* sp. fueron probados a nivel in vitro para evaluar el potencial de control contra *Alternaria* sp. mediante siembras duales, encontrando como resultado que el antagonista rodea al patógeno, sin crecer sobre él.

ROCO (2001), indica que a nivel in vitro *T. harzianum* sobre *A. alternata* redujo en 46% la secreción de la enzima endo-poligalacturonasas de *A. alternata* que este hongo utiliza para infectar los tejidos de las plantas, además, aumentó en 14% la secreción de endo-quitinasas de *T. harzianum* que le sirve para degradar la pared celular del patógeno. Por lo tanto, la presencia del agente de biocontrol se traduce en una disminución de la capacidad infectiva de *A. alternata*.

GONZALES (1999), indica que estudió la actividad antagónica in vitro de una cepa nativa de *Trichoderma* sp. y una comercial (*Trichoderma harzianum* R. (A-34)) contra tres aislamientos de *Alternaria solani*. Las cepas de *Trichoderma* mostraron un alto efecto antagónico contra *A. solani*, tanto en forma micelial como metabólica, destacándose la cepa nativa que ejerció un efecto antagónico e hiperparasítico significativamente superior a la comercial.

EZZIYYANI *et al.* (2004), indican que a nivel in vitro *Trichoderma harzianum* tuvo un efecto antagónico contra *Phytophthora capsici* en los

cultivos duales en medio PDA, aumentando su actividad antifúngica mediante la secreción de la enzima hidrolítica ( $\beta$ -1,3-glucanasa), y posiblemente otros, sobrecreciendo y reduciendo totalmente la colonia del patógeno.

BONILLO (2005), evaluó el efecto de control de aislamientos seleccionados a nivel in vitro de cepas de *Trichoderma* sp. contra *Septoria lycopersici* en el cultivo de tomate, obteniendo en los resultados diferencias significativas entre las cepas, siendo algunas cepas de *Trichoderma* sp. los más promisorios que otras.

RIOS *et al.* (2004), evaluaron el efecto de tres antagonistas del género *Trichoderma* ( $10^6$  conidias/ml) en el control de las principales enfermedades del cacao, realizando aplicaciones cada 30 días, los resultados no muestran diferencias estadísticas significativas con el testigo, pero si numéricamente.

## **2.5. Del Fungicida**

### **2.5.1. Rovral ®50 PM**

Modo de acción : Contacto

Nombre comercial: Rovral ®50 PM

Ingrediente activo : Iprodione

Fórmula :  $C_{13}H_{13}Cl_2N_3O_3$  (Iprodione).

**- Características**

SOLEL *et al.* (1996), sostienen que es un fungicida de acción contacto para aplicaciones en tratamientos preventivos, activo contra todas las fases del ciclo de desarrollo de los hongos. Inhibe la germinación de las esporas, el crecimiento del micelio y el desarrollo de los órganos productores de esporas.

Así mismo, tiene las siguientes características:

- Es un fungicida de amplio espectro de acción.
- Tiene tolerancias establecidas en los países de destino de la fruta de exportación.
- Puede ser utilizado para tratamientos de post cosecha debido a su gran espectro de acción.
- Baja toxicidad, inócuo para abejas e insectos benéficos.
- Seguro para el ambiente y la aplicada categoría toxicológica ligeramente peligrosa.

**- Espectro de acción**

ERKILIC *et al.* (1999), indican que Iprodione actúa sobre los hongos de la familia de las *Heliotiaceas* o *Sclerotinaceas* (*Botrytis*, *Sclerotinia*, *Monilinia*), pero se diferencia de otros productos, por tener un espectro de acción muy amplia que comprenden numerosas enfermedades tales como: *Rhizoctonia*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Rhizopus* y *Helminthosporium*.

**- Modo de aplicación**

Se emplea en aspersión al follaje, puede también ser aplicado al suelo para el control de los patógenos habitantes del suelo.

**- Reporte en el Perú**

VILCHEZ (2007), indica que estudió el efecto de Iprodione (0.2%) aplicados en forma individual en el control de *Alternaria alternata* en Tangelo Minneola. De los resultados concluye que no existe un control estadísticamente significativo de la enfermedad, indicando además que el empleo de Iprodione en aplicaciones individuales es antieconómico por irrogar mayor costo de producción en relación a otros ingredientes activos.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Lugar de ejecución**

El presente trabajo se desarrolló en dos fases:

##### **3.1.1. Fase de laboratorio**

Esta fase del trabajo se realizó en el laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, ubicada en el km 2 de la carretera Tingo María-Huánuco, distrito de Rupa Rupa, provincia de Leoncio Prado, departamento de Huánuco; cuyas coordenadas UTM son:

Norte	:	8969849.07 m
Este	:	390636.56 m
Altitud	:	669.50 msnm

Presentando un Bosque Húmedo Premontano Tropical (bh-PT), con temperatura media de 25°C y humedad relativa de 82.5%, según la clasificación ecológica realizada por HOLDRIDGE (1987), con una precipitación pluvial de 3400 mm/año.



### 3.1.2. Fase de campo

Se llevó a cabo en el fundo “Baldeón”, ubicado en la localidad de Huamancoto, geopolíticamente localizado en el departamento de Huánuco, provincia de Daniel Alomía Robles, distrito de Pumahuasi. Los datos meteorológicos presentados en el Cuadro 1, son extrapolables para las dos fases de desarrollo del presente trabajo.

**Cuadro 1.** Datos meteorológicos registrados durante el periodo de ejecución de la fase de campo realizada de Marzo a Junio del 2008.

<b>Meses</b>	<b>T° máxima (°C)</b>	<b>T° mínima (°C)</b>	<b>T° media (°C)</b>	<b>HR (%)</b>	<b>PP (mm)</b>	<b>HL (hora)</b>
Marzo	28.3	20.4	24.4	88.5	400.5	74.1
Abril	29.7	20.9	25.3	85.2	232.4	141.7
Mayo	29.2	20.2	24.7	84.0	116.0	154.3
Junio	29.1	19.8	24.4	86.0	106.0	167.0

**FUENTE:** Estación meteorológica “José Abelardo Quiñones (Tingo María) a 15 km del fundo experimental.

## 3.2. Metodología

### 3.2.1. Fase de laboratorio

#### 3.2.1.1. Preparación del extracto de propóleo

El propóleo obtenido de un apiario ubicado en la localidad de Mallqui (Carretera Tingo María-Huánuco) fue preparado bajo dos formas:

**Primera forma de preparación:** empleando como disolvente alcohol etílico ó etanol (96° QP), se prepararon soluciones de propóleo al 1, 5 y 15%; a éstas se las denominó soluciones madres de extracto etanólico de propóleo (EEP). Esta forma de preparación es la sugerida por la mayoría de investigadores (SOSA *et al.*, 2000 y BONILLO, 2005) que emplean el propóleo en el tratamiento de enfermedades. A partir de las soluciones madres (1, 5 y 15%), se prepararon otras soluciones empleando como diluyente agua destilada estéril.

**Segunda forma de preparación:** esta forma de preparación fue realizada al comprobarse que la cantidad de alcohol etílico presente en las diferentes diluciones de las soluciones madres del extracto etanólico de propóleo (EEP) inhiben significativamente la germinación de conidias de *A. alternata* (Cuadros 2 y 9). No se puede prescindir del alcohol para diluir el propóleo por ser una sustancia hidrófoba. Para diluir 15 g de propóleo se necesitan mínimamente 13 ml de alcohol, por lo que un volumen de 100 ml solución madre estaba constituido de 15 g de propóleo, 13 ml de alcohol y 72 ml de agua destilada estéril, denominado a esta solución extracto hidro-etanólico de propóleo (EHEP) al 15%. A partir de esta solución se realizaron diferentes diluciones que fueron las que se emplearon para evaluar la tasa de crecimiento micelial y aplicación a nivel de campo.

### **3.2.1.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)**

Antes de realizar el ensayo de determinación CMI se montó un ensayo previo para determinar el tiempo de inicio de la germinación de conidias de *A. alternata*, este ensayo consistió en colocar una gota de suspensión conidial estandarizada sobre placas petri conteniendo medio PDA (Agar Papa Dextrosa). Las placas fueron incubadas a temperatura ambiente (25-27°C). Cada 3 horas se realizaron observaciones al microscopio para determinar el tiempo en la cual más del 50% de conidias habían germinado. Este resultado sirvió para iniciar las observaciones en la prueba de la concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico de propóleo.

Las soluciones madres y sus respectivas diluciones fueron preparadas empleando como diluyente agua destilada estéril. Una vez que el medio de cultivo PDA había solidificado en las placas de petri se colocaron dos gotas equidistantes de las diluciones de extracto etanólico de propóleo (EEP), luego se tomó una gota de una suspensión conidial estandarizada a  $10^6$  conidias/ml de *A. alternata* y se colocó sobre cada gota de EEP. Las placas fueron incubadas a temperatura ambiente. A las 15 horas empleando un microscopio óptico a un aumento de 10X se ubicó el sitio donde se colocó la gota (EEP + suspensión conidial) se contabilizó el número de conidias que presentaban la formación de tubos germinativos. En el Cuadro 2,

se presenta las soluciones madres con sus respectivas diluciones empleadas para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI). También se incluyó 3 dosis del fungicida Iprodione (Ip). Los resultados de germinación se sometieron a un análisis de variancia utilizando un diseño completamente al azar (DCA).

**Cuadro 2.** Soluciones madres de extracto etanólico de propóleo (EEP) en diferentes niveles de dilución en agua para la determinación del CMI sobre las conidias de *A. alternata*.

<b>Clave</b>	<b>Tratamientos</b>
T <sub>1</sub>	Solución madre de EEP 1%, diluida al 10% agua destilada estéril
T <sub>2</sub>	Solución madre de EEP 1%, diluida al 15% agua destilada estéril
T <sub>3</sub>	Solución madre de EEP 1%, diluida al 20% agua destilada estéril
T <sub>4</sub>	Solución madre de EEP 1%, diluida al 25% agua destilada estéril
T <sub>5</sub>	Solución madre de EEP 5%, diluida al 05% agua destilada estéril
T <sub>6</sub>	Solución madre de EEP 5%, diluida al 10% agua destilada estéril
T <sub>7</sub>	Solución madre de EEP 5%, diluida al 20% agua destilada estéril
T <sub>8</sub>	Solución madre de EEP 5%, diluida al 40% agua destilada estéril
T <sub>9</sub>	Solución madre de EEP 5%, diluida al 50% agua destilada estéril
T <sub>10</sub>	Solución madre de EEP 5%, diluida al 75% agua destilada estéril
T <sub>11</sub>	Solución madre de EEP 5%, sin diluir
T <sub>12</sub>	Solución madre de EEP 15%, diluida al 02% agua destilada estéril
T <sub>13</sub>	Solución madre de EEP 15%, diluida al 03% agua destilada estéril
T <sub>14</sub>	Solución madre de EEP 15%, diluida al 06% agua destilada estéril
T <sub>15</sub>	Solución madre de EEP 15%, diluida al 10% agua destilada estéril
T <sub>16</sub>	Solución madre de EEP 15%, diluida al 15% agua destilada estéril
T <sub>17</sub>	Solución madre de EEP 15%, diluida al 20% agua destilada estéril
T <sub>18</sub>	Solución madre de EEP 15%, diluida al 30% agua destilada estéril
T <sub>19</sub>	Solución del fungicida Iprodione al 0.05% de producto comercial
T <sub>20</sub>	Solución del fungicida Iprodione al 0.10% de producto comercial
T <sub>21</sub>	Solución del fungicida Iprodione al 0.02% de producto comercial

### **3.2.1.3. Extracto etanólico de propóleo sobre la tasa de crecimiento micelial**

Para evaluar este parámetro se preparó una solución madre al 15% de extracto etanólico de propóleo (EEP). A partir de esta solución se prepararon otras empleando como diluyente medio PDA. En el Cuadro 3 se muestran los tratamientos evaluados. De un cultivo puro de *A. alternata* en PDA se extrajeron discos de agar (5 mm de diámetro) y se colocaron en el centro de las placas que contenían las diferentes diluciones de extractos etanólico de propóleo al 15%. Las placas se incubaron a temperatura ambiente.

