

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL  
DE HUAMANGA**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA**



**Aislamiento, caracterización, control biológico y químico in  
vitro del agente causal de la pudrición negra de la piña**

*(Ananas comosus)*, Ayacucho

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:  
INGENIERA AGRÓNOMA**

**PRESENTADO POR:  
Flor Adelaida Cancho Yance**

Ayacucho – Perú

2019

*A Dios, por todas sus bendiciones.*

*A mis padres Sr. Saturnino y Sra. Felicitas, por todo el enorme sacrificio, amor y entrega; en darme siempre lo mejor. Son y serán siempre mi motivo de seguir adelante.*

*A mi hermana Kelly por estar siempre presente, animando a no desistir en este proyecto de vida.*

## **AGRADECIMIENTO**

A mi *alma mater* la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga con su Facultad de Ciencias Agrarias, especialmente a la Facultad de Agronomía, por la oportunidad brindada en albergar mis momentos de estudiante.

Mi gratitud al Ing. Guillermo Carrasco Aquino por su acertada participación en el asesoramiento, sus valiosos consejos y dedicación en este proyecto, brindándome siempre sus conocimientos y experiencia en el tema, con lo cual he podido concluir con éxito la presente tesis.

A los señores miembros del jurado calificador, por su aporte y observaciones en el enriquecimiento del presente trabajo y a todos mis profesores de quienes siempre guardaré un grato recuerdo por sus enseñanzas y amistad que me brindaron.

A mis amigos y a todas las personas que me apoyaron en la ejecución del presente trabajo de investigación.

## ÍNDICE GENERAL

	<b>Pág.</b>
Dedicatoria.....	ii
Agradecimiento.....	iii
Índice general.....	iv
Índice de tablas .....	vi
Índice de figuras.....	vii
Índice de anexos.....	viii
Resumen.....	9
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>11</b>
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>13</b>
1.1. Generalidades de la piña ( <i>Ananas comosus</i> ).....	13
1.1.1. Origen y dispersión .....	13
1.1.2. Taxonomía .....	13
1.1.3. Características botánicas .....	14
1.1.4. Morfología .....	14
1.1.5. Variabilidad .....	14
1.1.6. Agroecología de la piña .....	18
1.1.7. Enfermedades de la piña .....	19
1.2. Pudrición negra de la piña .....	20
1.3. Síntomas de la pudrición negra en la piña .....	21
1.4. Control cultural .....	25
1.5. Control biológico .....	27
1.5.1. <i>Trichoderma</i> controlador biológico .....	28
1.6. Control químico .....	28
1.6.1. Fungicidas de contacto.....	30
1.6.2. Fungicidas sistémicos .....	32
1.6.3. Control químico en la pudrición negra de la piña.....	32
1.6.4. Fichas técnicas de productos químicos: MANZATE® 200 D, SPORTAK 45 CE, BENZOMIL® 500 y SYL® .....	35

## **CAPÍTULO II**

<b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>39</b>
2.1. Ubicación del experimento .....	39
2.1.1. Ubicación política .....	39
2.1.2. Ubicación geográfica (zona 18L).....	39
2.2. Materiales, equipos e insumos .....	40
2.2.1. Materiales.....	40
2.2.2. Equipos.....	40
2.2.3. Insumos .....	40
2.3. Planteamiento del experimento .....	41
2.3.1. Tipo de investigación .....	41
2.3.2. Factores de estudio experimental.....	41
2.3.3. Descripción de los tratamientos .....	42
2.3.4. Diseño experimental .....	44
2.3.5. Duración del experimento.....	44
2.4. Instalación y conducción del experimento.....	44
2.4.1. Aislamiento del hongo patógeno.....	44
2.4.2. Caracterización y reconocimiento de las estructuras del patógeno.....	47
2.4.3. Prueba de eficacia de los productos fúngicos en el control in vitro.....	48
2.5. Parámetros de evaluación.....	52

## **CAPÍTULO III**

<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>54</b>
3.1. Aislamiento del agente causal de la pudrición negra de la piña .....	54
3.2. Caracterización y reconocimiento del agente causal de la pudrición negra de la piña.....	58
3.3. Prueba de eficacia de los productos en el control in vitro .....	61
3.4. Fito patogeneidad .....	65
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>68</b>
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	<b>69</b>
<b>REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>70</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>74</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
Tabla 2.1. Tratamientos estudiados para los medios de cultivo y temperaturas...	43
Tabla 2.2. Tratamientos estudiados para los productos químicos y las dosis.....	43
Tabla 2.3. Tratamientos estudiados para los productos biológicos.....	43
Tabla 2.4. Fungicidas utilizados en la prueba de medio envenenado.....	49
Tabla 2.5. Tratamientos de la prueba de control biológico in vitro.....	51
Tabla 3.1. Velocidad de crecimiento radial (cm) de <i>T. paradoxa</i> en diferentes medios de cultivo y temperaturas.....	55
Tabla 3.2. Análisis de varianza para la velocidad de crecimiento radial (cm) en diferentes medios de cultivo y temperaturas a las 96 Hrs. de evaluación.....	55
Tabla 3.3. Prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ) de la velocidad de crecimiento radial en la interacción medio x temperatura.....	56
Tabla 3.4. Dimensiones de la conidia, hifa y conidióforo de <i>Thielaviopsis paradoxa</i> .....	60
Tabla 3.5. Valores de porcentaje de inhibición micelial obtenidos para los 11 tratamientos.....	62
Tabla 3.6. Análisis de variancia para el porcentaje de inhibición micelial a los 96 Hrs. de evaluación de los 10 tratamientos.....	63
Tabla 3.7. Prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ) del porcentaje de inhibición micelial de los 11 tratamientos.....	63

## ÍNDICE DE FIGURAS

		<b>Pág.</b>
Figura 1.1.	Partes de la planta de la piña en un corte longitudinal.....	15
Figura 1.2.	Planta adulta de piña con diferentes tipos de material vegetal.....	18
Figura 2.1.	Ubicación geográfica de la Universidad Nacional san Cristóbal de Huamanga.....	39
Figura 2.2.	Materiales e insumos utilizados en el experimento.....	41
Figura 2.3.	Presencia de micelios del agente causal de la pudrición negra de la piña en el interior y exterior de los frutos incubados.....	45
Figura 2.4.	Líneas coincidentes en la calibración del microscopio entre el objeto milimétrico y el ocular milimétrico.....	48
Figura 2.5.	Placa Petri luego de ser marcada para su evaluación.....	50
Figura 2.6.	Líneas de medición para el crecimiento micelial diario del patógeno y controlador en placa Petri.....	51
Figura 3.1.	Crecimiento micelial del hongo patógeno a 25°C en los diferentes medios selectivos: a. PDA, b. V- 8 y c. PZA.....	55
Figura 3.2.	Velocidad de crecimiento micelial en la interacción medio de cultivo x temperatura.....	56
Figura 3.3.	Crecimiento micelial en diferentes medios de cultivo y temperaturas.....	57
Figura 3.4.	Desarrollo inicial y final del hongo patógeno en el medio de cultivo PDA.....	58
Figura 3.5.	Mediciones micrométricas de las estructuras microscópicas de <i>Thielaviopsis paradoxa</i> . A. Hifas, B. Conidios; C. Conidioforo.....	59
Figura 3.6.	Distribución gráfica de <i>Thielaviopsis paradoxa</i> en el Perú.....	61
Figura 3.7.	Promedio de crecimiento de micelios y porcentaje de inhibición micelial.....	64
Figura 3.8.	Resultados de la prueba de fito patogenicidad en los frutos de piña de la variedad Golden y Cayena lisa.....	66

## ÍNDICE DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
Anexo 1. Resultados del experimento.....	75
Anexo 2. Panel fotográfico.....	79

## RESUMEN

El presente trabajo, consistió en aislar y caracterizar al agente causal de la pudrición negra de la piña, para determinar un eficaz control in vitro del agente causante de la pudrición negra del fruto de piña, para lo cual se colectaron frutos de piñas con síntomas característicos del mercado local mayorista Nery García Zárate. Las muestras se transportaron al laboratorio de Fitopatología de la Escuela Profesional de Agronomía de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, donde se hizo el aislamiento del hongo en tres diferentes medios PDA (Papa Dextrosa Agar), PZA (Papa Zanahoria Agar) y Agar V8 a diferentes temperaturas 10, 20, 25 y 30°C, como resultado se determina que el medio más favorable para el crecimiento micelial del hongo patógeno con 3.8 cm/24 Hrs. es el PDA a una temperatura de 25 °C; posteriormente se realizó la caracterización e identificación morfológica del hongo mediante microscopia óptica, determinando estructuras reproductivas características del hongo y comprobación mediante criterios taxonómicos establecidos, del que se obtuvo como resultado que el patógeno causante de la pudrición negra de la piña es el hongo *Thielaviopsis paradoxa*. Finalmente se realizó el control químico in vitro donde los tratamientos más eficaces son: T1 (Mancozeb -dosis recomendado), T3 (Propineb - dosis recomendado), T5 (Benomil - dosis recomendado), T6 (Benomil - dosis al 50%), T7 (Procloraz - dosis recomendado) y T8 (Procloraz - dosis al 50%), estos tratamientos inhibieron el crecimiento de *Thielaviopsis paradoxa* al 100%. Sin embargo el control biológico con *Trichoderma viride* obtuvo un porcentaje de inhibición (PI) de 94.96 %, y el control con *Trichoderma harzianum* obtuvo un PI de 87.56 %.

**Palabras clave:** Aislamiento, caracterización, control biológico, pudrición negra y piña

## INTRODUCCIÓN

La importancia que tienen las plantas como base de la alimentación humana y animal, hacen indispensable y necesario el conocimiento no solo de su producción sino también de las pérdidas y por ende las causas de estas.

La gran variabilidad de enfermedades producidas por hongos en plantas de interés económico, ha causado grandes pérdidas económicas y la pudrición negra de la piña, según Maldonado (1997) ocasiona hasta el 70% de pérdidas en la post cosecha, además afecta a otros cultivos tropicales como: cocotero, camote, plátano, palma datilera, café, cacao, mango entre otros.

En el Perú esta enfermedad fue reportada por primera vez el año 2004 en el departamento de Ucayali, es desde ese momento que la enfermedad se viene dispersando a nivel nacional, afectando principalmente a la palma aceitera y a la piña.

La piña (*Ananas comosus*) es un cultivo que año tras año adquiere mayor importancia en la selva peruana, debido a su precocidad para la producción, su rentabilidad y su demanda en el mercado nacional e internacional. El cultivo también ha sido considerado como una buena opción para los programas de Desarrollo Alternativo, habiendo sido seleccionado por su gran potencial para sustituir el cultivo de la coca.

La rentabilidad del cultivo de la piña se ve disminuida por varios problemas fitosanitarios, los cuales pueden afectar a los diversos órganos de la planta durante la etapa de siembra, crecimiento, producción y poscosecha. Durante la poscosecha, los principales problemas son las enfermedades fungosas, siendo una de las más importantes la “Pudrición negra de la piña” (PNP) causada por *Ceratocystis paradoxa* (Dade) Moreau cuyo estado conidial es *Thielaviopsis paradoxa* (de Seney) Hohnel. Este hongo llega a producir grandes pérdidas económicas pues afecta toda la planta: a los

hijuelos usados como semilla, a las hojas y al fruto principalmente, deteriorando la pulpa, haciéndolo no apto para el consumo humano ni para la industria.

En la región de Ayacucho se han observado frutas con síntomas similares a los producidos por *Thielaviopsis paradoxa* (de Seynes) Hohnel, sin embargo el hongo aún no se ha reportado en la región de Ayacucho.

Por ello, en el presente trabajo de investigación se pretende evidenciar al agente causal de la pudrición negra de la piña, con la finalidad de recomendar las medidas de control más eficaces para bajar la incidencia y severidad de este patógeno. Asimismo se generará conocimiento sobre estudios de caracterización del patógeno que causa esta enfermedad; con la finalidad de determinar las principales características de la sintomatología inicial presentada por las plantas, que ayuden a detectar a tiempo la enfermedad. Debido a lo anteriormente mencionado se plantea el presente trabajo con los siguientes objetivos:

### **Objetivo general**

Aislar y caracterizar al patógeno causante de la pudrición negra de la piña, para determinar un eficaz control in vitro.

### **Objetivos específicos**

1. Aislar en diferentes medios de cultivo y temperaturas al patógeno causante de la pudrición negra de la piña (*Ananas comosus*).
2. Caracterizar al patógeno causante de la pudrición negra de la piña.
3. Determinar un eficaz control in vitro para el patógeno causante de la pudrición negra de la piña.

## **CAPÍTULO I**

### **MARCO TEÓRICO**

#### **1.1 GENERALIDADES DE LA PIÑA (*Ananas comosus*)**

La piña; es la especie más importante de la familia Bromeliaceae (Chao *et al.*, 2007). La característica principal de este grupo es la alta capacidad de retener agua y resistir la pérdida de la misma (Jiménez, 1999). Es la segunda fruta tropical más importante en el mundo después del mango, la demanda internacional de la piña sigue en crecimiento principalmente debido a los diferentes hábitos alimenticios de los consumidores americanos y europeos que consideran a esta fruta tropical como una de las más finas del mundo, destacando en ella su agradable sabor, aroma y su contenido de vitamina C (FAO, 2010).

Según FAO (2000), los principales productores a nivel mundial de esta fruta son: Tailandia, Filipinas, Brasil, China e India. Por otro lado el 2008 el Ministerio de Agricultura indica que el departamento más importante en producción de piña es Junín con un 45%, le siguen en orden de importancia La Libertad con un 18%, viniendo a continuación los departamentos de Ayacucho, Cuzco, San Martín y Ucayali.

##### **1.1.1 Origen y dispersión**

Las bromelias (Bromeliaceae) son originarias principalmente de América subtropical y tropical, comprenden aproximadamente 56 géneros y 3000 especies (Luther, 2004). La piña *Ananas comosus* es la especie más importante de la familia Bromeliaceae, originaria de un lugar no especificado de Sudamérica (Chao *et al.*, 2007; Collins, 1951; Luther, 2004; Páez, 1998; Ruas, 1995; Uriza Ávila, 2005). Los estudios de diversidad sugieren que se originó entre Brasil, norte de Argentina y Paraguay en los bordes meridionales del Amazonas (es decir, la zona de nacimiento de la Cuenca del Plata), desde donde se difundió al curso superior del Amazonas, la zona de Venezuela y las Guayanas (Páez, 1998).

La dispersión prehispánica de la piña abarcó toda el área tropical de América del Sur, Antillas, América Central y México y en el siglo XVI fue llevada a África por portugueses, y al final de ese siglo ya había llegado hasta Filipinas y Java (Py *et al.*, 1987).

### 1.1.2. Taxonomía

Según Garcidueñas (2013), la clasificación taxonómica de la piña es la siguiente:

**Reino:** Planta

**División:** Magnoliophyta

**Clase:** Liliopsida

**Subclase:** Commelinidae

**Orden:** Bromeliales

**Familia:** Bromeliaceae

**Subfamilia:** Bromelioideae

**Género:** Ananas

**Especie:** *comosus*

**Nombre científico:** *Ananas comosus*.

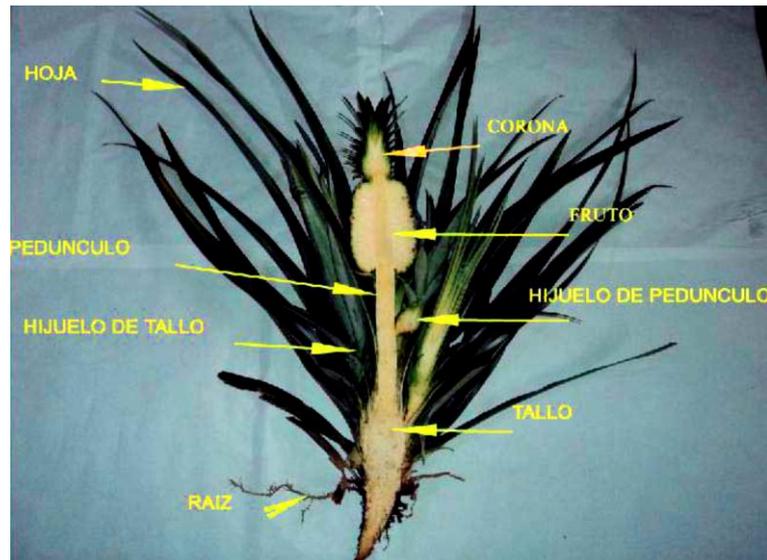
### 1.1.3. Características botánicas

En el Manual de Piña PEPP (2010), se menciona que la piña presenta las siguientes características particulares:

- Planta en forma de “roseta” que permiten recolectar el agua y las pulverizaciones foliares eficientemente.
- Resistencia de la planta a condiciones de estrés por sequía
- Débil evapotranspiración, complementada por su metabolismo de ácido crasuláceo (MAC).
- Respuesta a la inducción floral, esta particularidad que permite escalonar la cosecha durante todo el año.

### 1.1.4. Morfología

La piña es una herbácea perenne, cuya inflorescencia terminal da origen a una fruta múltiple. Después de la maduración de los primeros frutos, la planta desarrolla nuevos brotes a partir de yemas axilares, para producir nuevos ejes de crecimiento capaces de producir otro fruto (Bartholomew *et al.*, 2002; González *et al.*, 2007; Samson, 1991).



**Figura 1.1.** Partes de la planta de la piña en un corte longitudinal

Fuente: Munive, 2011.

### a) Porte

De acuerdo a Py *et al.* (1987) La piña solo se propaga por vía vegetativa, para lo cual se dispone de tres clases de materiales de siembra: la corona de hojas que hay encima del fruto, que rara vez se usa; los bulbillos que brotan en la mayoría de los cultivares en la base de la fruta y que forman plantas que fructifican entre 18 y 22 meses, y los brotes basales que nacen en las axilas de las hojas que fructifican entre 15 y 18 meses.

### b) Tallo

Py *et al.* (1987) indica que el tallo tiene forma de maza y es más ancho en la parte superior. Los entrenudos son muy angostos y en ellos se encuentran yemas axilares y raíces, en el ápice hay un meristema que genera hojas y que al llegar a la madurez forma una inflorescencia. Internamente el tronco de la piña se divide en tres estructuras: epidermis, zona cortical y cilindro central. La separación de estas dos últimas está bien definida por una capa de tejido transparente en la parte apical y media del tallo, que se oscurece en la inferior, recorrida por haces vasculares que van del cilindro central hacia la zona cortical y la hojas. Es de esta zona de separación donde se originan la parte subterránea del tallo que está cubierta con un mechón de raíces adventicias fibrosas (Bartholomew *et al.*, 2002; González *et al.*, 2007; Samson, 1991).

Py *et al.* (1987) afirma que el tejido básico del tronco es parénquima compacto, cargado de granos de almidón además de células con cristales de oxalato de calcio.

### **c) Raíces**

Garcidueñas (2013) indica que las raíces primarias sólo se encuentran en las plántulas muy jóvenes, pero mueren poco después de la germinación y son reemplazadas por las raíces adventicias. Estas forman un sistema corto y compactado en la base del tallo, con numerosas raíces fuertes y limitada ramificación. En condiciones ideales, el sistema radicular del suelo puede extenderse hasta 1-2 m lateralmente y 0,85 m de profundidad.

### **d) Hojas**

Py *et al.*, (1987) menciona que las hojas de la piña forman una roseta que rodea completamente el tallo. Además afirma que el follaje de la piña, como de otras Bromeliáceas forma un excelente sistema colector del agua de lluvia y polvo atmosférico y abriga numerosos insectos y otros animales.

Las hojas inferiores, originarias del material del cultivo son más pequeñas 5 - 20 cm en comparación con las más jóvenes, que pueden alcanzar más de 1.6 m de largo y 7 cm de ancho, dependiendo de la variedad y condiciones ecológicas (Bartholomew *et al.*, 2002; González *et al.*, 2007; Kerns *et al.*, 1936; Samson, 1991).

De acuerdo a Sandoval y Ernesto (2011), las hojas son nombradas de acuerdo a su posición en el tallo, las que se localizan en la parte más baja son las A, B y C; las localizadas en la parte superior son nombradas D, E, y F. Las hojas "D" son las que se usan como muestra para la inducción floral.

### **e) Inflorescencia**

El pedúnculo e inflorescencia se desarrollan a partir del meristemo apical. La etapa de la emergencia de la inflorescencia se llama "corazón rojo" (Kerns *et al.*, 1936). Las brácteas del pedúnculo son cortas y estrechas. El pedúnculo se alarga después de la floración. Su longitud varía mucho con las variedades (Jiménez, 2000). La inflorescencia tiene más de 50 y menos de 200 flores individuales, está coronada por una corona, compuesta por numerosas hojas cortas (hasta 150) en un tallo corto. Las flores o frutas individuales están dispuestas alrededor del eje central (Figura 1.2). Entre la flor superior y la corona hay una zona de transición con brácteas pero no de flores (Bartholomew *et al.*, 2002).

De acuerdo a Py *et al.* (1987) las primeras flores en abrirse son las inferiores, y como cada día se abren unas pocas el período de floración se extiende por tres o cuatro semanas.

#### **f) Flor**

Las flores son hermafroditas, trímeras, con tres sépalos, tres pétalos, seis estambres en dos verticilos de tres y un pistilo tricarpelar. La flor tubular estrecha y la producción de néctar abundante son especialmente adaptadas para que realice la polinización un colibrí (Bartholomew *et al.*, 2002). El conjunto de estas flores individuales dan origen al fruto (Bonatti, *et al.*, 2005).

