

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO**

**DIVISIÓN DE AGRONOMÍA  
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA**



**Efectividad Biológica del Fungicida Azoxystrobin en *Alternariaalternata*  
de Tomate (*Solanumlycopersicum*L.)*in vitro*.**

**POR:**

**LAURA DEL CARMEN ECHEVERRÍA UTRILLA**

**TESIS**

**Presentada como requisito para obtener el título de:**

**INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO**

**Saltillo, Coahuila, México**

**Abril, 2012**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

Efectividad Biológica del Fungicida Azoxystrobin en *Alternaria alternata*  
de Tomate (*Solanum lycopersicum* L.) *in vitro*.

Por

LAURA DEL CARMEN ECHEVERRÍA UTRILLA

Tesis

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Aprobada



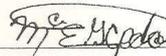
M.C. Abiel Sánchez Arizpe

Asesor Principal



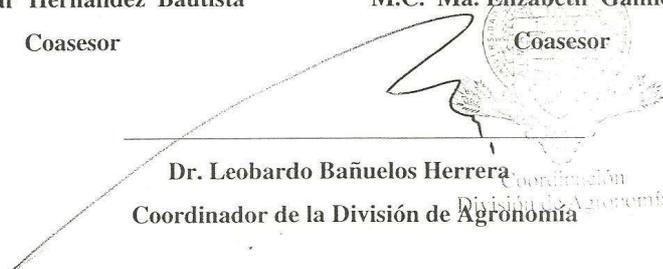
Ing. Omegar Hernández Bautista

Coasesor



M.C. Ma. Elizabeth Galindo Cepeda

Coasesor



Dr. Leobardo Bañuelos Herrera  
Coordinador de la División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México

Abril, 2012

## AGRADECIMIENTOS

Con gran amor y respeto a la **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO** por haberme recibido y brindarme una oportunidad para desarrollarme dándome conocimientos, para ser una gran profesionalista.

Mi más sincero y profundo agradecimiento al **M.C. Abiel Sánchez Arizpe** por su gran esmero en la minuciosa revisión. Por sus propuestas en el desarrollo del presente trabajo y por la motivación que recibí de él en la culminación de este trabajo.

Al **Ing. Omegar Hernández Bautista** por su valiosa cooperación en la revisión de este trabajo, como también por sus sabios consejos y por ayudarme en todo momento en la realización del mismo.

Al **M.C. Ma. Elizabeth Galindo Cepeda** por su valiosa cooperación y en la revisión de este trabajo, en los procedimientos de y métodos de laboratorio.

Al **Ing. Epifanio Castro del Ángel** por su valiosa cooperación en la revisión de este trabajo así como por sus sugerencias para realizar el mismo.

Al **M.C. Faustino Lara Victoriano** por su valiosa cooperación en la identificación del Hongo *Alteraria alternata*.

A las Técnicas **Cristina Sánchez Flores y Silvia Ovalle Nava** por su valiosa colaboración y apoyo incondicional en los trabajos de laboratorio.

## DEDICATORIAS

### A DIOS

Por darme salud, fuerza, paciencia, valor y sabiduría para seguir adelante ante todas aquellos obstáculos que se presentaron en mi camino.

### A MIS PADRES

**Sr. Magín Echeverría Ozuna y Sra. Flor UtrillaYañez**

Por su apoyo incondicional, por sus tantas palabras de aliento y motivación, por su paciencia. Y por todo el amor que en cada momento me dan para seguir luchando por mis metas. Este logro es de ellos también, gracias por siempre los AMO.

### A MIS HERMANAS

**Nadia y Carmelita**

Por ese amor que me regalan y esas sonrisas de motivación, que día a día fueron mi timón para seguir adelante y de esta manera poder demostrarles que no hay imposibles cuando algo se quiere.

### A MIS ABUELOS:

**Carmen (†), Ma. Esperanza (†), Miguel, Ma. Enriqueta (†)**

Por todo el amor, apoyo y por todas aquellas buenas enseñanzas que me dieron, infinitamente gracias mis viejitos, los querré siempre.

### A MI NOVIO

**Jorge Antonio Bautista Domínguez**

Por estar a mi lado en momentos difíciles y felices de mi vida, por su amor, por sus consejos, por toda su comprensión y por muchas cosas más. Te amo flaco.

### A MIS AMIGOS DE LA GENERACIÓN

Por compartir cada momento de alegría, de incertidumbre, de logros, de fidelidad, por todas esas palabras de aliento y amor, siempre los recordare. **Ing. Jorge Antonio, Rosivel, Rosario y Bere,** que Dios los bendiga.

**A MIS AMIGOS DE PINOLA**No los nombro uno por uno por miedo a olvidarme de unos de ustedes, pero a todos gracias por comenzar conmigo esta meta que hoy he culminado. Gracias por todo y Dios me los bendiga.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

	<b>Pagina</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	i
<b>DEDICATORIAS</b> .....	ii
<b>ÍNDICE DE CONTENIDO</b> .....	iii
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b> .....	vi
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	vii
<b>RESUMEN</b> .....	viii
<b>INTRODUCCION</b> .....	1
<b>Objetivos</b> .....	4
<b>hipótesis</b> .....	4
<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	5
Orígenes del Tomate.....	5
Importancia Económica del Tomate.....	5
Posición Taxonómica.....	6
Descripción Botánica.....	6
Raíz.....	6
Tallo.....	6
Hoja.....	7
Flor.....	7
Fruto.....	7
Semilla.....	8
Aspectos Agronómicos.....	8
Temperatura.....	8
Humedad.....	8
Luminosidad.....	9
Suelo.....	9

Agente Causal del Moho Negro ( <i>Alternariaalternata</i> ) en Tomate.....	9
Género <i>Alternaria</i> .....	10
<i>Alternariaalternata</i> .....	11
Medios de Crecimiento para <i>AlternariaAlternata</i> .....	11
Clasificación Taxonómica .....	11
Descripción Morfológica.....	12
Síntomas de la Enfermedad .....	12
Ciclo de la Enfermedad.....	13
Generalidades del Fungicida Azoxystrobin .....	13
Formula Química.....	13
Importancia Económica de Azoxystrobin .....	14
Modo de Acción .....	14
Resistencia.....	15
Recomendaciones Generales de FRAC para el Manejo de	
Resistencia en Fungicidas Qol (Incluyendo Azoxystrobin) .....	16
Toxicidad Aguda .....	16
Toxicidad Crónica .....	17
<b>MATERIAL Y METODOS</b> .....	18
Ubicación del Experimento .....	18
Material Utilizado .....	18
Desinfección del Material Utilizado .....	18
Aislamiento del Hongo en Medio de Cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA).....	19
Purificación del Hongo en Medio de Cultivo (PDA).....	19
Incremento del Inoculo de <i>A. alternata</i> en Medio Nutritivo V8 .....	19
Identificación del Agente Causal.....	20
Cultivo Monosporico de <i>A. alternata</i> .....	20
Conteo de Esporas .....	21

Preparación de la Solución para el Método de Plato Envenenado .....	22
Evaluación de Tratamientos.....	23
Análisis Estadístico .....	24
<b>RESULTADOS Y DISCUSION .....</b>	<b>25</b>
Aislamiento, Purificación, Incremento e Identificación de <i>A. alternata</i> .....	25
Evaluación de Tratamientos.....	26
Porcentaje de Germinación.....	26
Corrección de Datos Mediante Abbot, 1925 .....	27
Determinación del ED 50 .....	28
Análisis de Varianza.....	28
Comparación de Medias Mediante Pruebas de Rango Multiplicación Tukey.....	29
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>31</b>
<b>CONCLUSIÓN .....</b>	<b>32</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>33</b>
<b>APÉNDICE.....</b>	<b>37</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

	<b>Pagina</b>
<b>Cuadro 1.</b> Maleza hospedera del hongo Moho negro ( <i>A. alternata</i> ) en tomate (Bruna, 2003) .....	<b>10</b>
<b>Cuadro 2.</b> Tratamientos del hongo <i>A. alternata</i> en platos envenenados con el fungicida Azoxystrobin .....	<b>23</b>
<b>Cuadro 3.</b> Porciento de germinación de conidias de <i>A. alternata</i> en el testigo (Acetona) a las 4 hrs y 8 hrs. ....	<b>27</b>
<b>Cuadro 4.</b> Porciento de germinación de conidias de <i>A. alternata</i> en el testigo (Agua) a las 4hrs y 8 hrs .....	<b>27</b>
<b>Cuadro 5.</b> Corrección de porcentaje de inhibición de conidas de <i>A. alternata</i> mediante Abbott, 1925; al presentar 5.5% de conidias germinadas en el testigo de acetona .....	<b>28</b>
<b>Cuadro 6.</b> Determinación del ED <sub>50</sub> de Azoxystrobin a las 8hrs; obtenidas mediante un análisis Probit con el programa estadístico SAS .....	<b>28</b>
<b>Cuadro 7.</b> Análisis de varianza para la germinación de <i>A. alternata</i> con datos transformados mediante Arco-seno .....	<b>29</b>
<b>Cuadro 8.</b> Comparación de medias de la germinación de <i>A. alternata</i> con datos previamente transformados mediante pruebas de rango múltiple Tukey .....	<b>30</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pagina</b>
Figura 1. Conidias de <i>A. alternata</i> (Ellis, 1997) con 1 a 9 septos transversales y varios longitudinales u oblicuos.....	12
Figura 2. Redistribución sobre la hoja en el tiempo (tres días después de la aplicación) de diferentes estrobilurinas marcadas radioactivamente a partir de una zona de aplicación “D” Azoxystrobin, (Fuente Syngenta) .....	15
Figura 3. Cepa pura de <i>A. alternata</i> formando colonias de crecimiento radial y de color gris.....	25
Figura 4. A Observación de <i>A. alternata</i> vista en un microscopio compuesto con objetivo de 10x; en una monta realizada con porta y cubre objetos más lactofenol. B Monta microscópica de <i>A. alternata</i> vista con el objetivo de 40x con características taxonómicas de (Neergaard, 1945) .....	25
Figura 5. A Conidia del mismo tratamiento observado a las 8 hrs. Completamente inhibida por el mecanismo de acción de ingrediente activo Axozystrobin. B Conidia del tratamiento a 10000 ppm con malformaciones en el tubo germinativo a las 8 hrs .....	26

