

**Evaluación de fungicidas para el control de
Alternaria spp. en tomate (*Solanum
lycopersicum* L.) bajo condiciones de
laboratorio**

**Marcell Crisanto Gómez Reconco
Cristian Jafet Núñez Espinoza**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2019

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**Evaluación de fungicidas para el control de
Alternaria spp. en tomate (*Solanum
lycopersicum* L.) bajo condiciones de
laboratorio**

Proyecto especial de graduación presentado como un requisito parcial para optar
al título de Ingenieros Agrónomos en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

**Marcell Crisanto Gómez Reconco
Cristian Jafet Núñez Espinoza**

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2019

Evaluación de fungicidas para el control de *Alternaria* spp. en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) bajo condiciones de laboratorio

Marcell Crisanto Gómez Reconco
Cristian Jafet Núñez Espinoza

Resumen. La presencia de enfermedades es un factor que limita la producción de tomate *Solanum lycopersicum* L. en muchas partes del mundo. Anualmente se presentan grandes pérdidas a causa de las enfermedades fúngicas, dentro de estas encontramos al género de gran importancia económica *Alternaria*. En este estudio se evaluó el crecimiento de cinco cepas de *Alternaria* spp. colectadas de plantaciones de camote, mango y tomate, ante la presencia de cuatro fungicidas (Mancozeb, Sulfato de cobre Pentahidratado y Oxitetraciclina, *Reynoutria sachalinensis*, y *Bacillus subtilis*) aplicados en tres diferentes concentraciones (100, 90 y 80%) en medio de cultivo agar papa dextrosa (APD). Además, se evaluó Mancozeb considerando que fue el mejor fungicida inhibiendo el crecimiento del hongo, en explantes de tomate inoculados con el hongo *in vitro*. Se determinó que todos los fungicidas afectaron el crecimiento de las cinco cepas de *Alternaria* spp. Mancozeb mostró la mayor inhibición del crecimiento, mientras que *Reynoutria sachalinensis* presentó la menor. Mancozeb, y Sulfato de cobre Pentahidratado y Oxitetraciclina en las tres concentraciones mostraron el mismo patrón de inhibición del hongo. Los productos biológicos *Reynoutria sachalinensis* y *Bacillus subtilis* mostraron diferencias significativas entre las concentraciones. Las aplicaciones de Mancozeb se recomienda realizarlas de manera preventiva, ya que, de forma curativa, puede no resultar tan eficiente en todas las cepas de *Alternaria* spp.

Palabras clave: Cepas, concentración, crecimiento de micelio, explantes.

Abstract. Diseases are limiting factor for tomato (*Solanum lycopersicum* L.) production in many parts of the world. Annually, high losses are reported due to fungal diseases; within these, we find the genus of great economic importance *Alternaria*. In this study it was evaluated the growth of five strains of *Alternaria* spp. collected from sweet potato, mango and tomato fields, in the presence of four fungicides (Mancozeb, Sulfato de cobre Pentahidratado y Oxitetraciclina, *Reynoutria sachalinensis* and *Bacillus subtilis*) applied at three different concentrations (100, 90 and 80%) in potato dextrose agar (PDA) culture medium. In addition, Mancozeb was evaluated considering it as the best fungicide inhibiting fungal growth, in tomato explants inoculated *in vitro*. It was determined that all fungicides affected the growth of the five strains of *Alternaria* spp. Mancozeb showed the greatest growth inhibition, while *Reynoutria sachalinensis* had the lowest. Mancozeb and Sulfato de cobre Pentahidratado y Oxitetraciclina the three concentrations showed the same fungal inhibition pattern; biological products as *Reynoutria sachalinensis* and *Bacillus subtilis* showed significant differences between concentrations. Mancozeb is recommended to be applied as preventive, since, curative, it may not be as efficient in all strains of *Alternaria* spp.

Key words: Concentration, explants, mycelial growth, stains.

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de Cuadros y Anexos.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	6
4. CONCLUSIONES.....	14
4. RECOMENDACIONES.....	15
6. LITERATURA CITADA.....	16
7. ANEXOS.....	19

ÍNDICE DE CUADROS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Dosis comercial de fungicidas usados para inhibir el crecimiento de <i>Alternaria</i> spp.....	4
2. Dilución y dosificación de fungicidas usados para inhibir el crecimiento de <i>Alternaria</i> spp.....	4
3. Efecto de fungicidas en el crecimiento de <i>Alternaria</i> spp. <i>in vitro</i>	6
4. Efecto de fungicidas a diferentes concentraciones en el crecimiento de <i>Alternaria</i> cepa A.....	8
5. Efecto de fungicidas a diferentes concentraciones en el crecimiento de <i>Alternaria</i> cepa B.....	9
6. Efecto de fungicidas a diferentes concentraciones en el crecimiento de <i>Alternaria</i> cepa C.....	10
7. Efecto de fungicidas a diferentes concentraciones en el crecimiento de <i>Alternaria</i> cepa D.....	11
8. Efecto de fungicidas a diferentes concentraciones en el crecimiento de <i>Alternaria</i> cepa E.....	12
9. Aplicaciones de Mancozeb en cinco cepas de <i>Alternaria</i> spp. inoculadas <i>in vitro</i> en explantes de tomate.....	13
Anexos	Página
1. Protocolo para la elaboración de agar papa dextrosa acidificado (PDA) sólido, para la inoculación <i>in vitro</i>	19
2. Protocolo para la inoculación de hongos.....	20
3. Protocolo para la elaboración de agar agua semisólido para inoculación de <i>Alternaria</i> spp (AA)	21
4. Protocolo para la preparación y siembra de explantes para diagnóstico.....	22
5. Ficha técnica de <i>Reynoutria sachalinensis</i>	23

1. INTRODUCCIÓN

El tomate *Solanum lycopersicum* L. o su nombre anterior *Lycopersicum esculentum* L., perteneciente a la familia Solanácea; es denominada una planta herbácea, anual y bianual, su crecimiento puede darse en forma determinada o indeterminada, lo que le permite ser cultivadas de diferentes formas (Allende *et al.* 2017). Es originario de América del Sur, localizado en tres regiones específicas, Chile, Ecuador y Colombia. Actualmente es reconocida como una de las hortalizas con mayor importancia a nivel mundial, por su alta demanda en el mercado y representativa área sembrada. Entre los principales productores encontramos a China, EEUU, Turquía, y Egipto. Los cuales representan alrededor del 70% de la producción a nivel mundial (Noreña *et al.* 2006).