#### **g) Fruto**

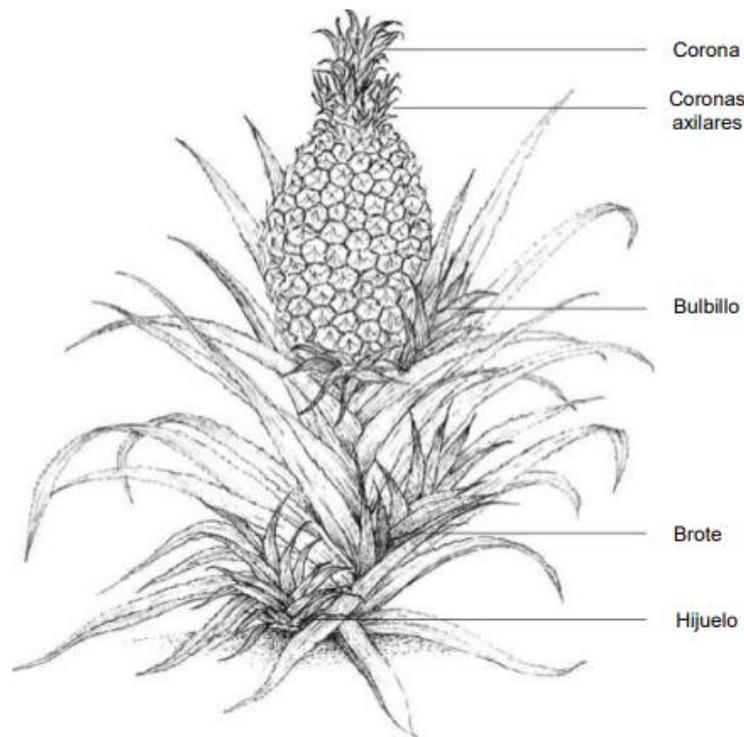
Morazán (2010) indica que el fruto de la piña es el conjunto de cada frutículo individual. Nace en el ápice del pedúnculo, cuya parte comestible consiste en los ovarios, base de los sépalos y brácteas de la flor. Es un fruto no climatérico. El desarrollo y maduración de la fruta se da en secuencia, es decir desde su base hasta la parte superior.

La maduración completa se da a los 25-26 semanas pos-inducción dependiendo de la época del año. El desarrollo del fruto depende del área foliar de la planta alcanzada en la inducción floral, ya que después de esta etapa ya no se forman nuevas hojas.

#### **h) Material vegetal**

PEPP (2010) menciona que una planta adulta de piña presenta diferentes tipos de material vegetal que sirven de material de propagación y de siembra; estos se clasifican de la siguiente manera: Corona se desarrolla sobre el fruto es un material compacto, presenta hojas pequeñas en forma de “roseta”.

- Bulbillos, se desarrollan en las axilas de las brácteas del pedúnculo.
- Hijuelos de tallo se desarrollan a lo largo del tallo, es un material de excelente calidad para la plantación, pero no se usan en los cultivares locales.
- Hijuelos de base de planta se desarrollan en la base del tallo muy cerca al suelo, se caracteriza por la formación de raíces que penetran al suelo.



**Figura 1.2.** Planta adulta de piña con diferentes tipos de material vegetal

Fuente: Py *et al.*, 1987.

### 1.1.5. Variabilidad

Inicialmente se dividieron las variedades de piña cultivada en tres grupos: “Cayena”, “Queen” y “Spanish”, con base en la morfología de la hoja, espinas, color de las flores, forma y tamaño del fruto. Py (1970), adicionó los grupos “Pernambuco” y “Maipure”. De acuerdo a Py *et al.* (1987) Los cultivares se clasifican en:

#### a) Española

Fruto globoso, con surcos profundos, amarillo anaranjado a rojo; pulpa amarilla a blanca con la médula ancha, sabor picante, fibrosa; hojas espinosas; resistente al marchitamiento, susceptible a gomosis.

**Cultivares:** “Española – Roja”, “Singapore”, “Selangor”, “Castilla”, “Cabezona” (triploide)

#### b) Queen

Fruto cónico, con surcos profundos, amarillo, pulpa muy amarilla, dulce y poco fibrosa, la médula delgada, hojas espinosas.

**Cultivares:** “Queen”, “Mc Gregor”, “Natal”, “Ripley”, “Alexandria”.

### **c) Abacaxi**

Fruto cónico amarillo, pulpa amarilla pálida a blanca, dulce, suave, jugosa, con poca fibra; hojas lisas o con pocas espinas.

**Cultivares:** “Abacaxi”, “Abaka”, “Sugar loaf”, “Papelón”, “Venezolana”.

### **d) Cayena**

Fruto cilíndrico, algo cónico y anaranjado, pulpa amarilla y dulce, algo ácida, suave y jugosa, con poca fibra; hojas lisas o con pocas espinas, ápice espinudo; susceptible al marchitamiento.

**Cultivares:** “Cayena lisa”, “Guadalupe”, “Baron Rothschild”, “Esmeralda”.

### **e) Maipure**

Fruto cilíndrico – ovoide, amarillo a anaranjado o rojo; pulpa blanca a amarilla, muy dulce, jugosa, suave, con fibras; la médula mediana; hojas sin espinas.

**Cultivares:** “Maipure”, “Rondon”, “Perolera”, “Monte Lirio”.

## **1.1.6. Agroecología de la piña**

### **a) Altitud**

De acuerdo a Garzón (2016), la piña se puede sembrar dentro de un rango que va de 0 a 1,200 msnm, siendo una altitud óptima entre los 300 y 900 msnm. Por otro lado PEPP (2010) nos indica que altitudes superiores a 1200 msnm pueden causar problemas en el crecimiento y desarrollo de la planta.

### **b) Temperatura**

La temperatura anual requerida para un adecuado crecimiento oscila entre 23 y 30 grados centígrados, con un óptimo de 27 grados centígrados. Temperaturas inferiores a 23 grados, aceleran la floración, disminuyendo el tamaño del fruto y haciéndolo más ácido y perecedero, mientras que temperaturas superiores a 30 grados, pueden quemar la epidermis y tejidos subyacentes ocasionando lo que se llama “golpe de sol” (Pac 2005). Según PEPP (2010), la temperatura ideal para el cultivo de piña están en el rango de 29-30 °C, si las temperaturas son inferiores a 16 °C cesa su crecimiento, además nos señala que La temperatura es el factor más importante en la producción; debido a que es fundamental en la formación, madurez, y calidad del fruto.

### **c) Pluviometría**

Según PEPP (2010), la piña es considerada como una planta resistente a las condiciones de estrés por agua y su cultivo se desarrolla en zonas con precipitaciones muy variables que oscilan entre 600 y los 4000 mm anuales, pero la producción óptima se obtiene con precipitaciones entre 1,000 a 1,500 mm.

Y de acuerdo a Pac (2005), aunque el cultivo sea poco exigente, la falta de agua en la etapa inmediata después de la siembra y en el inicio de la floración y formación del fruto retarda el crecimiento de la planta y reduce el tamaño del fruto.

### **d) Luminosidad**

La piña es una planta exclusiva de sol, no soporta sombra, la sombra afecta su crecimiento y desarrollo, las plantas que crecen bajo sombra presenta hojas más delgadas, verde oscuro y de crecimiento lento por lo que sus frutos son pequeños (PEPP 2010).

Según Pac (2005) una iluminación, muy intensa causa quemaduras en la superficie del fruto, mientras que si la intensidad es baja, se produce disminución en el contenido de azúcar, elevando la acidez del jugo.

### **e) Suelos**

La piña posee un sistema radicular superficial y frágil, altamente susceptible al encharcamiento, por lo tanto prefiere suelos livianos con buen drenaje. La piña crece bien en suelos arenosos, arcillo arenosos y franco arcillo arenosos (Montilla *et al.*, 1997).

Suelos ácidos son los mejores para el cultivo de piña y estos corresponden a los que se encuentra entre 4,5 – 5,5 de pH (ligera a fuerte acidez). Cuando el pH del suelo supera del rango establecido el crecimiento de la piña es afectada por deficiencias de K- Mg y en algunos casos de Ca. (PEPP 2010).

#### **1.1.7. Enfermedades de la piña**

Según Rohrbach y Schmitt (1994) las enfermedades del cultivo de la piña pueden ser divididas en aquellas con etiologías abióticas y las de etiologías bióticas. Entre las

principales plagas y enfermedades que afectan al cultivo de piña se pueden mencionar las siguientes:

- Pudrición negra en frutos , hojas y tallos (*Ceratocystis paradoxa* )
- Pudrición del tallo (*Erwinia sp.*)
- Mal de ojo en frutos (*Penicillium sp.*)
- Mal del clavo (*Fusarium sp.*)
- Mancha foliar (*Asterinella sp.*)
- Necrosis apical (*Botrydiplodia theobromae*)
- Necrosis del borde de la hoja (*Curvularia lunata Boedijn*)
- Pudrición del corazón (*Phytophthora cinnamomi Rands*)

## **1.2. PUDRICIÓN NEGRA DE LA PIÑA**

De Seynes descubre el *Ceratocystis paradoxa* en 1886 como agente causal de la podredumbre negra de la piña. En Java el año 1893 Walker y Went encuentran al mismo patógeno causando daños en la caña de azúcar, y el mismo año Masse aísla este hongo de la caña de azúcar procedente de las Antillas.

Por otro lado en 1931, Dickson, citado por Py *et al.* (1987), reporta por primera vez a *C. paradoxa* en Australia, señalando que dicho hongo ha causado pérdidas considerables de diversas frutas, durante al menos 20 años y que el mismo tipo de pudrición había sido observado en otros países como: Brasil, Hawai, Java, Filipinas, Puerto Rico, África del Sur y Taiwán, causando graves pérdidas.

En 1994 Ploetz *et al.*, reportan que este patógeno también ya se encontraba presente en los países como: Nigeria, Argelia, Camerún, Colombia, República Dominicana, Ecuador, Egipto, El Salvador, Ghana, Guyana, Irak, Jamaica, Mauritania, México, Arabia Saudita, Malasia, Trinidad y Tobago, Túnez y Venezuela, sin embargo en el Perú aún no era reportada.

Masse (1893) indica que este patógeno se encuentra ampliamente distribuido en los trópicos y tiene una amplia gama de hospederos. Y es en 1931 que Dickson reporta *Tielaviopsis paradoxa* (De Seyn) Socc. Hohn, forma imperfecta de *C. paradoxa* en piña y en otras plantas del género *Ananas*.

García (1987), Hanlin (1990) y Agrios (2004) indican que el *Ceratocystis paradoxa* se encuentra entre los hongos perfectos que ocasionan las pudriciones negras de raíz y del tallo como de la caña, cocotero, piña, camote, plátano, palma datilera, café, cacao, mango entre otras.

Wesley (1983) indica que la pudrición negra, tiene como agente causal al hongo *Ceratocystis paradoxa* (Dade) Moreau y es la enfermedad de mayor importancia económica en el cultivo de la piña; este patógeno es muy agresivo si las condiciones climáticas le son favorables, puede causar pérdidas de hasta el 70% de la cosecha.

A la pudrición negra de la piña también se le conoce como pudrición de la base del fruto, pudrición blanda, pudrición acuosa, mancha blanca de la hoja y enfermedad de la Thielaviopsis (Py *et al.*, 1987).

*Thielaviopsis paradoxa* es un hongo que produce dos tipos diferentes de esporas asexuales, endoconidios y clamidósporos, este último podrá sobrevivir por largos períodos en el suelo. En la fase teleomórfica se conoce como *Ceratocystis paradoxa* y, en esta fase es raramente en los ambientes naturales (Elliot, 2011).

Pinho *et al.* (2013) indican que el hongo aislado de frutos enfermos de pudrición negra en la piña mostró colonias blancas en PDA, volviéndose negro 1 a 2 días después, con un fuerte aroma afrutado. Peritecia parcial o completamente sumergida, café oscuro o negro, globosa,  $775-1803 \times 150-275 \mu$ , con un cuello largo, negro, marrón claro hacia la punta, ahusamiento,  $575-1387 \times 40-77.5 \mu$ , hifas ostiolares hialino, erecto o moderadamente divergente. Ascosporas elipsoides, a menudo con lados desigualmente curvados, hialinos, no septados, lisos,  $6-10 \times 2-3 \mu$  m. Conidióforos delgados, que surgen lateralmente de la hifa, septados, fialídicos, hialinos a café muy pálidos,  $103-213 \times 7.5-10 \mu$ , disminuyendo hacia la punta y produciendo una sucesión de conidias a través del extremo abierto. Conidios cilíndricos a algo ovales cuando maduran, hialinos a pardos, paredes lisas,  $6.5-10 \times 3-5 \mu$ . Terminal de Aleurioconidia, en cadenas, obovado a oval, de paredes gruesas, marrón,  $9-24 \times 6-10 \mu$ , indica finalmente que el hongo aislado es la especie *Ceratocystis paradoxa*.

Según Ploetz *et al.*, (1994), Ellis (1971) y Morgan y Jones (1964), el hongo *Chalara paradoxa* (de Seyn) Sacc. (Sin. *Thielaviopsis paradoxa* (de Seyn) Hohn es la forma anamórfica del patógeno que causa la pudrición negra de la piña; produce ambas estructuras, conidias, clamidosporas. Los conidióforos son usualmente rectos, pudiendo ir desde hialinos (sin color) hasta un color marrón claro, llegando a medir 250  $\mu$  de longitud. Cada uno tiene al final una abertura por donde emanan las conidias. La conidia tiene una medida variable entre 7 y 15  $\mu$  de largo por 2.5 a 6  $\mu$  de ancho y es de forma cilíndrica hasta elíptica con bordes angulados (rectos) y de color hialino a marrón claro.

Las clamidosporas son lisas y ovaladas teniendo entre 9.5 y 25  $\mu$  de largo por 5.5 a 15  $\mu$  de ancho; se presentan terminalmente en cadenas originando hifas cortas y ramificadas y varían de un color marrón claro a un color marrón oscuro.

Ellis (1971) indica que las colonias son de color marrón oscuro a negro. Coincide en que los conidióforos, son hialinos a marrón claro, con un largo de hasta 50  $\mu$  y con un ancho entre 4 y 6  $\mu$ . La artroconidia se forma en cadenas; son de forma elipsoidal u ovoide, de un color marrón claro hasta marrón oscuro, lisa con paredes generalmente gruesas, a veces presenta una hendidura longitudinal hialina, con un tamaño de 10 a 25  $\mu$  de largo por 8 a 16  $\mu$  de ancho. Presenta fiálides de hasta 200  $\mu$  de largo por 8 a 10  $\mu$  de grosor en la parte más ancha y de 3 a 4  $\mu$  de grosor en las partes más angostas. La fialoconidia tiene cadenas largas, la primera parte de la cadena es cilíndrica e hialina, mientras que la segunda parte es helipsoidal y de color blanco humo a marrón dorado; mayormente de 7 a 14  $\mu$  de longitud por 3 a 6  $\mu$  de ancho.

Y de acuerdo a Ávila (2015), la especie *Ceratocystis paradoxa* (Dade) Moreau, comprende conidióforos de 85- 180  $\times$  4-10  $\mu$ , rectos, lisos, a veces sinuosos en la base, son hialinos a marrón claro, septados en la base; las células conidiogenas 57-80  $\times$  7-10  $\mu$ , de forma lageniforme, a veces cilíndricas, hialinas, 3-4  $\mu$  de diámetro en el ápice. Conidios cilíndricos de 4- 14  $\times$  2-3  $\mu$ , truncados en los extremos, fialídicos, lisos, hialinos, tornándose de color marrón claro y algunas veces de forma variable, cilíndricos-ovales o ligeramente elipsoidales, 4-21  $\times$  3-6  $\mu$ , con hendidura longitudinal, liso o en cadena.

Sobre *Ceratocystis paradoxa* (Dade) C. Moreau, Ploetz *et al.* (1994) mencionan que es la forma perfecta (teleomórfica) de *T. paradoxa*, encontrada en medios artificiales, y que la fase perfecta no se encuentra ni en piña ni en coco, sus mayores hospedantes. El peritecio está inmerso en el tejido afectado, es de color marrón oscuro, globoso, con un diámetro de 190 a 260  $\mu$  y con la presencia de prominencias simples o tan largas que terminan en forma de tenedor. La parte del anillo del peritecio es de color marrón claro a negrozco y mide entre 700 a 1500  $\mu$  de largo, terminando en una serie filamentosas. Las ascosporas son hialinas pudiendo tener entre 5.5 y 9.5  $\mu$  de largo por 2.0 a 6.5  $\mu$  de ancho, no septadas y elipsoidales con desproporcionalidad en los lados y envueltos con una cubierta gelatinosa. Dichas esporas son expulsadas en forma de racimo. Morgan y Jones (1964) encontraron que el peritecio puede llegar hasta 350  $\mu$  y que las hifas son hialinas, no septadas y lisas midiendo 7 a 10 de largo por 2.5 a 4  $\mu$  de ancho.

Por otro lado Agrios (2004) indica que la especie *Ceratocystis paradoxa* vive, crece y se propaga como un parásito no obligado, casi siempre en asociación con la materia orgánica muerta y es favorecido por la considerable humedad del suelo, alta humedad relativa del aire y la temperatura; por tanto el micelio puede sobrevivir con estas condiciones ya sea dentro o fuera del hospedero.

De acuerdo a las investigaciones de Tzeng y Sun (2009) la temperatura para el desarrollo del micelio de este hongo causante de la pudrición negra de la piña (*Ceratocystis paradoxa*) es de 25 a 30 °C con una tasa de crecimiento de 3.2 cm por día; no puede crecer a temperaturas menores de 10°C o mayores de 35 °C; por otro lado, se menciona que también crece y esporula a 28 °C y puede iniciar la esporulación a partir de los 15°C con un pH entre 6.5 y 7.

Y Robles (2006) señala que *C. paradoxa* crece más activamente a temperaturas de 21 a 22°C, por debajo de 10°C el desarrollo se detiene. El nivel de humedad en el suelo o en el medio ambiente es otro factor importante para la germinación de los conidios y la penetración al hospedante.

Sin embargo Correa (2013) afirma que ha observado que las condiciones pueden variar dependiendo del hospedante de donde se aisló, tal es el caso del aislamiento obtenido de cocotero el cual se desarrolla a 28°C y produce mayor cantidad de esporas a 29°C y el

crecimiento como la esporulación se reduce a medida que aumenta la temperatura ya que a 40°C se detiene.

Alvarez y Gómez (1997b) evaluaron el desarrollo de *T. paradoxa* por dos semanas en distintos medios de cultivo, a 25 °C y en la oscuridad, obteniendo como resultado que el mejor medio de cultivo fue el Zanahoria Agar, seguido por la Papa Dextrosa Agar (PDA) y el Jugo-V8 Agar.

Ploetz *et al.*, (1994) señalan que *C. paradoxa* sobrevive como clamidosporas en residuos de piña e en el suelo, dichas clamidosporas germinan en presencia de un medio de cultivo adecuado.

La humedad del suelo juega un papel importante para la presencia de la enfermedad, las condiciones favorables son cuando hay un 20% hasta 100% de humedad, esto porque el hongo se encuentra principalmente en los 25 cm superiores del perfil del suelo (Correa, 213; Raid y Rott, 2015).

La clasificación taxonómica para el agente causal de la pudrición negra de la piña de acuerdo a la Sociedad Española de Fitopatología en el 2007 es la siguiente:

Reino : Fungi  
Phylum : Ascomycota  
Sub-phylum : Pzizomycotina  
Clase : Sordariomycetes  
Subclase : Hypocreomycetidae  
Orden : Microascales  
Familia : Ceratocystidaceae  
Especie : *Thielaviopsis paradoxa*

### **1.3. SÍNTOMAS DE LA PUDRICIÓN NEGRA EN LA PIÑA**

Castro y Hernández (1992) afirman que la fruta afectada por este hongo puede podrirse en término de 5 a 7 días, si las condiciones le son favorables. El inicio de la enfermedad se relaciona directamente con la presencia de heridas en las plantas o frutas, y en el caso de pos cosecha con temperaturas muy altas de almacenamiento (Bartholomew *et al.*, 2003).

Una vez que las plantas están infectadas estas empiezan a manifestar los primeros síntomas a los 10 días (Robles, 2006), este mismo autor menciona que la enfermedad se detiene por la variación de temperatura que oscila entre 28 a 34°C, observándose que cuando incrementa la temperatura a más de 31°C la manifestación de síntomas se detiene. Así mismo, si el hongo penetra por heridas, los síntomas se observan en menor tiempo.

Barahona y Sancho (1998) indican que los frutos maduros sufren una descomposición total, los tejidos se suavizan, adquiriendo una consistencia acuosa y un color pardo amarillento. En este estado se puede percibir un aroma agradable producto de la fermentación de la glucosa. Externamente la cáscara se observa de color café claro y con apariencia acuosa, al tacto se siente suave y al presionar un poco se rompe, dejando salir los líquidos que contiene. El avance del hongo dentro de los tejidos ocurre por la difusión de enzimas que matan las células del hospedero. Finalmente se tiene una masa en descomposición en cuya superficie se observa una coloración gris o negro que corresponden a los conidios del hongo.

El hongo que produce esta enfermedad no es capaz de penetrar sino existen heridas que le sirvan de puerta de entrada. Las infecciones más comunes son las que se originan en la base, a partir del corte. También puede presentarse infecciones laterales que se inician en las partes heridas o golpeadas. Una característica muy particular de esta enfermedad es que toda herida o capa expuesta de la pulpa se cubre de una capa negra compuesta por macrosporas del hongo, esto también puede observarse cerca de la corona del fruto (Barahona y Sancho, 1998).

