



**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**  
**Universidad del Perú, Decana de América**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**EFFECTO DE LA ACTIVIDAD METABÓLICA DE CEPAS DE  
HONGOS ANTAGONISTAS SOBRE *Alternaria alternata* (Fr.)  
CAUSANTE DE LA MANCHA PARDA EN CÍTRICOS**

Tesis  
para optar al Título Profesional de Biólogo, con mención en  
Microbiología y Parasitología

Bach. JOSÉ ANTONIO CAMARENA LIZARZABURU

**Lima - Perú**

**2012**





**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**  
**Universidad del Perú, Decana de América**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**EFFECTO DE LA ACTIVIDAD METABÓLICA DE CEPAS DE  
HONGOS ANTAGONISTAS SOBRE *Alternaria alternata* (Fr.)  
CAUSANTE DE LA MANCHA PARDA EN CÍTRICOS**

Tesis  
para optar al Título Profesional de Biólogo, con mención en  
Microbiología y Parasitología

Bach. JOSÉ ANTONIO CAMARENA LIZARZABURU

ASESOR:  
Ph.D. PEDRO LUIS CASTELLANOS SÁNCHEZ

**Lima - Perú**

**2012**

## **DEDICATORIA**

### **A DIOS**

Quien siempre me acompaña, por permitirme culminar esta etapa de mi vida.

### **A mis padres**

Matías Camarena Romero y Gelda Lizarzaburu Cieza, por los esfuerzos y sacrificios para brindarme una profesión que es la mejor herencia que pudieron darme y por su apoyo incondicional en mi desarrollo personal y profesional.

### **A mis hermanos**

Por su confianza, comprensión y cariño que siempre han demostrado.

*Muchos sueñan con alcanzar sus metas.  
Otros preferimos mantenernos despiertos  
para hacer nuestros sueños realidad.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Debo expresar mi sincero agradecimiento:

Mi pleno reconocimiento al Ph.D. Pedro Luis Castellanos Sánchez, profesor investigador de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por su ayuda invaluable en la elaboración de la presente tesis.

A los Ingenieros Luis Valdiviezo, Hilda Gómez y Willy Soberanis, especialistas del Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA), por su apoyo y sugerencias, paciencia, confianza y amistad recibida.

A la Blga. Anny Zapata Granja, por su apoyo metodológico y que siempre estuvo atenta a mis inquietudes profesionales, a ella mi eterna gratitud.

A la Dra. Elizabeth Nuñez, por sus aportes, colaboración, pero sobre todo su amistad.

A los Ingenieros Karina Tokashiki e Ynes Quispe, por haberme permitido realizar los ensayos en el fundo San Hipólito "Arona" perteneciente al Sr. Luis Alayza de Losada.

A mis amigos y compañeros de SENASA, por su amistad, acertados consejos, con quienes compartí momentos inolvidables: Cledy Ureta, Martín Tenorio, Carlos Ninahuanca, y César Carvallo.

A Liz Mayra Isabel, por su amor, confianza, paciencia, comprensión, apoyo, consejos y comentarios. Por estar a mi lado y ayudarme a mantenerme despierto.

Gracias a todos...

## ABREVIATURAS

ha	Hectárea
Kg	Kilogramo
cm	Centímetro
TM	Toneladas métricas
MIP	Manejo integrado de plagas
mL	mililitro
rpm	revoluciones por minuto
SENASA	Servicio Nacional de Sanidad Agraria
µg	microgramo
µm	micrometro
CNB	Cámara de Neubauer
ADE	Agua destilada estéril
APD	Agar papa dextrosa
PICR	Porcentaje de inhibición de crecimiento radial
ACB	Agente de Control Biológico

## ÍNDICE

	Pág.
I.- Introducción.....	1
II.- Marco teórico.....	4
2.1.- Historia y origen de los cítricos.....	4
2.1.1.- Taxonomía y morfología.....	7
2.1.2.- Ecología.....	8
2.1.3.- Importancia económica.....	9
2.2.- Enfermedades de los cítricos.....	11
2.2.1.- La enfermedad: “Mancha parda de los cítricos”.....	11
2.2.2.- Taxonomía y morfología.....	12
2.2.3.- Ecología.....	13
2.2.4.- Daño económico.....	14
2.2.5.- Alternativas de control y medidas de combate.....	14
2.3.- Control biológico de enfermedades.....	15
2.3.1.- Los hongos como agentes de control biológico.....	16
2.3.2.- Microorganismos antagonistas.....	17
2.3.3.- <i>Trichoderma</i> spp.....	18
2.3.4.- Taxonomía y morfología de <i>Trichoderma</i> spp.....	19
2.4.- Importancia del metabolismo secundario.....	21
2.4.1.- Hongos productores antifúngicos.....	21
2.4.2.- Metabolismo secundario.....	22
2.4.3.- Pigmentos.....	23
2.5.- Efecto de los agroquímicos sobre la microbiología de la superficie aérea de las plantas.....	23
2.5.1.- Efecto de fungicidas.....	24
III.- Materiales y métodos.....	26
3.1.- Localización del área de estudio.....	26
3.2.- Selección de hongos con propiedades antagonistas sobre <i>Alternaria alternata</i> .....	26
3.2.1.- Activación de las cepas antagonistas y fitopatógena.....	26