## RESUMEN

El Moho negro (Pudrición negra) del tomate causado por el hongo *Alternaria alternata* es la principal enfermedad del fruto para industria en el Norte de Sinaloa. Los síntomas varían desde pequeñas lesiones superficiales de color café claro hasta lesiones necróticas hundidas en los frutos maduros y en condiciones de alta humedad, el hongo produce una capa negra de conidios sobre el tejido infectado. En la región antes mencionada, es muy común la aplicación del fungicida Mancozeb para el control de esta enfermedad; sin embargo, en muchas ocasiones las aplicaciones no resultan eficientes debido a que se realizan con presencia de síntomas iniciales.

Considerando la importancia del Moho negro; se llevó a cabo el presente estudio con el objetivo de determinar la efectividad del ingrediente activo Azoxystrobin, para el control de germinación de conidias de *Alternaria alternata*. Para ello empleamos el método de sensibilidad *in vitro* descrita por FRAC (Fungicide Resistance Action Committee), la cual consiste en comparar la germinación de conidias a diferentes concentraciones del fungicida, en este caso fueron: 1 ppm, 10 ppm, 100 ppm, 1000 ppm y 10,000 ppm, con 4 repeticiones cada una, bajo las condiciones de: 26 °C de temperatura y luz continua; el conteo de la germinación de conidias se realizó a las 8 horas después de la siembra.

Los resultados demostraron que la germinación de conidias a diferentes concentraciones de 1, 10, 100, 1000 y 10,000 ppm, fueron: 68.070, 66.235, 60.563, 49.343 y 4.065% respectivamente, se corrigió la inhibición al presentar conidias no germinadas en el testigo mediante el método de Abbott, 1925, los cuales se registraron de la siguiente manera: 10.05, 12.16, 20.10, 40.21, 98.94 % de inhibición por el ingrediente activo Azoxystrobin.

**Palabras clave:** *Alternaria alternata*, Azoxystrobin, *in vitro*, Moho negro, Inhibición de conidias, Tomate.

## INTRODUCCIÓN

Para enfrentar un problema existen dos procesos básicos: la definición del problema y la solución, en algunas ocasiones se torna muy difícil solucionar un problema sin definirlo adecuadamente, dentro de un programa de mejoramiento y protección vegetal, la evaluación de las pérdidas o daños económicos se relaciona con el proceso de definición (James, 1974); si no disponemos de información sobre la magnitud de las pérdidas que eventualmente puede ocasionar una enfermedad o un factor limitante de la producción, no estamos en condiciones de decidir adecuadamente los montos que se deben invertir para su control.

La calidad del fruto debe definirse en función del uso al que va a ser destinado el producto. En el caso del tomate fresco deben considerarse todas las características valoradas por los consumidores, incluyendo el sabor, el aroma y la textura (Jarén, 2005). Las cualidades organolépticas están relacionadas con la composición química, Aguayo y Artés (2004); consideran que para tener un aroma y un sabor óptimo, los tomates deben tener un contenido en sólidos solubles (TSS) entre 4 y 6 °brix y un pH entre 4 y 5. Baldwin *et al.* (1998); Consideran que la relación entre el TSS y la acidez es un buen indicador para el sabor y el aroma de los tomates frescos.

El tomate (*Solanumlycopersicum*L.) es la hortaliza más importante en muchos países del mundo; su cultivo está difundido en todos los continentes y en muchos casos representa una de las principales fuentes de vitaminas y minerales para las personas (Nuez, 1995).

Los problemas fitosanitarios constituyen el principal limitante del cultivo del tomate, en las zonas productoras; por su importancia económica destacan las enfermedades fungosas; en particular, el tizón tardío causado por *Phytophthora infestans*(Mont) De Bary. El Tizón temprano, ocasionado por *Alternaria solani*(Ellis y Martin) y el Moho negro del tomate, causado por *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.), los cuales afectan ramas, pecíolos, hojas, tallos y frutos, causando una disminución considerable de la producción (Fraire, 1993);

tradicionalmente el control de estos patógenos ha sido por agroquímicos, los cuales se aplican a la semilla, follaje y al suelo, con resultados favorables.

El “Moho negro” del tomate causado por *Alternariaalternata*, es la enfermedad más importante de los tomates en la agroindustria en la zona central de Chile; lo que provoca la disminución en el rendimiento e impacta negativamente la calidad de los frutos, siendo estos rechazados en las plantas procesadoras del país.

Este hongo *Alternariaalternata* infecta a los frutos maduros, los síntomas varían desde las pequeñas lesiones superficiales de color café claro hasta lesiones necróticas hundidas. En condiciones de alta humedad, el hongo produce una capa negra de conidios sobre el tejido infectado.

Esta enfermedad es endémica en el Norte de Sinaloa y su severidad varía de acuerdo a las condiciones de humedad prevalentes durante la madurez de los frutos y al retraso en las cosechas. Cuando ocurren periodos prolongados de follaje mojado debido a rocíos, lluvia o alta humedad relativa, los conidios del hongo germinan en respuesta a nutrientes solubles presentes en la superficie de los frutos (Pearson and Hall, 1975); invadiendo hasta un 50% de ellos. Todos los genotipos de tomate para la industria que se usan actualmente son susceptibles a la enfermedad (IPM Manual Group-UC, 1982), de ahí la importancia del uso de los fungicidas para su control.

Los productores de tomate que abastecen la industria del Norte de Sinaloa comúnmente realizan 1 ó 2 aplicaciones de Mancozeb para el control de Moho negro en frutos de tomate, y en muchas ocasiones estas resultan ineficientes debido a que se realizan cuando ya observan los síntomas iniciales de la enfermedad. Ante esto se realizaron estudios sobre el control del moho negro en California donde indican que una aplicación de Clorotalonil efectuada 6 semanas antes de la cosecha controla satisfactoriamente la enfermedad (Davis *et al.*, 1997).

Estudios realizados durante el desarrollo del proyecto Manejo integrado de Enfermedades del tomate, permitieron establecer; que la incidencia de la enfermedad del Moho negro; se incrementa desde la cosecha de los frutos hasta que éstos son recibidos en las plantas procesadoras, pudiendo alcanzar pérdidas que llegan a un 15%, según el manejo fitosanitario durante el cultivo.

Cuando la incidencia de *Alternariaalternata* supera el 8%, los productores reciben descuentos en la cosecha o ésta es rechazada por la industria, lo que representa pérdidas significativas. Esta enfermedad es endémica en el Norte de Sinaloa y su severidad varía de acuerdo a las condiciones de humedad prevalentes durante la madurez de los frutos y al retraso en la cosecha.

Siendo uno de los problemas fitosanitarios que enfrentan los productores del cultivo de tomate, así como el decremento que provoca en la producción, asociado a la poca información que se tiene sobre esta enfermedad, tomando en cuenta lo anterior, se llevó a cabo la realización de esta importante investigación para poder comprobar la efectividad del fungicida de ingrediente activo Azoxystrobin en cuanto a inhibición de la germinación de conidias del hongo de *A. alternata* en forma *in vitro*.

## **OBJETIVO**

Evaluación *in vitro* del fungicida Azoxystrobin en el hongo *Alternaria alternata* que causa la enfermedad del Moho Negro en frutos de tomate.

## **HIPOTESIS**

Se espera que al menos una de las concentraciones establecidas a evaluar logre la mayor inhibición en cuanto germinación de conidias del hongo *Alternaria alternata* bajo condiciones *in vitro*.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### Origen del Tomate

El cultivo del tomate (*Solanumlycopersicum*L.), es originaria del Perú, Ecuador y México, e introducido a Europa en el siglo XVI; al principio, cultivado como planta de ornato; A partir de 1900 se extendió el cultivo como alimento humano y actualmente ocupa un lugar importante entre las hortalizas en el mundo; Además, es una importante materia prima para la industria de transformación (Rick, 1976).