Montilla *et al.* (1997) manifiestan que esta enfermedad afecta principalmente los frutos, aunque se puede manifestar en diferentes partes de la planta. Sobre las hojas se presentan manchas blanco-amarillentas en condiciones de alta humedad y fuertes vientos. Sin embargo, allí no llega a esporular el hongo porque las lesiones se secan rápidamente. A sí mismo a nivel de los brotes o hijos (corona, basales, axilares) se produce una pudrición negra basal, la cual puede causar serias pérdidas del material de siembra, luego de su plantación, en condiciones de alta humedad causa la destrucción total de los tejidos más suaves, sino hay un adecuado curado de las mismas.

Robles (2006), indica que generalmente la infección ocurre a través de picaduras de insectos, grietas de crecimiento o directamente a través de las aberturas naturales de las frutas o pedúnculo. Siendo un patógeno de herida, en el caso de piña.

#### **1.4. CONTROL CULTURAL**

De acuerdo a Garofalo y Mc Millan (2004) se recomienda aplicar las siguientes estrategias para evitar el éxito del patógeno:

- Evitar encharcamiento de los terrenos
- Evitar heridas mecánicas a las plantas
- Realizar el control de insectos que causan heridas al cultivo
- Eliminar las plantas afectadas (incluyendo raíces),
- Evitar el movimiento de suelo en equipos y herramientas de trabajo
- Desinfestar las herramientas (se puede usar alcohol 50:50 en agua o hipoclorito de sodio al 10%).

Así mismo, es necesario la eliminación de los residuos de cosecha que puedan servir como fuente de inóculo, además de la rotación de cultivo, buena preparación del terreno, manejo oportuno de malezas, fertilización adecuada, un sistema de riego eficiente y adicionar materia orgánica al suelo, (Bautista, 2014).

Masís (2008) indica lo siguiente:

- En el campo se debe evitar dejar la semilla en puños por muchos días, ya que esto crea a lo interno condiciones de alta humedad y temperatura que favorecen al patógeno.
- Cuando se utilice semilla tipo corona, no dejar residuos de pulpa en la semilla.
- Se debe evitar que los cosechadores envíen a la planta empacadora frutas afectadas.
- Durante el transporte a la planta se debe evitar que la fruta se golpee, ya que esto favorece la entrada del patógeno.
- No dejar la fruta en el patio de la empacadora por mucho tiempo sin el tratamiento poscosecha.
- Adecuado monitoreo y control de la cadena de frío durante el transporte de la fruta al mercado de destino.

## 1.5. CONTROL BIOLÓGICO

El control biológico ha sido considerado una alternativa más natural y ambientalmente aceptable que el tratamiento químico existente (Baker y Paulitz, 1996).

Las especies de *Trichoderma* producen metabolitos tanto volátiles como no volátiles que afectan negativamente el crecimiento de diferentes hongos (Bruce *et al.*, 1984, Corley *et al.*, 1994; Horvath *et al.*, 1995; Moses *et al.*, 1975).

Eziashi *et al.* (2006) señalan que pruebas de metabolitos volátiles, no volátiles y de difusión directa mostró que todas las especies de *Trichoderma* excepto *T. aureovirida* inhibió el crecimiento de *C. paradoxa*. En todas las pruebas realizadas, *T. polysporum*, *T. viride* y *T. hamatum* redujo significativamente ( $p < 0.05$ ) el crecimiento micelial de *C. paradoxa*.

Eziashi *et al.* (2006) indican que las semillas germinadas de la palma aceitera tratadas con *Trichoderma species* y la solución de Benlate redujeron la infección de *Ceratocystis paradoxa*, pero la reducción varió. No se registraron infecciones en el primer día después de la inoculación. La infección se notó en el tercer día con *Trichoderma polysporum*, *T. viride* y benlate con reducciones significativas ( $p < 0.005$ ) que las otras especies de *Trichoderma*. En el séptimo día *T. polysporum*, *T. viride* y benlate fueron significativamente ( $p < 0,005$ ) eficaz y similar en la reducción de *C. paradoxa*. Pero más consistencia fue *T. polysporum* con 13.0 y 10.0% para las semillas germinadas heridas y no dañadas en el día 14.

### 1.5.1. *Trichoderma* controlador biológico

Cook y Baker (1989), citado por Leyva (2006) indican que el género *Trichoderma* está compuesto por hongos presentes en forma natural en casi todos los suelos y otros hábitats, coloniza las raíces de la planta con facilidad.

Harman (2000), citado por Leyva (2006) indica que el *Trichoderma* ha desarrollado mecanismos para atacar y parasitar a otros hongos, actuando como biocontrolador y colonizador de raíces. Durante su evolución, el *Trichoderma* fue adquiriendo la capacidad de parasitar y/o excluir a otros hongos competidores. Entre los métodos de acción del hongo se pueden mencionar:

- Parasitismo directo
- Producción de antibióticos
- Competencia por nutrientes y espacio
- Inactivación de enzimas del patógeno
- Inducción de resistencia en la planta
- Mejoramiento del desarrollo radicular
- Estimular el crecimiento de la planta.

La forma más común de *Trichoderma* de parasitar a otros hongos, es el parasitismo directo, lo cual se logra envolviendo las células del hongo (hifas) a parasitar (hospedante) en forma de tirabuzón. *Trichoderma* secreta enzimas (celulasas, gluconasas, lipasas, proteasas y quitinasas) que ayudan a disolver la pared celular de las hifas del hospedante, facilitando la inserción de estructuras especializadas y del micelio del biocontrolador, que se encarga de absorber los nutrientes del interior del hongo hospedante. Al final el micelio del hongo parasitado queda vacío y con perforaciones.

Chávez (2006) sostiene que el *Trichoderma* también cumple con acciones indirectas como: impulsar mecanismos de defensa fisiológicos y bioquímicos de la planta como: tolerancia al estrés por parte de la planta, mejorar la solubilización y absorción de nutrientes inorgánicos y de esta manera genera una resistencia inducida.

Castro y Rivillas (2012) indican que el rango de temperatura para el crecimiento de *Trichoderma* varía entre 15 - 30°C, con un óptimo de 25°C, temperaturas mayores a 30°C limitan el crecimiento y desarrollo del hongo, e inicia la formación de clamidosporas. Las condiciones adecuadas de humedad están en el 70%, pero tiene la capacidad de crecer en un rango entre 20% y 80%. La condición de pH fluctúa entre 5.5 y 7.5, con un óptimo de 6.6.

### **Especies de *Trichoderma***

#### ***a. Trichoderma harzianum***

Roselló (2003) indica las colonias de *Trichoderma harzianum* presentan un crecimiento rápido, poco uniforme y con penachos de pelos aislados, al principio hialinas y después adquieren tonalidades de color verde debido a la producción de conidios.

Castillo (2004) indica que *T. harzianum* es un bio-regulador y antagonista natural de los fitopatógenos *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *F. roseum*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia* spp., *Pythium* spp, *Alternaria* spp., *Armillaria mellea*, *Rosellina* spp.

#### ***b. Trichoderma viride***

Neemproducts (2008), citado por Guilcapi (2009) indica que *Trichoderma viride* es un organismo antagonista de hongos presentes en el suelo y altamente efectiva para el control de semillas y el suelo de enfermedades especialmente legumbres y semillas oleaginosas. Es un hongo cuando se aplica junto con las semillas coloniza las mismas, se multiplica; no sólo mata a los patógenos presentes en la superficie de la semilla, sino que brinda protección al suelo de agentes patógenos.

### **1.6. CONTROL QUÍMICO**

Según Vivienne y Mondino (2011) el control químico es el uso de sustancias químicas para matar o inhibir al patógeno en alguna etapa de la patogénesis. La mayoría son fungistáticos, bacteriostáticos, o sea, no matan sino que inhiben el desarrollo del microorganismo.

#### **Clasificación**

Según Vivienne y Mondino (2011) la clasificación se da de acuerdo al tipo de patógeno y donde se aplican:

- Fungicidas
- Bactericidas
- Nematicidas
- Desinfectantes de suelo
- Desinfectantes de materiales varios

Además se pueden considerar sustancias con acción indirecta:

- Insecticidas, acaricidas, nematicidas que se usen para controlar vectores de virus.
- Herbicidas que disminuyan la población de huéspedes alternativos.
- Sustancias que inducen resistencia sistémica en la planta. Este es un modo de acción en desarrollo actualmente.

Según el espectro de acción:

- Amplio (inespecíficos, no selectivos)
- Reducido espectro de acción

La selectividad no es una característica absoluta, está relacionada en alto grado con la cantidad de producto que contacta con el organismo y con la biomasa de éste. El espectro de acción abarca aquellos microorganismos que son inhibidos con cantidades pequeñas de la sustancia en cuestión, cantidades suficientemente pequeñas como para hacer rentable y práctico su aplicación (Vivienne y Mondino, 2011).

Hay que recordar que aún los productos más específicos no son muy selectivos, generalmente no diferencian entre organismos de un mismo grupo taxonómico, por ejemplo un género de hongos. Y ya que los enemigos naturales o antagonistas de los fitopatógenos pueden ser organismos emparentados con éstos, al aplicar un producto suele pasar que se está “combatiendo” también a los antagonistas.

Según Cisneros (2012) el sitio de acción son dos:

- Sitio de acción específicos (unisitios)
- Múltiples sitios de acción (multisitios)

Indica que el sitio de acción se refiere a la forma en que el fungicida ataca al hongo. En general coincide que los fungicidas de contacto son de múltiples sitios de acción (atacan por muchos lados al hongo), mientras que los fungicidas que penetran a la planta en general van a afectar al hongo en algún sitio específico de este. Deben poder diferenciar entre el hongo y la planta.

De acuerdo a Vivienne y Mondino (2011) el espectro de acción y sitio de acción son conceptos diferentes y no están relacionados, ya que un fungicida puede ser de sitio de acción específico y tener un amplio espectro de acción. (Ej. Benomil)

Según su localización respecto al vegetal, se clasifican en:

- De contacto
- Sistémicos.
- Penetrantes, translaminares, “loco-sistemicos”

### **1.6.1. Fungicidas de contacto**

De acuerdo a Vivienne (2003) los fungicidas de contacto son los más antiguos, incluyen los principios activos más usados a nivel mundial. En general son de amplio espectro. Los de modo de acción conocido son de múltiples sitios de acción. Los fungicidas de contacto se dividen en dos:

- Orgánicos
- Inorgánicos

#### **Orgánicos**

##### **Ditiocarbamatos**

- Mancozeb, maneb, zineb, (etilen-bisditiocarbamatos = EBDC);
- Metiram (disulfuro de polietilentiouramina + Zn)
- Ferbam, ziram, (dimetil-ditiocarbamatos)
- Tiram, (terametil tiuram)
- Propineb. (propilen-bisditiocarbamato)

Reaccionan de manera general con los grupos -SH, inhiben enzimas, interfieren con la producción de energía dentro de la célula.

Son de los productos más usados actualmente, especialmente el Mancozeb. De amplio espectro, efectivos para *Phytophthora infestans*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria spp.*, *Septoria spp.*, etc. El Mancozeb posee cierta acción preventiva contra royas. Inefectivos contra oidios.

Considerados de baja fitotoxicidad en el uso normal, si por aplicación excesiva y cutícula muy fina, ingresan al vegetal lo dañan localmente.

### **1.6.2. Fungicidas sistémicos**

En general, los fungicidas son de amplio espectro, aunque en función de cada materia activa se controlan mejor unas enfermedades que otras. La principal diferencia entre fungicidas es su método de acción. Así los fungicidas se pueden dividir en dos grandes grupos, según su modo de acción: fungicidas de contacto y fungicidas sistémicos (Mondino, 2003).

## **Benzimidazoles**

Dentro de este grupo se encuentran:

- Benomil
- Carbendazim
- Metil tiofanato
- Tiabendazol
- Fuberidazol.

### **Características de los benzimidazoles**

- a. Inhiben la síntesis de la tubulina, el sitio de acción es un aminoácido de la  $\beta$ -tubulina. Las subunidades alfa y beta de la tubulina se polimerizan para dar origen a los microtúbulos, que forman parte del citoesqueleto además la tubulina puede ensamblarse nuevamente y originar el huso mitótico, que participa en la separación de los cromosomas. Esta sustancia existe en todas las células eucariotas, aunque Oomycetes y plantas son insensibles a los benzimidazoles.
- b. El cambio de un sólo aminoácido (fenilalanina  $\rightarrow$  tirosina, o arginina  $\rightarrow$  histidina) se traduce en resistencia. Las cepas insensibles tienen la misma habilidad competitiva como las sensibles.
- c. Existe resistencia cruzada negativa con Dietofencarb.
- d. Son de fácil absorción por la planta: metil tiofanato > tiofanato > benomil > carbendazim > tiabendazol.
- e. Mejoran la absorción, la acidificación y los humectantes no iónicos.
- f. Transporte por los vasos del xilema (acrópeto).

Los Benzimidazoles son de amplio espectro de acción principalmente dentro de asco- y deuteromicotina. Contra los géneros: *Venturia*, *Erysiphe*, *Sphaerotheca*, *Podospaera*, *Botrytis*, *Monilinia*, *Sclerotinia*, *Nectria*, *Fusarium*, *Verticillium*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Ascochyta*, *Phoma*, *Phomopsis*, *Thielaviopsis*, *Diplocarpon*, *Mycosphaerella*, *Botryosphaeria*, *Pyricularia*, *Gloesporium*, *Cercospora*, *Septoria*, *Ceratocystis*, y *Rhizoctonia*.

No poseen acción contra: Oomycetes (*Phytophthora*, *Peronospora*, etc.), Zigomycetes (*Rhizopus*) y la mayoría de los basidiomycetes (royas carbonas), ni contra algunas especies de Deuteromycetes (*Alternaria*, *Helminthosporium*). No poseen acción bactericida.

Para reducir los problemas de resistencia FRAC recomienda utilizar mezclas (preferido) o alternar con otros sitios de acción.

Son lombricidas y son retenidos en los primeros 2 - 5 cm del suelo. Pueden aumentar la incidencia de ácaros al matar tanto a los que son plaga como a los predadores (enemigos naturales), re infestando rápidamente los fitófagos.

### **1.6.3. Control químico en la pudrición negra de la piña**

El tratamiento post cosecha convencional de mayor uso para prevenir el daño de hongos y mohos en piña es la selección de un preservante que consiste en una mezcla de fungicidas y ceras. Los principales fungicidas utilizados para el control de la pudrición en corona y pedúnculo son el benomyl y el triadimefon cuya acción es inhibir el crecimiento del patógeno (Montero y Cerdas, 2005).

Masís (2008) en el manual de Principales Enfermedades del Cultivo de la Piña, recomienda lo siguiente:

- Procurar un adecuado tratamiento de semilla, el cual debe incluir productos a base de triadimefon o propiconazole.
- Aplicar un tratamiento poscosecha con cera y refuerzo al pedúnculo con productos a base de triadimefon, procloraz o propiconazole.

De acuerdo a Alvarado *et al.* (2006) la pudrición en corona y pedúnculo causada por *Ceratocystis paradoxa* fue controlada satisfactoriamente por Biocto TM 6 a 4.5 y 6.0 ml/L.

En pruebas in vitro realizadas en Brasil se utilizó Tebuconazol solo o en combinación con Trifloxistrobina que inhibió el desarrollo del hongo (Sansoli, 2015).

De acuerdo a Villachica (2006) los fungicidas que previenen el desarrollo de la pudrición negra de la piña en las frutas cosechas e inoculadas en el experimento de campo fue: Benomil, Bromuconazol, Procloraz, Triadimefon y Trifumizol; teniendo mejores resultados con Benomil y Procloraz.

**1.6.4. Fichas técnicas de productos químicos: MANZATE® 200 D, SPORTAK 45 CE, BENZOMIL® 500 y SYL®**

**FICHA TÉCNICA DE MANZATE® 200 D**

<b>GENERALIDADES</b>	
<b>Nombre comercial</b>	MANZATE® 200 D
<b>Ingrediente activo</b>	Mancozeb
<b>Formulación</b>	Polvo Mojable
<b>Composición química</b>	Mancozeb 800 g/kg - Ingredientes inertes 200 g/kg
<b>Compatibilidad</b>	El producto es incompatible con productos de reacción alcalina como caldo bórdales, cal y sulfuro de Lima
<b>DL50 oral aguda DL50 dermal</b>	> 5000 mg/kg > 2000 mg/kg
<b>Categoría toxicológica</b>	Ligeramente peligroso
<b>Mecanismo de acción</b>	Contacto. Inhibe la actividad enzimática de los hongos
<b>Momentos de aplicación</b>	En aplicaciones preventivas el intervalo puede variar de 7 a 14 días; reduciéndose de 4 a 5 días si las condiciones de temperatura y humedad favorecen el desarrollo del hongo.

**USOS Y DOSIS**

<b>CULTIVO</b>	<b>PLAGAS</b>		<b>DOSIS g/cil 200 L</b>	<b>P.C. (días)</b>	<b>L.M.R. (ppm)</b>
	<b>Nombre común</b>	<b>Nombre técnico</b>			
<b>Algodón</b>	"Mancha negra"	<i>Alternaria tenuis</i>	400 - 500	7	0.5
<b>Tomate</b>	"Hielo o Ranca" "Mancha negra"	<i>Phytophthora infestans</i> <i>Alternaria solani</i>	400 - 500	7	4
<b>Papa</b>	"Hielo o Ranca" "Mancha negra"	<i>Phytophthora infestans</i> <i>Alternaria solani</i>	400 - 500	7	0.2
<b>Cebolla</b>	"Mildiu"	<i>Peronospora destructor</i>	400 - 500	7	0.5
<b>Lechuga</b>	"Mildiu"	<i>Bremia lactucae</i>	400 - 500	7	10
<b>Melón Sandía</b>	"Mildiu"	<i>Pseudoperonospora cubensis</i>	400 - 500	7	0.5 10
<b>Vid</b>	"Podredumbre gris"	<i>Botrytis cinerea</i>	400 - 500	7	5
<b>Arroz</b>	"Mancha carmelita"	<i>Helminthosporium oryzae</i>	2 - 3 g/Kg de semilla	7	ND

## FICHA TÉCNICA DE SPORTAK 45 CE

<b>GENERALIDADES</b>	
<b>Nombre comercial</b>	SPORTAK 45 CE
<b>Ingrediente activo</b>	Prochloraz
<b>Formulación</b>	Concentrado emulsionable
<b>Concentración</b>	450 g/L
<b>Compatibilidad</b>	Con la mayoría de plaguicidas agrícolas, No se recomienda mezclarlo con productos de fuerte reacción alcalina.
<b>DL50 oral aguda</b> <b>DL50 dermal</b>	> 0.9 – 1.1 mg/kg 5000 mg/kg
<b>Categoría toxicológica</b>	Moderadamente peligroso
<b>Mecanismo de acción</b>	Sistémico. Inhibe la biosíntesis del ergosterol en el patógeno,
<b>Momentos de aplicación</b>	Está recomendado especialmente para desinfección de semillas, coronas, bulbos, tubérculos, esquejes y otros órganos de propagación también para tratamientos post cosecha.

## USOS Y DOSIS

CULTIVO	PLAGAS		DOSIS (L/HA)	DOSIS ml/cil	%	P.C. (días)	L.M.R. (ppm)
	Nombre común	Nombre técnico					
<b>Mango</b>	"Antracnosis"	<i>Colletotrichum gloeosporoides</i>	--	70 - 150	--	7	0.5
<b>Papaya</b>	"Mancha foliar"	<i>Cercospora spp.</i>	--	70 - 150	--	7	4
<b>Frijol</b>	"Roya"	<i>Uromyces phaseoli</i>	--	70 - 150	--	7	0.2
<b>Tomate</b>	"Alternaria"	<i>Alternaria solani</i>	--	70 - 150	--	7	0.5
<b>Espárrago</b>	"Fusarium"	<i>Fusarium spp.</i>	--	100-200	--	7	0.5 10
<b>Palto</b>	"Lasiodiplodia"	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	--	--	0.1	7	5
<b>Vid</b>	"Muerte regresiva"	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	1.25	--	--	7	ND
<b>TRATAMIENTO POST – COSECHA</b>							
<b>Mango</b>	Complejo de hongos de pudrición en post-cosecha	<i>Penicillium spp,</i> <i>Alternaria spp,</i> <i>Rhizopus spp,</i> <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	50 – 100 ml/100 litros de agua		No tiene	2	

## FICHA TÉCNICA DE BENZOMIL® 500

GENERALIDADES	
<b>Nombre comercial</b>	BENZOMIL® 500
<b>Ingrediente activo</b>	Benomyl
<b>Formulación</b>	Polvo mojable
<b>Concentración</b>	500 g/Kg
<b>Compatibilidad</b>	Con plaguicidas y afines de uso frecuente, excepto con productos que sean de reacción alcalina.
<b>DL50 oral (ratas)</b> <b>DL50 dermal (conejo)</b>	> 10000 mg/kg > 10000 mg/kg
<b>Categoría toxicológica</b>	Ligeramente peligroso
<b>Mecanismo de acción</b>	Sistémico/Contacto. Inhibe la formación de la beta tubulina.
<b>Momentos de aplicación</b>	Puede ser usado para desinfección de semillas, mediante inmersión durante 5 minutos de la semilla a tratar para una mejor impregnación, también puede ser usado para aplicaciones dirigidas al cuello de planta (drench). Debe ser aplicado un máximo de 2 veces por ciclo de cultivo y alternándolo con fungicidas de diferentes modos de acción.