Se registró el diámetro (cm) de desarrollo de la colonia medido en la parte opuesta a la tapa de la placa petri diariamente por 6 días.

### **3.2.1.4. Extracto hidro-etanólico de propóleo (EHEP) e Iprodione sobre la tasa de crecimiento micelial**

Al comprobarse que el contenido de alcohol presente en el EEP tiene un marcado efecto en la germinación y tasa de crecimiento micelial de *A. alternata*; se probó el efecto de otra forma de preparación del propóleo (extracto hidro-etanólico de propóleo) en la tasa de crecimiento micelial.

**Cuadro 3.** Diferentes diluciones de extracto etanólico de propóleo al 15% (solución madre) sobre la tasa de crecimiento micelial de *Alternaria alternata*.

Clave	Solución EEP	% de dilución
T <sub>1</sub>	Testigo en medio PDA	
T <sub>2</sub>	EEP al 15%	1% en medio PDA
T <sub>3</sub>	EEP al 15%	2% en medio PDA
T <sub>4</sub>	EEP al 15%	3% en medio PDA
T <sub>5</sub>	EEP al 15%	4% en medio PDA
T <sub>6</sub>	EEP al 15%	5% en medio PDA
T <sub>7</sub>	EEP al 15%	6% en medio PDA
T <sub>8</sub>	EEP al 15%	7% en medio PDA
T <sub>9</sub>	EEP al 15%	8% en medio PDA
T <sub>10</sub>	EEP al 15%	9% en medio PDA
T <sub>11</sub>	EEP al 15%	10% en medio PDA
T <sub>12</sub>	EEP al 15%	15% en medio PDA
T <sub>13</sub>	EEP al 15%	20% en medio PDA
T <sub>14</sub>	EEP al 15%	25% en medio PDA

En el Cuadro 4, se presentan las diferentes diluciones de una solución madre de hidro-etanólico de propóleo al 15%. Se incluye como testigo comparativo 3 dosis del fungicida Iprodione y la dosis más baja (2%) de alcohol etílico (96° QP).

Se registró el diámetro (cm) de desarrollo de la colonia medido en la parte opuesta a la tapa de la placa petri diariamente por 7 días. Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de variancia utilizando con un diseño completamente al azar (DCA), con 8 tratamientos y 4 repeticiones.

**Cuadro 4.** Tasa de crecimiento micelial de *A. alternata* en 3 diluciones de extracto hidro-etanólico de propóleo (EHEP) al 15% de solución madre.

Clave	Solución EHEP	Dilución (%)
T <sub>1</sub>	Extracto hidro-etanólico de propóleo al 15%	15% en PDA
T <sub>2</sub>	Extracto hidro-etanólico de propóleo al 15%	20% en PDA
T <sub>3</sub>	Extracto hidro-etanólico de propóleo al 15%	25% en PDA
T <sub>4</sub> *	Iprodione	0.05% en PDA
T <sub>5</sub> *	Iprodione	0.10% en PDA
T <sub>6</sub> *	Iprodione	0.20% en PDA
T <sub>7</sub> *	Alcohol etílico	2% en PDA
T <sub>8</sub> *	Testigo (medio PDA)	

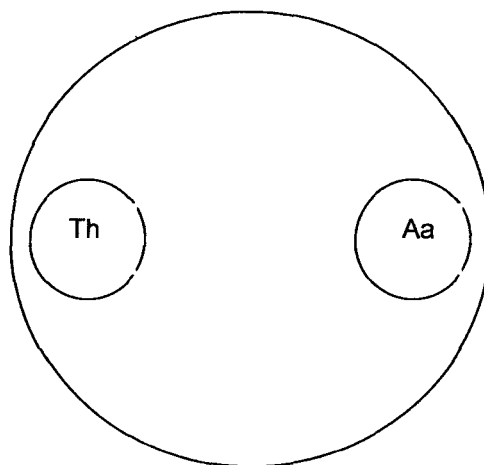
\* Testigos comparativos

### 3.2.1.5. Antagonismo de *Trichoderma harzianum* frente a *Alternaria alternata*

Con la finalidad de evaluar el efecto parasítico o antibiótico de *Trichoderma harzianum* sobre *Alternaria alternata*; se realizaron siembras duales de ambos sobre una placa que contenía PDA. Para ello se obtuvieron discos de 5 mm de diámetro de crecimientos puros de ambos hongos y fueron colocados equidistantemente en las placas petri tal como se muestra en la Figura 1.

Se registró el crecimiento radial (cm) de ambos en la parte opuesta a la tapa de la placa petri diariamente por 8 días. El antagonismo

de *T. harzianum* frente *A. alternata* fue determinado en base a un análisis de variancia utilizando un diseño completamente al azar (DCA).



**Figura 1.** Siembras duales de *Trichoderma harzianum* (Th) vs. *Alternaria alternata* (Aa) en medio PDA.

### 3.2.2. Fase de campo

Esta fase se instaló en una plantación del híbrido Tangelo Minneola de 10 años de edad, sembrado a un distanciamiento de 7 x 6 m. Antes de la aparición epidémica de esta enfermedad, el área instalada constaba de 2 hectáreas; sin embargo, como consecuencia de la alta incidencia y escasa producción, el agricultor decidió eliminarlos con el objetivo de sustituirlos por el cultivo del cacao, al momento de la instalación del experimento sólo quedaban 70 de las 476 plantas que había en las 2 hectáreas, con una incidencia menor al 10%. El área experimental se demarcó en cuatro bloques en el que se distribuyeron cinco tratamientos; cada



tratamiento constó de una planta (unidad experimental). En cada unidad experimental, se marcaron al azar 4 ramas terminales; evaluándose en ellas el número de brotes formados, número de brotes enfermos, número de hojas enfermas y sanas. Antes de la aplicación de los tratamientos, al inicio del brotamiento se cuantificó la incidencia inicial de la mancha parda en cada uno de los tratamientos, las aplicaciones empezaron el 2 de Marzo del 2008 y las evaluaciones se realizaron cada 15 días hasta inicios del llenado del fruto (15 de Junio del 2008). El número de aplicaciones y las frecuencias de aplicación de los tratamientos se muestran el Cuadro 5.

El antagonista *T. harzianum* empleado fue proporcionado por el Laboratorio de Fitopatología de la Universidad Nacional Agraria de la Selva. El incremento del antagonista se realizó mediante la fermentación sólida de arroz, empleando bolsas de polipropileno, que contenía 200 gramos de arroz y 60 ml de agua destilada. Las bolsas fueron selladas con grapas. La esterilización se realizó en autoclave de 121°C, 15 libras y durante 30 minutos.

La transferencia del antagonista al sustrato arroz estéril se hizo en cámara de siembra colocándose en cada bolsa 3 discos de medio PDA conteniendo el micelio y las conidias de *T. harzianum* antagonista. Se incubó por 10 días a temperatura ambiente bajo luz artificial.

### 3.2.2.1. Componentes en estudio

#### a. Híbrido de Tangelo Minneola

El cultivar Tangelo de 10 años de edad.

#### b. Patógeno

Conidias de inóculo natural de *Alternaria alternata* existentes dentro de la misma plantación durante el periodo experimental.

#### c. Agentes de control

- Extracto hidro-etanólico de propóleo (15 y 30% de dilución, procedente de una solución madre al 15% de EHEP).
- *Trichoderma harzianum* ( $10^6$  conidias/ml aproximadamente).
- Fungicida de contacto (Iprodione) al 0.2% de producto comercial.

### 3.2.2.2. Tratamientos en estudio

**Cuadro 5.** Dos diluciones de extracto hidro-etanólico de propóleo (EHEP) procedente de una solución madre al 15%, *T. harzianum* e Iprodione en el control de *A. alternata*.

Clave	Tratamientos	Dosis	Frecuencia ( días)	N° de Aplicaciones
T <sub>1</sub>	EHEP	15%	15	6
T <sub>2</sub>	EHEP	30%	15	6
T <sub>3</sub>	<i>T. harzianum</i>	$1.420 \times 10^6$ ufc	15	6
T <sub>4</sub>	Iprodione	0.2% de pc*	15	6
T <sub>5</sub>	Testigo (agua)		15	6

\* pc = producto comercial (Rovral 50 PM)

El gasto de agua por planta fue de 2.5 litros aproximadamente. Cada uno de los tratamientos fue aplicado utilizando una mochila manual Marca Jacto, de 20 litros de capacidad.

### 3.2.2.3. Diseño experimental

El diseño experimental empleado fue el Diseño de Bloques Completo al Azar (DBCA), con subunidades de muestreo con 5 tratamientos, 4 subunidades de muestreo y 4 repeticiones (CALZADA, 1970).

#### a. Modelo Aditivo Lineal:

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{ij} + \lambda_{ijk}$$

#### Donde:

$Y_{ijk}$  = Es el valor observado en la k-ésima subunidad correspondiente a la u. e correspondiente al j-ésimo bloque, al cual se le aplicó la i-ésima tratamiento.

$\mu$  = Efecto de la media general.

$\tau_i$  = Efecto de la i-ésima tratamiento.

$\beta_j$  = Efecto del j-ésimo bloque.

$\varepsilon_{ij}$  = Efecto aleatorio del error experimental de la u. e correspondiente al j-ésimo bloque al cual se le aplicó la i-ésima tratamiento.

$\lambda_{ijk}$  = Es el efecto aleatorio del error de muestreo.

**Para:**

i = 1,2,3,4,5 tratamientos.

j = 1,.....,4 bloques.

k= 1.....,4 unidades de muestreo.

**b. Análisis de variancia**

**Cuadro 6.** Análisis de variancia para los tratamientos en estudio.

<b>Fuente de variación</b>	<b>Grados de libertad</b>
Bloques	3
Tratamientos	4
Error experimental	12
Error de muestreo	60
Total	79

**3.2.2.4. Características del campo experimental**

**Dimensiones del campo experimental**

Largo	: 35 m
Ancho	: 24 m
Distancia entre calles	: 6 m
Área total del campo experimental	: 840 m <sup>2</sup>

**Bloques**

Número de bloques	: 4
Largo de los bloques	: 35 m

Ancho de los bloques	: 6 m
Área de cada bloque	: 210 m <sup>2</sup>
Área total de bloques	: 840 m <sup>2</sup>

#### Parcelas

Número total de parcelas	: 20
Número de parcelas/bloque	: 5
Largo de cada parcela	: 7 m
Ancho de cada parcela	: 6 m
Área total de cada parcela	: 42 m <sup>2</sup>

#### **3.2.2.5. Parámetros a evaluar**

En la planta se ubicaron 4 ramas y dentro de cada rama se marcaron 3 brotes en los que cada 15 días se registraron:

- a. Número de brotes sanos y enfermos.
- b. Número de brotes muertos.
- c. Número de hojas sanas y enfermas.