### ImportanciaEconómica del Tomate

En la producción nacional, el tomate es la hortaliza número uno en volumen producido, peso absoluto y relativo en las exportaciones hortícolas y su papel como motor en la introducción del progreso tecnológico en la agricultura mexicana. El cultivo del tomate se lleva a cabo en 26 estados de la República entre los que sobresalen en orden de importancia Sinaloa, Baja California Norte, San Luis Potosí, Jalisco, Nayarit y Sonora. Las exportaciones han crecido en forma continua durante los 10 últimos años con excepción de 1992, cuando por inundaciones en Sinaloa la oferta exportable bajo y la reducción del volumen exportado en 1999 por cuestiones sobre oferta en Estados Unidos (Schwentesiuss y Gómez, 2000; citado por Gil, 2000).

En México el tomate se encuentra dentro de las primeras cuatro hortalizas más importantes, debido a la superficie cultivada y a las divisas que genera por concepto de las exportaciones principalmente a los Estados Unidos (SAGARPA, 2000).

Mientras que en el Estado de Sinaloa la superficie utilizada para el cultivo de tomate es de 14,095.68 ha, con una producción de 687,056.78 ton; obteniendo así un rendimiento de 49.59 ton/ha por lo que logro a gran escala en valor de producción de \$ 3, 238,715.17 en miles de peso (SIAP, 2010).

## Posición Taxonómica

Los tomates silvestres se agrupaban hasta hace poco tiempo en el género *Lycopersicum*. Actualmente, ya incluidas en el género *Solanum*, se siguen descubriendo y clasificando nuevas especies de tomates, como por ejemplo *Solanummarcanum* y *S. huaylasense*(Peralta *et al.*, 2005).

Reino..... Plantae

División.....Magnoliophyta

Clase.....Magnoliopsida

Subclase.....Asteridae

Orden.....Solanales

Familia.....Solanaceae

Género.....*Solanum*

Especie.....*lycopersicum*

## Descripción Botánica

### Raíz

El sistema radicular del tomate consta de una raíz principal pivotante;pudiendo llegar a una profundidad de más de 1.25 m, simultáneamente se producen raíces adventicias y ramificaciones secundarias que pueden llegar a formar una masa densa y de cierto volumen; los suelos ligeros y arenosos favorecen el desarrollo de raíces profundas (FAO, 2010).

### Tallo

El tallo típico tiene de 2 a 4 cm de diámetro en la base y está cubierto por pelos glandulares que salen de la epidermis (Nuez, 1995). Rodríguez *et al.*, (1984) citados por Tapia (1985) mencionan que el tallo es erguido durante los primeros

estadios de desarrollo pero pronto se tuerce a consecuencia del peso, siendo necesario tutorarlo cuando se cultiva en invernadero.

## **Hoja**

La hoja es compuesta y posee un número impar de folíolos verdes, que depende de la variedad y de la posición de la hoja en la planta; Asimismo la forma, dimensión, estructura, espesor y color son factores que también dependen de la variedad; En general las hojas de variedades tardías son más gruesas y más oscuras aunque también influyen las condiciones de cultivo. Cuando la planta es muy vigorosa ocurre que la hoja se repliega alrededor del raquí, mientras que el abullonado de las hojas jóvenes puede ser debido a un estrés hídrico o a los pinzamientos, sobre todo en el tipo determinado (FAO, 2010).

## **Flor**

Flor de pedúnculo corto, cáliz gamosépalo con 5 ó 10 lóbulos; El androceo presenta 5 ó más estambres unidos a la corola; El gineceo presenta de 2 a 30 carpelos que originan los lóculos del fruto (Folquier, 1976). La floración del tomate se produce en forma de raíces simples o ramificados (distintos tipos de climas) en diferentes pisos o estratos, siendo lo normal que en cada inflorescencia pueda haber entre 7 y 10 flores, aunque en ocasiones pueden llegar hasta 50 (Maroto, 1989).

## **Fruto**

El fruto del tomate es una baya globosa o piriforme de color generalmente amarilla, rosa o rojo, debido a la presencia de licopeno y caroteno en distintas y variable proporción; El tamaño del fruto depende principalmente del número de óvulos fecundados, pero hay muchos otros factores que juegan un papel importante, como por ejemplo la nutrición, el riego, la temperatura y el número de lóculos. Con las variedades multiloculares se obtienen frutos grandes y acostillados cuando la planta tiene buen suministro de agua y nutrientes (FAO, 2010).

## **Semilla**

Las semillas de tomate son pequeñas, reniformes de germinación superficial de color café y de 3 a 5 mm de largo con 2 a 4 mm de ancho; La superficie está cubierta de vellosidades, de pequeñas escamas y restos del tegumento externo que las revestían esta conserva su poder de germinación durante 4 o más años si se mantiene en condiciones adecuadas (FAO, 2010).

## **Aspectos Agronómicos**

### **Temperatura**

El tomate es una planta termoperiódica, creciendo mejor con temperaturas variables que constantes, variando con respecto a la edad de la planta (Went, 1984; citado por Nuez, 1995).

Rodríguez *et al.* (1984) mencionan que debido al origen tropical del tomate, este necesita temperaturas sensiblemente elevadas para asegurarse un ciclo total de vegetación y llevar sus frutos a una maduración completa; el ciclo estival debe ser relativamente largo, resultando necesaria, por término medio una temperatura diurna de 23 a 24 ° C y una temperatura nocturna de 14 ° C.

### **Humedad**

La alta humedad relativa del aire tiene gran interés sobre todo durante la dehiscencia polínica y la consiguiente polinización y fecundación, siendo quizá la más adecuada entre un 55 y un 60%. Además de que como cifras medias, el tomate, para cubrir su ciclo, requiere de unos valores de la integral térmica comprendidos entre 3000 y 4000 °C(Maroto, 1989).

Rodríguez *et al.* (1984) mencionan que la humedad influye sobre el crecimiento de los tejidos, fecundación de las flores y desarrollo de las enfermedades criptogámicas. Si la humedad relativa es menor a 50% no hay una buena retención de los granos de polen y las flores se desprenden de la planta; al disminuir la humedad relativa a menos del 40% se provoca deficiencia de calcio, ya que este elemento se absorbe mejor cuando existe transpiración normal que cuando disminuye (Guenkov, 1974).

## **Luminosidad**

En cuanto a las exigencias de luz para que se formen buenos frutos de tomates, es necesario un mínimo de luz de 4000 a 6000 pie/bujía o Luxes; en caso de escasez de iluminación el ciclo vegetativo puede alargarse demasiado(Guenkov, 1974).

## **Suelo**

El mejor tipo de suelo para este cultivo es el franco-arenoso o arenoso y de preferencia con un alto contenido de materia orgánica (Folquier, 1976).

### **Agente Causal del Moho Negro (*Alternariaalternata*) en Tomate**

Es la principal enfermedad del cultivo de tomate industrial; Este hongo causa lesiones irregulares de color café en las hojas y termina secándolas, especialmente en la parte basal (Bruna, 2003).

Afecta también a los frutos tanto en el campo como en almacenamiento, formando lesiones localizadas en todo el fruto, especialmente en la parte superior, donde se deposita el rocío y allí el hongo absorbe nutrientes secretados por el fruto; También se le encuentra en la parte apical, especialmente cuando previamente ha existido daño por pudrición apical. La pudrición del fruto es seca, de color café negruzca y puede penetrar profundo (Bruna, 2003).

Estas pudriciones en los frutos son causa de rechazo de los tomates en las plantas agroindustriales; La penetración del hongo se produce a través de numerosas heridas (hendiduras de crecimiento, golpes de sol, necrosis apical, picaduras de insectos, golpes diversos) y además, a través de la cutícula del fruto en forma directa (Bruna, 2003).

El agua libre sobre los frutos y el suelo durante varias horas, son condiciones muy propicias para el desarrollo de la enfermedad; por otra parte, los riegos realizados después de un periodo de sequía, pueden ser el origen de numerosas hendiduras de crecimiento a partir de las cuales el hongo podrá penetrar al fruto, riegos mal dirigidos conducen a la misma situación (Bruna, 2003).

Se le encuentra frecuentemente en el suelo; en restos de tejidos enfermos, en las cubiertas de las semillas, en la mayoría (Cuadro 1) de la maleza que son frecuentes en los cultivos de tomate y en otros hospederos perennes como manzanos y álamos(Bruna, 2003).

**Cuadro 1.** Maleza hospedera del hongo que causa el Moho negro (*Alternariaalternata*) en tomate según Bruna, 2003.

<b>Nombre común</b>	<b>Nombre científico</b>
Ballica	<i>Loliummultiflorum</i>
Bledo	<i>Amaranthusdeflexus</i>
Chamico	<i>Datura stramonium</i>
Chépica	<i>Cynodondactilon</i>
Cicuta	<i>Coniummaculatum</i>
Chufa	<i>Cyperussculentum</i>
Correhuela	<i>Convolvulusarvensis</i>
Diente de león	<i>Taraxacumofficinale</i>
Galega	<i>Galega officinalis</i>
Lechuguilla	<i>Lactucaserriola</i>
Malva	<i>Malva rotundifolia</i>
Quinqûilla	<i>Chenopodium álbium</i>
Rábano	<i>Raphanuspp.</i>
Sanguinaria	<i>Polygonumaviculare</i>
Senecio	<i>Senecio vulgaris</i>
Verdolaga	<i>Potulacaaleracea</i>
Yuyo	<i>Brassicacampestris</i>

### **Género *Alternaria***

El género *Alternaria* contiene especies cosmopolitas que se encuentran en un amplio rango de materiales y productos; Como saprobias pueden deteriorar alimentos y forrajes, produciendo compuestos biológicamente activos tal como micotoxinas; Como patógenas reducen el rendimiento de las cosechas o afectan a los vegetales almacenados; Es necesaria una identificación precisa de las especies porque cada nombre entraña un conjunto de características (preferencias para el crecimiento, patogenicidad, producción de metabolitos secundarios) que permiten predecir el comportamiento del hongo (Andersen *et al.*, 2001).