## USOS Y DOSIS

CULTIVO	PLAGAS		DOSIS Kg/Ha	P.C. (días)	L.M.R. (ppm)
	Nombre común	Nombre técnico			
<b>Algodón</b>	"Chupadera fungosa"	<i>Rhizoctonia solani</i>	3.5-4.0 g/Kg o 165 g por quintal de semilla*		
<b>Espárrago</b>	"Chupadera fungosa"	<i>Fusarium oxysporum</i>	0.4 – 0.6	N.D.	0.1
<b>Frijol</b>	"Chupadera fungosa"	<i>Rhizoctonia solani</i>	3.5 – 4.0 g/Kg de semilla*		
<b>Papa</b>	"Rhizoctoniasis"	<i>Rhizoctonia solani</i>	200 g/200 L. Sumergir por 3 minutos en la solución.		
<b>Vid</b>	"Muerte regresiva"	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	3.0	15	0.3
<b>Zapallo</b>	"Oidium"	<i>Erisiphe cichoracearum</i>	0.4 g/Ha	7	2

## FICHA TÉCNICA DE SYL®

<b>GENERALIDADES</b>	
<b>Nombre comercial</b>	SYL®
<b>Ingrediente activo</b>	Propineb
<b>Formulación</b>	Polvo mojable
<b>Concentración</b>	700 g/Kg
<b>Compatibilidad</b>	No es compatible con productos de reacción alcalina.
<b>DL50 oral</b> <b>DL50 dermal</b>	< 1000 mg/kg (ratas) < 1000 mg/kg (conejo)
<b>Categoría toxicológica</b>	Ligeramente peligroso
<b>Mecanismo de acción</b>	Contacto. Reacciona con las enzimas sulfhidrilicas e impide su acción.
<b>Momentos de aplicación</b>	Iniciar las aplicaciones cuando las condiciones ambientales sean favorables para el desarrollo de la enfermedad o tan pronto se observen los primeros síntomas. El intervalo de aplicación será de 7 a 10 días. Disminuir la frecuencia de aplicación cada 5 días, si las condiciones de temperatura y humedad favorecen el desarrollo del hongo.

## USOS Y DOSIS

CULTIVO	PLAGAS		DOSIS Kg/cil 200 L	P.C. (días)	L.M.R. (ppm)
	Nombre común	Nombre técnico			
<b>Papa</b>	"Hielo o Ranca"	<i>Phytophthora infestans</i>	0.5 – 1.0	7	0.2
<b>Tomate</b>	"Hielo o Ranca" "Mancha de hoja"	<i>Phytophthora infestans</i> <i>Alternaria solani</i>	0.5 – 0.75	7	5
<b>Algodón</b>	"Mancha de hoja"	<i>Alternaria tenuis</i>	0.5 – 0.6	7	3
<b>Zapallo</b> <b>Melón</b> <b>Sandía</b>	"Mildiu" "Mancha de hoja"	<i>Pseudoperonospora cubensis</i> <i>Alternaria spp.</i>	0.5 – 0.6	7	0.2 0.5 1
<b>Naranja</b>	"Podredumbre gris"	<i>Botrytis cinerea</i>	0.5 – 0.6	7	2
<b>Esparrago</b>	"Cercosporiosis"	<i>Cercospora asparagi</i>	0.5 – 0.6	7	0.1

## CAPÍTULO II METODOLOGÍA

### 2.1. UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO

Los experimentos se llevaron a cabo en el laboratorio de Fitopatología de la Escuela Profesional de Agronomía de la Universidad Nacional De San Cristóbal De Huamanga, que está ubicada en el distrito de Ayacucho, provincia de Huamanga.

#### 2.1.1. Ubicación política

Distrito : Ayacucho

Provincia : Huamanga

Región : Ayacucho

#### 2.1.2. Ubicación geográfica (zona 18L)

Latitud : 13°14'54" S

Longitud : 74°22'22" O

Altitud : 2642 msnm



**Figura 2.1.** Ubicación geográfica de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga

## **2.2. MATERIALES, EQUIPOS E INSUMOS**

### **2.2.1. Materiales**

- Cuchilla
- Papel toalla
- Bolsas plásticas
- Marcador indeleble
- Sacabocados
- Porta objetos
- Cubre objetos
- Cuaderno de campo
- Placa Petri
- Mecheros
- Vaso precipitado
- Matraz Erlenmeyer
- Tapers hermético
- Bisturí
- Pinzas
- Pipetas
- Agujas
- Regla
- Cinta parafilm
- Pizetas
- Colador
- Varillas de vidrio
- Lapiceros indelebles
- Materiales de escritorio

### **2.2.2. Equipos**

- Microscopio compuesto
- Esteroscopio
- Cocina eléctrica
- Balanza de precisión
- Termómetro ambiental
- Flujo laminar
- Estufa
- Refrigeradora
- Autoclave

### **2.2.3. Insumos**

- Alcohol
- Hipoclorito de sodio al 0.5% y 1.0%
- Lactofenol
- Agua estéril
- Papa
- Zanahoria
- Jugo V8
- Ampicilina
- Fungidas
- Biocontroladores
- Agar
- Dextrosa



**Figura 2.2.** Materiales e insumos utilizados en el experimento

## 2.3. PLANTEAMIENTO DEL EXPERIMENTO

### 2.3.1. Tipo de investigación

La investigación es de tipo aplicada y nivel experimental puesto que se maneja variables experimentales en condiciones controladas con el fin de determinar el tipo de medio, la temperatura y el control más eficaz para el patógeno en estudio.

### 2.3.2. Factores de estudio experimental

Los factores para evaluar son:

- Medios de cultivo (m)
- Temperaturas (r)
- Productos para el control de la pudrición negra de la piña (p)
- Dosis de los productos para el control de la pudrición negra de la piña (d)

#### **Factor 1:** Medios de cultivo

M1: Papa Dextrosa Agar (PDA)

M2: Papa Zanahoria Agar (PZA)

M3: Jugo V8 Agar (V8)

#### **Factor 2:** Temperaturas

R1: 10 °C

R2: 20 °C

R3: 25 °C

R4: 30 °C

**Factor 3:** Productos para el control de la pudrición negra de la piña

P1: Fungicida sistémico (Benomil)

P2: Fungicida sistémico (Procloraz)

P3: Fungicida de contacto (Mancozeb)

P4: Fungicida de contacto (Propineb)

P5: Controlador biológico (*Trichoderma viride*)

P6: Controlador biológico (*Trichoderma harzianum*)

**Factor 4:** Dosis de los productos por volumen de AGAR para f1, f2, f3 y f4

D1: VR (cantidad de dosis recomendado)

D2: VR - 50%

D3: SD (sin dosis)

### **2.3.3. Descripción de los tratamientos**

Para los factores 1 y 2 se contó en total con 12 tratamientos, en base a tres tipos de medio de cultivo y cuatro temperaturas diferentes, esto con el objetivo de determinar el tipo de medio de cultivo y temperatura adecuada para el crecimiento in vitro del patógeno. En la tabla 2.1 se describe cada tratamiento.

Y para los factores 3 y 4 se contó en total con 10 tratamientos, en base a cuatro productos químicos y dos productos biológicos, a los cuales se le añadió dos niveles de dosis, excepto a los productos p5 y p6, todo esto con el objetivo de determinar el producto y dosis que presenta un mayor efecto en el control in vitro del patógeno. En la tabla 2.2 se describe cada tratamiento.

**Tabla 2.1.** Tratamientos estudiados para los medios de cultivo y temperaturas

TRATAMIENTO	CÓDIGO	MEDIOS DE CULTIVO (M)	TEMPERATURA (R)
T1	M1R1	Papa Dextrosa Agar (PDA)	10 °C
T2	M1R2	Papa Dextrosa Agar (PDA)	20 °C
T3	M1R3	Papa Dextrosa Agar (PDA)	25 °C
T4	M1R4	Papa Dextrosa Agar (PDA)	30 °C
T5	M2R1	Papa Zanahoria Agar (PZA)	10 °C
T6	M2R2	Papa Zanahoria Agar (PZA)	20 °C
T7	M2R3	Papa Zanahoria Agar (PZA)	25 °C
T8	M2R4	Papa Zanahoria Agar (PZA)	30 °C
T9	M3R1	Jugo V8 Agar (V8)	10 °C
T10	M3R2	Jugo V8 Agar (V8)	20 °C
T11	M3R3	Jugo V8 Agar (V8)	25 °C
T12	M3R4	Jugo V8 Agar (V8)	30 °C

**Tabla 2.2.** Tratamientos estudiados para los productos químicos y las dosis

TRATAMIENTO	CÓDIGO	PRODUCTOS DE CONTROL (P)	DOSIS (D)
T1	P1D1	Benomil (Benzomil)	(VR)
T2	P1D2	Benomil (Benzomil)	(VR-50%)
T3	P2D1	Procloraz	(VR)
T4	P2D2	Procloraz	(VR-50%)
T5	P3D1	Mancozeb (Skekura)	(VR)
T6	P3D2	Mancozeb (Skekura)	(VR-50%)
T7	P4D1	Propineb	(VR)
T8	P4D2	Propineb	(VR-50%)

**Tabla 2.3.** Tratamientos estudiados para los productos biológicos

TRATAMIENTO	ENFRENTAMIENTO
T1	Testigo <i>Thielaviopsis</i>
T2	Testigo <i>Trichoderma harzianum</i>
T3	Testigo <i>Trichoderma viride</i>
T4	<i>Thielaviopsis</i> vs <i>T. harzianum</i>
T5	<i>Thielaviopsis</i> vs <i>T. viride</i>

#### **2.3.4. Diseño experimental**

Para los factores 1 y 2 se utilizó el Experimento Factorial en DCR, con 12 tratamientos y 3 repeticiones, obteniéndose un total de 36 unidades experimentales.

Para el tercer y cuarto factor se utilizó el Experimento Factorial en DCR, con 9 tratamientos y 3 repeticiones, obteniéndose un total de 27 unidades experimentales.

#### **2.3.5. Duración del experimento**

El experimento planteado se realizó durante los años 2017 y 2018 teniendo una duración total de 5 meses (150 días).

### **2.4. INSTALACIÓN Y CONDUCCIÓN DEL EXPERIMENTO**

Los experimentos se llevaron a cabo aplicando los conocimientos de los libros de Fitopatología (Agrios G. 2004) y Metodología para la investigación fitopatológica (French E. 1980)

#### **2.4.1. Aislamiento del hongo patógeno**

##### **a) Selección del material enfermo**

Previo revisión bibliográfica sobre los síntomas que presenta la pudrición negra de la piña, se recolectaron frutos de piña de las variedades: Cayena lisa y Golden del mercado mayorista Nery García Zárate. Este mercado es abastecido con frutos traídos desde el VRAEM y la selva de Junín.

##### **b) Incubación**

Los frutos recolectados se llevaron al laboratorio de fitopatología de la Universidad Nacional De San Cristóbal de Huamanga; donde se procedió a lavarlos con agua estéril, para ser incubados por cuatro días a temperatura ambiente en cámaras húmedas, con el fin de que las estructuras fúngicas sean visibles para su posterior aislamiento.

Transcurridos los tres días de haber instalado las muestras en las cámaras húmedas, se hizo la evaluación de presencia de micelios aéreos en las superficies de las muestras como se puede observar en la figura 2.1. Para luego ser aislado en el medio de cultivo Papa Agar Dextrosa, que fue previamente preparada.



**Figura 2.3.** Presencia de micelios del agente causal de la pudrición negra de la piña en el interior y exterior de los frutos incubados.

### **c) Aislamiento y purificación**

Por los síntomas descritos en la literatura, después de los cuatro días de incubación del fruto enfermo se identificó el tejido enfermo, el cual se lavó con agua estéril, después se esterilizó superficialmente con 1,0% de NaClO (hipoclorito de sodio) durante 60 s y finalmente se enjuagó con agua estéril y se procedió a la siembra en el medio de cultivo PDA. Las placas sembradas y selladas con parafilm se incubaron a 27°C, en oscuridad; luego de aparecidas las colonias, se repicaron a placas limpias conteniendo PDA, esto con la finalidad de obtener cultivos puros. Constatada la pureza de los cultivos, se guardaron en refrigeración a 15°C, para su mantenimiento y conservación. Todo el procedimiento de aislamiento se puede apreciar en el Anexo.

### **d) Aislamiento en diferentes medios de cultivo y temperaturas**

Para la prueba, se utilizaron los siguientes tipos de medio:

#### **PAPA DEXTROSA AGAR (PDA)**

- Papas partidas (picadas) 250 gr.
- Dextrosa 18 gr.
- Agar 18 gr.
- Agua destilada 1000 ml.

#### PAPA ZANAHORIA AGAR (PZA)

- Papas partidas (picadas) 250 gr.
- Zanahorias partidas (picadas) 250 gr.
- Agar 20 gr.
- Agua destilada 1000 ml.

#### AGAR V- 8

- Jugo V-8 200 ml
- Carbonato de calcio 3 gr.
- Agar 20 gr.
- Agua destilada hasta completar 1000 ml.

#### **Preparación de medios**

Cocinar las papas partidas en 500 ml de agua por 30 minutos. Disolver el agar en 500 ml de agua. Colocar el extracto de papa en un colador y mezclar con el agar diluido. Agregar después la dextrosa y mezclar. Completar el volumen a 1000 ml con agua destilada. Distribuir en matraces y esterilizar a 15 Lb por 20 minutos en autoclave.

Similar procedimiento se siguió para la preparación de los demás medios de cultivo. Después de la esterilización los medios se dejaron enfriar, en una cámara especial libre de corrientes de aire y polvo para impedir la contaminación con otros agentes microbianos, hasta que estuvieron tibios y luego utilizando el mechero para evitar cualquier tipo de contaminación se le adicionó ampicilina, en seguida se realizó el plaqueado en placas Petri con aproximadamente 20 ml de medio.

#### **Siembra en placas**

En las placas conteniendo medios de cultivo, y con la ayuda de un estilete estéril se sembró en el centro, esporas transferidas de esporulaciones desarrolladas en medios PDA incubados a 27°C por 72 Hrs.

Se utilizaron los siguientes medios de cultivo como tratamientos de estudio:

- PDA
- PZA
- V8

### **Incubación del hongo patógeno a diferentes temperaturas**

Para determinar la T° que mejor favorece al crecimiento micelial y el desarrollo de las estructuras fructificantes se realizaron pruebas de temperaturas a 10, 20, 25 y 30°C; en los tres medios de cultivo: PDA, PZA y V8.

Se sembraron 3 placas para cada temperatura en estudio (10, 20, 25 y 30°C). Para la incubación en las temperaturas de 20, 25 y 30°C se utilizó una estufa eléctrica calibrada. Por otro lado para la incubación a 10°C se utilizó una refrigeradora calibrada. Se incubó hasta que los micelios del hongo patógeno llenen la placa Petri.

#### **2.4.2. Caracterización y reconocimiento de las estructuras del patógeno**

Las características macroscópicas que se consideraron fueron: el color, aspecto de la colonia y la velocidad de crecimiento de la colonia.

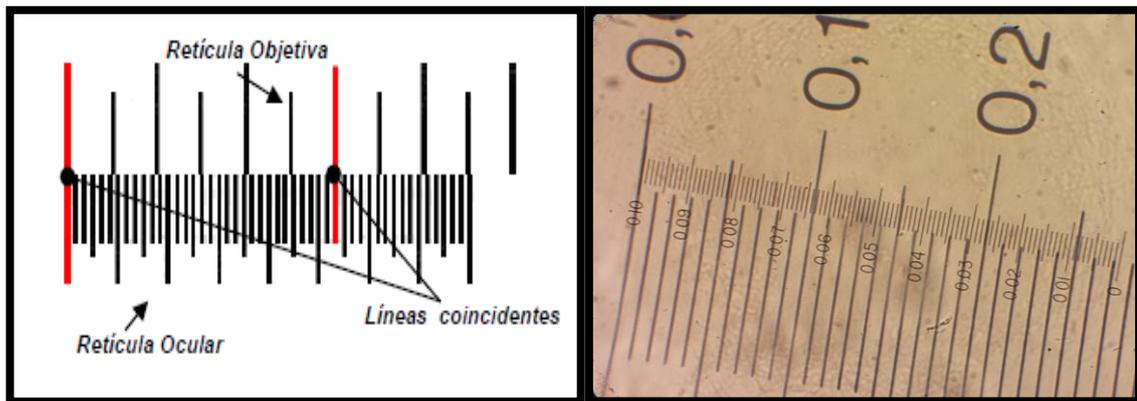
Por otro lado las características microscópicas evaluadas fueron las estructuras que presentó: como hifas, conidióforos, conidias; y las dimensiones de las estructuras y de sus partes. Con los parámetros mencionados se procedió a la identificación del patógeno en base a las claves propuestas por:

- a. Barnett y Hunter, 1972. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*.
- b. Morgan y Jones, 1967. *Ceratocystis paradoxa*. CMI descriptions.
- c. Pinho, B., Dutra, M., Deiziane C., & Pereira, Olinto L, 2013. *Tropical Plant Pathology*.

Para la caracterización microscópica, se realizó una previa calibración al microscopio utilizado, este procedimiento consistió en lo siguiente:

1. Se limpió cuidadosamente el objeto y ocular milimétricos con el papel seda.
2. Se verificó una correcta iluminación con el objetivo de menor aumento.
3. Se colocó el objeto milimétrico el cual se debe enfocar.
4. Se sustituyó un ocular por el ocular milimétrico, para hacer coincidir el inicio de la reglilla del ocular milimétrico con el inicio de la reglilla del objeto milimétrico.
5. Se observa las marcas que coinciden entre ambas reglillas, tal como se muestra en la Figura 2.2 Si existen otras marcas que coinciden se toma en cuenta la de mayor dimensión (longitud).

6. Se determinó el número de divisiones de la reglilla del objeto milimétrico que coincide con la división del ocular milimétrico. Se calculó la dimensión del total de divisiones de la reglilla del objeto milimétrico usado, por cada división del ocular milimétrico.



**Figura 2.4.** Líneas coincidentes en la calibración del microscopio entre el objeto milimétrico y el ocular milimétrico

### 2.4.3. Prueba de eficacia de los productos fúngicos en el control in vitro

En este experimento se utilizó dos pruebas: la prueba de envenenamiento para realizar la evaluación con los productos químicos y la prueba de enfrentamiento para el caso de los controladores biológicos, Además se incluyó un testigo, donde el medio de cultivo no fue mezclado con ningún producto. Las placas inoculadas fueron incubadas a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . A continuación se mencionan los procedimientos más importantes:

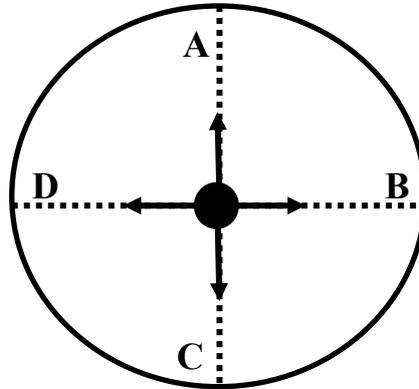
#### Prueba del medio envenenado

1. Se preparó el medio de cultivo envenenado; para lo cual, previo al plaqueo, se pesó cada uno de los fungicidas en dos dosis, a excepción del PROCLORAZ debido a que su formulación es concentración emulsionable: 1) La dosis recomendada en la literatura y 2) la mitad de la dosis recomendada en la literatura. Cada dosis fue vertida en 75 ml de PDA a punto de plaqueo. Después de homogenizarlo se procedió al plaqueo. Los fungicidas utilizados y las dosis figuran en el Tabla 2.3.
2. Considerando que se evaluaron 4 fungicidas a dos dosis cada uno, se tuvo un total de 8 tratamientos. Además se tuvo un testigo, el cual es el PDA sin fungicida. Para cada tratamiento se realizaron 3 repeticiones. El diseño estadístico usado en el experimento fue un Diseño completamente Randomizado con 2 factores (fungicida y dosis), con un total de 9 tratamientos.

**Tabla 2.4.** Fungicidas utilizados en la prueba de medio envenenado

<b>CÓDIGO</b>	<b>NOMBRE COMERCIAL</b>	<b>PRODUCTO ACTIVO</b>	<b>FORMULACIÓN</b>	<b>CONCENTRACIÓN</b>	<b>CONCENTRACIÓN EMPLEADA p.p.m de producto comercial</b>	<b>MODO DE ACCIÓN</b>	<b>GRUPO</b>
T1	BENZOMYL	Benomil	Polvo mojable	50%	1000	SISTÉMICO	BENZIMIDAZOL
T2	BENZOMYL	Benomil			500	SISTÉMICO	BENZIMIDAZOL
T3	SPORTAK 45	Procloraz	Concent. Emulsionable	450 g/l	1000	SISTÉMICO	IMIDAZOL
T4	SPORTAK 46	Procloraz			500	SISTÉMICO	IMIDAZOL
T5	DITHANE M-45	Mancozeb	Polvo mojable	85%	2000	CONTACTO	DITIOCARBONATO
T6	DITHANE M-45	Mancozeb			1000	CONTACTO	DITIOCARBONATO
T7	ANTRACOL	Propineb	Polvo mojable	70%	2000	CONTACTO	DITIOCARBONATO
T8	ANTRACOL	Propineb			1000	CONTACTO	DITIOCARBONATO
T9	TESTIGO	----	----	----	----	----	----

- Una vez que se solidificó y enfrió el medio, se colocó una rodaja con crecimiento micelial del hongo, extraída con un sacabocado de 4 mm de diámetro. La rodaja se colocó al centro de la placa, que la dividieron en cuatro cuadrantes iguales (Figura 2.3).