### **3.2.3. Ensayo complementario**

#### **3.2.3.1. Efecto del extracto (etanólico e hidro-etanólico) de propóleo, Iprodione y *T. harzianum* sobre *A. alternata* en brotes extraídos de Tangelo *Minneola***

Con la finalidad de tener un mejor control de factores ambientales y concentración de inóculo se montó un ensayo que consistió en aplicar los tratamientos de campo sobre brotes extraídos según la metodología propuesta por CANIHOS *et al.* (1999) con algunas modificaciones.

##### **♦ Obtención de los brotes**

La metodología propuesta CANIHOS *et al.* (1999) consiste en extraer hojas individuales, sin embargo, bajo nuestras condiciones las hojas extraídas se necrosan rápidamente, por lo que se modificó la metodología a brotes. Éstos fueron obtenidos de plantas de Tangelo en lo que prácticamente era inexistente la enfermedad (Fundo Agrícola UNAS). Los brotes que tenían hojas de aproximadamente 3 cm de largo, colocados en tubos de ensayo que contenían agua como suministro de humedad, los tubos se colocaron en gradillas y fueron colocados dentro de una campana de vidrio (50×50×50 cm) colocando en su interior motas húmedas de algodón para favorecer una alta humedad relativa; antes de la aplicación de los tratamientos se dejó por 10 horas para su aclimatación.

♦ **Preparación del inóculo**

Sobre cada placa que contenían crecimientos puros de *A. alternata* se agregaron 10 ml de agua destilada estéril, luego con una espátula Drigalski se raspó suavemente la superficie del medio con la finalidad de desprender las conidias del hongo. El sobrenadante se colectó en un vaso de vidrio estéril. Seguidamente, se sometió a un filtrado empleando papel filtro (Watman N° 105). La suspensión conidial fue refiltrado por dos veces con abundante agua destilada estéril para disminuir algunas trazas de la toxina que produce este hongo. La suspensión fue ajustada a una concentración de  $10^4$  conidias/ml.

♦ **Aplicación de los tratamientos**

Una vez transcurrida 10 horas de aclimatación de los brotes dentro de la campana de vidrio se procedió a la aplicación de los tratamientos, mediante aspersión manual. Después de 5 horas de aplicado los tratamientos, se asperjo sobre los brotes de cada tratamiento con la suspensión conidial de *A. alternata*. Los tratamientos en estudio se muestran el Cuadro 7. La temperatura dentro de la campana de vidrio varió entre 22 a 24.5°C y la HR de 67 a 94%.

A las 36 horas después de la aplicación de la suspensión conidial, se evaluó en dos hojas de cada brote, donde se estimó mediante

observación visual el porcentaje de área foliar necrosada. Los datos fueron sometidos a un análisis de variancia empleando un diseño completamente al azar (DCA), con 11 tratamientos y 3 repeticiones.

**Cuadro 7.** Extracto de propóleo al 15% (solución madre), *T. harzianum* e Iprodione sobre el control de *A. alternata* en brotes extraídos de Tangelo.

Clave	Tratamientos	Dosis
T <sub>1</sub>	Extracto hidro-etanólico de propóleo	15% de dilución
T <sub>2</sub>	Extracto hidro-etanólico de propóleo	30% de dilución
T <sub>3</sub>	Extracto etanólico de propóleo	15% de dilución
T <sub>4</sub>	Extracto etanólico de propóleo	30% de dilución
T <sub>5</sub>	<i>Trichoderma harzianum</i>	10 <sup>6</sup> ufc
T <sub>6</sub>	Iprodione	0.2%
T <sub>7</sub>	Iprodione	0.3%
T <sub>8</sub>	Alcohol etílico	2%
T <sub>9</sub>	Alcohol etílico	4%
T <sub>10</sub>	Testigo (conidias de <i>A. alternata</i> )	10 <sup>4</sup> ufc
T <sub>11</sub>	Testigo (aplicación de solo agua)	---



## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Fase de laboratorio

#### 4.1.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de propóleo

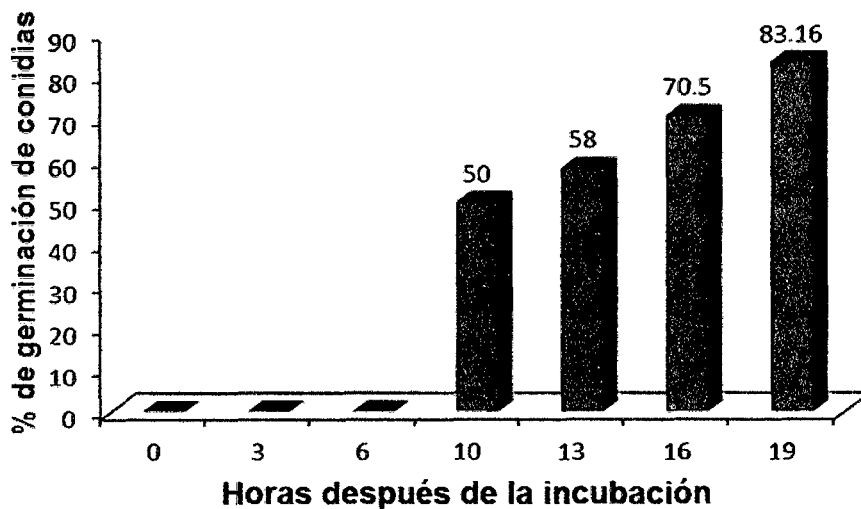
##### a. Tiempo de germinación de las conidias

En el Cuadro 8, se muestra los resultados de la prueba de Duncan ( $\alpha=0.05\%$ ), para el porcentaje de germinación de conidias de *A. alternata*; horas después de colocar una suspensión conidial sobre medio PDA. En ella se observan diferencias estadísticas para los intervalos de 13, 16 y 19 horas. En la Figura 2, se observa que aproximadamente el 50% de conidias germinan después de 10 horas de incubación. Sin embargo, el inicio de la germinación se da a partir de las seis horas.

No se ha encontrado información bibliográfica disponible sobre el tiempo de germinación de las conidias en medio de cultivo alguno por lo que los datos obtenidos en este ensayo no son comparables. Los altos valores en el porcentaje de germinación de las conidias (más del 90%) a las 22 horas indican que este patógeno tiene una alta habilidad germinativa; en consecuencia, tendría una alta posibilidad de infección. Evaluaciones posteriores a las 19 horas hacen dificultosas las observaciones de los tubos

germinativos de muchas conidias puesto que el micelio desarrollado comienza a crecer profusamente en todas las direcciones.

De acuerdo a los resultados del Cuadro 8 y Figura 2, se puede concluir que para evaluar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de algún producto sobre la germinación de conidias de *A. alternata*, las evaluaciones deben hacerse en un periodo comprendido entre las 10 y 19 horas después de incubación.



**Figura 2.** Porcentaje de germinación de conidias de *A. alternata* horas después de la incubación en medio PDA.

**Cuadro 8.** Porcentaje de germinación de conidias de *A. alternata* horas después de incubación en medio PDA (Duncan  $\alpha=0.05\%$ ).

Clave	Tratamientos	Porcentaje de germinación (%)	Significación
T <sub>3</sub>	19 horas	83.16	a
T <sub>2</sub>	16 horas	70.50	b
T <sub>1</sub>	13 horas	58.00	c

Tratamientos unidos por la misma letra en columna no difieren significativamente entre si

#### **b. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)**

En el Cuadro 9, se muestran los resultados del grado de inhibición de las diferentes concentraciones de las soluciones madres (1, 5 y 15%) de extracto etanólico de propóleo (EEP) y sus diferentes diluciones en medio de cultivo PDA en el porcentaje de germinación de conidias de *A. alternata* evaluados a 15 horas después de incubación. Se adicionaron, como tratamientos comparativos, 3 dosis del fungicida de contacto Iprodione; cuya dosis recomendada de producto comercial para aspersiones a nivel de campo es del 0.2%.

Ninguna de las diluciones de la solución madre al 1% (T<sub>1</sub>=10%, T<sub>2</sub>=15%, T<sub>3</sub>=20% y T<sub>4</sub>=25%) ejercieron una disminución significativa en el porcentaje de germinación de conidias; en consecuencia, el CMI para las conidias de *A. alternata* está en las diferentes diluciones de soluciones madres a una concentración mayor al 5% de EEP (T<sub>5</sub> al T<sub>18</sub>).

**Cuadro 9.** Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del EEP sobre la germinación de conidias de *A. alternata*.

Clave	Solución madre	Dilución en agua destilada estéril	Porcentaje de germinación	Constituyentes en la dilución por 100 ml	
				Propóleo (g)	Alcohol (ml)
T <sub>1</sub>	EEP al 1%	10%	76.67	0.10	9.90
T <sub>2</sub>	EEP al 1%	15%	73.33	0.15	9.90
T <sub>3</sub>	EEP al 1%	20%	71.43	0.20	9.80
T <sub>4</sub>	EEP al 1%	25%	70.00	0.25	9.80
T <sub>5</sub>	EEP al 5%	5%	20.00	0.25	4.80
T <sub>6</sub>	EEP al 5%	10%	9.09	0.50	9.50
T <sub>7</sub>	EEP al 5%	20%	4.17	1.00	19.00
T <sub>8</sub>	EEP al 5%	40%	0.00	2.00	38.00
T <sub>9</sub>	EEP al 5%	50%	0.00	2.50	47.50
T <sub>10</sub>	EEP al 5%	75%	0.00	3.75	71.30
T <sub>11</sub>	EEP al 5%	100% (sin diluir)	0.00	5.00	95.00
T <sub>12</sub>	EEP al 15%	2%	31.82	0.30	1.70
T <sub>13</sub>	EEP al 15%	3%	20.00	0.45	2.60
T <sub>14</sub>	EEP al 15%	6%	14.29	0.90	5.10
T <sub>15</sub>	EEP al 15%	10%	3.85	1.50	8.50
T <sub>16</sub>	EEP al 15%	15%	0.00	2.25	12.80
T <sub>17</sub>	EEP al 15%	20%	0.00	3.00	17.00
T <sub>18</sub>	EEP al 15%	30%	0.00	4.50	25.50
T <sub>19</sub>	Iprodione *	0.05%	0.00		
T <sub>20</sub>	Iprodione	0.10%	0.00		
T <sub>21</sub>	Iprodione	0.20%	0.00		
T <sub>22</sub>	Agua		76.30		

\* Las dosis corresponden a producto comercial.  
EEP= Extracto etanólico de propóleo.

Los tratamientos (T<sub>8</sub> al T<sub>10</sub>) con diluciones iguales o superiores al 40% de una solución madre al 5% inhibieron totalmente la germinación de las conidias al igual que diluciones (T<sub>16</sub> al T<sub>18</sub>) iguales o superiores al 15% de una solución madre al 15%; sin embargo, el contenido de

alcohol en éstas últimas soluciones es aproximadamente tres veces menos que en las diluciones de la solución madre al 5%. Estos tratamientos (T<sub>8</sub> al T<sub>10</sub> y T<sub>16</sub> al T<sub>18</sub>) tienen un comportamiento semejante al iprodione en la inhibición total de la germinación de las conidias de *A. alternata* en comparación al tratamiento con agua (T<sub>22</sub>) que tuvo un 76.3% de germinación. De acuerdo, a estos resultados la solución madre óptima de extracto de propóleo debe ser a 15% y a una dilución igual o mayor al 15% por contener menor cantidad de alcohol en su composición. El alcohol tiene por si sólo un efecto inhibitorio en la germinación de las conidias, tal como se muestra en el Cuadro 10, en el que porcentajes superiores al 4% de inhiben completamente el desarrollo micelial. Estos resultados orientaron a buscar una nueva forma de preparar el propóleo dónde se minimice significativamente el contenido del alcohol etílico; en ese sentido se inició la preparación de extracto hidro-etanólico de propóleo (EHEP). Varias pruebas han permitido determinar que el mínimo necesario de alcohol para disolver 15 g propóleo es con 13 ml de alcohol etílico.