## ***Alternariaalternata***

Es un hongo presente en todos los continentes, causa la muerte de las plantas, daña al fruto y disminuye el rendimiento; las lesiones en frutos disminuye su valor comercial atacando al tomate, papa, berenjena, zanahoria, papaya entre otros muchos hospederos, sobreviviendo de una estación a otra, en el suelo y restos de cultivos(Agrios, 2005).

### **Medios de Crecimiento para *Alternariaalternata***

Las características del crecimiento constituyen uno de los criterios para la clasificación; en medio de cultivo Czapek- Levadura *A. alternata* produce colonias con un diámetro de 56 a 63 mm en tan solo 1 semana a 27°C, son chatas y ligeramente algodonosas con micelio aéreo de color gris verdoso y al reverso de color negro parduzco; Mientras que las cepas de *A. infectoria* forman escasos conidios, tienen un micelio algodonoso y el reverso de la colonia es oscuro en el centro rodeado de un anillo anaranjado pálido(Andrews, 1992).

Los cultivos de *A. alternata* en medios de cultivo PDA; al principio son blancos, pero se torna a un gris oscuro con bordes blancos a las 48 hrs. posteriormente, la colonia se extiende cubriendo la caja de petri; la esporulación es abundante, de color casi negro donde los conidióforos son verde olivo y septados (Jones *et al.*, 1997).

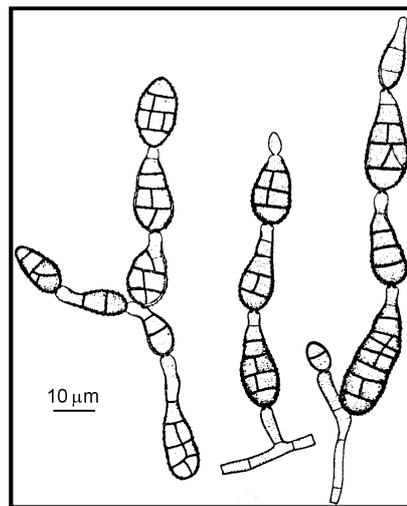
### **Clasificación Taxonómica**

Alexopouloset *al.* (1996), ubica *Alternariaalternata* de la siguiente manera:

Phylum.....*Ascomycota*  
Clase.....*Euascmycetes*  
Orden.....*Pleosporales*  
Familia..... *Pleosporaceae*  
Género.....*Alternaria*  
Especie.....*alternata*

## Descripción Morfológica

Hongo filamentoso con conidióforos simples, tabicados, en cuyo extremo se forman unos conidios muriformes, de color pardo, con septos transversales y verticales de disposición irregular (Figura 1), que por gemación de la célula apical se genera un nuevo conidio, formándose largas cadenas de 10 o más conidios. (Jones *et al.*, 1997). Las cadenas aparecen en los cultivos como manojos densos y aislados (Roberts *et al.*, 2000).



**Figura 1.** Conidios de *A. alternata* (Ellis, 1971) con 1 a 9 septos transversales y varios longitudinales u oblicuos (Disponible en: [www.unsa.edu.ar/matbib/hongos/htextocubierta.pdf](http://www.unsa.edu.ar/matbib/hongos/htextocubierta.pdf)).

## Síntomas de la Enfermedad

Los síntomas en hojas y fruto son característicos de la enfermedad: manchas alargadas café oscuro a negro, con anillos concéntricos; Las áreas afectadas se oscurecen ligeramente hasta llegar a negro; Este manchado comienza alargándose ligeramente hasta la parte superior de la planta hasta que la planta muere; en el fruto las lesiones son firmes, hundidas y a veces con anillos concéntricos con un denso gris oscuro a verde olivo, sobre estas lesiones se produce abundantes fructificaciones (Jones *et al.*, 1997).

## Ciclo de la Enfermedad

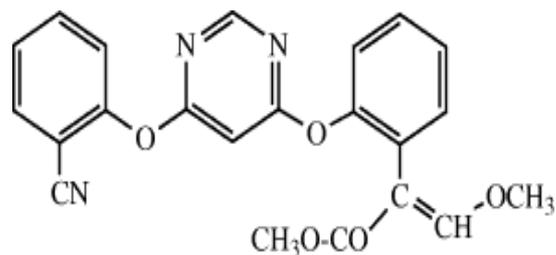
Los hongos de la pudrición negra son importantes saprofitos y causan enfermedad en fruto, la infección ocurre cuando las esporas son diseminadas por aire, sobre la planta o cuando la planta entra en contacto con el suelo infestado y en el fruto cuando esté presente una herida penetra por la cutícula o pericarpio; La germinación e infección puede infectar plantas heridas; penetrando por lesiones en la cutícula de la hoja o del fruto, en plantas poco vigorosas o estresadas son más susceptibles; también la falta de nutrientes, aumenta la susceptibilidad (Jones *et al.*, 1997).

## Generalidades del Fungicida Azoxystrobin

Azoxystrobin es el primer ingrediente activo descubierto en la clase química de los compuestos B-metoxiacrilatos (Fungicidas QoI Cód.FRAC11-GrupoC) (FRAC,2010), los cuales son moléculas sintéticas análogas a las estrobilurinas de ocurrencia natural, que están presentes en hongos de los géneros *Oudemansiella* y *Strobilurus*.

## Formula Química

$C_{22}H_{17}N_3O_5$  y su fórmula estructural es: Methyl (E)-2-(2-(2-cyanophenoxy)pyrimidin-4-yloxy-phenyl)-3-methoxyacrylate (IUPAC).



## Importancia Económica de Azoxystrobin

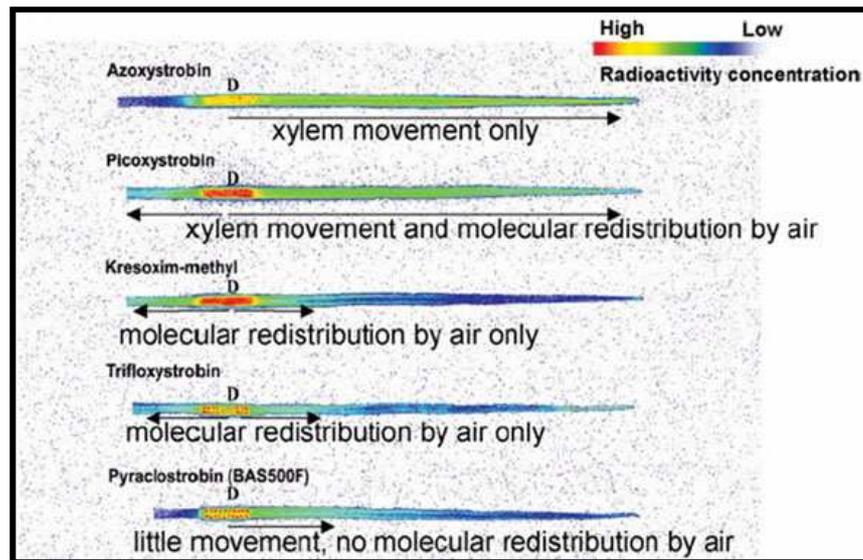
Este fungicida estuvo disponible comercialmente en 1998, siendo una característica fundamental su amplio espectro, cuya actividad biológica está dirigida contra géneros en los cuatro principales grupos de hongos fitopatógenos: Ascomicetos (ej. Cenicillas, Botrytis), Basidiomicetos (ej. Royas), Deuteromicetos (ej. Necrosis del arroz) y Oomycetos (ej. Mildius). Hoy, a nivel mundial, productos fungicidas con el ingrediente activo Azoxystrobin han sido desarrollados y tienen registros para el control de hongos de los géneros: *Alternaria*, *Mycosphaerella*, *Phakopsora*, *Cercospora*, *Puccinia*, *Phoma*, *Exserohilum*, *Colletotrichum*, *Phytophthora*, *Botrytis*, *Rhizoctonia*. Principalmente y en diferentes cultivos como soya, cereales, vid, papa, tomates y banano entre otros, constituyéndose en una alternativa de amplio uso y complementaria en esquemas de rotación en donde solo se contaba con un limitado número de alternativas fungicidas, por ejemplo triazoles (Wong, 2002).

### Modo de Acción

Su modo de acción bioquímico está definido por la inhibición del transporte de electrones del complejo III en la respiración (fungicida de sitio específico) y su actividad biológica está principalmente orientada hacia la inhibición de la germinación, penetración y, con menor especificidad, en el crecimiento micelial del hongo; algunos autores han reportado su efecto como de alto desempeño, en particular, en las etapas de preinfección de los patógenos (Wong, 2002).