La mayor extensión de este cultivo se encuentra en Asia con un área de 1,005 millones de hectáreas sembradas, produciendo 50.12 millones de toneladas. Al paso del tiempo, su demanda ha ido en aumento al igual que el comercio y producción, esto a causa del aumento en el área sembrada y rendimiento por área (Florez *et al.* 2010). En los últimos años el incremento en la producción se ha visto de la siguiente manera; Asia produce el 57.9%, seguido por América 16% (FAO 2017). En el 2018 los mayores rendimientos se observan en Holanda con 50.7 kg/m² (Chilealimentos 2018).

Los principales destinos de producción de este cultivo radican en el consumo fresco y la industria (Allende *et al.* 2017). Para el año 2016, se estimó una producción de 177 millones de toneladas de tomate a nivel mundial, obteniendo aproximadamente un incremento del 30% en la producción en comparación a la de diez años atrás (Chilealimentos 2018). En los últimos 10 años (2007-2017), la producción ha aumentado en 40 millones de toneladas; en América Central la producción de tomate ha tenido un incremento de un millón de toneladas (FAO 2017).

La presencia de enfermedades se considera un factor que limita la producción de tomate en muchas partes del mundo, principalmente cuando se utilizan cultivares que no son resistentes a varias de ellas. En las explotaciones de tomate existen diversas enfermedades con diferentes causas y etiologías (Gómez *et al.* 2011).

Anualmente, se registran grandes pérdidas por enfermedades fúngicas en los cultivos, debido a la reducción en tasa fotosintética, pérdidas por pudriciones, entre otras. Uno de los grupos que provocan pérdidas es el filo de los ascomicetos. Dentro de este filo, se encuentra el género *Alternaria*; el cual es de gran importancia económica debido a que puede encontrarse abundantemente en cualquier tejido de planta, ya sea viva o muerta (Simmons 2007).

El género *Alternaria* infecta a las plantas de manera foliar y en la familia de las Brassicaceae, causa manchas en sus hojas (Nidhi *et al.* 2007), por lo que reduce la tasa fotosintética de la planta, lo que se refleja en la producción; además no solo ataca a las hojas, sino, se puede observar daños tanto en tallos y como en frutos con peculiares formas de manchas o anillos necróticos (Soto 2017).

Las especies del género *Alternaria* pueden sintetizar 70 metabolitos secundarios denominados micotoxinas, estos son tóxicos para las plantas, algunos también afectan animales y personas. La exposición a las toxinas producidas por el género *Alternaria* se ha relacionado con la aparición de efectos adversos en la salud humana y animal provocando en algunos casos efectos carcinogénicos, citotóxicos, mutagénicos y genotóxicos (Pavón Moreno *et al.* 2012)

El uso de fungicidas es esencial para que el cultivo logre su óptima producción. los experimentos *in vitro* generalmente se utilizan para estudiar la naturaleza de enfermedades fúngicas. Los objetivos de este estudio fueron los siguientes:

- Evaluar el desarrollo de *Alternaria* spp. *in vitro* ante la presencia de cuatro fungicidas en diferentes concentraciones.
- Evaluar el efecto de Mancozeb en *Alternaria* spp. inoculada *in vitro* en explantes de tomate.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación. El estudio se realizó en el laboratorio de Fitopatología, Diagnóstico e Investigación Molecular de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, ubicada en el Km 30 carretera de Tegucigalpa a Danlí, Honduras; con una precipitación de 1,100 mm, temperatura promedio de 24 °C y una altura de 800 msnm. Se dividió en dos partes, a nivel de laboratorio se establecieron cinco cepas de *Alternaria* spp. en medios de cultivo agar agua, utilizando diferentes concentraciones de fungicidas para su control. Se utilizaron hojas de plantas de tomate para inocular el patógeno en laboratorio y posteriormente se aplicaron tres concentraciones de los fungicidas comparando la eficiencia de estos en el control del hongo. Las plantas de tomate fueron establecidas en uno de los invernaderos de la Unidad de Biología Molecular.

Elaboración de protocolo para inoculación de *Alternaria* spp. y su control *in vitro*.

Preparación de medio para establecimiento del hongo. Se utilizó agar-papa-dextrosa (APD), por su alta disponibilidad de almidones y dextrosa que brindan condiciones favorables para el crecimiento y esporulación del hongo. En la elaboración del medio de cultivo se siguieron en orden cronológico las actividades establecidas en el protocolo del laboratorio. El medio fue expuesto a una temperatura de 121 °C durante 45 minutos con una presión de 1.05 kg/cm² para ser esterilizados.

Distribución de los fungicidas a diferentes concentraciones en el medio PDA. Se utilizaron cuatro fungicidas; Mancozeb, Sulfato de cobre Pentahidratado y Oxitetraciclina, *Reynoutria sachalinensis* y *Bacillus subtilis*. Se realizó una mezcla entre el medio de cultivo y los cuatro fungicidas a diferentes concentraciones, partiendo de la dosis comercial (Cuadro 1), posteriormente se realizó la inoculación del hongo utilizando el protocolo del laboratorio.

Dilución de fungicidas. Se establecieron tres concentraciones para cada fungicida, partiendo de la dosis comercial se agregaron dosis al 90 y 80% (Cuadro 2).