#### **4.1.2. Extracto etanólico de propóleo sobre la tasa de crecimiento micelial**

En el Cuadro 11, se muestra el efecto de las diferentes diluciones de una solución madre al 15% en la tasa de crecimiento micelial de *A. alternata*. Una dilución del 1% reduce la tasa de crecimiento micelial en 2.4 veces menos que el testigo, mientras que diluciones igual o superior al 7%

inhiben totalmente el crecimiento micelial. En relación a la germinación de conidias la inhibición total se alcanza a partir de porcentajes superiores al 10%, mientras que para la inhibición total del crecimiento micelial es a porcentajes mayores al 6%; esto posiblemente, se debe a que valores de dilución entre el 6-10% permite la germinación pero no el crecimiento y desarrollo micelial.

**Cuadro 10.** Tasa de crecimiento micelial de *A. alternata* en diferentes concentraciones de alcohol etílico en medio PDA.

<b>Clave</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Tasa de crecimiento (cm/día)</b>
T <sub>1</sub>	Testigo en medio PDA	0.85
T <sub>2</sub>	Alcohol al 2.0%	0.70
T <sub>3</sub>	Alcohol al 2.1%	0.60
T <sub>4</sub>	Alcohol al 2.2%	0.55
T <sub>5</sub>	Alcohol al 2.3%	0.55
T <sub>6</sub>	Alcohol al 2.4%	0.54
T <sub>7</sub>	Alcohol al 2.5%	0.36
T <sub>8</sub>	Alcohol al 2.6%	0.14
T <sub>9</sub>	Alcohol al 2.7%	0.15
T <sub>10</sub>	Alcohol al 2.8%	0.13
T <sub>11</sub>	Alcohol al 2.9%	0.12
T <sub>12</sub>	Alcohol al 3.0%	0.13
T <sub>13</sub>	Alcohol al 4.0%	0.00
T <sub>14</sub>	Alcohol al 5.0%	0.00
T <sub>15</sub>	Alcohol al 7.5%	0.00
T <sub>16</sub>	Alcohol al 10%	0.00
T <sub>17</sub>	Alcohol al 12.7%*	0.00

\* Porcentaje de alcohol etílico presente en una dilución al 15% de una solución madre del EEP al 15%

**Cuadro 11.** Tasa de crecimiento micelial de *A. alternata* en diferentes diluciones de una solución madre al 15% de extracto etanólico de propóleo (EEP).

<b>Clave</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Tasa de crecimiento (cm/día)</b>
T <sub>1</sub>	Testigo en medio PDA	0.85
T <sub>2</sub>	EEP al 1%	0.35
T <sub>3</sub>	EEP al 2%	0.35
T <sub>4</sub>	EEP al 3%	0.32
T <sub>5</sub>	EEP al 4%	0.23
T <sub>6</sub>	EEP al 5%	0.19
T <sub>7</sub>	EEP al 6%	0.17
T <sub>8</sub>	EEP al 7%	0.00
T <sub>9</sub>	EEP al 8%	0.00
T <sub>10</sub>	EEP al 9%	0.00
T <sub>11</sub>	EEP al 10%	0.00
T <sub>12</sub>	EEP al 15%	0.00
T <sub>13</sub>	EEP al 20%	0.00
T <sub>14</sub>	EEP al 25%	0.00

#### **4.1.3. Extracto hidro-etanólico de propóleo e Iprodione sobre la tasa de crecimiento micelial**

En el Cuadro 12, se muestran los resultados de la prueba de Duncan ( $\alpha=0.05\%$ ), para el efecto del extracto hidro-etanólico de propóleo, alcohol etílico e Iprodione en la tasa de crecimiento micelial de *A. alternata*, observándose diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos.

**Cuadro 12.** Tasa de crecimiento micelial de *A. alternata* en tres diluciones de EHEP al 15% (solución madre), alcohol etílico e Iprodione (Duncan  $\alpha=0.05\%$ ).

Clave	Tratamientos	Tasa de crecimiento (cm/día)	Significación
T <sub>8</sub>	Testigo (solo medio PDA)	0.82	a
T <sub>1</sub>	EHEP* al 15% en PDA	0.69	b
T <sub>7</sub>	Alcohol Etilico al 2%	0.53	c
T <sub>2</sub>	EHEP* al 20% en PDA	0.50	c
T <sub>3</sub>	EHEP* al 25% en PDA	0.49	c
T <sub>4</sub>	Iprodione al 0.05% en PDA	0.47	c
T <sub>5</sub>	Iprodione al 0.1% en PDA	0.34	d
T <sub>6</sub>	Iprodione al 0.2% en PDA	0.17	e

Tratamientos unidos por la misma letra en columna no difieren significativamente entre sí.

\* EHEP = Extracto hidro-etanólico de propóleo (15 g propóleo, 13 ml alcohol y 72 ml de agua).

El porcentaje de alcohol etílico presente en una dilución al 15, 20 y 25% es 2, 2.7, 3.3% respectivamente, de una solución madre del EHEP al 15%.

Si comparamos los resultados obtenidos para los tratamientos con el fungicida Iprodione del Cuadro 9 y 12, se observa que éste inhibe totalmente la germinación, más no así el crecimiento micelial; éste hecho puede deberse a que la estructura más sensible de un hongo a la acción de cualquier sustancia o condición ambiental es el tubo germinativo; mientras que el micelio es menos vulnerable a las mismas condiciones (AMORIN, 1995). Situación semejante se presentó al poner en contacto directo las conidias con el medio PDA conteniendo las diluciones mayores al 40% y 15% de soluciones madres de EEP al 5 y 15% respectivamente (Cuadro 9), desfavoreció cualquier



crecimiento micelial; en cambio, para los tratamientos del Cuadro 12 se colocó un disco de 50 mm de diámetro de medio PDA que contenía principalmente micelio, este disco de medio no envenenado pudo haber dotado de nutrientes por un tiempo hasta que el micelio se acondicione al medio envenenado. Si comparamos estos tratamientos ( $T_4$ ,  $T_5$  y  $T_6$  del Cuadro 12) con el testigo el Iprodione a nivel in vitro sólo reduce de un 48 a un 80% la tasa de crecimiento micelial de *A. alternata*.

El  $T_7$  (alcohol etílico al 2%), demuestra lo que líneas atrás veníamos anunciando que el alcohol por si sólo tiene un efecto deletéreo sobre el desarrollo de *A. alternaria*. Siendo, estadísticamente semejante al efecto del EHEP diluido al 20 ( $T_2$ ), 30% ( $T_3$ ) e Iprodione al 0.05% ( $T_4$ ). Si comparamos el efecto que tiene el EEP (Cuadro 9) y el EHEP (Cuadro 12) en la tasa de crecimiento micelial, observamos que el  $T_{12}$  (EEP diluido al 15%) inhibe totalmente en crecimiento micelial mientras que en el EHEP al mismo nivel de dilución ( $T_1$ ) presenta una tasa de crecimiento micelial de 0.65 cm/día. A juzgar por estos resultados, en mejor efecto de control del propóleo sería mediante la extracción alcohólica; pero debemos tener presente que en este tipo de extracción existe una alta cantidad de alcohol (12.7%); que según los resultados del Cuadro 10 dosis superiores de alcohol al 4% inhibe totalmente el crecimiento micelial; por tanto, el control ejercido por una solución de EEP está fuertemente influenciado por el alcohol. Por ésta razón, se determinó emplear

bajo condiciones de campo EHEP, por tener un menor contenido de alcohol y evaluar realmente el efecto del propóleo como sustancia antifúngica.

#### **4.1.4. Antagonismo de *Trichoderma harzianum* frente a *Alternaria alternata***

Numerosos trabajos de investigación reportan que *Trichoderma* tiene efecto parasítico sobre diferentes especies de *Alternaria*. Los resultados obtenidos de este ensayo son mostrados en el Cuadro 13, donde la tasa de crecimiento de *A. alternata* ( $T_2$ ) es reducido en cuatro veces menos (76%) con respecto a su crecimiento sin competencia ( $T_1$ ). Varios investigadores han reportado que las especies de *Trichoderma* ejercen su mecanismo de control por la producción de antibióticos, toxinas o enzimas hidrolíticas (MANOCHA y SAHAI, 1993). Lorito *et al.* (1996) citados por HERRERA-ESTRELLA y CHET (2004), sugieren que *T. harzianum* produce oligopéptidos de 12–22 aminoácidos (comúnmente conocidos como peptaibols), que son ricos en ácido-aminoisobutirico, N-acetilados y otros. Estos oligopéptidos modifican la permeabilidad de la membrana celular del hongo. Esto sugiere un escenario (tanto in vitro como en condiciones naturales) donde las enzimas (quitinasas) debilitan o degradan la pared celular y los antibióticos (peptaibols) inhiben síntesis de los componentes de la pared celular, actuando de esta manera en forma sinérgica ambos compuestos causándole finalmente la muerte del patógeno. El aislamiento de *T. harzianum* empleado en esta prueba posee

tener mecanismos de control por antibiosis y micoparasitismo, puesto que el antagonista no sólo limitó el crecimiento, sino que además, creció sobre el micelio de *Alternaria* (Figura 3).

Estos resultados son similares a lo reportado por SANDOVAL *et al.* (2006), quienes reportan disminución del 53% en el crecimiento in vitro de este mismo patógeno por *T. harzianum*.

**Cuadro 13.** Tasa de crecimiento micelial *A. alternata* en siembra dual (vs) *T. harzianum* y mecanismo de control ejercido.

Clave	Tratamiento	Tasa de crecimiento (cm/día)	Mecanismos de control	
			Antibiosis	Micoparasitismo
T <sub>1</sub>	<i>T. harzianum</i> <i>A. alternata</i> vs. <i>T.</i>	0.150b		
T <sub>2</sub>	<i>harzianum</i>	0.097c	+	+
T <sub>3</sub>	<i>A. alternata</i> (testigo)	0.420a		

(+) = Existe antibiosis o parasitismo

## 4.2. Fase de campo

### 4.2.1. De la evaluación del número de brotes formados y hojas

En el Cuadro 14, se muestra el resumen del análisis de variancia para la incidencia acumulada de: brotes enfermos (BE), brotes sanos (BS), brotes muertos (BM), hojas enfermas/brote (HE) y hojas sanas/brote (HS). Se observa que existen diferencias significativas a nivel de bloques y tratamientos para los parámetros evaluados.



**Figura 3.** Antagonismo (micoparasitismo y antibiosis) de *Trichoderma harzianum* frente a *Alternaria alternata* en medio PDA.

Estas diferencias pudieron haber sido influenciadas por la presencia de plantas injertadas sobre limón rugoso y otros sobre mandarina Cleopatra. Las plantas de Tangelo injertadas sobre patrón limón rugoso resultan ser plantas más vigorosas, altas y presentan un mayor brotamiento, respecto a aquellas plantas injertadas sobre mandarina cleopatra. En la plantación en estudio se desconoce la ubicación exacta de las plantas injertadas sobre uno u otro patrón.