Todas las estrobilurinas tienen algún potencial de movimiento hacia el interior de las plantas y son localmente sistémicas (translaminares) pero se han observado comportamientos diferenciales entre ellas. Por ejemplo, Pyraclostrobin es una estrobilurina localmente sistémica, siendo tomada por la planta pero no desplazándose a través de ella más allá del punto de toma. En contraste, Azoxystrobin es tomado por la planta y dispersado a una distancia definida más allá del punto de toma, por otra parte; se ha observado para otro fungicida QoI, Kresoxim-methyl la capacidad de redistribución superficial a través de efectos de volatilización, (termino denominado mesostémia), pero una limitada capacidad de distribución en el interior del tejido lo que determina un efecto sobre patógenos

que concentran sus estructuras sobre los tejidos más que hacia el interior de los mismos y en comparación con Azoxystrobin que si lo logra en este caso. Todos estos comportamientos determinan un diferencial de desempeño en el tiempo y así mismo definen su actividad biológica en el control de diferentes patógenos (Fuente Syngenta).



**Figura 2.** Redistribución sobre la hoja en el tiempo (tres días después de la aplicación) de diferentes estrobilurinas marcadas radioactivamente a partir de una zona de aplicación "D" Azoxystrobin: El movimiento es únicamente por xilema, Picoxystrobin: El movimiento es por xilema y su redistribución molecular lo hace con ayuda del aire, Kresoxim-methyl: Redistribución molecular solo por aire, Trifloxystrobin: Redistribución molecular solo por aire, Pyraclostrobin (BAS500F): Poco movimiento, sin redistribución molecular por vía aérea (Fuente Syngenta).

### Resistencia

Aunque Azoxystrobin es una de las primeras sustancias del relativamente nuevo grupo de fungicidas de la clase estrobilurinas, hay patógenos que ya han desarrollado resistencia, la cual se sabe se ha extendido desde el año 1999; Dado su carácter de fungicida de sitio específico que actúa en procesos del metabolismo primario, la selección de cepas resistentes de diversos patógenos se ha hecho evidente en, *Blumeria (Erysiphe)*, *Graminisf.sp. tritici*,

*Mycosphaerellafijiensis*, *Plasmoparaviticola*, *Pseudoperonosporacubensis*, *Venturiainaequalis*, *Pythiumaphanidermatum*, en los cuales se ha observado pérdida total o parcial de la eficacia con el uso del fungicida cuando es aplicado individualmente, sin embargo para *P. infestans*, *Bremialactucae*, *Peronosporaspp.* y todos los géneros de royas (*Puccinia*, *Uromyces*, *Phakopsora*, *Hemileia*) no se ha observado la aparición de cepas resistentes (Gisi, 2008).

### **Recomendaciones Generales de FRAC para el Manejo de Resistencia en Fungicidas QoI (Incluyendo Azoxystrobin) son:**

- ❖ Realizar aplicaciones de fungicidas QoI solo en esquemas de rotación, considerando efectos de resistencia cruzada entre ingredientes activos del grupo.
- ❖ Si se utilizan ingredientes activos del grupo QoI individualmente se deben realizar aplicaciones únicas o en bloque, si se dispone de mezclas formuladas o de tanque con otros fungicidas (conocidas) se deben realizar aplicaciones en un esquema similar. Debe asegurarse que los fungicidas de mezcla aseguren los controles para los patógenos a tratar.
- ❖ Asegurar la eficacia de las alternativas complementarias en las rotaciones.
- ❖ En general los fungicidas QoI son muy efectivos en la prevención de la germinación de esporas, y por esto deberían ser utilizados en los primeros estadios del desarrollo de la enfermedad (tratamiento preventivo).

### **Toxicidad Aguda**

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica el Azoxystrobin como sustancia "levemente peligrosa" (Clase III), por lo que su LD<sub>50</sub> (dosis oral requerida para matar la mitad de una población de ratas de laboratorio) es de más de 5.000 mg/kg para las ratas. Irrita la piel y puede causar sensibilización; también está clasificado como tóxico en cuanto a su inhalación (WHO, 1999).

El Comité Asesor en Plaguicidas del Reino Unido (ACP, por su sigla en inglés) señaló que los usos para los cuales se estudió su aprobación "no incluían la aspersión que generaba partículas de un tamaño relevante para la inhalación", por lo cual recomendó cuidar que el riesgo potencial de inhalación se mantuviera dentro de rangos aceptables, la ACP también destacó que la sustancia activa contenía un coadyuvante clasificable como capaz de ser potencialmente generador de sensibilidad en la piel, y la industria que lo fabrica estuvo de acuerdo en reformular el producto para reducir la cantidad del coadyuvante (EPA,1997).

### **Toxicidad Crónica**

La EPA (Agencia de Protección Ambiental, de Estados Unidos) concluye que "es improbable que el Azoxystrobin sea carcinogénico. En su Manual de Plaguicidas destaca: "No genera efectos oncogénicos en ratones o ratas. No se encontraron evidencias de neurotoxicidad, ni efectos en el sistema endocrino o teratogenicidad (EPA, 1997).

## **MATERIAL Y METODOS**

### **Ubicación del Experimento**

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Fitopatología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, ubicado geográficamente sobre las coordenadas 25° 22" Latitud Norte y 101° 00" Longitud Oeste; Con una altura sobre el nivel del mar de 1743 m. Ubicada en Buenavista a 7 Km al sur de la Ciudad de Saltillo, Coahuila.

### **Material Utilizado**

Se colectó el material biológico enfermo en una plaza comercial de verduras, este material enfermo que presentaba una evidente pudrición y un necrosamiento en la parte del pedúnculo del tomate, tenía presencia de micelio superficial de color gris a oscuro. La muestra se colectó en el mes de marzo del 2011 en Saltillo, Coahuila.

### **Desinfección del Material Colectado**

Se realizó un conjunto de procedimientos para eliminar o reducir la contaminación que pudiese traer la muestra vegetal por microorganismos; ya sean hongos entomopatógenos, fitopatógenos y saprofitos, etc. que pudieran interferir con el trabajo a realizar. Con lo que se comenzó primeramente fue con la desinfección de la superficie de la cámara de flujo laminar utilizando alcohol y enseguida a desinfectar totalmente el tomate con hipoclorito de sodio al 3% por tres minutos para luego enjuagar por tres veces con agua destilada también por tres minutos.

## **Aislamiento del Hongo en Medio de Cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA)**

Una vez desinfectado el tomate se prosiguió a cortar pequeñas porciones vegetativas de la zona de avance de la enfermedad. Y posteriormente se prosiguió a sembrar cada porción de explante; en cajas de petri con medios de cultivo PDA. La siembra se realizó en la cámara de flujo laminar previamente desinfectado, una vez terminado de sembrar se sellaron con cinta transparente (Kleen pack), donde se incubaron con temperatura constante de 25° C por 7 días.

## **Purificación del Hongo en Medio Cultivo PDA**

Se prepararon cajas de petri con medios de cultivo PDA, para obtener cultivos puros del hongo a partir del cultivo o fuente de inóculo original que se aisló primeramente. La siembra del hongo se realizó en la cámara de flujo laminar con ayuda de una asa bacteriológica para hacer el raspado al medio de cultivo y se dispersó en todo el medio. Se utilizó la misma temperatura 25° para poder ser colocadas en la incubadora y así mantenerla por 7 días mientras se espera el crecimiento del hongo.

## **Incremento del Inoculó *Alternaria alternata* en Medio Nutritivo de V8**

Una vez obtenido el hongo *A. alternata* purificado se prosiguió a realizar un incremento de este mismo en cajas de petri pero ahora en el medio de cultivo que contuvo los siguientes reactivos: Carbonato de calcio (CaCO<sub>3</sub>), agar bacteriológico, agua y finalmente jugo V8 para poder proporcionarle más nutrientes al hongo, ya que este medio contiene jugo de tomate, zanahoria, apio, betabel, perejil, lechuga y espinaca. De tal manera se preparó el medio nutritivo con todos los reactivos mencionados y se centrifugaron para poder mezclar completamente el medio.

Una vez centrifugado el medio se colocó en un matraz de 500 ml para poder esterilizar el medio en una olla de presión a 120° C (15 libras de presión) durante 15 min. Una vez que bajo la temperatura de la olla de presión sacamos el

matraz con el medio y se continuo vaciando el medio en las cajas de petri esterilizadas y se esperó hasta que estas se solidificaran para poder sembrar el hongo en estas. Se utilizó la cámara de flujo laminar para poder hacer la siembra de manera esterilizada y el mechero para evitar contaminación. Con un sacabocados se extrajo parte del medio de cultivo que contiene al hongo puro y con ayuda de una aguja de disección se colocó el explante cortado por el sacabocados al medio de V8. Se terminó por hacer lo mismo con las siguientes cajas de petri, se sellaron con cinta (Kleen pack) toda la periferia dela caja para evitar la entrada de saprofitos y se incubaron a 25°C por 7 días.