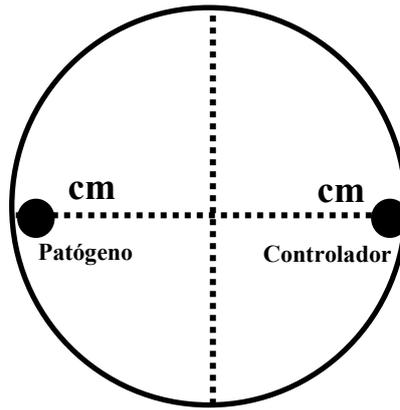


**Figura 2.5.** Placa Petri luego de ser marcada para su evaluación

- El testigo fue sembrado de la misma forma, pero en placas Petri con medio PDA sin fungicida. Todas las placas fueron incubadas a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ .
- Todos los días se procedió a medir el crecimiento del hongo, para lo cual se utilizó una regla milimétrica. La evaluación terminó cuando el hongo sembrado en la placa Petri sin fungicida (testigo) cubrió completamente el medio de cultivo. Se puede observar el proceso en el Anexo.

### **Prueba de crecimiento dual**

- Se realizaron enfrentamientos entre el patógeno y aislamientos de los controladores biológicos como *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride*.
- En una placa Petri conteniendo PDA; sobre la superficie del medio se colocó en un extremo, una rodaja de 4 mm de medio conteniendo micelio del patógeno y en el otro extremo otra rodaja del mismo diámetro con micelios del controlador.
- Para realizar las mediciones del crecimiento micelial del patógeno y del controlador se realizó una línea horizontal y vertical en la parte inferior de la placa que sirvió de guía para tomar las medidas hacia el centro de la placa (Figura 2.3).
- Los tratamientos, así como la distribución de estos se observan en la Tabla 2.4.



**Figura 2.6.** Líneas de medición para el crecimiento micelial diario del patógeno y controlador en placa Petri

**Tabla 2.5.** Tratamientos de la prueba de control biológico in vitro

TRATAMIENTO	ENFRENTAMIENTO
T1	Testigo <i>Thielaviopsis</i>
T2	Testigo <i>Trichoderma harzianum</i>
T3	Testigo <i>Trichoderma viride</i>
T4	<i>Thielaviopsis</i> vs <i>T. harzianum</i>
T5	<i>Thielaviopsis</i> vs <i>T. viride</i>

### Prueba de fitopatogenicidad

De acuerdo a los postulados de Koch esta prueba tuvo como objetivo verificar si el agente aislado reproducía la sintomatología de la pudrición negra de la piña. Se realizó en frutos sanos de piña de la variedad Cayena Lisa y Golden; para realizar esta prueba se procedió de la siguiente manera:

1. El hongo aislado se multiplicó en placas Petri conteniendo el medio PDA.
2. Cuando la placa estaba completamente llena de hifas y esporas, se hizo el licuado con agua destilada, para luego ser inoculado en los frutos. Previamente los frutos fueron lavados con agua potable, desinfectados en hipoclorito de sodio al 1%, enjuagados con agua estéril y secados.
3. La inoculación se realizó en el lado lateral del fruto, y se hizo de dos formas:
  - a. Con herida
  - b. Sin herida
4. Fueron colocadas en bolsas plásticas cerradas (cámara húmeda), e incubadas a temperatura ambiente  $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

5. Se realizaron evaluaciones y observaciones diarias del desarrollo de los síntomas de la pudrición negra de la piña, se compararon con los que fueron reportados en la literatura.
6. Finalmente, se procedió a realizar el reaislamiento y la reidentificación del agente causal, a partir de la fruta inoculada. De la misma manera a la realizada en la prueba anterior. El procedimiento de la prueba de fito patogenicidad se puede observar en el Anexo 5.

## **2.5. PARÁMETROS DE EVALUACIÓN**

### **a) Aislamiento del hongo patógeno**

Esta evaluación se determinó mediante el experimento factorial en diseño completamente randomizado con dos factores que son: tipo de medio y temperatura.

### **b) Caracterización y reconocimiento del agente causal de la pudrición negra de la piña**

Para caracterizar e identificar al patógeno responsable de causar la pudrición negra de la piña se ha evaluado los siguientes parámetros:

- Color de la colonia
- Forma de la colonia
- Aspecto de la colonia

Además la identificación del género del patógeno se realizó en base a las claves propuestas por:

1. Barnett y Hunter. 1972. Illustrated Genera of Imperfect Fungi.
2. Morgan y Jones. 1967. *Ceratocystis paradoxa*. CMI descriptions.
3. Pinho, B., Dutra, M., Deiziane C., & Pereira, Olinto L. 2013. Tropical Plant Pathology.

### **c) Eficacia de los productos fúngicos en el control in-vitro del agente causal**

El parámetro principal fue el ritmo de crecimiento del patógeno en porcentaje de inhibición como respuesta a los productos de control, realizando las mediciones diarias de la longitud del micelio. Para evaluar el ensayo se aplicó la fórmula propuesta por Vincent (1947), la prueba en medio envenenado con fórmula (1) y para la prueba en medio de enfrentamiento se aplicó la fórmula (2).

**Fórmula 1.**

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{c.m. \text{ testigo} - c.m. \text{ tratamiento}}{\text{crecimiento micelial testigo}} \times 100$$

**Fórmula 2.**

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{c.m. \text{ patógeno} - c.m. \text{ controlador}}{\text{crecimiento micelial del patógeno}} \times 100$$

**Dónde:**

**c.m.**= crecimiento micelial

## **CAPÍTULO III**

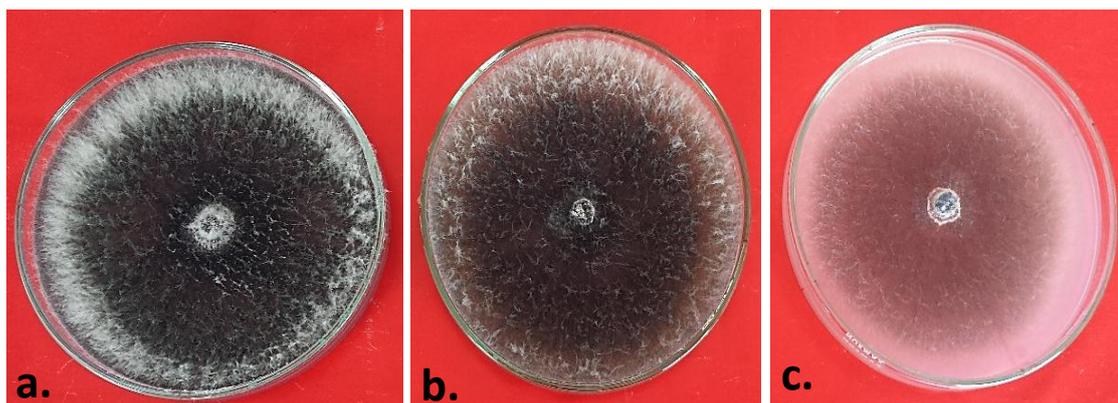
### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **3.1. AISLAMIENTO DEL AGENTE CAUSAL DE LA PUDRICIÓN NEGRA DE LA PIÑA**

A partir de las siembras del tejido infectado (pulpa de fruta), sobre el medio PDA, se observó el desarrollo de colonias; como indica Villachica (2006), en la fase inicial del patógeno, los micelios son de color blanco que posteriormente va tomando un color marrón hasta llegar a un color negro oscuro.

En el medio selectivo PDA, se observó el desarrollo del patógeno en estudio, con un patrón de crecimiento de tipo radiado con micelio aéreo en abundancia con respecto a los otros dos medios selectivos (PZA y V8), tal como se puede observar en la figura 3.1 y el crecimiento de la colonia fue muy rápido llegando a cubrir la totalidad de la superficie de la placa en tres días a partir de la siembra, a diferencia de Villachica (2006) que reporta el crecimiento de la colonia en su totalidad en 4 o 5 días.

Pérez *et al.* (2014) señalan que el crecimiento de *Thielaviopsis paradoxa* en medio de cultivo PDA, tiene un crecimiento acelerado, radial y plano que inicialmente mostró un color blanco y a medida que pasaban el periodo de incubación tomó un color gris claro hasta negruzco, estas características las coinciden con las descritas por Hernández *et al.* (2011).



**Figura 3.1.** Crecimiento micelial del hongo patógeno a 25°C en los diferentes medios selectivos: a. PDA, b. V- 8 y c. PZA

El análisis estadístico se ha realizado con los promedios de cada unidad experimental (tratamiento) con la finalidad de obtener datos uniformes en tamaño, siguiendo la metodología aplicada en la evaluación del crecimiento micelial.

**Tabla 3.1.** Velocidad de crecimiento radial (cm) de *T. paradoxa* en diferentes medios de cultivo y temperaturas

MEDIO	CRECIMIENTO (cm/24Hrs.)*			
	10°C	20°C	25°C	30°C
PDA	0	3.04	3.80	3.40
PZA	0	2.58	3.45	2.81
V8	0	2.60	3.12	3.35

\*Promedio de 3 placas Petri

Debido a que en los tratamientos (PDA, PZA Y V8) a 10°C no se observó crecimiento micelial (crecimiento micelial nulo) del agente causal de la pudrición negra de la piña se obviarán en los análisis estadísticos.

**Tabla 3.2.** Análisis de varianza para la velocidad de crecimiento radial (cm) en diferentes medios de cultivo y temperaturas a las 96 Hrs. de evaluación

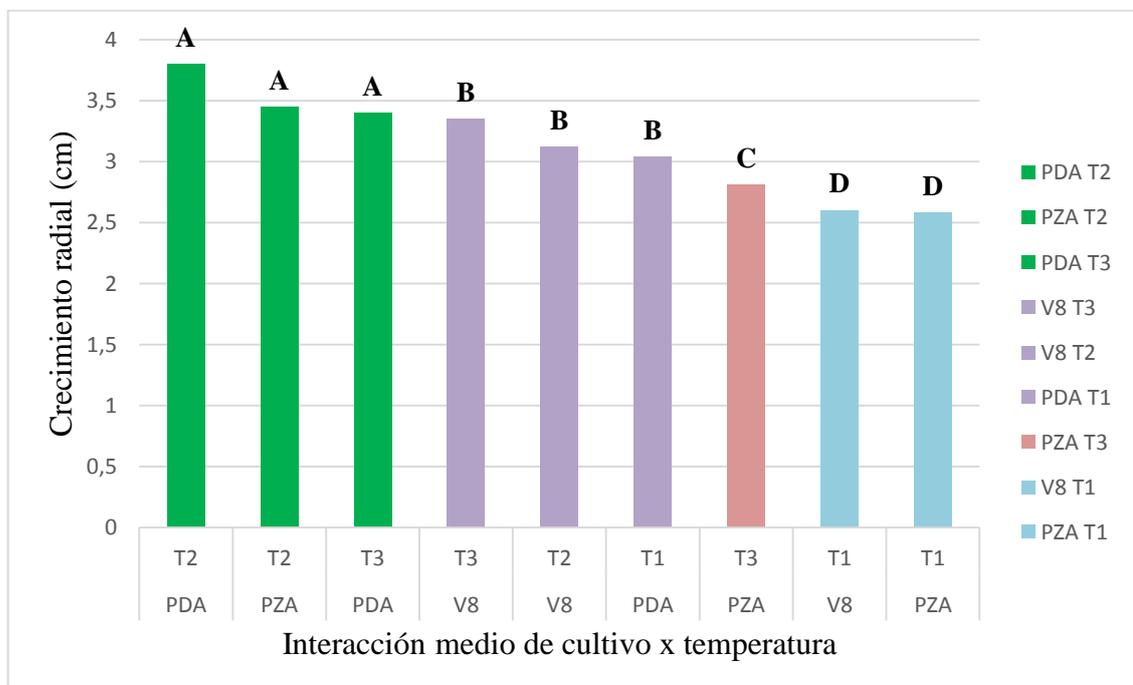
F.V.	G.L.	SC	CM	FC	
TRATAMIENTO	8	70.12	6.37	284.49	**
MEDIO	2	0.85	0.43	19.06	**
TEMP	3	68.38	22.79	1017.13	**
MEDIO*TEMP	6	0.89	0.15	6.65	**
ERROR	21	0.54	0.02		
TOTAL	32	70.56			

C.V. = 6.38%

En la tabla 3.2 se observa que en el análisis de varianza para las variables medio de cultivo y temperatura, además de la interacción presenta diferencias altamente significativas entre los tratamientos, por ello se realizó la prueba de Tukey, con la finalidad de realizar comparaciones entre tratamientos.

**Tabla 3.3.** Prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ) de la velocidad de crecimiento radial en la interacción medio x temperatura.

MEDIO	TEMP	CRECIM. RADIAL	PRUEBA DE TUKEY
PDA	T2	3.8	A
PZA	T2	3.45	A
PDA	T3	3.4	A
V8	T3	3.35	B
V8	T2	3.12	B
PDA	T1	3.04	B
PZA	T3	2.81	C
V8	T1	2.6	D
PZA	T1	2.58	D

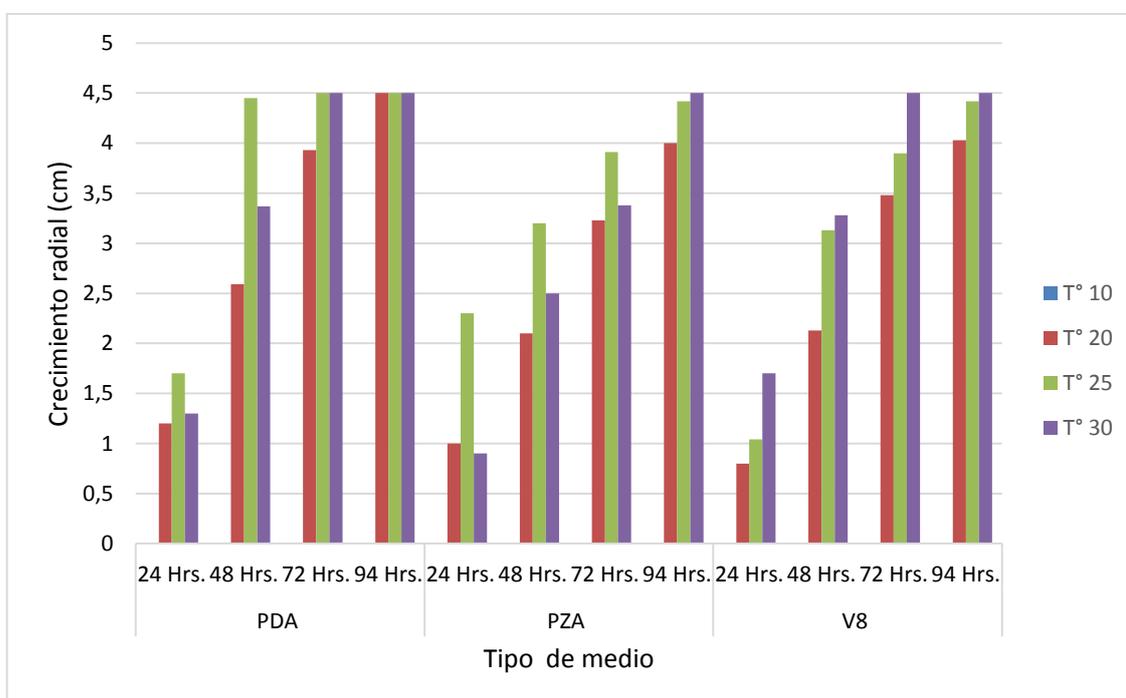


**Figura 3.2.** Velocidad de crecimiento micelial en la interacción medio de cultivo x temperatura.

De acuerdo a la prueba de Tukey se observa que la mayor velocidad de crecimiento micelial del agente causal (3.8 cm/24 Hrs.) se da en el medio diferenciado Papa Dextrosa Agar (PDA) a una temperatura de 25°C; sin embargo no existe diferencia estadística con el medio Papa Zanahoria Agar (PZA) a 25°C y el jugo V8 a 30°C.

Por otro lado el crecimiento radial del micelio del agente causal es mínimo en el medio diferenciado PZA, además la superficie de la placa fue cubierta completamente en 96 Hrs. después de la siembra. Estos resultados no concuerdan con los resultados obtenidos por Álvarez y Gómez (1997) donde el medio más favorable para el crecimiento del patógeno fue el medio diferenciado PZA; este resultado difiere debido a que Álvarez realiza un aislamiento del agave mexicano.

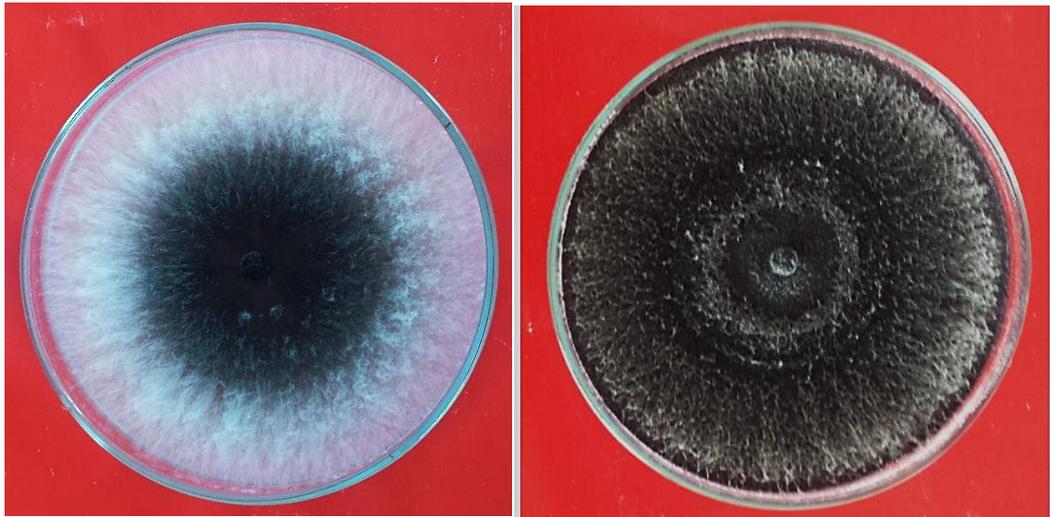
Por otro lado a la temperatura de 10°C, el crecimiento del micelio es nulo; estos resultados concuerdan con el enunciado de Frossard (1978), quien afirma que el desarrollo del patógeno *Thielaviopsis paradoxa* se detiene completamente cuando la temperatura es menor a los 12°C.



**Figura 3.3.** Crecimiento micelial en diferentes medios de cultivo y temperaturas.

### 3.2. CARACTERIZACIÓN Y RECONOCIMIENTO DEL AGENTE CAUSAL DE LA PUDRICIÓN NEGRA DE LA PIÑA

Las colonias del hongo aislado en medio PDA presentaron abundante micelio, el cual se observó en forma algodonosa. Inicialmente fue de color blanquecino y luego fue tomando un color marrón claro hasta llegar a un color negro oscuro (Figura 3.2). El hongo creció sobre toda la superficie de la placa Petri a las 72 Hrs. de sembrado.



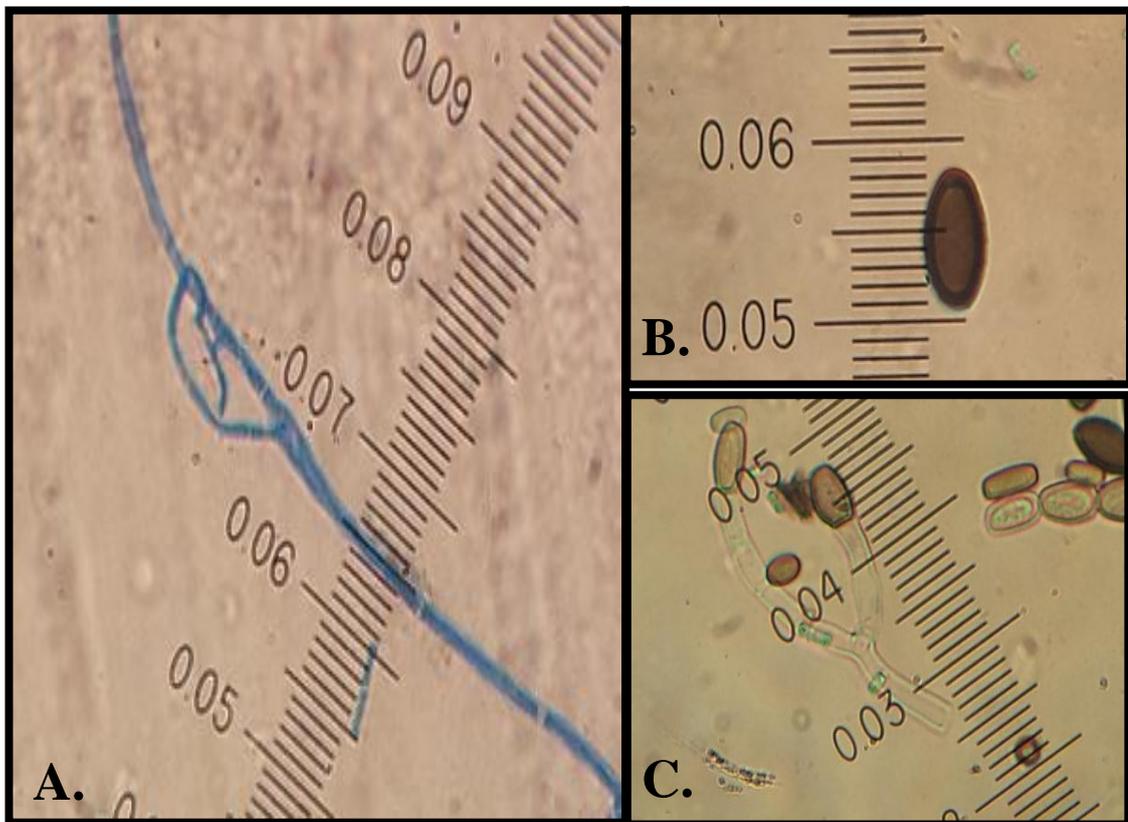
**Figura 3.4.** Desarrollo inicial y final del hongo patógeno en el medio de cultivo PDA.