En el Cuadro 15, se exponen los resultados de la prueba de Duncan ( $\alpha=0.05\%$ ) para cada uno de los parámetros evaluados y la incidencia acumulada obtenidos durante todo el periodo de evaluación. Sólo se han encontrado diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos para los parámetros de incidencia acumulada de brotes enfermos (IABE) y hojas enfermas/brote (IAHE). La menor incidencia de brotes enfermos (IABE) fue obtenida en el T<sub>1</sub> que corresponde a EHEP al 15%; sin embargo, sólo es estadísticamente significativo al testigo (T<sub>5</sub>). Estos resultados hasta cierto punto son erráticos, dado que doble de la dosis del T<sub>1</sub> produce el 50% más enfermedad (T<sub>2</sub>) y es semejante estadísticamente al testigo (T<sub>5</sub>). El porcentaje de incidencia de brotes enfermos obtenidos en los tratamientos con Iprodione (T<sub>4</sub>) y testigo (T<sub>5</sub>) fueron del 9 y 16%, respectivamente. Para este mismo parámetro en el mismo cultivo VILCHEZ (2007), reportó para la zona de Satipo-Junín una incidencia del 28 y 31%. Estas diferencias porcentuales indican una baja presión de inóculo en la plantación durante el desarrollo del presente ensayo. Además, el número de total de brotes formados en el presente osciló entre 15 y 19, mientras que en el ensayo de VILCHEZ (2007) oscilaron entre 48 y 68 brotes formados. Este último dato, permite inferir que el cultivo se encuentra en su ciclo de menor producción, por tanto es de esperar que el nivel de incidencia de enfermedades también sea baja, característica común de las enfermedades policíclicas.

Las condiciones climáticas de la zona donde se llevó el presente ensayo como en el que desarrolló VILCHEZ (2007), son semejantes para el factor de temperatura pero para la precipitación en nuestra zona es aproximadamente 3 veces más; esta condición podría estar limitando la disponibilidad continua de conidias en la superficie de los tejidos enfermos al ser lavados por gota de lluvia. La precipitación se intensificó a partir de Marzo a Junio (Cuadro 2). Así mismo, la humedad relativa y la temperatura fueron óptimas para el desarrollo de la enfermedad. Según VINCENT *et al.* (2000), existe una elevada dependencia de las condiciones ambientales y la rapidez en la aparición de síntomas.

La aparente ineficiencia de los tratamientos en este ensayo, además de las condiciones fisiológicas de la planta y clima pueden también estar relacionadas al ciclo patogénico corto de *A. alternata*; según KOHMOTO *et al.* (1979), las manchas necróticas en hojas, brotes y frutos se desarrollan después de 24 a 36 horas de la infección, mientras que la diseminación de estructuras propagativas se inicia a partir de los 3 días. Durante el intervalo de aplicación (15 días) en el presente ensayo *A. alternata* ha generado más de 4 ciclos infectivos contribuyendo significativamente en la mantención casi constante del nivel de inóculo; por tanto, se debe reducir la frecuencia de aplicación tal como fue sugerido por CASTRO y MONTOYA (1996) a 7 días. Otro factor que puede tener relación a la ineficiencia en los resultados en los

tratamientos con propóleo se debe a la calidad y cantidad de la concentración de los principios activos; SOSA *et al.* (2000), demostraron diferencias en eficiencia de control de acuerdo a zonas de origen del propóleo en la Argentina. La calidad depende de la especie vegetal de donde la abeja extrae la sustancia resinosa y del solvente usado para su extracción (CAFARCHIA *et al.*, 1999). Sin embargo, MAIDANA (1998), al no hallar diferencias en la calidad de propóleo, opina que no hay "propóleo malo".

La incidencia acumulada obtenida en el tratamiento (T<sub>4</sub>), en el que se aplicó el fungicida de contacto Iprodione resulta ser estadísticamente semejante al testigo y al resto de tratamientos en todos los parámetros evaluados, esto podría deberse probablemente a que la población de *A. alternata* introducida al Perú sea procedente de una zona donde haya obtenido algún nivel de resistencia al Iprodione tal como reporta Hutton (1989) citado por SOLEL *et al.* (1996) que en la variedad 'Murcott' después de 4 años de aplicación con una frecuencia de 8 aplicaciones por año observó que *A. alternata* presentaba resistencia al Iprodione.

**Cuadro 14.** Análisis de variancia para la incidencia acumulada brotes enfermos, brotes sanos, brotes muertos, hojas enfermas/brote, hojas sanas/brote.

F.V	GL	Incidencia acumulada									
		Brotes enfermo (BE)		Brotes sanos (BS)		Brotes muertos (BM)		Hojas enfermas/ brote(HE)		Hojas sanas/ brote(HS)	
		1/	2/	1/	2/	1/	2/	1/	2/	1/	2/
Bloques	3	0.0125	0.0056s	0.2623	0.0498s	0.0150	0.0064s	0.0173	0.0074s	0.0446	0.0083s
Tratamientos	4	0.0047	0.0020s	0.0408	0.0082s	0.0035	0.0015s	0.0104	0.0043s	0.0153	0.0028s
Error experimental	12	0.0019	0.0008	0.0257	0.0054	0.0028	0.0012	0.0058	0.0024	0.0095	0.0017
Error de muestreo	60	0.0016	0.0007	0.0128	0.0026	0.0023	0.0009	0.0015	0.0006	0.0060	0.0012
C.V			3.46%		4.42%		4.14%		3.43%		2.84%

S : Significación estadística al 5% de probabilidad.

<sup>1/</sup> Datos originales

<sup>2/</sup> Para el análisis de variancia y la prueba de significación, los datos fueron transformados a  $\sqrt{X+0.5}$



**Cuadro 15.** Número e incidencia acumulada de brotes totales, brotes enfermos, brotes sanos, brotes muertos, hojas/brote, hojas enfermas/brote, hojas sanas/brote (Duncan  $\alpha=0.05\%$ ).

Clave	Tratamientos	Número (N) e incidencia acumulada (IA) de Brotes (B)								Número (N) e incidencia acumulada (IA) de hojas por brote (H)					
		Totales (E+S+M)		Enfermos (BE)		Sanos (BS)		Muertos (BM)		Total (E+S)		Enfermas (HE)		Sanas (HS)	
		NBT	IAT	NBE	IABE	NBS	IABS	NBM	IABM	NTH	IAT	NHE	IAHE	NHS	IAHS
T <sub>1</sub>	EHEP* al 15%	19.33a	1.00a	1.65 b	0.08 b	16.50a	0.86a	1.18a	0.06a	6.19a	0.99a	0.23 b	0.04b	5.92a	0.95a
T <sub>2</sub>	EHEP* al 30%	16.79a	0.99a	1.80ab	0.17ab	13.73a	0.76a	1.26a	0.07a	6.87a	0.97a	0.39ab	0.05ab	6.30a	0.92a
T <sub>3</sub>	<i>T. harzianum</i>	15.09a	0.99a	1.67ab	0.11ab	12.35a	0.81a	1.07a	0.07a	4.94a	0.97a	0.28ab	0.05ab	4.54a	0.92a
T <sub>4</sub>	Iprodione al 0.2%	17.33a	0.99a	1.58ab	0.09ab	15.05a	0.86a	0.70a	0.04a	6.12a	0.99a	0.27ab	0.04ab	5.81a	0.95a
T <sub>5</sub>	Testigo (agua)	15.79a	0.99a	2.45a	0.16a	12.13a	0.76a	1.11a	0.07a	4.91a	0.98a	0.38 b	0.06b	4.53a	0.92a

Tratamientos unidos en columna con la misma letra, no difieren estadísticamente entre sí.

EHEP\* = Dilución de la solución madre de extracto hidro-etanólico de propóleo al 15%

NBT= Número de brotes totales

NBE= Número de brotes enfermos

NBS= Número de brotes sanos

NBM= Número de brotes muertos

NTH= Número total de hojas

NHE= Número de hojas enfermas

NHS= Número de hojas sanas

IAT= Incidencia acumulada total

IABE= Incidencia acumulada de brotes enfermos

IABS= Incidencia acumulada de brotes sanos

IABM= Incidencia acumulada de brotes muertos

IAHE= Incidencia acumulada de hojas enfermas

IAHS= Incidencia acumulada de hojas sanas

### 4.3. Ensayo complementario

#### 4.3.1. Efecto del extracto (hidro-etanolico y etanólico) de propóleo, *T. harzianum* e Iprodione sobre *A. alternata* en brotes extraídos de Tangelo Minneola

En el Cuadro 16, se muestran los resultados de la prueba de Duncan ( $\alpha=0.05\%$ ), para el control del extracto de propóleo, *T. harzianum*, Iprodione sobre *A. alternata*. Donde existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos y en comparación con los testigos.

**Cuadro 16.** Extracto (hidro-etanólico y etanólico) de propóleo, *T. harzianum*, Iprodione sobre el porcentaje de lesiones de *A. alternata* en hojas de Tangelo Minneola (Duncan  $\alpha=0.05\%$ ).

Clave	Tratamientos	Porcentaje de área afectada	Significación
T <sub>10</sub>	Testigo (conidias <i>A. alternata</i> )	28.33	a
T <sub>2</sub>	EHEP* al 30%	22.50	b
T <sub>3</sub>	EEP** al 15%	21.66	b
T <sub>8</sub>	Alcohol al 2%	16.66	c
T <sub>9</sub>	Alcohol al 4%	15.00	c
T <sub>5</sub>	<i>T. harzianum</i> 10 <sup>6</sup> ufc	13.33	c
T <sub>1</sub>	EHEP* al 15%	13.33	c
T <sub>4</sub>	EEP** al 30%	12.66	c
T <sub>6</sub>	Iprodione al 0.2%	1.10	d
T <sub>7</sub>	Iprodione al 0.3%	0.50	d
T <sub>11</sub>	Testigo (agua sin conidias)	0.00	d

Tratamientos unidos por la misma letra en columna no difieren significativamente entre sí.

\* EHEP; extracto hidro-etanólico de propóleo de solución madre 15%.