### **Identificación del Agente Causal**

Se obtuvo un crecimiento radial del hongo en todo el medio de cultivo. Al esporular el hongo presentó micelio de color negro en el centro y de color gris en las orillas. Se colocó una gota de lactofenol de azul de algodón en el porta objetos para enseguida colocar la muestra del micelio que se toma con una aguja de disección y se colocó el cubre objetos. Ya teniendo la monta del hongo en el porta objetos se pasa al observar en el microscopio compuesto enfocado con el objetivo 4x para poder ubicar la estructura del hongo, luego al objetivo de 10x para observar las primeras partes del hongo y por último se ajustó a un objetivo de 40x. Para la identificación del hongo se compararon características según taxonomía de (Neergaad,1995).Y por último corroborada por el M.c. Faustino Lara Victoriano quien confirmo la identidad del hongo como *Alternariaalternata*por las características presentes en el hongo. Se hicieron montas de la muestra para poder afirmar que las características antes mencionadas correspondieran al hongo *A. alternata*.

### **Cultivo Monosporico de *Alternariaalternata***

Transcurridos los días de germinación del hongo que se incrementó, pasamos a realizar el cultivo monosporico a partir de una colonia del hongo *A. alternata*.Se preparó una solución de Tween 80 al 0.1%de la formulación comercial. Se hizo una dilución al 10%. Se tomar 10 ml de Tween 80 y se le

agregó 90 ml de agua destilada. En la preparación del Tween al 0.1%, se toma 1 ml de la solución al 10% agregándole 99 ml de agua destilada. Se preparó una suspensión de esporas a partir del medio nutritivo con el hongo en desarrollo. Con 1 ml de la solución de Tween al 0.1% se le colocó una pequeña porción del hongo en suspensión y con un vortex se agitó por espacio de 30 segundos para que se separaran todas las esporas.

Con una alícuota de la suspensión que se le colocó la cámara de Neubauer por el centro de esta a manera para que se dispersara y detenidamente observadas en el microscopio compuesto a objetivo 4x y enseguida 40x se contarón el número de esporas contenidas en la primera dilución.

Para realizar una segunda dilución, se tomaron 100 µl con un micro pipetade la suspensión anterior y se le agregó 900 µl de agua destilada, se agito en el vortex por espacio nuevamente de 30 segundos para separar las esporas. Se realizaron 9 diluciones las necesarias para tener una suspensión a una concentración de 50 a 100 esporas por mililitro equivalente a  $1 \times 10^8$  conidias

Con una micro pipeta se tomaron 100µl de la concentración  $1 \times 10^8$  esporas y se sembraron en una placa con medio nutritivo y se distribuyó con una varilla de vidrio en toda la caja depetri, dentro de la cámara de flujo laminar. Se incubaron por 25° C por espacio de una semana. Este procedimiento se realizó para 10 cajas depetri.

Se cortó con una hoja de bisturí estéril una colonia en formación y se transfirió a otra caja depetri con medio de cultivo PDA. La idea de este cultivo monosporico fue que la colonia que se cortó provenga de una sola conidia.

### **Conteo de Esporas**

Con un sacabocado se extrajo un parte del medio nutritivo con el hongo y se colocó en un matraz con 200 ml de agua destilada, con un gotero se agregaron 4 gotas dedispérsate Tween 80 y se agitó hasta que las esporas estén

completamente homogenizadas. Se limpiaron individualmente la cámara de Neubauer y el cubreobjetos, ya limpios se colocó el cubreobjetos sobre el área de conteo de la cámara; con un pipeta Pasteur se tomó una alícuota y se colocó en una ranura de la cámara procurando llenar solamente el área el cubreobjetos y se dejó reposar la solución por 1 minuto para que las esporas se asienten y estabilicen su movimiento; posteriormente se colocó la cámara de Neubauer en el microscopio compuesto enfocado con el objetivo de 4x, una vez ubicada la cuadrícula central de la cámara se cambió el objetivo 40x y se inició el conteo de esporas.

De los 25 cuadros de la parte central de la cámara se contaron las esporas que estuvieron dentro de los 4 cuadros de las esquinas y el cuadro central, cuidando de no hacer dobles conteos basándose en las tres líneas blancas que delimitan a cada cuadro, con esto se pudo definir cuáles son los conidios que se deben de contar, se contaron los conidios que estuvieron en la primera línea de arriba y de la línea derecha, no se contaron los de la líneas de abajo y de la izquierda.

Una vez contados los 5 cuadros, se procedió hacer la suma y se obtuvo la media por cuadro, se multiplico por 25 que es el total de cuadros en la cámara Neubauer, esto nos dio una estimación del total de esporas en toda la cámara; El resultado se multiplico por el factor de dilución( la cantidad de agua en que se suspendió el hongo formulado) que es igual a 200 ml de agua, en seguida se multiplica por 10000 (el volumen de agua en la cámara de Neubauer es una diezmilésima parte de un mililitro) que es una constante, a lo que obtuvimos una concentración de esporas de  $1 \times 10^6$  (Cañedo *et al.*, 2004).

### **Preparación de la Solución para el Método de Plato Envenenado**

Se preparó un matraz con capacidad de 1000 ml para colocar 27.3 g de PDA, más 700 ml de agua destilada por lo que se pasó a calentar hasta que el medio nutritivo de PDA quedara completamente disuelto y homogéneo. Se repartió 100ml del medio en 7 matraces; cada uno de 250 ml de capacidad; se esterilizaron en autoclave a 120 libras de presión por 15 minutos. Se esperó hasta que la temperatura de los medios nutritivos estuviera a 40°C para poder

colocar la dosis del fungicida a cada matraz, de tal forma que quedaran de la siguiente manera:

**Cuadro 2.** Tratamientos del hongo *Alternaria alternata* en platos envenenados con el fungicida Azoxystrobin.

Tratamientos		Repeticiones
0	PDA + Agua + <i>A. alternata</i>	1 2 3 4
0	PDA + Acetona + <i>A. alternata</i>	1 2 3 4
1ppm	PDA + Acetona+ Azoxystrobin + <i>A.alternata</i>	1 2 3 4
10 ppm	PDA+ Acetona+ Azoxystrobin + <i>A. alternata</i>	1 2 3 4
100 ppm	PDA+ Acetona+ Azoxystrobin + <i>A. alternata</i>	1 2 3 4
1000 ppm	PDA+ Acetona+ Azoxystrobin + <i>A. alternata</i>	1 2 3 4
10000 ppm	PDA + Acetona+ Azoxystrobin+ <i>A. alternata</i>	1 2 3 4

Cada tratamiento contenía una suspensión de  $1 \times 10^6$  conidias, equivalente a 100 y 150 conidias, de las cuales fueron observadas y evaluadas 50 tomadas al azar.

### Evaluación de Tratamientos

La evaluación de tratamientos se realizó primeramente a las 4 hrs después de la siembra para observar el efecto de inhibición que se había presentado en el transcurso de ese tiempo, con ayuda de un microscopio compuesto a un objetivo de 40x se eligieron a las 50 conidias que serían observadas y evaluadas; fueron marcadas desde la superficie de la caja de petri para volver hacer la siguiente observación a las 8hrs a esas mismas conidias elegidas. En la exanimación de cada conidia se detectó poca emisión de tubos germinativos en el testigo y en concentraciones de 1, 10, 100, 1000 y 10000 ppm no presentaron germinación. Para la siguiente y última evaluación realizada a las 8hrs, las conidias en el testigo presentaban mayor emisión del tubo germinativo; pero a diferencia de las conidias con las concentraciones antes mencionadas ya había ocurrido un cambio

en el tubo germinativo de algunas de ellas y la desaparición total del tubo germinativo en otras.

### **Análisis Estadístico**

Se recurrió primeramente a sacar el porcentaje de germinación en conidias de *A. alternata* en testigos de acetona y agua, posteriormente a las 4 hrs de haber sembrado el fungicida en las cajas de petri y enseguida a las 8 hrs. Se consideraron como conidios germinados cuando se observó el tubo germinativo emitir de la conidia. Los datos obtenidos se sometieron a la prueba de Abbott ,1925 para corrección de los porcentos de inhibición en las conidias. Se continuó con el programa estadístico SAS mediante el Análisis Probit; con el que se determinó el ED<sub>50</sub>(Dosis efectiva media). Y por último con el Análisis de Varianza con datos transformados mediante Arco-seno y por último se realizó una Comparación de Medias de Germinación mediante Pruebas de Rango MúltipleTukey.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

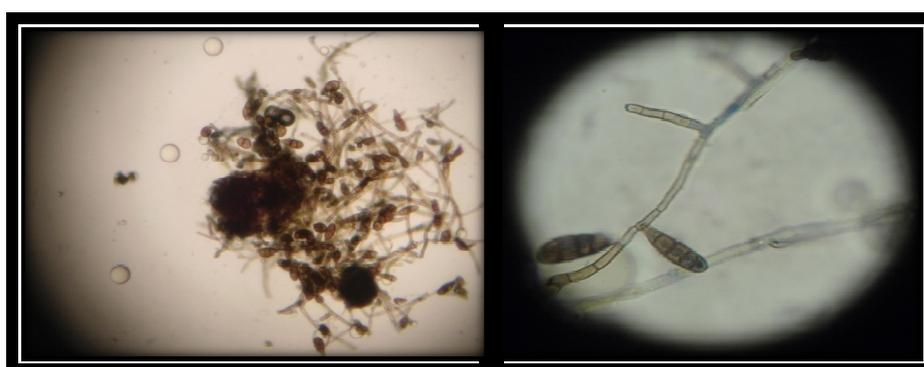
### Aislamiento, Purificación, Incrementación e Identificación de *Alternaria alternata*

A partir del material biológico colectado se inició con todo el proceso de aislamiento, identificación, purificación y multiplicación del mismo a lo que se obtuvieron las siguientes cepas puras (Figura 3).