Cuadro 1. Dosis comercial de fungicidas usados para inhibir el crecimiento de *Alternaria* spp.

Ingrediente activo	Unidad	Dosis comercial/ha
Sulfato de cobre Pentahidratado y Oxitetraciclina	L	0.5
<i>Bacillus subtilis</i>	L	2.0
Mancozeb	kg	1.5
<i>Reynoutria sachalinensis</i>	L	1.25

Cuadro 2. Dilución y dosificación de fungicidas usados para inhibir el crecimiento de *Alternaria* spp.

Ingrediente activo	Unidad	Dosis comercial/ 150 mL	Dosis comercial al 90%/ 150 mL	Dosis comercial al 80%/ 150 mL
Sulfato de cobre Pentahidratado y Oxitetraciclina	mL	0.375	0.340	0.300
<i>Bacillus subtilis</i>	mL	1.500	1.350	1.200
Mancozeb	g	0.300	0.270	0.240
<i>Reynoutria sachalinensis</i>	mL	0.225	0.200	0.162

Evaluación de la efectividad de los fungicidas para control de *Alternaria* spp. *in vitro*.

Se realizaron tres tomas de datos, a los cuatro, siete y 10 días después la inoculación, con el fin de observar el desarrollo del hongo ante la presencia de los fungicidas a diferentes concentraciones. Se midió en mm el diámetro alcanzado por el hongo en el medio de cultivo.

Elaboración de protocolo para inoculación de *Alternaria* spp. en explantes foliares *in vitro* de tomate y su control con el mejor fungicida.

Preparación de medio de siembra de explantes. Se elaboró un medio agar agua semisólido, usando una relación de 4 g de bacto-agar por litro de agua destilada, el medio fue expuesto a una temperatura de 121 °C durante 45 minutos con una presión de 1.05

kg/cm² para ser esterilizados, luego se vertió en platos Petri donde fueron colocados los explantes.

Colecta de explantes. De la planta madre se seleccionaron y cortaron hojas sanas, sin presencia de lesiones y contaminantes.

Lavado y desinfección de explantes. La desinfección de los explantes se realizó en la cámara de flujo laminar, utilizando una solución con cloro al 3% y agua filtrada estéril, donde el tejido permaneció por tres minutos. Luego se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril, sumergiendo las hojas durante dos minutos por enjuague. Se utilizó papel filtro estéril para secar los tejidos para después establecerlos en medio agar-agua.

Siembra de explantes e inoculación *Alternaria* spp. en explantes. En la cámara de flujo, utilizando una pinza estéril, se sembraron los explantes frescos en los platos Petri, asegurando que el envés de la hoja entrara en contacto con el medio de cultivo. Luego con ayuda de un bisturí estéril se inocularon cinco cepas del hongo, extraídas de medios de cultivo agar agua (AA).

Aplicación de fungicida. El fungicida con mejor resultado sobre la inhibición del hongo fue Mancozeb (Cuadro 3). En la cámara de flujo laminar, se realizaron aplicaciones de este fungicida a cada una de las cinco cepas de *Alternaria* spp., a las 24, 48, 72, 96 y 120 horas después de haber observado los primeros síntomas del hongo (cuatro días después de inocular), se utilizó la dosis mínima (0.24 g en 150 mL).

Evaluación de control de Mancozeb sobre *Alternaria* spp. A las 24, 48 y 72 horas después de realizar la aplicación del fungicida, se determinó de manera cualitativa el efecto del fungicida sobre el desarrollo del hongo en el explante, para observar y determinar la eficiencia en el control del fungicida sobre el hongo.

Diseño experimental. Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA). Se utilizaron cuatro fungicidas y el testigo; se evaluaron cinco cepas de hongo por cada fungicida. Se realizaron tres repeticiones independientes en el tiempo para el análisis estadístico. Se obtuvo un total de 185 unidades experimentales.

La variable medida fue el crecimiento del micelio en centímetros (cm). El fungicida con el mejor efecto de inhibición del hongo fue aplicado en explantes de tomate, para determinar de manera cualitativa (sí o no) el efecto de este sobre el control de *Alternaria* spp. Los datos se analizaron con el programa estadístico InfoStat y SAS[®] versión 9.4. Para el análisis de las variables se elaboró un análisis de varianza (ANDEVA) para todos los resultados obtenidos, se hizo una separación de medias utilizando test de comparaciones múltiples Duncan. El análisis de varianza y separación de medias se realizó con una probabilidad $P \leq 0.05$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis del crecimiento del *Alternaria* spp. en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (APD).

Efecto de Mancozeb en el crecimiento del hongo. El Mancozeb es un polímero complejo del etileno bis (ditiocarbamato) de manganeso y zinc (Bayoumi 2002). Es un fungicida que afecta al patógeno en múltiples procesos metabólicos, causando una disrupción en la actividad respiratoria del metabolismo de lípidos y producción de ATP en la célula del hongo (Cisneros 2013).

Datos de la enfermedad, después de la aplicación del fungicida, demostraron que Mancozeb inhibe el crecimiento de *Alternaria* spp. comparándolo con el control (Cuadro 3). La dosis comercial (1.5 kg/ha) y sus diluciones al 90 y 80%, no muestran diferencia alguna inhibiendo el crecimiento de las cepas de *Alternaria* spp. aisladas de las plantas de tomate, mango y camote. Según estudios realizados por Gondal *et al.* (2012) quienes comparan diferentes dosis de Mancozeb, el amplio espectro fungitóxico del fungicida ha demostrado efectos similares a los de este estudio, controlando el patógeno *Alternaria* spp. a los siete, 14 y 21 días después de la aplicación, en diluciones más concentradas a las utilizadas en este ensayo.

Cuadro 3. Efecto de fungicidas en el crecimiento de *Alternaria* spp. *in vitro*.