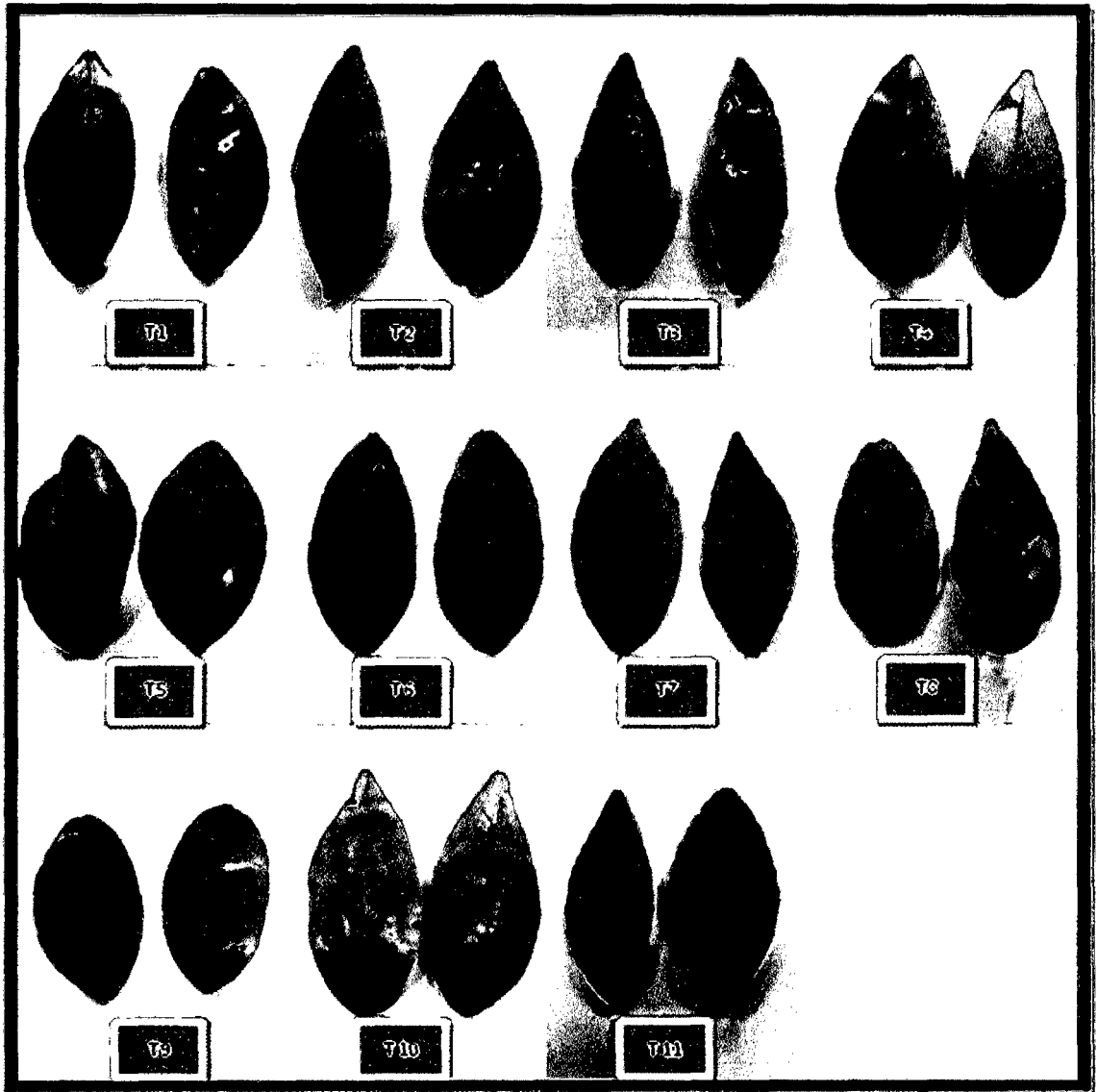
\*\*EEP; extracto etanólico de propóleo, de solución madre 15%.

El porcentaje de 2 y 4% es la cantidad de alcohol existente en la dilución al 15 y 30% para EEP de una solución madre al 15%.

Se estimó mediante observación visual el porcentaje de lesiones sobre las hojas de Tangelo evaluadas 36 horas después de terminada el ensayo, los resultados obtenidos en el tratamiento testigo (solo aplicación de conidias de *A. alternata*) son similares a los obtenidos por CANIHOS *et al.* (1999). Los tratamientos con el fungicida Iprodione ( $T_6$  y  $T_7$ ), produjeron los menores porcentajes de área foliar afectada, siendo estadísticamente semejantes al tratamiento sin aplicación de inóculo ( $T_{11}$ ) y estos tres tratamiento superaron estadísticamente al resto. Los tratamientos con EHEP al 30% ( $T_2$ ) y EEP al 15% ( $T_3$ ) produjeron los mayores porcentajes de daño (22.5 y 21.6%) y son estadísticamente menor (28.3%) sólo al tratamiento testigo con aplicación de conidias ( $T_{10}$ ).

De las dos formas de preparación del propóleo: extracción etanólica (EEP) y extracción hidro-etanólica (EHEP) no existen diferencias estadísticas marcadas, sin embargo, la extracción etanólica (EEP) tiene mejor efecto de control por contener dentro de su composición mayor contenido de alcohol. Siendo en el tratamiento con extracción etanólica (EEP) al 30% ( $T_4$ ) el contenido de alcohol es de 25.4%, en comparación con el tratamiento de extracción hidro-etanólica (EHEP) al 30% ( $T_2$ ) es de 4%.

El efecto de control de *Trichoderma harzianum* es semejante al control ejercido por algunos de los tratamientos con propóleo, por lo que puede constituirse en una alternativa de control de la mancha marrón dentro de un programa de manejo integrado de esta enfermedad.



**Figura 4.** Grado de lesiones causadas por *A. alternata* en brotes extraídos de tangelo tratadas previamente con diferentes concentraciones de EHEP, *T. harzianum* e Iprodione.

#### **4.4. Costos de la preparación de los tratamientos en estudio**

En el Cuadro 17, se muestra el costo de preparación de los productos empleados para los tratamientos en estudio. Para la preparación de 20 l de producto a aplicar, se nota que se incurre en menor gasto en la preparación de

*Trichoderma* (Sl. 2.6 nuevos soles), resultando ser 46.6, 35.6 y 5.4 nuevos soles menos que preparar 20 l de EEP, EHEP e Iprodione respectivamente. Así mismo, cuando se extrapola a hectárea resulta que la aplicación de *Trichoderma* es 67.5% menos que los costos de aplicar el fungicida Iprodione. Mientras que para los extractos de propóleo está en un orden del 79.5 (EHEP) a 83.7% (EEP) más caro. Los costos de aplicación de los extractos de propóleo resultan muy caros en comparación al fungicida Iprodione; en consecuencia la aplicación de Iprodione puede constituirse junto al antagonista *Trichoderma* en una alternativa para el control de la “mancha parda” en tangelos.

**Cuadro 17.** Costo de preparación de los productos empleados para los tratamientos en estudio.

<b>Insumos/preparación</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Costo S/.</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Costo S/.</b>	<b>Costo total S/.</b>
01 l de solución madre de EEP* al 15%	850 ml (alcohol etílico )	4.40	150 g (propóleo)	12.00	16.40
01 l de solución madre de EHEP** al 15%	130 ml (alcohol etílico )	0.67	150 g (propóleo)	12.00	12.67
20 l dilución al 15% de EEP al 15%	17.00 l (agua)	...	3 l de EEP	49.20	49.20
20 l dilución al 15% de EHEP al 15%	17.00 l (agua)	...	3 l de EHEP	38.20	38.20
20 l de Iprodione al 0.2%	19.60 l (agua)	...	40 g de Iprodione	08.00	08.00
20 l de <i>Trichoderma</i>			200 g	02.60	02.60

\*EEP= extracto etanólico de propóleo

\*\*EHEP= extracto hidro-etanólico de propóleo

Costos de los productos para aplicación por hectárea:

Costo de aplicación de *Trichoderma* = S/. 13.0/kg; 6 kg/ha x 6 aplicaciones = S/. 468.00

Costo de aplicación del control químico = S/. 200.00/kg; 1.200 kg/ha x 6 aplicaciones = S/. 1440.00

Costo de aplicación al 15% de EEP = S/. 16.4/l; 90 l/ha x 6 aplicaciones = S/. 8856.00

Costo de aplicación al 15% de EHEP = S/. 12.7/l; 90 l/ha x 6 aplicaciones = S/. 6876.00

1 Kilo de propóleo = S/. 80.00

## V. CONCLUSIONES

1. El extracto etanólico (EEP) y extracto hidro-etanólico (EHEP) de propóleo tienen un marcado efecto en la inhibición de la germinación y crecimiento micelial de *Alternaria alternata* a nivel in vitro a diluciones mayores al 15% de una solución madre al 15% de propóleo.
2. El contenido de alcohol etílico presente en los preparados de extracto etanólico (EEP) y extracto hidro-etanólico (EHEP) de propóleo a una dilución de 15% de una solución madre al 15% es de 12.7% y 2% respectivamente. Dosis superiores al 4% de alcohol etílico inhiben totalmente el crecimiento micelial de *Alternaria alternata* a nivel in vitro.
3. En el ensayo de campo no se han encontrado diferencias estadísticas en control de la "mancha parda" por la aplicación de una dilución al 15 y 30% de una solución madre al 15% de EHEP, *Trichoderma harzianum* y fungicida Iprodione al 0.2% de producto comercial.

## VI. RECOMENDACIONES

1. Continuar con los estudios tendientes en encontrar una dosis óptima de aplicación, a través de nuevas formas de extracción de los principios activos del propóleo.
2. Realizar aislamientos de cepas de *Trichoderma* que posean un mayor efecto de control sobre *A. alternata*.
3. Realizar ensayos preliminares de control de *A. alternata* con nuevos productos antifúngicos empleando la técnica de brotes extraídos a nivel *in vitro*.



## VII. RESUMEN

En el Laboratorio de Fitopatología de la Universidad Nacional Agraria de la Selva (UNAS) y en los terrenos del fundo “Baldeón” se evaluó el efecto de la aplicación de propóleo de abeja (*Apis mellifera*), el antagonista *Trichoderma harzianum* y el fungicida Iprodione en el control de *Alternaria alternata* pv. *citri* agente causal de la “mancha parda” en el híbrido Tangelo minneola a nivel in vitro y campo. En la prueba de determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de diferentes soluciones del extracto etanólico propóleo (EEP), se determinó que todos ejercen inhibición total, debido a que la concentración de alcohol etílico en todas las soluciones superaba al 10%. Al realizar una prueba de germinación en diferentes concentraciones de alcohol etílico se demostró que concentraciones mayores al 4% ejercen cien por ciento de inhibición en la germinación y tasa de crecimiento micelial. Los siguientes ensayos se realizaron empleando extracto hidro-etanólico de propóleo (EHEP), cuya composición de la solución madre constaba de 15 g de propóleo, 13 ml de alcohol y 72 ml de agua destilada; a partir de esta solución se realizaron diferentes diluciones (15, 20 y 25%).

La fase de campo se realizó en plantaciones de Tangelo, realizándose 6 aplicaciones con una frecuencia de 15 días, durante Marzo a Junio del 2008. Los tratamientos aplicados fueron los siguientes: T<sub>1</sub> (EHEP al 15%), T<sub>2</sub> (EHEP al 30%), T<sub>3</sub> (Th), T<sub>4</sub> (Ip) T<sub>5</sub> (testigo). Se cuantificó cada 15 días el número brotes sanos, enfermos y muertos, como también el número de hojas sanas y

enfermas/brote, llegándose a determinar que los tratamientos (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>) no muestran un control significativo.

Al no observar un claro efecto en campo se montó un ensayo adicional in vitro, sobre *A. alternata* en brotes extraídos de Tangelo. Se probó extracto EEP y EHEP al 15 y 30% de una solución madre al 15%, *T. harzianum* (10<sup>6</sup> conidias/ml) e Iprodione al 0.2 y 0.3%, alcohol etílico al 2 y 4%), y dos testigos adicionales (uno con la aplicación de conidias de *A. alternata* y otra sin la aplicación). Treinta y seis horas después se estimó el porcentaje de lesiones sobre cada hoja, concluyendo que no hubo efecto marcado de control, salvo Iprodione que detuvo la infección en un 96% en la dosis comercial.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. ALCANO, M.; HURTADO T.; ALBARRACIN, N. y ALTUNA, G. 2001. Patogenicidad y evaluación in vitro del control biológico y químico de *Alternaria alternata* causante de canchales en frutos de tomate *Lycopersicon esculentum* L. Universidad Central de Venezuela. XVII Congreso Venezolano de Fitopatología 30 p. [En línea]: INIA, 25 Jul. 2008 (<http://alerce.inia.cl/sochifit/X.html>).
2. ALKA, B. y TIMMER, L.W. 2002. Timing fungicide applications for control of *Alternaria* Brown Spot of citrus. In Florida, USA. 80 p.
3. AMOROS, M.C. 2003. Producción de Agrios, Tercera edición revisada Edición Mundi Prensa. España. 352 p.
4. AMORIN, L. 1995. Infección. Capítulo 15. En: Manual de Fitopatología. Volume 1: Principios e conceitos, 417-453. BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; L. AMORIM. (eds.). 3. ed. São Paulo: Ceres. 919 p
5. ASÍS, M. 1989. Propóleo: el oro púrpura de las abejas. Ed. CIDA, La Habana, Cuba. 218 p.
6. ASÍS, M. 1996. Apiterapia para todos. Instituto cubano del libro. Editorial Científico técnico del medio. La Habana, Cuba. 124 p.
7. BEDASCARRASBURE, E.; MALDONADO L.; FIERRO M.; BRACHO, J. y MAIDANA, J. 1999. El Propóleo: un valioso producto apícola. Serie Actualización PROAPI N° 1. 8 p.
8. BELLA, P.; GUARINO, C.; LA ROSA, R. y CATARA, A. 2001. Severe Infections of *Alternaria* spp. On a mandarin hybrid. Journal of Plant Pathology in Florida, EE.UU. 83-231 p.