Las observaciones microscópicas se realizaron después de la calibración del microscopio, donde la medida real del ocular para el aumento 10X fue  $10.6 \mu$  y para el aumento 40X fue  $2.63 \mu$ .

Tras la observación del hongo se reveló la presencia de micelio constituido por hifas delgadas, de  $7.7 \mu$  de grosor promedio, hialinas y en su mayoría rectas, aunque algunas veces moderadamente divergentes. Los conidioforos son delgados, se originan lateralmente de las hifas, septados, que van desde un hialino hasta un color cremoso claro, con largo promedio de  $174.3 \mu$  y ancho promedio de  $7.6 \mu$ , disminuyendo en grosor hacia el final por donde emergen las conidias. Las conidias son ovaladas, generalmente hialinas, tienen una longitud promedio de  $16.3 \mu$  y un ancho de  $7.2 \mu$ . También se observó la presencia de abundantes clamidosporas, las cuales se forman en cadenas siendo en su mayoría cilíndricas a ovaladas, de color marrón claro a marrón oscuro.

Las características macroscópicas y microscópicas del hongo aislado, coinciden con lo informado por la mayoría de autores como es el caso de Bamett y Hunter (1972), Barran (1968), Morgan y Jones (1967), Ploetz *et al.*, (1994) y Snowdon (1990), para la especie *Thielaviopsis paradoxa*. Dickson (citado por Py *et al.* 1987), fue el primero en reportar el hongo en 1931 en Australia pero no específicamente en el cultivo de piña.

De igual forma en los resultados de Perez *et al.* (2014) se observaron las mismas características microscópicas de *Thielaviopsis paradoxa*., los que coincidieron con la descripción en la clave taxonómica de Watanabe (1937) y estudios realizados por Hernández *et al.* (2011) en el cultivo de piña.

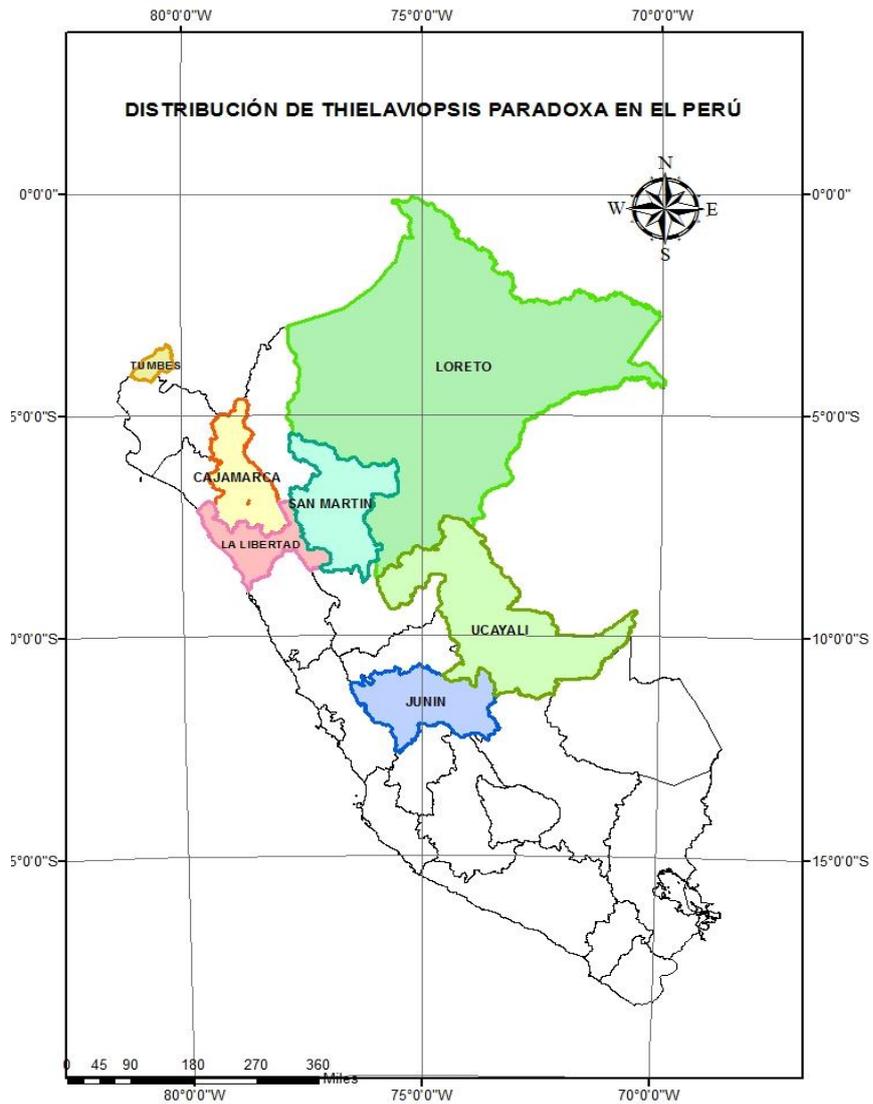


**Figura 3.5.** Mediciones micrométricas de las estructuras microscópicas de *Thielaviopsis paradoxa*. A. Hifas, B. Conidios; C. Conidioforo

**Tabla 3.4.** Dimensiones de la conidia, hifa y conidióforo de *Thielaviopsis paradoxa*.

N°	DIMENSIONES									
	DIMENSIONES DE CONIDIAS				HIFAS		DIMENSIONES DE CONIDIÓFORO			
	LARGO		ANCHO		ANCHO		LARGO		ANCHO	
	(MICRAS)	(MICRAS)	(MICRAS)	(MICRAS)	(MICRAS)	(MICRAS)	(MICRAS)	(MICRAS)	(MICRAS)	(MICRAS)
UNID.	MEDIDA	UNID.	MEDIDA	UNID.	MEDIDA	UNID.	MEDIDA	UNID.	MEDIDA	
1	6	15.78	3	7.89	3	7.89	68	178.84	2	5.26
2	6	15.78	3	7.89	2	5.26	60	157.8	3	7.89
3	7	18.41	3	7.89	3	7.89	72	189.36	3	7.89
4	7	18.41	3	7.89	4	10.52	65	170.95	4	10.52
5	6	15.78	2	5.26	3	7.89	61	160.43	2	5.26
6	5	13.15	2	5.26	3	7.89	70	184.1	3	7.89
7	7	18.41	3	7.89	2	5.26	73	191.99	2	5.26
8	6	15.78	2	5.26	3	7.89	66	173.58	3	7.89
9	7	18.41	3	7.89	3	7.89	68	178.84	3	7.89
10	7	18.41	3	7.89	3	7.89	60	157.8	4	10.52
11	8	21.04	4	10.52	2	5.26	65	170.95	3	7.89
12	5	13.15	2	5.26	3	7.89	73	191.99	3	7.89
13	6	15.78	3	7.89	4	10.52	66	173.58	3	7.89
14	6	15.78	2	5.26	3	7.89	65	170.95	3	7.89
15	6	15.78	3	7.89	3	7.89	60	157.8	4	10.52
16	5	13.15	2	5.26	2	5.26	72	189.36	3	7.89
17	7	18.41	3	7.89	3	7.89	69	181.47	2	5.26
18	6	15.78	3	7.89	4	10.52	67	176.21	3	7.89
19	8	21.04	4	10.52	2	5.26	63	165.69	4	10.52
20	6	15.78	3	7.89	3	7.89	70	184.1	3	7.89
21	5	13.15	2	5.26	3	7.89	61	160.43	2	5.26
22	6	15.78	3	7.89	4	10.52	68	178.84	2	5.26
23	7	18.41	3	7.89	3	7.89	62	163.06	3	7.89
24	7	18.41	3	7.89	3	7.89	65	170.95	3	7.89
25	6	15.78	2	5.26	2	5.26	66	173.58	2	5.26
26	6	15.78	3	7.89	2	5.26	63	165.69	3	7.89
27	5	13.15	2	5.26	3	7.89	60	157.8	4	10.52
28	5	13.15	2	5.26	3	7.89	72	189.36	3	7.89
29	6	15.78	3	7.89	4	10.52	70	184.1	3	7.89
30	6	15.78	3	7.89	3	7.89	68	178.84	2	5.26
<b>PROMEDIO</b>	<b>16.306</b>		<b>7.19</b>		<b>7.71</b>		<b>174.28</b>		<b>7.63</b>	
<b>DESV. STD.</b>	<b>2.227</b>		<b>1.534</b>		<b>1.682</b>		<b>11.028</b>		<b>1.740</b>	
<b>R2</b>	<b>0.045</b>		<b>0.0029</b>		<b>0.0045</b>		<b>0.0008</b>		<b>0.0015</b>	

Según el SENASA, en el Perú este hongo patógeno *Thielaviopsis paradoxa* se reportó por primera vez en el año 2004 en el departamento de Ucayali y posteriormente en San Martín, Junín, Tumbes, Loreto, Cajamarca y La Libertad. La distribución gráfica en el Perú se puede observar en el gráfico 3.6.



**Figura 3.6.** Distribución gráfica de *Thielaviopsis paradoxa* en el Perú

Fuente: Elaboración propia.

### 3.3. PRUEBA DE EFICACIA DE LOS PRODUCTOS EN EL CONTROL IN VITRO

Los resultados obtenidos de los tratamientos, expresada como porcentajes de inhibición frente a las cepas de *Thielaviopsis paradoxa*, se muestran en la Tabla 3.5.

**Tabla 3.5.** Valores de porcentaje de inhibición micelial obtenidos para los 11 tratamientos

CÓDIGO	TRATAMIENTO	REPETICIÓN	CREC.MICEL. cm/72 Hrs.	% DE INHIBICIÓN
T1	MANCOZEB (VR)	r1	0.00	100.00
		r2	0.00	100.00
		r3	0.00	100.00
T2	MANCOZEB (VR - 50%)	r1	0.00	100.00
		r2	0.25	94.44
		r3	0.30	93.33
T3	PROPINEB (VR)	r1	0.00	100.00
		r2	0.00	100.00
		r3	0.00	100.00
T4	PROPINEB (VR - 50%)	r1	0.33	92.78
		r2	0.30	93.33
		r3	0.00	100.00
T5	BENOMIL (VR)	r1	0.00	100.00
		r2	0.00	100.00
		r3	0.00	100.00
T6	BENOMIL (VR -50%)	r1	0.00	100.00
		r2	0.00	100.00
		r3	0.00	100.00
T7	PROCLORAZ (VR)	r1	0.00	100.00
		r2	0.00	100.00
		r3	0.00	100.00
T8	PROCLORAZ (VR - 50%)	r1	0.00	100.00
		r2	0.00	100.00
		r3	0.00	100.00
T9	<i>Trichoderma harzianum</i>	r1	0.48	89.33
		r2	0.66	85.33
		r3	0.54	88.00
T10	<i>Trichoderm viride</i>	r1	0.18	96.00
		r2	0.22	95.11
		r3	0.28	93.78
TESTIGO	-.-	-.-	4.50	0.00

El análisis estadístico se ha realizado con los promedios de cada unidad experimental (tratamiento) con la finalidad de obtener datos uniformes en tamaño, siguiendo la metodología aplicada en el análisis del porcentaje de inhibición micelial.

**Tabla 3.6.** Análisis de variancia para el porcentaje de inhibición micelial a los 96 Hrs. de evaluación de los 10 tratamientos.

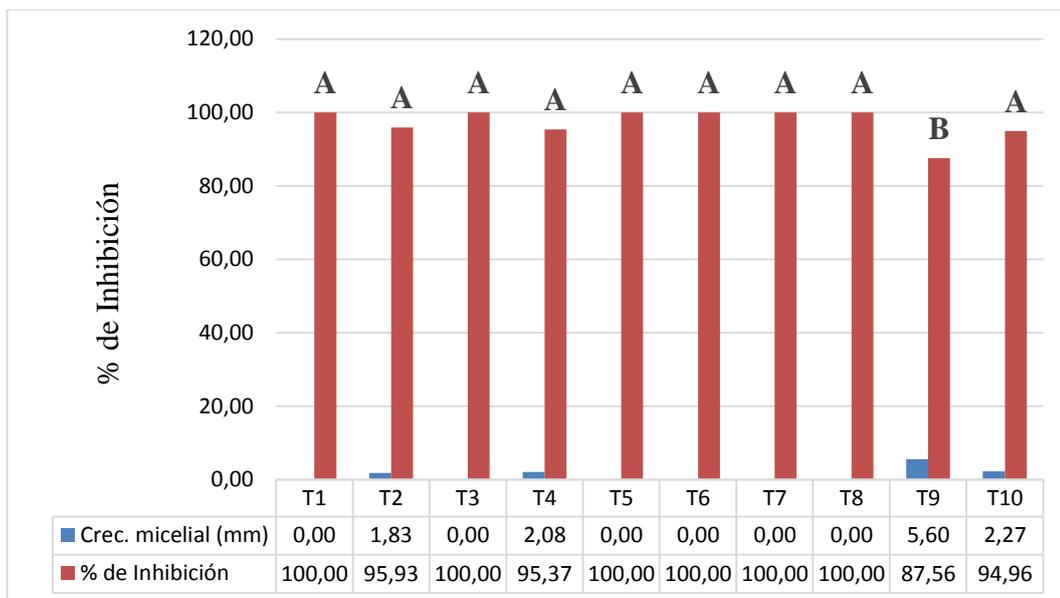
<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>FC</b>
TRATAMIENTO	9	454.41	49.92	14.15 **
ERROR	17	63.49	3.53	
TOTAL	26	517.90		

En la tabla 3.6 se observa que en el análisis de variancia para la variable porcentaje de inhibición del crecimiento micelial presentó diferencias altamente significativas entre los tratamientos, por ello se realizó la prueba de Tukey, con la finalidad de realizar comparaciones entre tratamientos.

**Tabla 3.7.** Prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ) del porcentaje de inhibición micelial de los 11 tratamientos.

<b>TRAT</b>	<b>%INHIBIC.</b>	<b>PRUEBA DE TUKEY</b>
<b>T6</b>	100.00	A
<b>T5</b>	100.00	A
<b>T7</b>	100.00	A
<b>T8</b>	100.00	A
<b>T1</b>	100.00	A
<b>T3</b>	100.00	A
<b>T2</b>	95.92	A
<b>T4</b>	95.37	A
<b>T10</b>	94.96	A
<b>T9</b>	87.55	B

La prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ) (Tabla 3.7) indica que los tratamientos T6, T5, T7, T8, T1, T3, T2, T4 y T10 presentaron promedios estadísticamente similares en cuanto al porcentaje de inhibición micelial y superaron con diferencia significativa al tratamientos T9, que presentó menor porcentaje de inhibición micelial.



**Figura 3.7.** Promedio de crecimiento de micelios y porcentaje de inhibición micelial.

En la figura 3.7, se observa que el mayor porcentaje de inhibición micelial (PI) fue de 100% para los tratamientos T1, T3, T5, T6, T7 y T8, correspondientes al control con Mancozeb con dosis recomendado, Propineb con dosis recomendado, Benomil en ambas dosis y Procloraz en ambas dosis respectivamente, por lo que no pudieron medirse las colonias de inhibición. Los tratamientos T2 y T4 presentan porcentaje de inhibición micelial de 95.93%, y 95.37% respectivamente, que pertenecen al control químico con Mancozeb en dosis baja y Propineb en dosis baja, donde las colonias se llegaron a medir entre 1.83 y 2.08 mm de diámetro.

El tratamiento T10 obtuvo un PI de 94.96%, el cual estadísticamente no difiere a los tratamientos que obtuvieron un porcentaje de 100%, este tratamiento pertenece al control biológico con *Trichoderma viride*, donde las colonias llegaron a medir un promedio de 2.27 mm de diámetro. El tratamiento T9 obtuvo un PI de 87.56%, estadísticamente es diferente al resto de tratamientos y corresponde al control biológico con *Trichoderma harzianum*, donde las colonias llegaron a medir 5.6 mm.

En relación a las dosis, los tratamientos (fungicidas sistémicos y de contacto) que tienen la dosis recomendada (VR) obtuvieron resultados positivos en porcentajes de inhibición del patógeno (100%), sin embargo, las dosis con volumen menos el 50% (VR – 50%) obtuvieron también resultados positivos estadísticamente, con la diferencia de que los fungicidas de contacto no inhibieron al 100%.

En cuestión de producto, el que mostró mayor eficacia en el control in vitro de *Thielaviopsis paradoxa* fueron los fungicidas sistémicos como: benomil y procloraz que inhibió en su totalidad el crecimiento del micelio, y los fungicidas de contacto permitieron el crecimiento micelial, cuando su volumen recomendado fue disminuido, sin embargo no existe diferencia estadística. El control biológico también mostro un control eficaz con *Trichoderma viride*.

En relación a otras investigaciones, los resultados obtenidos con *Trichoderma viride* son similares a los obtenidos por Castellanos *et al.* (2008), donde manifiestan que *Trichoderma viride* evidenció tener un alto potencial y espectro de acción in vitro como biocontrol de *Thielaviopsis paradoxa* con un porcentaje de inhibición micelial de 94.96 %. En esta prueba se notó una capacidad hiperparasita alta de los aislamientos de *T. viride* y *T. harzianum*, pese a que estadísticamente el PI de *T. harzianum* es menor con respecto al tratamiento químico.

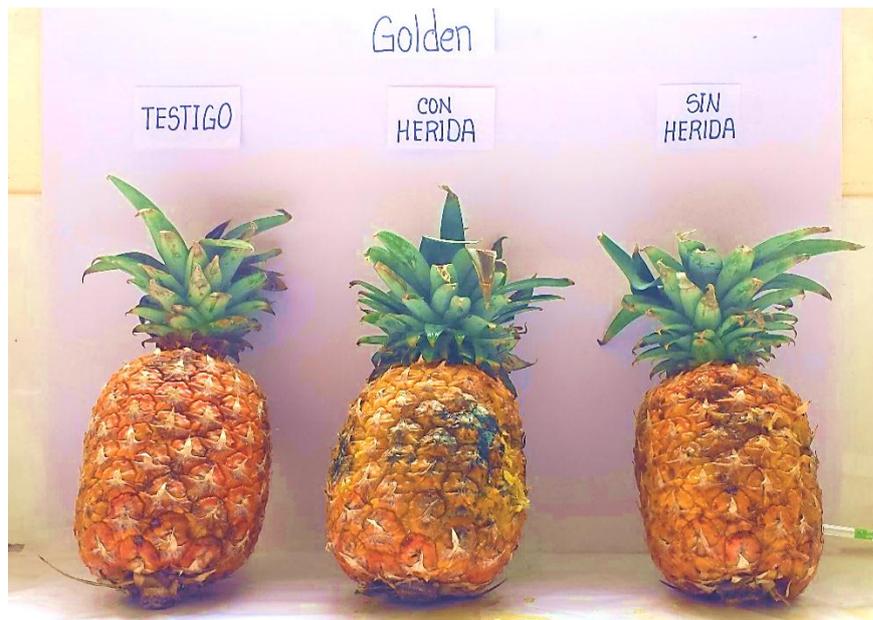
De igual modo, en cuanto a los resultados Benomil y Procloraz, coincide por lo referido por Villachica (2008), que recomienda la utilización de fungicidas sistémicos contra *T. paradoxa* debido a que en sus experimentos in vitro, éste patógeno resultó ser sensible a los ingredientes activos de estos fungicidas.

Omamor (1985) recomienda el Benomyl para el control de *Ceratocystis paradoxa* (Anamorfo: *Thielaviopsis paradoxa* (De Seynes) Höhnelt).

### **3.4. FITO PATOGENECIDAD**

La prueba de fito patogenicidad se cumplió de acuerdo con el enunciado de Koch, puesto que el aislamiento *Thielaviopsis paradoxa* reprodujo los síntomas observados inicialmente; y las características microscópicas del hongo reaislado coincidieron con las del hongo inoculado, es decir *Thielaviopsis paradoxa*.

A partir de las 120 Hrs. de realizada la prueba de fito patogenicidad se observaron los primeros síntomas en las frutas de piña inoculadas con *T. paradoxa*; se observó un cambio en la coloración inicial (amarilla oscuro) a la coloración final (negro claro), resultados que coinciden con los descritos por Villachica (2006).



**Figura 3.8.** Resultados de la prueba de fito patogenicidad en los frutos de piña de la variedad Golden y Cayena lisa

Se presentó síntomas semejantes a los frutos que se recolectaron para el aislamiento; la descomposición inició en la herida inoculada, donde los tejidos se suavizaron, adquiriendo una consistencia acuosa y un color pardo amarillento tal como indica Barahona y Sancho (1998). Además se puede percibir un aroma agradable producto de la fermentación de la glucosa. Externamente la cáscara se observa de color café claro y con apariencia acuosa.

Al igual que Pérez *et al.* (2014) se observó inicialmente una pudrición blanda de color pardo que con el tiempo se oscureció hasta obtenerse un color pardo negruzco, esto debido a la formación de conidios, los cuales son de color marrón negruzco.

Es importante resaltar que en la prueba de fito patogenicidad el avance de la pudrición fue mayor cuando la inoculación se realizó en la herida generada, ello se explica por el contacto directo que tiene el hongo con la pulpa. Este resultado debe tenerse presente para el manejo postcosecha del fruto, ya que la preocupación de los agricultores se centra solo en la herida dejada por el corte del pedúnculo, pero, no consideran que un inadecuado transporte puede facilitar las condiciones para un mayor daño por el hongo.