Fungicidas	Diámetro de colonia (cm)
Sulfato de cobre Pentahidratado y Oxitetraciclina	0.46 ^b ‡
<i>Bacillus subtilis</i>	0.45 ^b
Mancozeb	0.00 ^a
<i>Reynoutria sachalinensis</i>	2.25 ^c
Control	4.07 ^d
CV	46.87
R ²	0.91
Probabilidad	<0.0001

‡= Medias con una letra común no son significativamente diferentes.

CV= Coeficiente de variación (%).

Efecto de Sulfato de cobre Pentahidratado y Oxitetraciclina en el crecimiento del hongo. Fungicida-bactericida, cuya acción química es a base de Cobre Pentahidratado y Oxitetraciclina. Su modo de acción como cualquier otro fungicida a base de cobre, es la desnaturalización inespecífica de las proteínas celulares cuando las esporas fúngicas germinantes absorben los iones tóxicos de cobre (Husak 2015).

En este estudio se determinó que Sulfato de cobre Pentahidratado y Oxitetraciclina, afecta el crecimiento de *Alternaria* spp. al compararlo con el control (Cuadro 3). La dosis comercial (0.5 L/ ha) y sus diluciones al 90 y 80%, no mostraron diferencia significativa entre ellas al controlar las cepas A y B aisladas de tomate, C aislada de mango y la E aislada de camote, con la excepción de una de la cepa C aislada de mango, donde el diámetro de la colonia varió significativamente en la evaluación al día cuatro. Estos resultados difieren con el estudio de Erazo (2016) donde se utilizó Sulfato de Cobre Pentahidratado para *Alternaria* spp. y la incidencia fue en aumento desde un 10% en el día 26 hasta 68% en el día 68. Sin embargo, Ochoa (2009) mostró en un estudio donde comparó el efecto de Sulfato de cobre Pentahidratado sobre *Alternaria* spp. al primer, tercer y octavo día después de aplicarlo, el fungicida tuvo efecto sobre el desarrollo del hongo al día uno y tres, pero la actividad fúngica disminuyó al día ocho.

Efecto del *Bacillus subtilis* en el crecimiento del hongo. Fungicida biológico (cepa QST-713 de *Bacillus subtilis*) con acción protectante multisitio, que previene el ataque de patógenos, evitando la formación del tubo germinativo y el micelio del hongo, evitando así su colonización. Detiene la germinación de esporas, brindando un efecto protectante a la planta. La formulación posee lipopéptidos que sinérgicamente actúan sobre la membrana celular, perforándola, y así, provocando la muerte del patógeno. Las tres concentraciones de *Bacillus subtilis* utilizadas en el estudio mostraron diferencias significativas en la inhibición del crecimiento de las cinco cepas de *Alternaria* utilizadas.

Estudios previos realizados por el Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (2010), en banano para el control de *Alternaria alternata*, demuestran que posee porcentajes de inhibición de crecimiento superiores al 80% al igual que Mancozeb y Captan.

Efecto de *Reynoutria sachalinensis* en el crecimiento del hongo. Pertenece al grupo químico de los 1,8- dihidroxiantraquinonas, es un producto a base de extracto de *Reynoutria sachalinensis*, su modo de acción es la inducción del sistema inmune de la planta, ayuda a la producción de fitoalexinas, compuestos fenólicos y antioxidantes. Inhibe también la germinación de esporas; actúa induciendo la producción de ácido ferúlico el cual ayuda a la lignificación de la pared celular generando una mayor resistencia ante la penetración de los patógenos.

Los resultados demuestran que *Reynoutria sachalinensis*, tiene efecto sobre *Alternaria* spp. al mostrar un menor crecimiento en comparación al control utilizado (Cuadro 3). Las tres diferentes concentraciones utilizadas, dosis comercial (1.25 L/ha) y sus diluciones al 90 y 80% muestran diferencias entre ellas, independientemente de las cinco cepas utilizadas en el ensayo. Actualmente no se han registrado estudios donde reporten un efecto antagonista de *Reynoutria sachalinensis* sobre *Alternaria* spp.

Los fungicidas Sulfato de cobre Pentahidratado y Oxitetraciclina, *Bacillus subtilis*, Mancozeb y *Reynoutria sachalinensis* afectan el crecimiento de las cinco cepas de *Alternaria* spp. inoculadas en el medio PDA. Mancozeb, mostró los mejores resultados de inhibición del hongo (Cuadro 3).

Los fungicidas Mancozeb, Sulfato de cobre Pentahidratado y Oxitetraciclina, *Reynoutria sachalinensis* y *Bacillus subtilis* aplicados en tres concentraciones diferentes afectan el crecimiento de la cepa A y B de *Alternaria* spp. aislada de plantas de tomate (Cuadro 4 y 5). En las aplicaciones de *Reynoutria sachalinensis* evaluados en tres días distintos y con tres concentraciones, la dosis al 90% mostró el menor crecimiento del hongo (Cuadro 5).

Cuadro 4. Efecto de fungicidas a diferentes concentraciones en el crecimiento de *Alternaria* cepa A.

Fungicidas	CONC [§]	Diámetro de colonia (cm)		
		Día 4	Día 7	Día 10
Sulfato de cobre Pentahidratado y Oxitetraciclina	100%	0.00 ^a ¥	0.00 ^a	0.00 ^a
	90%	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
	80%	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
<i>Bacillus subtilis</i>	100%	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
	90%	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
	80%	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
Mancozeb	100%	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
	90%	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
	80%	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
<i>Reynoutria sachalinensis</i>	100%	0.00 ^a	1.00 ^b	3.53 ^b
	90%	0.00 ^a	1.00 ^b	4.07 ^c
	80%	0.63 ^b	2.73 ^c	4.57 ^d
CV		113.86	95.36	27.39
R ²		0.93	0.88	0.99
Probabilidad		<0.0001	0.0016	0.0467

¥= Medias con una letra común no son significativamente diferentes entre columnas.