**Figura 3.** Cepas puras de *Alternaria alternata* formando colonias de crecimiento radial y de color gris.

De las cepas puras obtenidas se identificó al hongo con las siguientes características: Hongo filamentososo con conidióforos simples, tabicados, en cuyo extremo se forman unos conidios muriformes, de color pardo, con septos transversales y verticales de disposición irregular (Figura 4).



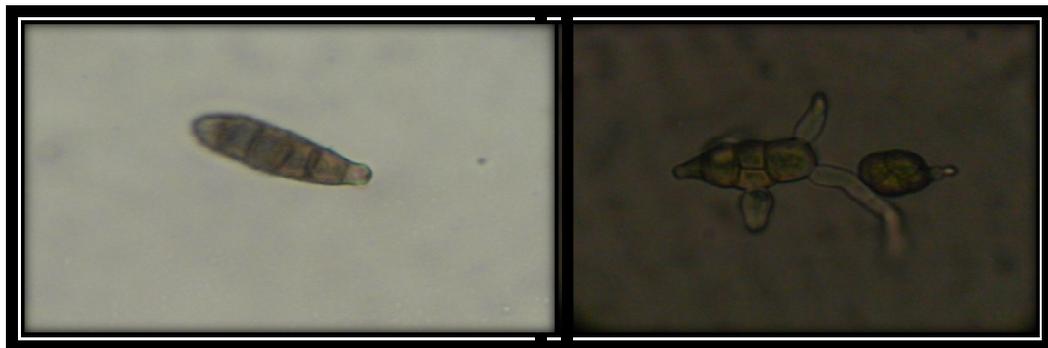
**A**

**B**

**Figura 4.** **A** Observación de *Alternaria alternata* vista en un microscopio compuesto con objetivo de 10 x. **B** Monta microscópica del hongo *A. alternata* vista con el objetivo de 40 x, con características taxonómicas de (Neergaard, 1995).

### Evaluación de Tratamientos

Una de las observaciones que llamó la atención al realizar la evaluación a los tratamientos fue el efecto inhibitorio en cuanto a germinación que demostró la concentración de 10 000 ppm a las 8 hrs, y como consecuencia del mismo efecto que hizo el ingrediente activo Azoxystrobin en algunas conidias mostraron una alteración en el tubo germinativo presentando malformaciones globosas al germinar la conidia.



**A**

**B**

**Figura 5.** **A** Conidia del mismo tratamiento observado a las 8 hrs. Completamente inhibida por el mecanismo de acción de ingrediente activo Azoxystrobin. **B** conidia del tratamiento a 10000 ppm con malformaciones en el tubo germinativo a las 8 hrs.

### **Porcentaje de Germinación**

Con base a los datos obtenidos en el porcentaje de germinación de conidias de *Alternaria alternata*, se comparó el cuadro “3” y “4” a las 4 y 8 Hrs, donde se observó que el diluyente “Acetona” se comportó como un agente retardante para la germinación en relación con el testigo con agua, registrando así un **69.5%** y **90.5%** respectivamente; posteriormente a las 8 Hrs, ya volatilizada la Acetona, tendió a comportarse similarmente al testigo con agua, donde presentó un **95%** y **94.5%** de germinación para agua y acetona respectivamente. Por tal razón, se trabajó con las observaciones de 8 Horas, aprovechando las propiedades de la acetona como diluyente sin alterar la germinación.

A continuación se registra la germinación para ambos testigos (agua y acetona) contabilizadas a las 4 y 8 horas después de la siembra (Cuadros: 3 y 4).

**Cuadro 3.** Porcentaje de germinación de conidias de *A. alternata* en el testigo (**Acetona**) a las 4 hrs y 8 hrs.

Repeticiones	% de Germinación	
	4 hrs	8 hrs
1	56	92
2	62	88
3	78	98
4	82	100
<b>Medias</b>	69.5	94.5

**Cuadro 4.** Porcentaje de germinación de conidias de *A. alternata* en el testigo (**Agua**) a las 4 hrs y 8 hrs.

Repeticiones	% de Germinación	
	4 hrs	8 hrs
1	92	98
2	92	92
3	88	92
4	90	98
<b>Medias</b>	90.5	95

### **Corrección de Datos Mediante Abbott, 1925**

De acuerdo a los datos que se muestran anteriormente (Cuadros: 3 y 4), referente al porcentaje de germinación; al registrar inhibición natural en las conidias del testigo, se analizaron mediante la prueba de Abbott, 1925, para descartar que la inhibición en los tratamientos no solo se debiera a la acción del fungicida.

**Cuadro 5.** Corrección del porcentaje de inhibición de conidias de *A. alternata* mediante Abbott, 1925; al presentar 5.5% de conidias germinadas en el testigo de acetona.

Concentraciones (ppm)	Conidias Observadas.	% Germ.	% E. D.	% E. D. Corregidos
Testigo	50	94.5	5.5	0
1	50	85	15	10.05
10	50	83	17	12.16
100	50	75.5	24.5	20.10
1000	50	56.5	43.5	40.21
10000	50	1	99	98.94

#### Determinación del ED<sub>50</sub>

Respecto a la determinación de la Dosis Efectiva Media (ED<sub>50</sub>) se muestra que con una concentración de 502.83 139 ppm, inhibe el 50 % de las conidias de *Alternaria alternata*; equivalente a 0.502 gramos de Ingrediente activo (Cuadro 6).

**Cuadro 6.** Determinación del ED<sub>50</sub> de Azoxystrobin a las 8Hrs, obtenidas mediante un análisis Probit con el programa estadístico SAS.

Probabilidad	Concentración
ED <sub>5</sub>	2.10 140
ED <sub>50</sub>	502.83 139
ED <sub>95</sub>	120 320

#### Análisis de Varianza

Entre los tratamientos usados para determinar la germinación de conidias; se encontró que son totalmente diferentes unos de otros en comparación con el testigo, dando como resultado alta significancia, y obteniendo un coeficiente de variación de 15.93% (Cuadro 7).

**Cuadro 7.** Análisis de varianza para la germinación de conidias de *A. alternata* con datos transformados mediante Arco-seno.

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>F Value</b>	<b>Pr &gt; F</b>
<b>Tratamiento</b>	5	14481.74722	1810.21840	24.00	.0001
<b>Error</b>	18	1131.31117	75.42074		
<b>Totales</b>	23	15613.05838			

### **Comparación de Medias Mediante Pruebas de Rango Múltiple Tukey**

Los 4 grupos estadísticos que la prueba de Tukey determinó comparando entre aquellos tratamientos que sobresalen de acuerdo a la transformación de Arco-seno, señalan que en el agrupamiento A del testigo absoluto ocurrió un 78.790 % de germinación; siendo este significativo por lo tanto diferente ante los agrupamientos : AB del 2<sup>do</sup>, 3<sup>er</sup> y 4<sup>to</sup> tratamiento; equivalente a 1, 10 y 100 ppm del Ingrediente activo Azoxystrobin; mostrando de un 68.070% a un 60.563% de germinación, por lo que se señala que no hay significancia entre estos tratamientos. Siguiendo por el Agrupamiento B con un 49.343% de germinación del 5<sup>to</sup> tratamiento, con 1000 ppm del ingrediente activo Azoxystrobin, se hace un comparativo con el Testigo y es notable la significancia que hubo entre estos tratamientos, por lo tanto hubo diferencia entre el Testigo Absoluto y el 5<sup>to</sup> tratamiento. En comparación al Testigo con el Agrupamiento C que corresponde al 6<sup>to</sup> tratamiento, donde hubo una Alta Significancia en cuanto a la concentración del Ingrediente activo Azoxystrobin de 10,000 ppm notándose el 4.065% de germinación en las conidias, por lo que es diferente a los demás tratamientos y hace referencia que el mejor tratamiento fue el del agrupamiento C, logrando el eficiente control inhibitorio en las conidias del hongo (cuadro 8).

**Cuadro 8.** Comparación de medias de la germinación con datos previamente transformados mediante pruebas de rango múltipleTukey.

Media	Tratamiento	Agrupamiento
78.790	Testigo	A
68.070	2	AB
66.235	3	AB
60.563	4	AB
49.343	5	B
4.065	6	C

## DISCUSIÓN

En este trabajo de investigación fue evidente el efecto inhibitorio *in vitro* de Azoxystrobin en la germinación de conidios de *A. alternata*, como se muestra en el (cuadro 3 y 4), con un ED<sub>50</sub> de 502.83139 ppm (Véase cuadro 6). Estos resultados diferencian enormemente con estudios realizados por Gastélum y Figueroa (2002), en una región tomatera de Sinaloa; donde con una concentración de 7 y 10 ppm inhibieron la germinación de los conidios de *A. alternata* en un 100%, mientras que en este estudio, la mayor inhibición (98.94 %) se presentó con una concentración de 10 000 ppm (Véase cuadro 5). Siendo esta concentración la que se incluye en un grupo estadístico significativo (Cuadro 8). Al comparar lo antes mencionado con las recomendaciones de la etiqueta, la cual sugiere emplear para los cultivos de papa y tomate: 250-300 ppm, se observa que nuestra ED<sub>50</sub> es una cantidad mayor a lo recomendado, por lo que suponemos que la presión de selección es un factor que provoca resistencia a este grupo de fungicidas, al observar altos niveles de tolerancia hacia Azoxystrobin.