3.2.2.- Preparación de la suspensión de hongos.....	27
3.2.3.- Evaluación de la actividad de los hongos frente a <i>A. alternata</i> .....	27
3.2.3.1.- Selección del hongo antagonista con mayor efecto biocontrolador.....	27
3.3.- Producción de metabolitos secundarios con actividad inhibitoria a partir de cultivos líquidos en caldo papa dextrosa (PD).....	28
3.3.1.- Aplicación del filtrado.....	29
3.4.- Medición de la actividad inhibitoria del crecimiento del fitopatógeno.....	29
3.5.- Determinación del porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR).....	29
3.6.- Protocolo del bioensayo en campo.....	30
3.6.1.- Localización.....	30
3.6.2.- Establecimiento de la zona experimental.....	30
3.6.3.- Factor en estudio.....	31
3.6.4.- Unidades de observación.....	31
3.6.5.- Aplicación de cada tratamiento al cultivo de cítrico.....	32
3.6.6.- Determinación de la incidencia de la enfermedad.....	32
3.6.7.- Determinación de la severidad de la enfermedad.....	33
3.6.8.- Determinación de la eficiencia de los productos.....	33
4.7.- Análisis estadístico.....	34
IV.- Resultados.....	35
4.1.- Selección de cepas de hongos con mayor propiedad antagónica sobre <i>Alternaria alternata</i> .....	35
4.2.- Efecto del filtrado obtenido de la cepa seleccionada sobre el crecimiento de <i>Alternaria alternata</i> .....	39
4.3.- Pruebas de campo.....	42
4.3.1.- Localización del área del estudio.....	42
4.3.2.- Efecto de los filtrados obtenidos de la cepa <i>Trichoderma R6</i> en el control de la mancha parda en cítricos en campo... ..	42
4.3.2.1.- Incidencia de la mancha parda de los cítricos en campo.....	42



4.3.2.2.- Severidad de la enfermedad mancha parda sobre el cultivo de cítricos.....	43
4.3.2.3.- Efecto de productos utilizados para el control de la mancha parda de los cítricos .....	47
V.- Discusión.....	48
5.1.- Selección de cepas de hongos con mayor propiedad antagónica sobre <i>Alternaria alternata</i> .....	48
5.2.- Efecto del filtrado obtenido de <i>Trichoderma R6</i> sobre el crecimiento de <i>Alternaria alternata</i> .....	51
5.3.- Pruebas de campo.....	55
5.3.1.- Incidencia de la enfermedad mancha parda de los cítricos en campo.....	55
6.3.2.- Severidad de la enfermedad mancha parda sobre el cultivo de los cítricos.....	56
6.3.3.- Efecto de productos utilizados para el control de la mancha de los cítricos.....	56
VI.- Conclusiones.....	58
VII.- Recomendaciones.....	59
VIII.- Referencias Bibliográficas.....	60
IX.- Anexo.....	76

## FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Cultivo dual para evaluar PICR de hongos antagonistas y fitopatógeno.	37
Figura 2. Observación microscópica a las 120 horas para evaluar la interacción entre los hongos enfrentados.	38
Figura 3. Obtención de tres filtrados del fermento de cultivo (caldo Papa Dextrosa) de las tres cepas antagonistas con mejores resultados.	40
Figura 4. Tendencia de las curvas de los valores de PICR de los filtrados de las tres cepas.	41
Figura 5. Porcentaje de incidencia del hongo <i>Alternaria alternata</i> en el cultivo de cítricos.	42
Figura 6. Porcentaje de gravedad de la enfermedad mancha parda en el cultivo de cítricos.	43
Figura 7. Efecto de dosis los productos utilizados para el control de “la mancha parda” en el cultivo de los cítricos.	47

## TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Escala de antagonismo.	30
Tabla 2. Determinación de tratamientos aplicados para el control de “la mancha parda” en cítricos.	31
Tabla 3. Escala de Horsfall- Barrat para evaluar la mancha foliar de cítricos.	33
Tabla 4. Porcentaje de inhibición de crecimiento radial de <i>Alternaria alternata</i> enfrentado con cada una de las cepas antagonistas evaluadas.	35
Tabla 5. Valores promedios de PICR de enfrentamiento entre posibles hongos antagonistas en comparación frente al testigo.	36
Tabla 6. Tipos de interacción hifal entre las cepas antagonistas y el fitopatógeno <i>Alternaria alternata</i> .	38
Tabla 7. Características de los filtrados fúngicos producidos en el medio líquido, caldo Papa Dextrosa.	39
Tabla 8. Porcentaje de inhibición de crecimiento radial de <i>Alternaria alternata</i> en medio PDA conteniendo los metabolitos inhibitorios de la cepas antagonistas evaluadas.	41
Tabla 9. Valores del PICR del hongo fitopatógeno <i>A. alternata</i> en medio PDA (testigo) y PDA más los filtrados de las cepas Tv, Th y Tr6.	41
Tabla 10. Valores de porcentaje de incidencia y severidad del tratamiento con el filtrado (actividad metabólica inhibitoria) de hongo antagonista T. R6.	44
Tabla 11. Valores de porcentaje de incidencia y severidad del tratamiento con producto de arroz con conidios de hongo antagonista T. R6.	44
Tabla 12. Valores de porcentaje de incidencia y severidad del tratamiento con producto químico (testigo).	45
Tabla 13. Valores de grado de incidencia y severidad de cada tratamiento	46

## RESUMEN

La mancha parda es una enfermedad causada por el hongo *Alternaria alternata* (Fr.), que afecta a mandarinas, en especial a una gran variedad de sus híbridos; sin embargo, cuando se tiene una concentración alta de inóculo cercano a otras variedades no susceptibles, puede causar daños apreciables en estos. La enfermedad afecta a órganos jóvenes causando necrosamiento, defoliación, lesiones necróticas y erupciones suberosas en frutos que reduce su valor en el mercado. El control de este patógeno se ha realizado hasta nuestros días con el empleo de fungicidas químicos que presentan desventajas económicas y ecológicas por lo agresivo y costoso que resultan al medio ambiente.

En el presente trabajo, se evaluaron 7 cepas fúngicas de los géneros *Trichoderma* (5), *Pochonia* (1) y *Clonostachys* (1), para seleccionar un agente de control biológico (ACB) promisorio para el control de *A. alternata* en dependencia de los resultados *in vitro*. Se hizo la selección de la cepa, *Trichoderma R6*, que presentó un mayor control del fitopatógeno mediante las pruebas *in vitro*: cultivos duales, observación microscópica, y evaluación de filtrados conteniendo sustancias biológicas inhibitorias. La cepa seleccionada fue evaluada frente a *A. alternata* en plantas de cítricos de mandarina variedad Fortune en campo, a partir de la época de brotamiento, el estadio fenológico más susceptible de la planta, se aplicaron tres tratamientos: filtrado obteniendo un control de 58,33% del fitopatógeno, y comparándolo con los otros dos, conidios en arroz y fungicidas químicos, con resultados de 50,0% y 48,52%, respectivamente.

**Palabras clave:** Control biológico, cítricos, *Alternaria alternata*, *Trichoderma R6*, estadio fenológico.

## ABSTRACT

The Alternaria Brown Spot (ABS) is a plant disease caused by the fungus *Alternaria alternata* (Fr.) that attacks tangerines and the varieties of their hybrids, although it may cause considerable lesions on unsusceptible varieties if they are adjacent to heavily infested plants as high inoculum concentrations. Alternaria Brown Spot (ABS) attacks young fruit, leaves and twigs causing brown-to-black necrotic lesions surrounded by a yellow halo, defoliation and large sunken pockmarks, thus reducing the value of the fruit for the fresh market. Nowadays, fungicides are the primary way of controlling Alternaria Brown Spot. However, this practice has economic and ecological disadvantages because of its higher costs and the aggressiveness against the environment.

The objectives of this study were to evaluate 7 fungal species and choose the best one as a biological control agent (BCA) to the control of *Alternaria alternata* based on *in vitro* results. Consequently, we have selected *Trichoderma R6* that showed better results through evaluations *in vitro*: dual cultures, microscopic observations, and evaluation of inhibitory substances filtrates.

*Trichoderma R6* was evaluated in a field of tangerines citrus Fortune variety cultivars since the bud break (vegetative) stage, most susceptible phenological stage against this disease. The filtrate obtained from the selected fungal species got the control 58,33% of phytopathogen in comparison with the 50,0% and 48,52% obtained with conidia on rice and chemical fungicides application respectively.

**Key words:** Biological control, citrus cultivars, *Alternaria alternata*, *Trichoderma R6*, phenological stage.