9. BIANCHI, E.M. 1996. Calidad de propóleos. C.E.D.I.A. - Santiago del Estero, Argentina. 10 p.
10. BONILLO, M.C. 2005. Saberes campesinos, una estrategia para el desarrollo de tecnología apropiada para la agricultura orgánica realizada por agricultores familiares. Tesis para optar al Grado de Magíster en Gestión en Desarrollo Rural y Agricultura Sustentable. Universidad Católica de Temuco, Chile. 147 p. [En línea]: UTC, Informes de Investigación, 10 Jun. 2007 (<http://biblioteca.uct.cl/tesis/mariobonillo/tesis.pdf>).
11. CAFARCHIA, C.; DE LAURENTIS N.; MILILLO M.A.; LOSACCO, V. y PUCCINI, V. 1999. Antifungal activity of Apulia región propolis. Parasitología. Dec; 41 (4): 87-90 p.
12. CANIHOS, Y.; PEEVER, T.L. and TIMMER, L.W. 1999. Temperature, leaf wetness, and isolate effects on infection of Minneola tangelo leaves by *Alternaria* sp. Plant Dis. 83:429-433 p.
13. CALZADA, B.J. 1970. Métodos estadísticos para la investigación. 3ra. Edic. Lima, Perú. 643 p.
14. CASTRO-CAICEDO, B.L. y MONTOYA-RESTREPO, E.C. 1996. Control químico de la mancha foliar del Tangelo Minneola *Alternaria tenuissima*. Avances Técnicos 234. Cenicafe, Chinchiná, Caldas, Colombia. 25-53 p.
15. CHET, I. and BAKER, R. 1981. Isolation and biocontrol potential of *Trichoderma hamatum* from soil naturally suppressive to *Rhizoctonia solani*. Phytopathology 71: 286-290 p.

16. CHET, I.; INBAR, J. y HADAR, I. 1997. Fungal antagonists and mycoparasites. In: Wicklow DT, Söderström B (Eds) *The Mycota IV: Environmental and microbial relationships*. Springer-Verlag, Berlin. 165-184 p.
17. CUNDOM, A. y MAZZA, S. 2001. Evaluación de *Trichoderma* sp. contra *Rhizoctonia solani* in vitro e invernáculo. Cátedra de Fitopatología Facultad de Ciencias Agrarias UNNE. Argentina. 4 p. [En línea]: UNNE. 15 Jun. 2007 (<http://www.unne.edu.ar/cyt/2001/5-agrarias/a-051.pdf>).
18. EGUIZÁBAL, A. y MOROMI, N. 2007. Actividad in vitro del extracto etanólico de propóleo peruano sobre *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus casei*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos Lima, Perú. *Rev Odontol Sanmarquina*. 10(2):18-20 p.
19. ERKILIC, A.; CANIHOS, I.; BICICI, M., y KURT, S. 1999. Iprodione Resistance of *Alternaria* sp. *citri* Minneola Tangelo isolates in urkey. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry in Florida*. 23: 1051-1056 p.
20. EZZIYYANI, M.; PÉREZ, C.; SID, A. y REQUENA, M. 2004. Biocontrol de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annuum* L.). Facultad de Biología, Universidad de Murcia, España. 45 p. [En línea]: UM. 15 Jul. 2008 (<http://www.um.es/analesdebiologia/numeros/26/PDF/05TRICHODERMA.pdf>).

21. FERNÁNDEZ-LARREA, O. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Manejo Integrado de Plagas. Costa Rica. 62: 96-100 p.
22. FERRARI, R.R. 2006. Esporulação in vivo, período de suscetibilidade dos tecidos e reação de tangerinas e híbridos a *Alternaria alternata*. Tese para a obtenção do título de Doutor em Agronomia (Produção Vegetal). Facultad de Ciências Agrárias e Veterinárias Universidade Estadual Paulista, Brasil. 95 p. [En línea]: UM. 15 Jul. 2008 (<http://www.fcav.unesp.br/download/pgtrabs/pv/d/1135.pdf>).
23. GARDNER, J.M.; KONO, Y. y CHANDLER, J.L. 1986. Bioassay and host-selectivity of *Alternaria citri* toxins affecting rough lemon and mandarins. Physiological and Molecular Plant Pathology, London, v. 29, 293-304 p.
24. GONZALES, S.C. 1999. Actividad antagónica de *Trichoderma* sp. aislada de un suelo de la provincia de Granma, Cuba frente a *Alternaria solani*. sor. [En línea]: Rev. Fac. agron. (Luz). 16: 167- 173 ([http://www.Redpav-fpolar.info.ve/fagroluz/v16\\_2/v162z005.html](http://www.Redpav-fpolar.info.ve/fagroluz/v16_2/v162z005.html)).
25. GRANGE, J.M.; DAVEY, R.W. 1990. Antibacterial properties of propolis. J. Of the Royal Society of Medicine. 83(3):2-6 p.
26. HERRERA-ESTRELLA, A. and CHET, I. 2004. The biological control agent *Trichoderma* from fundamentals to applications. in fungal biotechnology in agricultural, food, and environmental applications. Edited by Ddip K. Arora. Department of Cell and Molecular Biology Tulane University New Orleans, Louisiana. 147-156 p.

27. HERRERA, I.L. 1992. La mancha parda de los cítricos en Cuba. Levante Agrícola. 49-50 p.
28. HOLDRIDGE, R.L. 1987. Ecología basada en zonas de vida. IICA. San José, Costa Rica. 216 p.
29. HOWELL, C.R. 1998. The role of antibiosis in biocontrol. In: Harman GE, Kubicek CP. *Trichoderma y Gliocladium*, vol. 2. Taylor & Francis, Padstow, 173-184 p.
30. KOHMOTO, K.; SCHEFFER, R.P., y WHITESIDE, J.O. 1979. Host Selective toxins from *Alternaria citri*. Phytopathology in Florida. 667-671 p.
31. KOHMOTO, K.; ITOH, Y.; SHIMOMURA, N.; KONDOH, Y.; OTANI, H.; KODAMA, M.; NISHIMURA, S. y NAKATSUKA, S. 1993. Isolation and biological activities of two host-specific toxins from the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*. Phytopathology, St. Paul, v. 83, n. 5. 495-502 p.
32. KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y.; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R. y POPOV, S. 1999. Antibacterial, antifungal and antiiviral activity of propolis of different geographic origin. Journal of Ethopharmacology. 235-240 p.
33. LEFKOVITS, I.Z.; SU, S. y FISCHER, P.B. 1997. Caffeic acid phenethyl ester profoundly modifies protein synthesis profile in type 5 adenovirus-transformed cloned rat embryo fibroblats cells. Int. J. Oncology, 11(1): 59-67 p.

34. LEVY, N.C. 1999. Atividade antimicrobiana da própolis. Revista da Universidade de Franca (Edição Especial) I Simpósio Brasileiro de Própolis e Apiterápicos, 7(7): 18 p.
35. LÓPEZ DEL VILLAR, J. y UBILLÚS, C.M. 2004. Estandarización del propóleos del valle de Oxapampa, departamento de Pasco (Perú) como materia prima para su utilización a nivel industrial. Tesis título de Químico Farmacéutico. Facultad de Farmacia y Bioquímica: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú. 80 p [En línea]: UNIVERSIA. 15 Jul. 2008 ([http://biblioteca.universia.net/html\\_bura/ficha/params/id/34694661.html](http://biblioteca.universia.net/html_bura/ficha/params/id/34694661.html)).
36. MAIDANA, J.F. 1998. Características físicas del propóleo, en relación a su procedencia y origen vegetal. Centro de Investigaciones Apícolas – CEDIA-UNSE. Santiago del Estero, Argentina Rev 23, 16- 20 p.
37. MANOCHA, M.S. and SAHAI, A.S .1993. Mechanisms of recognition in necrotrophic and biotrophic mycoparasites. Can J Microbiol 39:269–275 p.
38. MARIN, J. 2004. Mancha parda de Tangerinas y Tangelos ocasionada por *Alternaria alternata* Fr keissler en el Perú. Ministerio de Agricultura, Servicio Nacional de Sanidad Agraria – SENASA. Lima, Perú. 40 p.
39. MARIN, J.; FERNÁNDEZ, H.S.; PERES, N.A.; ANDREW, M.; PEEVER, T.L. y TIMMER, L.W. 2006. First report of *Alternaria* brown spot of citrus caused by *Alternaria alternata* in Peru. Phytopathology, St. Paul, v. 90, n. 5. 686 p.



40. MENEZES, M.E. 2001. Clasificación taxonómica de hongos fitopatógenos. Edición Mundi Prensa. España. 89- 120 p.
41. MONDAL, S.N.; BHATIA, A.; SHIITS, T., y TIMMER, L.W. 2005. Baseline sensitivities of fungal pathogens of fruit and foliage of citrus to Azoxystrobin, Pyraclostrobin, and Fenbuconazole. Plant Dis. In Florida, USA. 89:1186-1194 p.
42. PEEVER, T.L.; OLSEN, L.; IBÁÑEZ, A., y TIMMER, L.W. 2000. Genetic differentiation and host specificity among populations of *Alternaria* spp. causing brown spot of grapefruit and tangerine x grapefruit hybrids in Florida. Phytopathology, St. Paul, v. 90, n. 4. 407-414 p.
43. PROPRAVKO, S.A. 1975. Composición química del propóleo, su origen y problemas de uniformación. Apimondia: Bucarest. 19-22 p.
44. REIS, R.F.; GOES, A.; MONDAL, S.M. y TIMMER, L.W. 2006. Effectiveness of fungicides and susceptibility of fruit and leaves of tangerine, tangor and tangelos to infection by *Alternaria alternata*, the cause of brown spot. Summa Phytopathologica, Botucatu, supl. 11-12 p.
45. RIOS, R.; CABEZAS, O.; CHAVEZ, J. y AREVALO, E. 2004. Control de las principales enfermedades del cacao (*Theobroma cacao* L.) con tres especies de *Trichoderma* spp. y un fungicida. Universidad Nacional Agraria de la Selva Tingo María, Perú. XVIII Congreso Peruano de Fitopatología. Huaraz. 77 p.
46. ROCO, A. 2001. In vitro la actividad de biocontrol *Trichoderma harzianum* sobre *Alternaria alternata* en presencia de reguladores de

crecimiento Universidad católica de Valparaiso. Chile. [En línea]: COLPOS. 25 Ago. 2008 (<http://www.colpos.mx/2010/images/cordoba/investigación/Katia/antagonistas.pdf>).