Respecto con a los resultados obtenidos anteriormente sugerimos estudios de resistencia de *A. alternata* a Azoxistrobin y fungicidas de diferente grupo toxicológico para tener un buen manejo químico de este patógeno.

## CONCLUSIÓN

Bajo las condiciones experimentales en que se desarrolló la presente investigación podemos concluir lo siguiente:

Se detectó tolerancia en la cepa de *Alternariaalternata* en relación al aumento de la concentración del ingrediente activo Azoxystrobin, superando nuestro ED<sub>50</sub> en lo recomendado en la etiqueta.

## BIBLIOGRAFIA

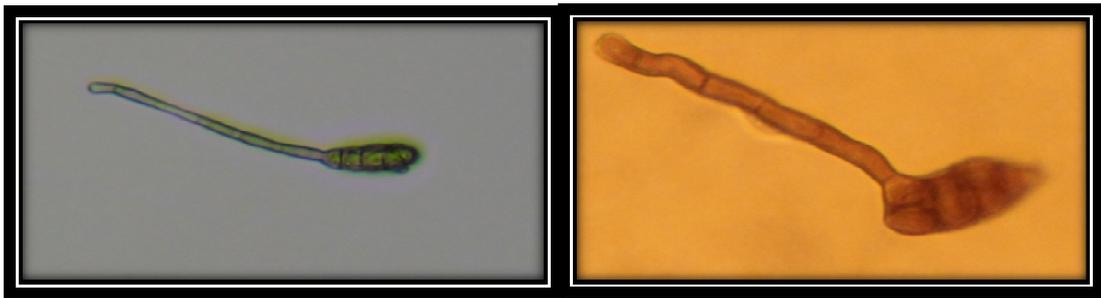
- Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*. 18: 265-267
- Andrews S. 1992. Differentiation of *Alternaria* species isolated from cereals on dichloran malt extract agar. pp. 351-355 en: Samson RA *et al.*, editores. *Modern Methods in Food Mycology*. Elsevier, Amsterdam.
- Alexopoulos, C.J., Mins, C.W and Blackwell, H. 1996. *Introductory mycology*. 4<sup>th</sup> Edition. Ed. John Wiley and Sons. Inc. New York. Pp. 632 y 869.
- Andersen .B. *et al.*, 2001. Chemical and morphological segregation of *Alternaria alternata*, *A. gaisen* and *A. longipes*. *Mycological Research* 105: 291-299.
- Aguayo, E. y Artés, F. 2004. Elaboración del tomate mínimamente procesado en fresco. *Compendios de Horticultura*. 15. Ediciones de Horticultura S.L. Reus (España).
- Agrios G.N., 2005. *Plant Pathology*. Fifth Edition. Ed. Elsevier Academic Press. San Diego, California. 992 pp.
- Baldwin, E.A., Scott, J.W., Malundo, T.M.M., Shewfelt, R.L. and Tandon, K.S. 1998. Relationship between sensory and instrumental analysis for tomato flavor. *J. Amer. Soc. Hort.* Vol. 89:100-145.
- Bruna V. A. 2003. *Especial hortalizas*. Tierra Adentro. Pag: 1y2.
- [www.inia.cl/medios/biblioteca/ta/NR30111.pdf](http://www.inia.cl/medios/biblioteca/ta/NR30111.pdf)
- Cañedo V., Ames T. 2004. *Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos*. Lima, Perú; Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú, 62 P. Consultado el 23 de julio de 2011.
- <http://www.cipotato.org/librarypdfdocsAN65216.pdf>

- Davis, R.M., Miyao, E.M., Valencia, J., May, D.M., and Gwynne, B.J. 1997. Benefits of applications of chlorothalonil for the control of black-mold of tomato. *Plant Disease* 81:601-603.
- Ellis MB. 1971. *Dematiaceous Hyphomycetes*. CMI, Kew.
- EPA, 1997. Azoxystrobin, Agencia de Protección Ambiental .US
- Folquier, F. 1976. *El tomate, estudio de la planta y su producción comercial*. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina.
- Fraire V., G. 1993. Método de control convencional. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Centro de Investigación Regional del Pacífico Sur, Campo Experimental Rosario Izapa. Tapachula, Chiapas, México. 11 p. (Folleto Técnico Núm. 5).
- FRAC. 2010. FRAC Code List©: Fungicides Sorted by Mode of Action (including FRAC Code numbering).
- FAO, 2010. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.  
[www.fao.org/index\\_es.htm](http://www.fao.org/index_es.htm)
- Guenkov, G. 1974. *Fundamentos de la horticultura cubana*. Instituto cubano del libro. La habana, cuba. Pp. 123-143.
- Gil, V.I. 2000. Manual práctico de producción de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) hidropónico bajo condiciones de invernadero. Departamento de Preparatoria Agrícola, U.A.Ch Chapingo. México.
- Gisi, U., Sierotzki H, 2008. Fungicide Modes of Action and Resistance in Downy Mildews. *European Journal of Plant Pathology* 122:157–167.

- IPM Manual Group-U.C. - Davis. 1982. Integrated pest management for tomatoes. Statewide Integrated Pest Management Project University of California. Publication No. 3274. Pp. 76-77.
- James, W.C. 1974. Assessment of plant diseases and losses. *Annu. Rev. Phytopathology*. 12:27-48.
- Jones, J.B., Jones, J.P., Stall, R.E., and Zitter, T.A. eds. 1991. *Compendium of Tomato Diseases*. American Phytopathological Society st, Paul, MN.
- Jarén, C., Arazuri, S. García, M.J., Arnal, P. and Arana, J.I. 2005. White *Asparragus*, Harvest Date Discrimination Using NIRS Technology. *International Journal of Infrared and Millimeter Waves*, 2006.
- Maroto B.J.V. 1989. *Horticultura herbácea especial*. 3<sup>o</sup> edición. Edit. Mundi Prensa. Madrid. España.
- Neergaard. Paul (1945). Danish species of *Alternaria* and *Stehphylium*. Copenhagen: Einar Munksgaar. 560+2p.
- Nuez, F. 1995. *El cultivo del tomate*. Editorial Mundi Prensa. Barcelona, España.
- Pearson, R.C., and Hall, D.H. 1975. Factors affecting the occurrence and severity of black- mold of ripe tomato fruit caused by *Alternaria alternata*. *Phytopathology* 65: 1352-1359
- Peralta, Iris E.; Knapp, Sandra; Spooner, David M. 2005. New Species of Wild Tomatoes (*Solanum* section *Lycopersicum*: Solanaceae) from northern Peru. Vol.30, Number 2. Pp 424-434.
- Rick M., Ch. 1976. *Tomato In: Evolution of Crop Plants*. Edited by N.W. Simmonds. Longman. London y New York.

- Rodríguez R.R., Rodríguez J.M.T y San Juan J.A.M 1984. Cultivo moderno del tomate. Mundi Prensa. Madrid, España.
- Roberts RG *et al.* 2000. RAPD fragment pattern analysis and morphological segregation of small-spored *Alternaria* species and species groups. *Mycological Research* 104: 151-160.
- SAGARPA, 2000. Anuario estadístico de la Producción Agrícola de los Estados Unidos Mexicanos. Volumen 1. Centro de Estadística Agropecuaria. D.F. México. pp.598-6187.
- SIAP, 2010. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera.  
[www.siap.gob.mx/](http://www.siap.gob.mx/)
- Tapia G. 1985. Influencia de las sustancias húmicas sobre el crecimiento y producción del jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Tesis de Licenciatura. Departamento de suelos U.A.Ch. Chapingo, México.
- World Health. 1999. Organisation Recommended Classification of Pesticides by Hazard 1998-99 (ref:WHO/PCS/98.2), WHO, Geneva.
- Wong F, Wolcox W. 2002. Comparative Physical Modes of Action of Azoxystrobin, Mancozeb and Metalaxyl against *Plasmopara viticola*. *Plant Disease*. 85:649-656.

# APÉNDICE



**A**

**B**

**Figura A Y B:** Conidias de *A. alternata*; del Testigo Absoluto con el tubo germinativo emitido en su totalidad a las 8 hrs.



**C**

**D**

**Figura C Y D:** (C) Conidia de *A. alternata* con el tratamiento a 1 ppm del ingrediente activo Azoxystrobin emitiendo su tubo germinativo a las 8 hrs. (D) conidias del tratamiento a 10 ppm con el ingrediente activo Azoxystrobin con los tubos emitidos pero con abultaciones en su formación.



**E**

**Figura E :** Conidia de *A. alternata* del tratamiento a 100 ppm con el mismo fungicida anteriormente descrito, observada a las 8 hrs después de haber sembrada la suspensión de conidias..