## CONCLUSIONES

1. El mejor medio de aislamiento para el agente causal de la Pudrición Negra de la Piña es el Papa Dextrosa Agar a una temperatura de 25°C, donde el crecimiento radial es de 3.8 cm /24 Hrs.
2. Tras la caracterización del hongo patógeno a través de claves taxonómicas, se identificó que el agente causal de la Pudrición Negra de la Piña es *Thielaviopsis paradoxa*, cuya forma perfecta es *Ceratocystis paradoxa*, este hongo patógeno se encuentra reportado en el Perú desde el año 2014 por el Servicio Nacional de Sanidad Agraria.
3. En el control químico in vitro los tratamientos más eficaces fueron: T1 (Mancozeb -dosis recomendado), T3 (Propineb - dosis recomendado), T5 (Benomil - dosis recomendado), T6 (Benomil - dosis al 50%), T7 (Procloraz - dosis recomendado) y T8 (Procloraz - dosis al 50%), estos tratamientos inhibieron el crecimiento de *Thielaviopsis paradoxa* al 100%. En el control biológico con *Trichoderma viride* se obtuvo un porcentaje de inhibición (PI) de 94.96%, y el control con *Trichoderma harzianum* obtuvo un PI de 87.56 %.

## RECOMENDACIONES

1. Evaluar en vivero y campo la efectividad de los productos Benomil, Procloraz, Mancozeb, Propineb, *Thricoderma harzianum* y *Thricoderma viride* para el control de *Thielaviopsis paradoxa*
2. Proseguir la investigación del control *in vitro*, con otros productos químicos y biológicos diferentes a los estudiados, para el control de *Thielaviopsis paradoxa*.
3. Realizar más trabajos de investigación en otros cultivos de importancia económica susceptibles a *Thielaviopsis paradoxa*.

## REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Agrios, G. 2004. Fitopatología. 2da Edición. *Limusa. México, DF 635p.*
- Alvarado, E.; Demerutis, C.; Martínez, A.; González, M. 2006. Evaluación de fungicidas biológicos para el control postcosecha de la pudrición de corona y pedúnculo en piña (*Ananas comosus* (L) Merr). *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, vol. 8(1), pp. 17-25.
- Álvarez, E., Gómez, P. 1997. Sexual compatibility in *Thielaviopsis paradoxa*. *Phytopathology*. 67p.
- Ávila MME. 2015. Curso de actualización en el “Manejo del picudo y enfermedades del agave”. Instituto Tecnológico de Tlajomulco. Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato [en línea]. Consultado: 16 de marzo del 2018, [http://www.cesaveg.org.mx/new/Descargas/AcAg\\_MPEA/Manejo\\_Integrado\\_de\\_Enfermedades\\_Martin\\_E\\_Avila\\_Miranda.pdf](http://www.cesaveg.org.mx/new/Descargas/AcAg_MPEA/Manejo_Integrado_de_Enfermedades_Martin_E_Avila_Miranda.pdf)
- Baker R., Paulitz T. 1996. Theoretical basis for microbial interactions leading to biological control of soilborne plant pathogens In: *Principles and Practice of Managing Soilborne Plant Pathogens*. Hall, R. (Ed.). The American Phytopathol. Soc. St. Paul, MN. pp. 50-79.
- Barahona, M., Sancho, H. 1998. Piña y papaya. Editorial de la Universidad Estatal a Distancia (EUNED), San José, Costa Rica.
- Barnett, H.; Hunter B. 1972. *Illustrated genera of imperfect fungi*. Burgess publishing company. Minneapolis, Minnesota.
- Bartholomew, D.; Paull, R. y Rohrbach, K. 2003. *The pineapple: botany, production and uses*. New York, US, CAB International. 301p.
- Bautista, B. 2014. Postharvest decay. Control strategies. Elsevier. México. *In Chapter 9: Hewajulige IGN., Wijesundera RLC. Thielaviopsis paradoxa, Thielaviopsis basicola (Black Rot, Black Root Rot)*. 287-308 pp [en línea]. Consultado: 12 de octubre del 2017 [https://books.google.com/books?id=YTZOAwAAQBAJ&pg=PA307&lpg=PA307&dq=Thielaviopsis+paradoxa,+Thielaviopsis+basicola++\(Black+Rot,+Black+Root+Rot\).&source=bl&ots=u2w6TLLsmA&sig=UY99ypo7FQs6QtQZxEfOdIrvpUM&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjL4Prv28fRAhWKilQKHfyKAFkQ6AEIMjAG#v=onepage&q=Thielaviopsis%20paradoxa%20%20Thielaviopsis%20basicola%20%20\(Black%20Rot%2C%20Black%20Root%20Rot\).&f=false](https://books.google.com/books?id=YTZOAwAAQBAJ&pg=PA307&lpg=PA307&dq=Thielaviopsis+paradoxa,+Thielaviopsis+basicola++(Black+Rot,+Black+Root+Rot).&source=bl&ots=u2w6TLLsmA&sig=UY99ypo7FQs6QtQZxEfOdIrvpUM&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjL4Prv28fRAhWKilQKHfyKAFkQ6AEIMjAG#v=onepage&q=Thielaviopsis%20paradoxa%20%20Thielaviopsis%20basicola%20%20(Black%20Rot%2C%20Black%20Root%20Rot).&f=false)

- Castro, A.; Rivillas, C. 2012. *Trichoderma spp* modos de acción eficacia y usos en el cultivo de café.
- Castro, Z.; Hernández, C. 1992. Cultivo, empaque y comercialización de piña para exportación. Ecuador, IFAIN. 53p.
- Collins, J. 1960. The Pineapple: Botany, Cultivation and Utilization. Interscience Publishers. New York. 294 p.
- Elliot, M. *Thieleviopsis* trunk rot of palm [en línea]. Consultado: 22 de abril del 2018, <http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/PP/PP14300.pdf>
- Ellis, M. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Instituto Kew, Surrey, England. Pp: 31-32.
- Eziashi, E. I., Uma, N. U., Adekunle, A. A., & Airede, C. E. (2006). Effect of metabolites produced by *Trichoderma* species against *Ceratocystis paradoxa* in culture medium. African Journal of Biotechnology, 5(9)
- FAO. 1998. Determinación del estatus de una plaga en un área. NIMF N° 8, Roma.
- Garofalo, J., McMillan, R. 2004. *Thielaviopsis* diseases of palms. Proceedings of the Florida State Horticultural Society, 117: 324-325.
- Garzón, J. 2016. Establecimiento y manejo de un cultivo de piña en la sede de la asociación de ingenieros agrónomos del llano en Villavicencio. Tesis para optar título de Ingeniero Agrónomo. Universidad de los Llanos. Pp: 22-23.
- Gepp, V., & Mondino, P. 2011. Control químico [en línea]. Consultado: 15 de mayo del 2018, [PDF] [fagro.edu.uy](http://fagro.edu.uy)
- Harman, G. 2003. *Trichoderma harzianum*, *T. viridis*, *T. koningii*, *T.hamatum* (*Deuteromycetes: Moniliales*). Rev. Protección Veg. v.24 N.1 La Habana.
- Instalación de hijuelos de piña en el Vraem. (24 Agosto 2015). Revista Andina [en línea]. Consultado: 15 de febrero del 2018, <http://www.andina.com.pe/agencia/noticia-instalan-mas-500000-hijuelos-pina-parcelas-hoja-coca-el-vraem-571915.aspx>
- Jiménez D, J.A. 1999. Manual práctico para el cultivo de la piña de exportación. Cartago, CR, Editorial Tecnológica de Costa Rica. 224 p.
- Maldonado, Y. 1996. Recomendaciones técnicas para el manejo del cultivo de la piña. Proyecto IBTA-CHAPAJIE. Cochabamba. Bolivia. 8p.
- Montilla, I., Fernández, s., Alcalá, D., Gallardo M. 1997. El Cultivo de la Piña en Venezuela. Venezuela. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias [en línea]. Consultado: 22 de febrero del 2018,

<https://books.google.com.pe/books?id=ezmgbqoL7TAC>

- Moreau, C. 1952. Coexistence des formes *Thielaviopsis* et *Graphium* chez une souche de *Ceratocystis major* (van Beyma) nov. comb. Revue de Mycologie. 17(Suppl. Col. No. 1). Pp: 17-25
- Morgan, G., Jones, P. 1964. Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. Commonwealth Micological Institute. Kew, Surrey, England. Pp: 143-144.
- Pac, J. 2005. Experiencias En El Cultivo De Piña (*Ananas comosus* (L) Merr.) Con El Hibrido MD2 En Finca La Plata, Coatepeque, Quetzaltenango.
- Perez, A., Chamorro, L., & Romero, J. 2014. Presencia del hongo *Thielaviopsis paradoxa* causante de pudrición negra de la piña oro miel en el departamento de Sucre. Revista Colombiana de Ciencia Animal-RECIA, 342-345.
- Pinho, B., Dutra, M., Deiziane C., & Pereira, Olinto L. 2013. Notes on *Ceratocystis paradoxa* causing internal post-harvest rot disease on immature coconut in Brazil. Tropical Plant Pathology, 38(2), Pp: 152-157 [en línea]. Consultado: 28 de noviembre del 2017, <https://dx.doi.org/10.1590/S1982-56762013000200010>
- Ploetz, R.; Zentmyer, A.; Nishiyima, W. 1994. Compendium of tropical fruitdiseases. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. Pp: 27-28, 45-47.
- Proyecto Especial Pichis – Palcazu. 2010, Manual de Piña. Proyecto Mejoramiento de la producción del Cultivo de la Piña Mediante Sistemas Agroforestales en el Distrito de Perene – Chanchamayo.
- Py, C., Lacoeyllhe J. Teisson C. 1987. The Pineapple. Cultivation and Uses. G. P. Maisonneuve & Larose Ed. Paris. Pp: 205-209, 359-361
- Py, C; Tisseau, M. 1969. La Piña Tropical. Primera Edición. Editorial Blume, Barcelona, España. 278 p.
- Rahman, M., Begum, M., y Alam, F. (2009). Cribado de aislados de *Trichoderma* como agente de control biológico contra *Ceratocystis paradoxa* causante de la enfermedad de piña de la caña de azúcar. *Mycobiology*, 37 (4), Pp: 277-285. <http://doi.org/10.4489/MYCO.2009.37.4.277>
- Robles, J. 2006. Presencia de *Thielaviopsis paradoxa* en agave (*Agave tequilana* Weber var. Azul). Universidad de Guadalajara. Centro universitario de ciencias

- biológicas y agropecuarias. División de ciencias agronómicas. Tesis. Guadalajara – México [en línea]. Consultado: 12 de mayo del 2018.  
[http://repositorio.cucba.udg.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/2342/Ramos\\_Camacho\\_Jose\\_Venancio.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.cucba.udg.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/2342/Ramos_Camacho_Jose_Venancio.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Rodríguez Murillo, M. 2006. Guía de identificación y manejo integrado de plagas y enfermedades en piña.
- Rodríguez, I. 1990. Efecto antagónico de ocho aislamientos de *Trichoderma* contra *Fusarium moniliforme* (Booth) y *Fusarium subglutinans* (Booth). Trabajo de Diploma en opción al título de Ingeniero Agrónomo Universidad Agraria de La Habana. 32p.
- Rodríguez, P. 2008. Diagnóstico del cultivo de piña en la provincia de Chanchamayo [archivo PDF] [en línea]. Consultado: 18 de marzo del 2018,  
<https://vdocuments.site/diagnostico-del-cultivo-de-pina.html>
- Rohrbach, K., Schmitt, D. 1994. Butt Rot, Black Rot and White Leaf Spot. En: Compendium of Tropical Fruit Diseases. Ploetz. R.C., G.A. Zentmyer, W.T. Nishijima y W.T. Rohrbach. Editores. The American Phytopathological Society. Minnesota. EE. UU. Pp: 45-47.
- Sansoli, C. 2015. Diversidad de patogénica em isolados de *Thielaviopsis paradoxa* provenientes de diferentes áreas productoras de caña de azúcar. Universidad Estadual Paulista. Julio de Mesquita Filho. Facultad de Ciencias Agrarias e Veterinarias. Brasil.
- Snowdon, A. 1990. A color Atlas of Post-harvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables. Volume 1: General Introduction & Fruits. University of Cambridge, Florida. USA. Pp: 155-157.
- Tzeng, S, Sun, E. 2009. Fruit basal rot of coconut caused by *Ceratocystis paradoxa*. Plant Pathology Bulletin 18: 67-74.
- Vázquez de Ramallo, N. Ramallo, J. 2004. Enfermedades de la caña de azúcar en Argentina. Guía para su reconocimiento y manejo [en línea]. Consultado: 02 de febrero del 2018, <http://www.sinavimo.gov.ar/plaga/ceratocystis-paradoxa>
- Villachica, H., S. Bello y A. Julca. 1991. Mejoramiento del cultivo de la piña en la amazonia peruana. Informe Técnico N° 16. Programa de Investigación en Cultivos Tropicales INIAA. Lima Perú.
- Wesley, C. 1983. La piña. Instituto interamericano de cooperación a la agricultura.

# ANEXOS

ANEXO 1.

RESULTADOS DEL EXPERIMENTO

Tabla 1. Crecimiento radial del hongo patógeno en el medio diferenciado PDA, PZA Y V8 a temperaturas de 10, 20, 25 y 30 °C

24 HRS.

M.C. T °C	PDA + Cp			X
	R1	R2	R3	
10	0.00	0.00	0.00	0.00
20	1.08	1.20	1.15	1.19
25	1.75	1.70	1.78	1.65
30	1.25	1.30	1.18	1.28

48 HRS.

M.C. T °C	PDA + Cp			X
	R1	R2	R3	
10	0.00	0.00	0.00	0.00
20	2.58	2.63	2.58	2.59
25	4.35	4.50	4.50	4.45
30	3.40	3.43	3.28	3.37

72 HRS.

M.C. T °C	PDA + Cp			X
	R1	R2	R3	
10	0.00	0.00	0.00	0.00
20	3.88	3.98	3.95	3.93
25	4.50	4.50	4.50	4.50
30	4.50	4.50	4.50	4.50

96 HRS.

M.C. T °C	PDA + Cp			X
	R1	R2	R3	
10	0.00	0.00	0.00	0.00
20	4.50	4.50	4.50	4.50
25	4.50	4.50	4.50	4.50
30	4.50	4.50	4.50	4.50

M.C. T °C	PZA + Cp			X
	R1	R2	R3	
10	0.00	0.00	0.00	0.00
20	1.00	0.98	0.88	0.99
25	1.33	4.48	1.10	2.30
30	0.93	0.85	0.85	0.89

M.C. T °C	PZA + Cp			X
	R1	T °C	R3	
10	0.00	0.00	0.00	0.00
20	2.05	2.15	2.125	2.11
25	3.18	3.18	3.18	3.18
30	2.55	2.50	2.40	2.48

M.C. T °C	PZA + Cp			X
	R1	R2	R3	
10	0.00	0.00	0.00	0.00
20	3.20	3.28	3.23	3.23
25	3.90	3.93	3.90	3.91
30	3.65	3.20	3.30	3.38

M.C. T °C	PZA + Cp			X
	R1	R2	R3	
10	0.00	0.00	0.00	0.00
20	4.05	4.03	3.95	4.01
25	4.33	4.50	4.43	4.42
30	4.50	4.50	4.50	4.50

M.C. T °C	V8+ Cp			X
	R1	R2	R3	
10	0.00	0.00	0.00	0.00
20	0.83	0.78	0.73	0.80
25	1.13	1.10	1.00	1.04
30	1.03	1.28	1.05	1.07

M.C. T °C	V8+ Cp			X
	R1	T °C	R3	
10	0.00	0.00	0.00	0.00
20	2.15	2.18	2.08	2.13
25	3.20	3.13	3.08	3.13
30	3.15	3.60	3.08	3.28

M.C. T °C	V8+ Cp			X
	R1	R2	R3	
10	0.00	0.00	0.00	0.00
20	3.45	3.48	3.50	3.48
25	3.95	3.85	3.75	3.90
30	4.50	4.50	4.50	4.50

M.C. T °C	V8+ Cp			X
	R1	R2	R3	
10	0	0	0	0.00
20	4.03	4.03	4.03	4.03
25	4.38	4.40	4.48	4.42
30	4.50	4.50	4.50	4.50

**Tabla 2.** Crecimiento radial del hongo patógeno en medios envenados con fungicidas de acción sistémica y de contacto

**24 HORAS**

FUNGICIDAS		DOSIS ALTA				DOSIS BAJA				TESTIGO				
		R1	R2	R3	X	R1	R2	R3	X	A	B	C	D	X
CONTACTO	Mancozeb	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.9	1.9	1.8	1.7	1.83
	Propineb	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.7	1.5	1.6	1.8	5.03
SISTÉMICO	Benomil	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.8	1.8	1.9	1.7	6.08
	Procloraz	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0					

**48 HORAS**

FUNGICIDAS		DOSIS ALTA				DOSIS BAJA				TESTIGO				
		R1	R2	R3	X	R1	R2	R3	X	A	B	C	D	X
CONTACTO	Mancozeb	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.4	0.2	2.8	2.9	2.9	2.7	2.83
	Propineb	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.4	0.0	0.3	2.6	2.8	2.7	2.6	2.68
SISTÉMICO	Benomil	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.7	2.8	2.3	2.8	2.65
	Procloraz	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0					

**72 HORAS**

FUNGICIDAS		DOSIS ALTA				DOSIS BAJA				TESTIGO				
		R1	R2	R3	X	R1	R2	R3	X	A	B	C	D	X
CONTACTO	Mancozeb	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.5	0.3	4.5	4.5	4.5	4.5	4.50
	Propineb	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	0.5	0.0	0.4	4.4	4.5	4.5	4.5	4.48
SISTÉMICO	Benomil	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.5	4.3	4.5	4.5	4.45
	Procloraz	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0					

**Tabla 3.** Crecimiento radial del hongo patógeno en medios duales con controladores biológicos

**24 HRS.**

BIOC.	TH & CP		TV & CP		TESTIGO														
	TRAT.	TH	CP	TV	CP	CP					TH					TV			
A						B	C	D	X	A	B	C	D	X	A	B	C	D	X
<b>I</b>	2.50	2.20	2.30	2.50	1.80	1.50	1.80	1.90	1.75	1.50	1.90	1.50	1.30	1.55	1.70	1.70	1.60	1.70	1.68
<b>II</b>	2.20	2.90	2.20	2.00	1.60	1.40	1.70	1.80	1.63	1.80	2.00	1.90	1.60	1.83	1.60	1.70	1.50	1.60	1.6
<b>III</b>	2.20	2.30	2.30	2.20	1.70	1.70	1.80	1.60	1.7	1.90	1.70	1.60	1.70	1.73	1.70	1.50	1.50	1.40	1.53
<b>IV</b>	1.30	2.90	2.50	2.00	1.80	1.50	1.60	1.80	1.68	1.70	1.80	1.80	1.60	1.73	1.60	1.60	1.30	1.50	1.5
<b>V</b>	2.00	2.30	2.00	1.70	1.80	1.60	1.70	1.80	1.73	1.50	1.70	1.90	1.20	1.58	1.50	1.70	1.30	1.70	1.55
<b>X</b>	2.04	2.52	2.26	2.08															

**48 HRS.**

BIOC.	TH & CP		TV & CP		TESTIGO														
	TRAT.	TH	CP	TV	CP	CP					TH					TV			
A						B	C	D	X	A	B	C	D	X	A	B	C	D	X
<b>I</b>	3.50	2.90	3.40	3.80	2.10	2.40	2.50	2.90	2.48	2.70	3.30	2.90	2.20	2.78	2.80	2.90	2.90	2.70	2.83
<b>II</b>	2.80	3.60	2.70	2.80	2.20	2.50	2.60	2.50	2.45	2.90	3.40	3.10	2.80	3.05	2.90	2.80	2.80	3.00	2.88
<b>III</b>	3.50	4.40	3.50	3.80	2.20	2.60	2.10	2.70	2.40	2.60	3.20	3.00	2.60	2.85	2.70	2.60	2.90	3.00	2.80
<b>IV</b>	3.50	4.10	3.00	3.10	2.10	2.80	2.60	2.10	2.40	2.80	3.10	3.30	2.50	2.93	2.60	2.90	2.80	3.10	2.85
<b>V</b>	2.40	4.00	3.00	3.20	2.50	2.40	2.40	2.70	2.50	2.50	2.90	2.70	3.00	2.78	3.10	2.90	2.90	3.30	3.05
<b>X</b>	3.14	3.80	3.12	3.34															

**72 HRS.**

BIOC.	TH & CP		TV & CP		TESTIGO														
	REPT.	TH	CP	TV	CP	CP					TH					TV			
A						B	C	D	X	A	B	C	D	X	A	B	C	D	X
<b>I</b>	3.60	3.70	4.20	4.50	3.80	3.80	3.90	4.20	3.93	4.50	4.10	3.90	3.90	4.10	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50
<b>II</b>	3.30	5.10	2.90	3.50	3.60	4.10	3.50	3.80	3.75	4.30	3.80	4.00	4.10	4.05	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50
<b>III</b>	4.10	4.60	4.20	4.80	3.50	3.40	4.20	4.00	3.78	4.10	3.90	3.70	3.80	3.88	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50
<b>IV</b>	3.60	5.30	4.40	4.60	4.10	3.90	3.80	3.60	3.85	4.40	4.20	3.80	3.90	4.08	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50
<b>V</b>	5.20	3.80	3.90	3.80	3.80	3.40	3.60	4.20	3.75	4.50	3.90	4.10	3.80	4.08	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50
<b>X</b>	3.96	4.50	3.92	4.24															