47. SANDOVAL, M.C.; FÁLICO, L.M. y NOELTING, M.C. 2006. Estrategia de control de *Alternaria alternata* keissler patógeno de *Coriandrum sativum* L. con *Trichoderma harzianum* RIFAI. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Lomas de Zamora. Buenos Aires, Argentina. [En línea]: Rev. Protección Veg. Vol. 21 No. 1: 31-36 ([www.censa.edu.cu/index2.php?option=com\\_docman%26task=doc](http://www.censa.edu.cu/index2.php?option=com_docman%26task=doc)).
48. SENASA, 2004. Control de la mancha parda en Tangelos ocasionada por *Alternaria Alternata* Fr. Keissler; Pichanaki. Servicio Nacional de Sanidad Agraria, Ministerio de Agricultura. Lima Perú. 5-35 p.
49. SIMMONS, E.G. 1999. *Alternaria* themes and variations Classification of citrus pathogens. Mycotaxon in Florida. 263-323 p.
50. SOLEL, Z. 1991. *Alternaria* brown spot on Minneola tangelos in Israel. Plant Pathol. 40:145-147 p.
51. SOLEL, Z.; y KIMCHI, M. 1998. Histopathology of infection of Minneola Tangelo by *Alternaria* brown spot pv. *citri* and the effect of host and environmental factors on lesion development. In Florida. Phytopathology. 557-561 p.
52. SOLEL, Z.; OREN, Y.; KIMCHI, M. 1997. Control of *Alternaria* brown spot of Minneola tangelo with fungicides. Crop Protection, Oxford, v. 16, n. 7. 659-664 p.

53. SOLEL, Z.; TIMMER, L.W. y KIMCHI, M. 1996. Iprodione resistance of *Alternaria alternata* pv. citri from Minneola Tangelo in Israel and Florida. Plant Dis. 80:291-293 p.
54. SOSA, L.A.; CABRERA, M.G.; ALVAREZ R.E., RAMÍREZ, S. y ROLIN, H. 2000. Búsqueda de usos alternativos del propóleo en el control biológico de hongos fitopatógenos. Actas de las Comunicaciones Científicas y Técnicas de la UNNE. [En línea]: UNNE, Informes de investigación, 5 Jun. 2007 (<http://www1.unne.edu.ar/cyt/agrarias/a-036.pdf>).
55. SOSA, L.A.; CABRERA, M.G.; ALVAREZ R.E., RAMÍREZ, S. y ROLIN, H. 2001. Propóleos: alternativa en el control biológico de patógenos fungosas de las plantas cultivadas. Facultad de Ciencias Agrarias - UNNE. Corrientes, Argentina. 18 p. [En línea]: UNNE, 5 Jun. 2008 ([http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/cyt/2000/5\\_agrarias/a\\_pdf/a\\_040.pdf](http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/cyt/2000/5_agrarias/a_pdf/a_040.pdf)).
56. TRABE, S.A. 2004. Fungicida ecológico líquido en forma de solución hidroalcohólica a base de propóleo natural. 2 p. [En línea]: TRABE, 15 Jul. 2007 (<http://www.trabe.net/agricultura/propolis.htm>).
57. TIMMER, L.W., y PEEVER, T.L. 1997. *Alternaria* brown spot found on Sunburst and grapefruit in Florida. USA. Citrus Industry. 78: 46 p.
58. TIMMER, L.W.; SOLEL, Z., GOTTWALD; T.R. IBAÑEZ, A.M. y ZITKO, S.E. 1998. Environmental factors affecting production, release, and field populations of conidia of *Alternaria alternata*, the cause of

brown spot of citrus on Florida, USA. *Phytopathology*. 88:1218-1223 p.

59. TIMMER, L.W. 2000. The alter rater, a new weather-based model for timing fungicide sprays for *Alternaria* control in Florida. USA. *Citrus Industry*. 81: 23-24 p.
60. TIMMER, L.W. y BHATIA, A. 2001. Evaluation of the Alter-Rater model for timing fungicide applications for control of *Alternaria* Brown Spot of citrus. *Phytopathology*. In Florida. USA. 34-46 p.
61. TOLOSA, L. y CAÑIZARES, E. 2002. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. Facultad de Ciencias, Químico y Biológicas de la Universidad Autónoma de Campeche, México. 19 p. [En línea]: UGR, 5 Jun. 2008 (<http://farmacia.ugr.es/ars/pdf/233.pdf>).
62. VELASQUEZ, J. y PINEDA, J. 1995. Evaluación de campo de un método de aplicación de *Trichoderma harzianum* Riffai en el control de *Sclerotium rolfsii*. VIII Jornadas de Investigación–Bioagro. Venezuela. 25 p. [En línea]: USDA, 20 Jun. 2007 (<http://www.ars.usda.gov/is/np/mva/jan96/lumsdn.htm>).
63. VILCHEZ, G. 2007. Control químico de la mancha parda causada por *Alternaria alternata* (Fr, Fr) Keiss. pv. *citri* en el híbrido Tangelo Minneola, Valle del Perene. Universidad Nacional Agraria de la Selva. Tesis para obtener el título de Ingeniero Agrónomo. Tingo María, Perú. 86 p.

64. VILELA, H.D. 2004. Producción nacional de cítricos en el Perú, Universidad San Martín de Porras. Lima, Perú. 33-40 p.
65. VINCENT, A.; ARMENGOL, J.; SALES, R.; ALFARO-LASSALA, F. y GARCÍA-JIMÉNEZ, J. 1999. Notas preliminares sobre una necrosis de la mandarina Fortuna en Comunidad Valenciana, España. Levante Agrícola. 349: 470-474 p.
66. VINCENT, A.; ARMENGOL, J.; SALES, R.; GARCÍA, J. y ALFARO-LASSALA, F. 2000. First report of *Alternaria* brown spot of citrus in Spain. Plant Disease. 84: 10-44 p.
67. WALKER, P. y CRANE, E. 1987. Constituents of propolis Apidologie 18 (4): 327-334 p.
68. WHITESIDE, J.O. 1976. A newly recorded *Alternaria* induced brown spot disease on Dancy tangerines in Florida, USA. Plant Disease Reporter. 326-329 p.

## **IX. ANEXO**

**Cuadro 18.** Porcentaje de germinación de conidias de *A. alternata* horas después de la incubación.

Clave	Tratamientos (horas)	Porcentaje de germinación (%)
T <sub>1</sub>	0	0.00
T <sub>2</sub>	3	0.00
T <sub>3</sub>	6	0.00
T <sub>4</sub>	10	50.00
T <sub>5</sub>	13	58.00
T <sub>6</sub>	16	70.50
T <sub>7</sub>	19	83.16

**Cuadro 19.** Análisis de variancia del tiempo de germinación de conidias de *A. alternata*.

FV	GL	SC	CM	Fcal	Ftab
Tratamientos	2	1583.34	791.67S	40.58	0.0001
Error experimental	12	234.13	19.51		
Total	14	1817.47			

CV= 6.26%

S : Significación estadística al 5% de probabilidad.

**Cuadro 20.** Análisis de variancia del extracto hidro-etanólico de propóleo e Iprodione en la tasa de crecimiento micelial de *A. alternata*.

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>Fcal</b>	<b>Ftab</b>
Tratamientos	7	104.11	14.87S	101.60	0.0001
Error experimental	24	3.51	0.15		
<b>Total</b>	<b>31</b>	<b>107.63</b>			

CV= 7.66%

S : Significación estadística al 5% de probabilidad.

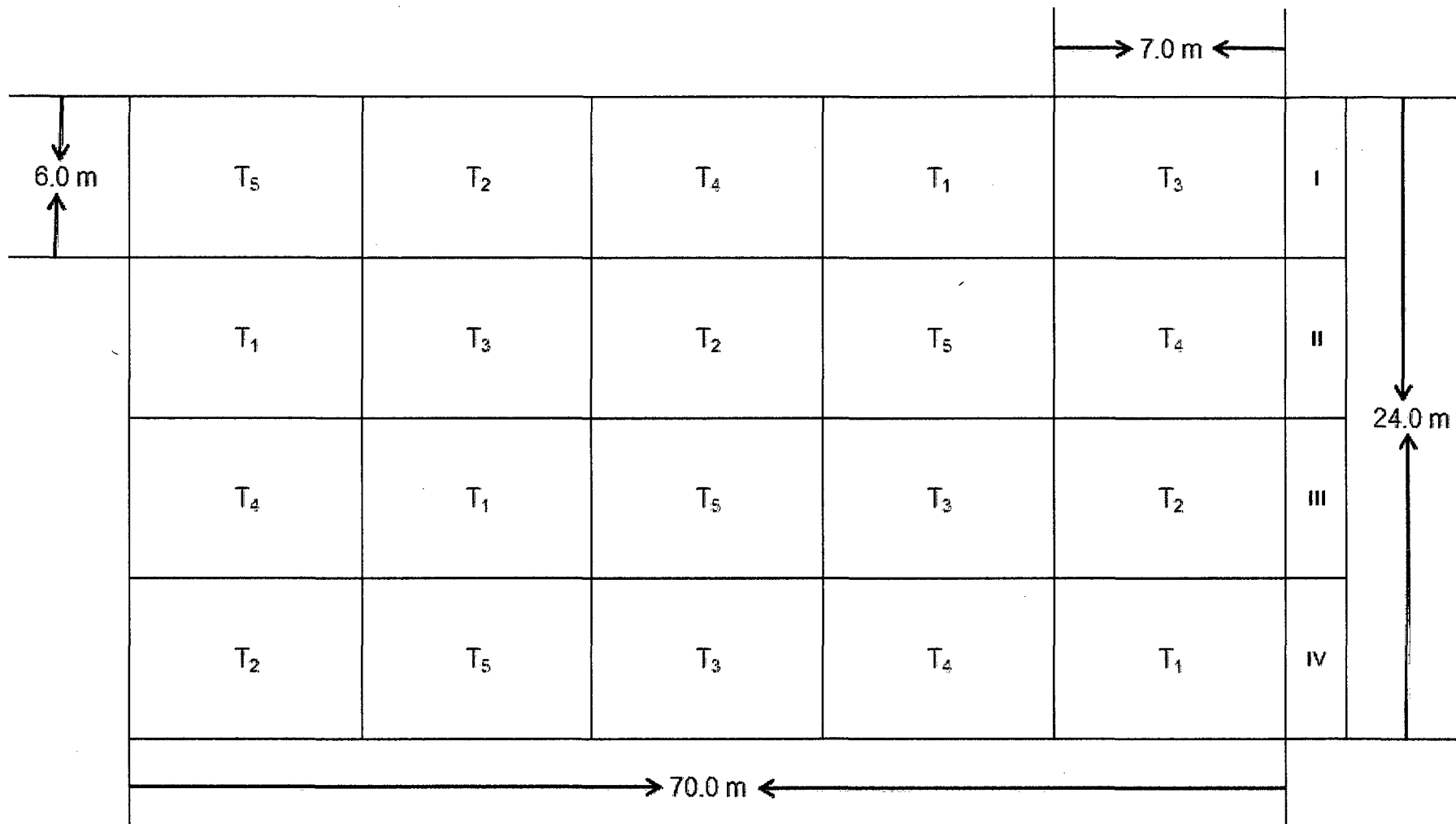
**Cuadro 21.** Análisis de variancia del extracto (hidro-etanólico y etanólico) de propóleo, Iprodione y *T. harzianum* sobre *A. alternata* en brotes extraídos de Tangelo Minneola 36 horas después del ensayo.

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>Fcal</b>	<b>Ftab</b>
Tratamientos	9	2079.92	231.10S	43.50	0.0001
Error experimental	20	106.26	5.31		
<b>Total</b>	<b>29</b>	<b>2186.18</b>			

CV=15.89%

S : Significación estadística al 5% de probabilidad.





**Figura 5.** Detalle del campo experimental (cuatro bloques con cinco tratamientos).