§CONC= Concentración.

CV= Coeficiente de variación (%).

Cuadro 5. Efecto de fungicidas a diferentes concentraciones en el crecimiento de *Alternaria* cepa B.

Fungicidas	CONC [§]	Diámetro de colonia (cm)		
		Día 4	Día 7	Día 10
Sulfato de cobre Pentahidratado y Oxitetraciclina	100%	0.43 ^b ¥	0.00 ^a	1.37 ^b
	90%	0.40 ^b	0.00 ^a	1.47 ^b
	80%	0.53 ^b	0.00 ^a	1.50 ^b
<i>Bacillus subtilis</i>	100%	0.00 ^a	0.40 ^{abc}	0.50 ^a
	90%	0.00 ^a	0.37 ^{ab}	0.50 ^a
	80%	0.00 ^a	0.50 ^{abc}	0.57 ^a
Mancozeb	100%	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
	90%	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
	80%	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
<i>Reynoutria sachalinensis</i>	100%	0.00 ^a	2.50 ^d	4.33 ^d
	90%	0.00 ^a	0.83 ^{abc}	2.53 ^c
	80%	0.63 ^a	2.57 ^d	4.50 ^d
CV		49.18	49.77	31.75
R ²		0.89	0.86	0.95
Probabilidad		0.021	0.0115	0.0048

¥= Medias con una letra común no son significativamente diferentes entre columnas.

§CONC= Concentración.

CV= Coeficiente de variación (%).

Los fungicidas Mancozeb, Sulfato de cobre Pentahidratado y Oxitetraciclina, *Reynoutria sachalinensis* y *Bacillus subtilis* afectan el crecimiento de la cepa C de *Alternaria* spp aislada de plantas de mango, según las evaluaciones realizadas al día cuatro, siete y 10 (Cuadro 6). En los cuatro fungicidas evaluados, se encontró diferencia significativa, para el día siete y para el día 10.

En las tres concentraciones de Mancozeb y Sulfato de cobre Pentahidratado y Oxitetraciclina, en los tres días evaluados no se encontró diferencia significativa. Al igual, *Reynoutria sachalinensis* y *Bacillus subtilis* mostró diferencias significativas entre las concentraciones evaluadas. Para *Reynoutria sachalinensis* la concentración al 90% mostró el menor crecimiento del hongo (Cuadro 6).

Cuadro 6. Efecto de fungicidas a diferentes concentraciones en el crecimiento de *Alternaria* cepa C.

Fungicidas	CONC [§]	Diámetro de colonia (cm)		
		Día 4	Día 7	Día 10
Sulfato de cobre Pentahidratado y Oxitetraciclina	100%	0.00 ^{ns}	0.67 ^b ¥	1.00 ^b
	90%	0.00	0.67 ^b	0.93 ^b
	80%	0.00	0.67 ^b	0.97 ^b
<i>Bacillus subtilis</i>	100%	0.33	0.77 ^b	1.10 ^b
	90%	0.43	0.77 ^b	1.17 ^b
	80%	0.47	0.83 ^b	1.57 ^c
Mancozeb	100%	0.00	0.00 ^a	0.00 ^a
	90%	0.00	0.00 ^a	0.00 ^a
	80%	0.00	0.00 ^a	0.00 ^a
<i>Reynoutria sachalinensis</i>	100%	1.17	3.03 ^d	5.17 ^e
	90%	0.93	2.57 ^c	4.60 ^d
	80%	1.23	3.20 ^d	5.50 ^f
CV		26.14	10.15	8.77
R ²		0.97	0.99	1.00
Probabilidad		0.0728	0.0006	0.0006

¥= Medias con una letra común no son significativamente diferentes entre columnas.

§CONC= Concentración.

ns= No significativo.

CV= Coeficiente de variación (%).

Para los fungicidas Mancozeb, Sulfato de cobre Pentahidratado y Oxitetraciclina, *Reynoutria sachalinensis* y *Bacillus subtilis* las evaluaciones realizadas al día cuatro, siete y 10 (Cuadro 7 y 8) en la cepa D y E de *Alternaria* spp. aislada de plantas de mango y camote, mostraron que existe diferencia significativa entre los fungicidas.

En las tres concentraciones de Mancozeb evaluados en tres días, no se encontró diferencia significativa (Cuadro 7). Se mostró diferencia significativa en las concentraciones de *Bacillus subtilis* evaluadas al día cuatro y 10, en *Reynoutria sachalinensis* al día cuatro y siete, y al día cuatro para Sulfato de cobre Pentahidratado y Oxitetraciclina. *Reynoutria sachalinensis* con la dosis al 90%, tuvo el mejor efecto ante el crecimiento del hongo (Cuadro 7).

Cuadro 7. Efecto de fungicidas a diferentes concentraciones en el crecimiento de *Alternaria* cepa D.

Fungicidas	CONC [§]	Diámetro de colonia (cm)		
		Día 4	Día 7	Día 10
Sulfato de cobre Pentahidratado y Oxitetraciclina	100%	0.00 ^a ¥	0.83 ^b	1.10 ^b
	90%	0.40 ^{bc}	0.97 ^{bc}	1.10 ^b
	80%	0.43 ^{bc}	0.93 ^b	1.03 ^b
<i>Bacillus subtilis</i>	100%	0.37 ^b	1.17 ^d	1.40 ^c
	90%	0.53 ^d	1.17 ^d	1.77 ^d
	80%	0.47 ^{cd}	1.13 ^{cd}	1.80 ^d
Mancozeb	100%	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
	90%	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
	80%	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
<i>Reynoutria sachalinensis</i>	100%	1.23 ^f	2.97 ^e	5.50 ^e
	90%	1.13 ^e	2.83 ^e	5.50 ^e
	80%	1.23 ^f	3.20 ^f	5.50 ^e
CV		9.36	7.86	3.85
R ²		0.99	0.99	1.00
Probabilidad		<0.0001	0.0196	0.0005

¥= Medias con una letra común no son significativamente diferentes entre columnas.