**96 HRS.**

BIOC.	TH & CP		TV & CP		TESTIGO														
	TRAT.	TH	CP	TV	CP	CP					TH					TV			
A						B	C	D	X	A	B	C	D	X	A	B	C	D	X
<b>I</b>	4.20	4.50	4.80	4.20	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50
<b>II</b>	5.00	4.00	3.70	4.30	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50
<b>III</b>	3.60	4.70	4.80	4.20	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50
<b>IV</b>	4.80	3.80	4.80	4.20	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50
<b>V</b>	5.50	3.50	4.40	4.20	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50
<b>X</b>	4.62	4.10	4.50	4.22															

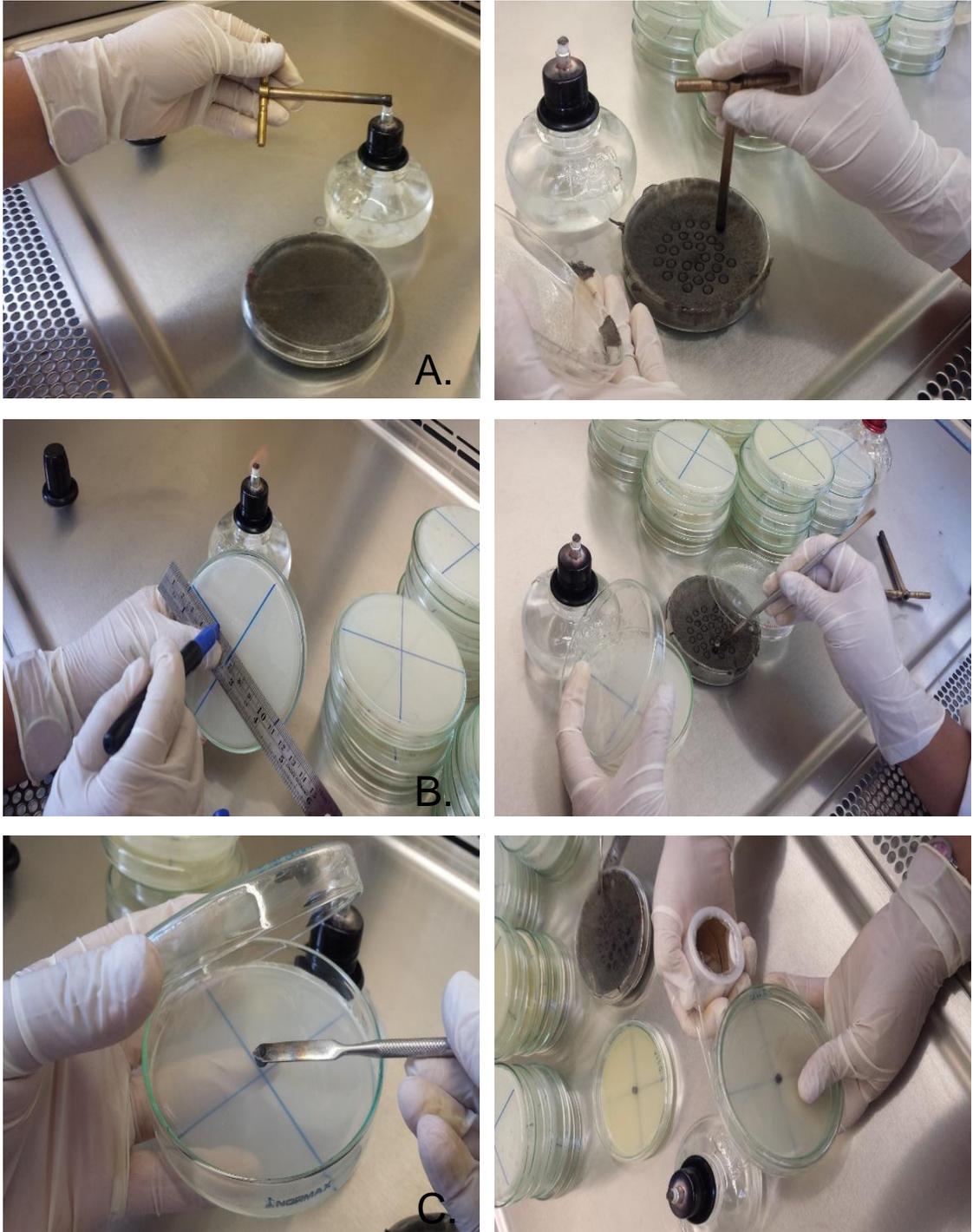
**ANEXO 2.**  
**PANEL FOTOGRÁFICO**



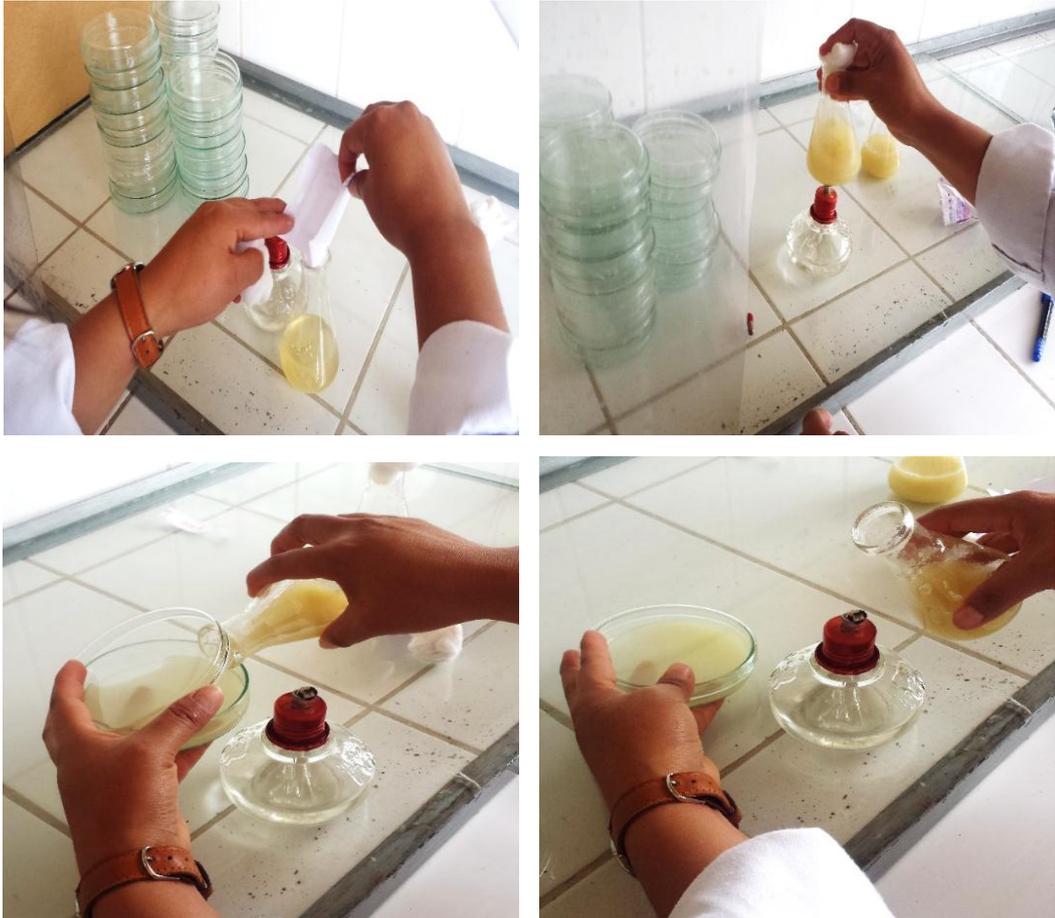
**Foto 1.** Selección y recolección de frutos que presentan síntomas de Pudrición negra de la piña



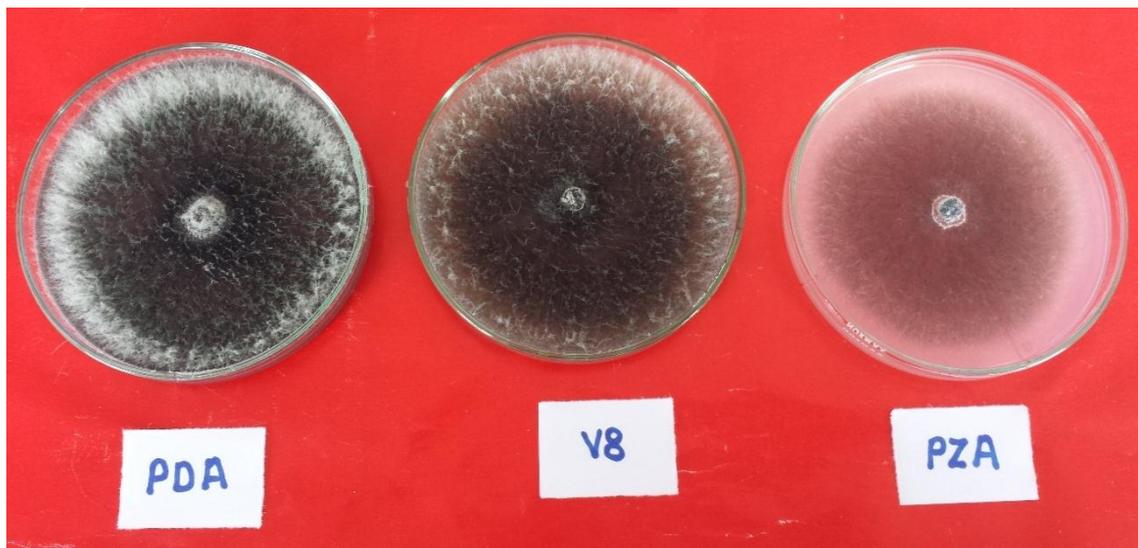
**Foto 2.** Procedimiento de aislamiento del patógeno: A. Lavado del fruto, B. Corte del tejido enfermo, C. Extracción del tejido enfermo, D. Aislamiento en un medio esterilizado, E. Siembra en PDA, F. Sellado de placas, G. incubación a 25 °C



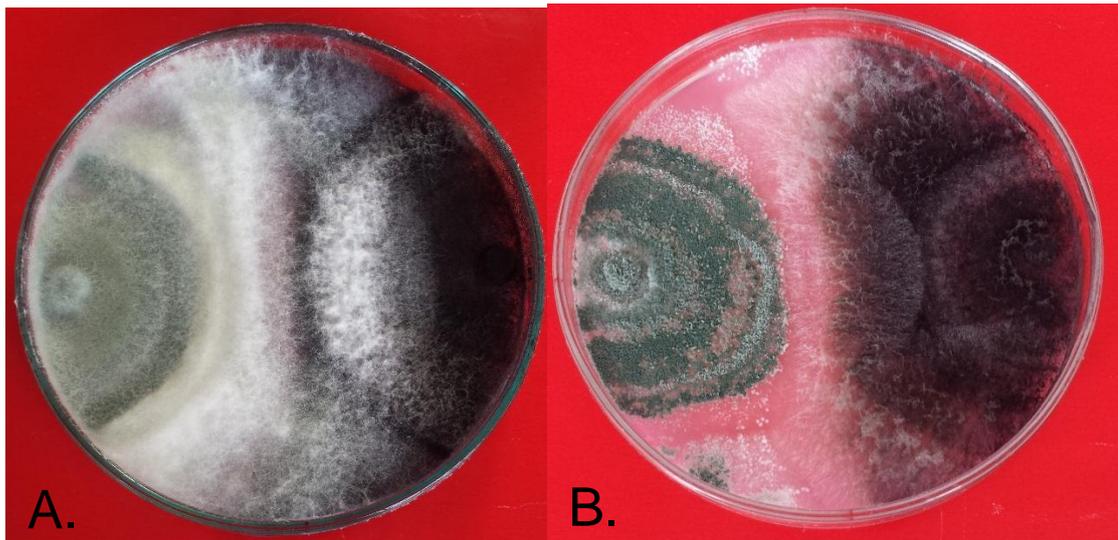
**Foto 3.** Procedimiento de purificación y repique del hongo patógeno en medio diferenciado PDA. A. Esterilización del sacabocado, B. Marcado de placa, C. Repique del hongo puro.



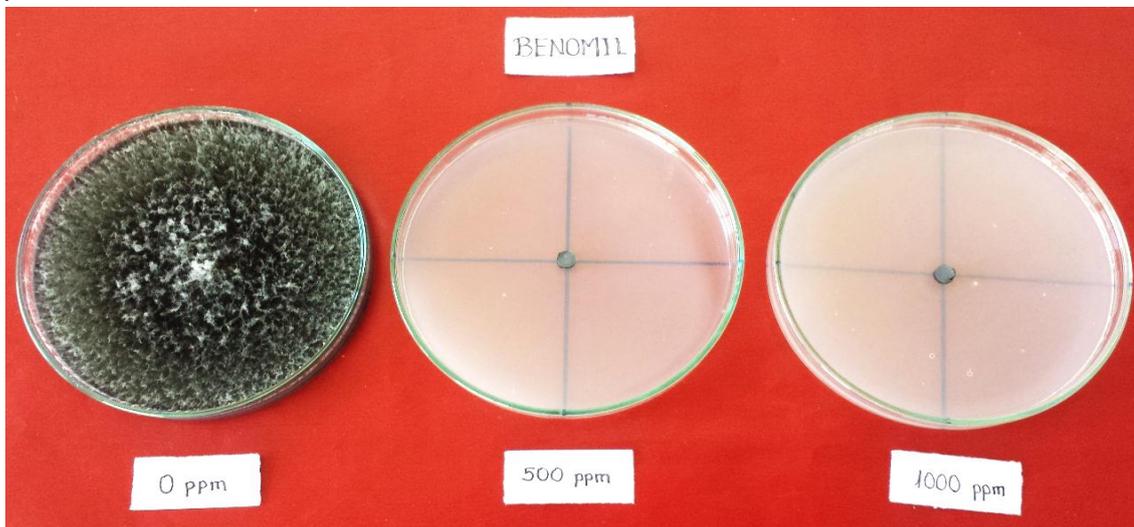
**Foto 4.** Procedimiento para la elaboración del medio diferenciado PDA envenenado, A. Se adicionó el fungicida al medio diferenciado, B. Agitar el medio, C. Palqueado, D. Incubación a 25° C.



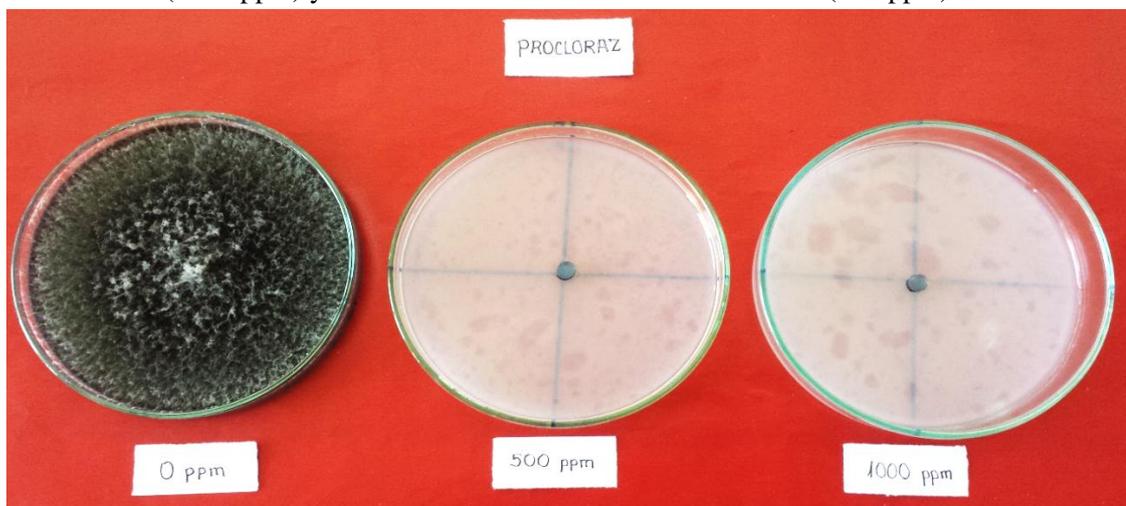
**Foto 5.** Resultados del aislamiento del agente causal de la pudrición negra de la piña en tres diferentes medios de cultivo a 25 °C



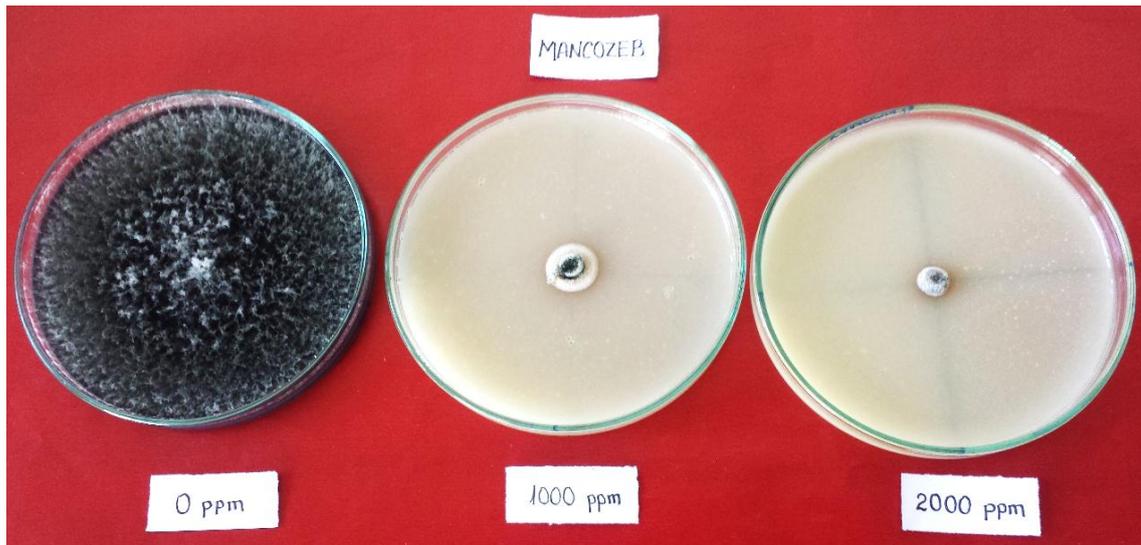
**Foto 6.** Resultados del control biológico de *Thielaviopsis paradoxa* con *Thricoderma viride* (A) y *Thricoderma harzianum* (B) a los 144 Hrs. de tratamiento.



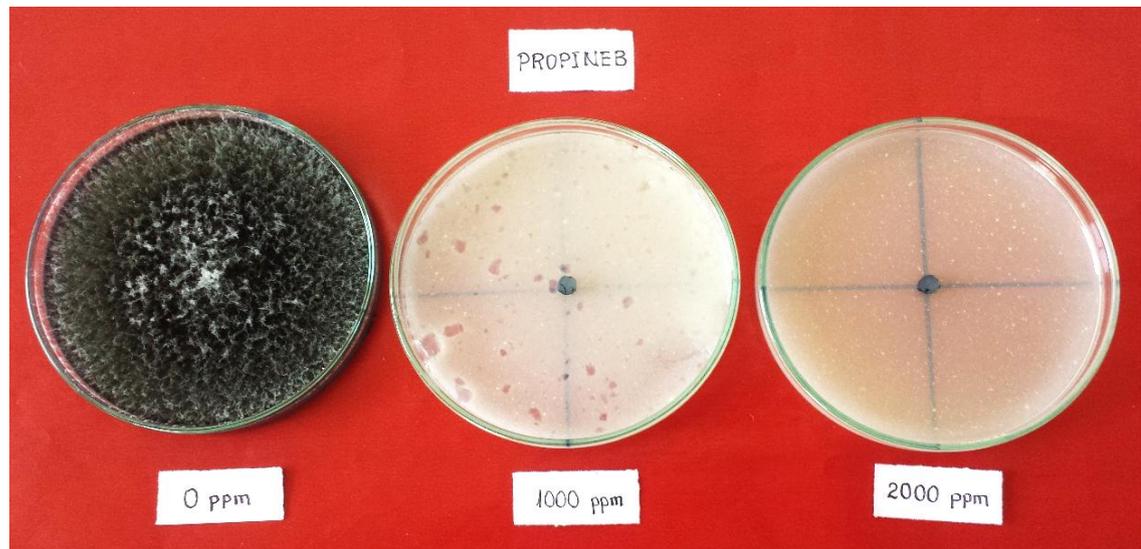
**Foto 7.** Resultados del control químico de *Thielaviopsis paradoxa* con Benomyl en volumen recomendado (1000 ppm) y menos el 50% del volumen recomendado (500 ppm).



**Foto 8.** Resultados del control químico de *Thielaviopsis paradoxa* con Prochloraz en volumen recomendado (1000 ppm) y menos el 50% del volumen recomendado (500 ppm).



**Foto 9.** Resultados del control químico de *Thielaviopsis paradoxa* con Mancozeb en volumen recomendado (2000 ppm) y menos el 50% del volumen recomendado (1000 ppm).



**Foto 10.** Resultados del control químico de *Thielaviopsis paradoxa* con Propineb en volumen recomendado (2000 ppm) y menos el 50% del volumen recomendado (1000 ppm).



**Foto 11.** Procedimiento para realizar la prueba de patogenicidad A. Daños al fruto B. Inoculación con suspensión de *Thielaviopsis paradoxa*, C. Protección de la parte inoculada, D. Prueba de patogenicidad con y sin herida en el fruto.