§CONC= Concentración.

CV= Coeficiente de variación.

No se mostró diferencia significativa, para Mancozeb y Sulfato de cobre Pentahidratado y Oxitetraciclina entre las concentraciones evaluadas a tres diferentes días. El fungicida *Reynoutria sachalinensis* mostró diferencia significativa entre fungicida en los tres días evaluados, *Bacillus subtilis* solamente al día 10 en la cepa E de *Alternaria* aislada de camote (Cuadro 8).

Cuadro 8. Efecto de fungicidas a diferentes concentraciones en el crecimiento de *Alternaria* cepa E.

Fungicidas	CONC [§]	Diámetro de colonia (cm)		
		Día 4	Día 7	Día 10
Sulfato de cobre Pentahidratado y Oxitetraciclina	100%	0.00 ^a [¥]	0.00 ^a	0.00 ^a
	90%	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
	80%	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
<i>Bacillus subtilis</i>	100%	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
	90%	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
	80%	0.00 ^a	0.23 ^a	0.27 ^b
Mancozeb	100%	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
	90%	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
	80%	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
<i>Reynoutria sachalinensis</i>	100%	0.00 ^a	0.77 ^b	2.43 ^c
	90%	0.00 ^a	0.00 ^a	0.37 ^b
	80%	0.40 ^b	1.47 ^c	3.23 ^d
CV		312.25	88.44	25.74
R ²		0.66	0.91	0.99
Probabilidad		0.0109	<0.0001	<0.0001

[¥]= Medias con una letra común no son significativamente diferentes entre columnas.

[§]CONC= Concentración.

CV= Coeficiente de variación.

Resultados relacionados a Mancozeb aplicado en concentración 80%. Las aplicaciones de Mancozeb realizadas a una concentración del 80% con relación a la comercial, demostró no tener efecto control en el crecimiento de las cinco cepas de *Alternaria* spp. con la excepción de la aplicación a las 24 horas en las cepas A, B y C donde el patógeno fue controlado y no siguió creciendo (Cuadro 9). Aplicaciones a las 48, 72, 96 y 120 horas no tienen efecto control sobre las cinco cepas utilizadas. El fungicida Mancozeb de manera preventiva mostró mejores resultados inhibiendo el crecimiento del hongo. La literatura indica que Mancozeb es un fungicida antiesporulante, inhibe el crecimiento del tubo germinativo y la germinación de las esporas impidiendo la infección, razón por la cual se considera un protector y su aplicación debe hacerse de manera preventiva (Cruz 2013).

Cuadro 9. Aplicaciones de Mancozeb en cinco cepas de *Alternaria* spp. inoculadas *in vitro* en explantes de tomate.

Cepas.	Aplicaciones a diferentes horas				
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Cepa A	Controló	No controló	No controló	No controló	No controló
Cepa B	Controló	No controló	No controló	No controló	No controló
Cepa C	Controló	No controló	No controló	No controló	No controló
Cepa D	No controló	No controló	No controló	No controló	No controló
Cepa E	No controló	No controló	No controló	No controló	No controló

4. CONCLUSIONES

- Todos los fungicidas lograron inhibir el crecimiento de las cepas de *Alternaria* spp., sin embargo, Mancozeb fue el que mejor resultados obtuvo, ya que logró la total inhibición en las tres concentraciones.
- Las aplicaciones de Mancozeb no tienen efecto control al aplicarse después de la aparición de los primeros síntomas del hongo.

5. RECOMENDACIONES

- Evaluar los protocolos de inoculación en plantas mantenidas bajo condiciones controladas de temperatura y humedad que propicien el desarrollo de *Alternaria* spp.
- Evaluar Mancozeb empleando concentraciones menores al 80% buscando efecto inhibitorio del crecimiento de *Alternaria in vitro*.
- Evaluar otros productos de origen biológico con efecto inhibitorio del crecimiento de *Alternaria* como alternativa de control.

6. LITERATURA CITADA

- Alfaro E, Morales L, Pedraza M, Chavez T, Morales K. 2015. Aislamiento e identificación de hongos asociados con el síntoma de roña en el cultivo de aguacate en Michoacán México. *Revista Mexicana de Fitopatología*; 33. 77-78.
- Allende M, Salinas L, Rodriguez F, Olivares N, Riquelme J, Antúnez A. 2017. Manual de Cultivo del Tomate bajo invernadero. Instituto de desarrollo agropecuario, Instituto de investigaciones agropecuarias (INIA). Boletín INIA N°12. P 110. Disponible en: <http://www.inia.cl/wpcontent/uploads/ManualesdeProduccion/12%20Manual%20de%20Tomate%20Invernadero.pdf>.
- Bayoumi E, Ordóñez C, Pérez Y, Balaña R, Ordóñez D. 2002. Citotoxicidad del fungicida mancozeb en cultivos de CHO-K1. *Revista de Toxicología*. 19(1), 29-34.
- Chilealimentos. 2018. Panorama mundial del mercado del tomate 2018. [actualizado el 20 de ene. de 2018; consultado el 9 de ago. de 2019]. <http://www.chilealimentos.com/wordpress/panorama-mundial-del-mercado-del-tomate-2018/>.
- Cisneros M. 2013. Inocuidad de los alimentos: Registro de insumos agrícolas. Guayaquil: AGROCALIDAD. [actualizado el 30 de jul. de 2013; consultado el 30 ago. 2019]. http://www.agrocalidad.gob.ec/wpcontent/uploads/downloads/2013/08/mario_cisneros__antecedentes_mancozeb.pdf.
- Cruz I. 2013. Características generales del mancozeb. Ecuador. AGROCALIDAD. [actualizado el 30 de jul. de 2013; consultado el 08 de sept. de 2019]. http://www.agrocalidad.gob.ec/wpcontent/uploads/downloads/2013/08/israel_garita_caracteristicas_generales_del_mancozeb.pdf.
- Erazo Delgado CZ. 2016. Determinación del tiempo óptimo de protección con casas chinas de manta térmica en tomate orgánico en Zamorano, Honduras [Tesis]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano-Honduras. 22 p.
- FAO, Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura. 2019. FAOSTAT-base de datos cultivos. [actualizado el 18 de ene. de 2019; consultado el 26 de jul. de 2019]. <http://www.fao.org/faostat/es/>.

- Florez Vergara A, Galvis Vanegas JA, González Blair GH. 2010. Manual de procesamiento y conservación del tomate [*Solanum Lycopersicum*]: Variedad larga vida y variedad cherry mínimamente procesados. 1 ed. Bogotá: Uniagraria. 51 p.
- Gondal AS, Ijaz M, Riaz K, Khan AR. 2012. Effect of different doses of fungicide (Mancozeb) against *Alternaria* leaf blight of tomato in tunnel. *Journal of Plant Pathology and Microbiology*, 3(03): 1-3.
- Gómez R, Hernández L, Cossio L, López J, Sánchez R. 2011. Enfermedades fúngicas y bacterianas del cultivo de tomate en el estado de Nayarit. México: INIFAP, CIRPAC. Disponible en: <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/bitstream/handle/123456789/3034/ENFERMEDADES%20FUNGOSAS%20Y%20BACTERINAS%20DEL%20CULTIVO%20DEL%20TOMATE%20EN%20EL%20ESTADO%20DE%20NAYARIT%20202.pdf?sequence=1>.
- Husak V. 2015. Copper and copper-containing pesticides: metabolism, toxicity and oxidative stress. [consultado el 30 de jul. de 2019]; 2(1): 38-50. Eng.
- ICIA, Instituto Canario de Investigaciones Agrarias. 2010. Evaluación de la eficacia *in vitro* de productos naturales y químicos en el control de especies fúngicas que afectan al cultivo del Plátano en Canarias. Disponible en: http://www.agrocabildo.org/publica/Publicaciones/frut_363_platanera.pdf.
- Nidhi S, Muhammad HR, Stephen S, Mohan T, Vipin KB, Nat NV. 2007. Proteome-level changes in two *Brassica napus* lines exhibiting differential responses to the fungal pathogen *Alternaria brassicae*. *Plant Science* 172:95-110.
- Noreña J, Rodrigues V, Guzman M, Zapata M. 2006. El cultivo de tomate bajo invernadero (*Lycopersicum esculentum*. Mill). Centro de investigación La Selva, Rionegro, Antioquia, Colombia. *Boletín Técnico* 21. P 48. Disponible en: https://www.academia.edu/8591625/El_cultivo_de_tomate_bajo_invernadero_1_Bolet%C3%ADn_T%C3%A9cnico_21.
- Ochoa Moya AE. 2009. Efecto de pesticidas ecológicos para el control de *Alternaria* (*Alternaria* sp) y phytophthora (*Phytophthora* sp.) en el tomate de árbol (*Solanum betácea*) *in vitro*. Universidad Técnica de Ambato. 81p. Disponible en: ” <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/1674/1/tesis-001%20Producción%20Agric.%20sustentable.pdf>.
- Pavón Moreno MÁ, González Alonso I, Martín de Santos R, García Lacarra T. 2012. Importancia del género *Alternaria* como productor de micotoxinas y agente causal de enfermedades humanas [The importance of genus *Alternaria* in mycotoxins production and human diseases]. *Nutr Hosp*. 27(6):1772–1781. spa.
- Simmons EG. 2007. *Alternaria* an identificación manual, 1st ed. Utrech (Netherlands): CBS Fungal Biodiversity Centre. 775 p.

Soto S. 2017. Fitopatología – Enfermedades en hortalizas: *Alternaria* en tomate. Instituto de investigaciones agropecuarias. Disponible en: <http://www.inia.cl/wp-content/uploads/FichasTecnicasSanidadVegetal/Ficha%2038%20Alternaria%20en%20tomate.pdf>.

7. ANEXOS

Anexo 1. Protocolo para la elaboración de agar papa dextrosa acidificado (PDA) sólido, para la inoculación *in vitro*.

El protocolo está determinado para preparar un litro de medio de cultivo.

1. Pesar 39 g de agar PDA
2. Añadir ~961 ml de agua destilada
3. Hervir para disolver
4. Autoclavar

Anexo 2. Protocolo para la inoculación de hongos

Es importante trabajar con orden y realizando el menor movimiento posible dentro de la cámara de flujo laminar (movimientos sutiles). Evitar objetos que obstruyan el flujo del aire en el área donde se está trabajando, así como el uso de joyas o cualquier otro accesorio que interfiera con la inocuidad y el movimiento sutil de las manos.

1. Apagar el aire acondicionado para evitar la turbulencia en la cámara de flujo laminar.
2. Seleccionar el hongo para la siembra.
3. Encender y preparar la cámara de flujo laminar: limpiar y desinfectar con alcohol al 70% (para mayor información encontrar la guía al lado derecho de la cámara).
4. Seleccionar los medios de cultivos que se utilizarán y colocarlos en la cámara de flujo laminar. Dejarlos reposar alrededor 10 min antes de la siembra y quitar el agua que se condensó en la tapa de los platos.
5. Preparar los materiales: bisturí, mechero, fósforos, parafina, contenedor para sostener el bisturí desinfectado y contenedor con alcohol para desinfectar al 95%.
6. Desinfectar el bisturí con alcohol al 95%.
 - a) Llevar el bisturí sobre la llama del mechero para flamearlo.
 - b) Desinfectarlo con alcohol al 95%.
 - c) Repetir a y b nuevamente.
 - d) Dejarlo reposar para que se seque y enfríe.
7. Para la siembra es importante seleccionar el borde del hongo con hifas jóvenes. Realizar un corte pequeño cuadrangular y sembrarlo en el centro del plato con la parte de las hifas en contacto con el medio.

Observación: hacer movimientos sutiles porque se puede crear contaminaciones por migración de esporas.

8. Dejar reposar los platos abiertos alrededor de 10 minutos para eliminar el exceso de humedad y condensación de la muestra y el plato.
9. Sellar con parafina los platos, rotularlos y colocarlos en los contenedores de crecimiento.
10. Limpiar (quitando los residuos de medios de cultivo u hongos del bisturí), desinfectar y depositar los materiales utilizados en su lugar.
11. Apagar la cámara de flujo laminar.

Anexo 3. Protocolo para la elaboración de agar agua semisólido para inoculación de *Alternaria* spp (AA).

El protocolo está determinado para preparar un litro de medio de cultivo.

1. Pesar 8 g de bacto-agar
2. Añadir ~992 mL de agua destilada
3. Autoclavar

Anexo 4. Protocolo para la preparación y siembra de explantes para diagnóstico.

1. *Toma de fotografía y detalle de síntomas*, colocar el tejido enfermo en el centro de una hoja blanca. Escribir en la parte inferior el tipo de síntomas que presenta el tejido y un código de identificación de muestra con el siguiente formato: año, abreviatura de la planta y número de muestra (ej. 17zh#1). Colocar la fecha de recepción de muestra y preparación del explante en la parte superior del código. Tomar la fotografía de la muestra de tal manera que aparezcan todos los datos. Escribir detalladamente la sintomatología y adjuntarla al tablero de muestra.
2. *Preparación de explantes*, con un bisturí esterilizado realizar de 8-9 pequeños cortes del tejido de la interfase y sumergirlos en agua filtrada en un beaker esterilizado. Utilizar guantes y bisturí individuales para cada muestra para evitar la contaminación cruzada.
3. *Preparación de material*, dentro de la cámara de flujo laminar colocar el material a utilizar: 2 beakers, 4 pinzas, mechero, fósforos, papel filtro, medio de cultivo, alcohol al 70% y agua destilada. Asegurarse que el material se encuentre esterilizado.
4. *Desinfección de explantes*, con una pinza esterilizada, transferir los explantes de la muestra a un beaker con una solución de hipoclorito (en un rango de 1-10%). Mantener la muestra de 3-5 minutos y menear el beaker para desinfectar los explantes.
5. *Lavado de explantes*, extraer los explantes sutilmente con una pinza esterilizada y transferirlos a un beaker con agua destilada estéril. Lavar los explantes por un minuto y repetir nuevamente el procedimiento.
6. *Secado de explantes*, finalmente extraer los explantes nuevamente con una pinza esterilizada y colocarlos sobre un papel filtro estéril para secarlos.
7. *Siembra de explantes*, transferir con una pinza esterilizada los explantes al medio de cultivo. Colocar de 6-7 explantes de manera uniforme y con la interfase en contacto con el medio.
8. *Rotulado*, sellar el medio con parafina y escribir el código, fecha y nombre de la persona que realizó la siembra.
9. *Incubación*, colocar las placas en la incubadora de 2-4 días para realizar las observaciones.

Anexo 5. Ficha técnica de *Reynoutria sachalinensis*.

Después de usar su equipo de aplicación, lávelo con agua y jabón. Deje circular el agua por todo el equipo, a fin de eliminar al máximo los residuos. No destapar la boquilla con la boca.

El personal de aplicación debe estar capacitado y recibir capacitaciones periódicas sobre el manejo y uso correcto de plaguicidas.

CONTRAINDICACIONES

- No aplicar en presencia de lluvia, o cuando exista probabilidad de la misma en las próximas 3 horas posteriores a la aplicación.
- No aplicar cuando la temperatura sea mayor a 30°C y la humedad relativa sea menor al 50%.
- No aplicar cuando la velocidad del viento sea mayor a 10 km/h.

FITOTOXICIDAD

REGALIA MAXX no es fitotóxico a los cultivos a las dosis aquí recomendadas, si se usa bajo las indicaciones de esta etiqueta.

INCOMPATIBILIDAD

REGALIA MAXX es compatible con productos a base de azoxistrobin, clorotalonil, Cu_2O (óxido cuproso), tiofanato metil, *Bacillus subtilis*, famoxadona, cimoxanil, mancozeb, mefenoxam, piraclostrobin, acibenzolar-S-metil y Miclobutanil. En caso de que desea realizar alguna mezcla, éstas se deberán hacer con marcas comerciales a base de los ingredientes activos antes mencionados y autorizados en los cultivos aquí indicados.

MANEJO DE RESISTENCIA

"PARA PREVENIR EL DESARROLLO DE POBLACIONES RESISTENTES, SIEMPRE RESPETE LAS DOSIS Y LAS FRECUENCIAS DE APLICACIÓN". "EVITE EL USO REPETIDO DE ESTE PRODUCTO, ALTERNÁNDOLO CON OTROS GRUPOS QUÍMICOS DE DIFERENTES MODOS DE ACCIÓN Y DIFERENTES MECANISMOS DE DESTOXIFICACIÓN Y MEDIANTE EL APOYO DE OTROS MÉTODOS DE CONTROL".

El mecanismo de acción de **REGALIA MAXX** a base del extracto de *Reynoutria sachalinensis*, es mediante la inducción del sistema inmune de la planta, es decir, induce la producción de fitoalexinas, proteínas PR, compuestos fenólicos y antioxidantes. Además, induce la producción del ácido ferúlico que favorece la lignificación de la pared celular para resistir la penetración de los patógenos y también, inhibe la germinación de esporas e induce la producción de la enzima glutanasa que rompe las paredes celulares del patógeno.



PRECAUCIÓN (verde 347)