

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**FACULTAD DE AGRONOMÍA**



**“EXTRACTO VEGETAL Y CONTROLADORES BIOLÓGICOS  
PARA EL CONTROL DE *Penicillium digitatum* AISLADO DE  
FRUTOS DE MANDARINA RESISTENTES AL IMAZALIL”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE  
INGENIERA AGRÓNOMA**

**EMILIA ELIZABETH NUÑEZ LEVANO**

**LIMA – PERÚ**

**2020**

---

**La UNALM es titular de los derechos patrimoniales de la presente investigación  
(Art. 24 – Reglamento de Propiedad Intelectual)**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA**

**FACULTAD DE AGRONOMIA**

**“EXTRACTO VEGETAL Y CONTROLADORES BIOLÓGICOS PARA EL  
CONTROL DE *Penicillium digitatum* AISLADO DE FRUTOS DE MANDARINA  
RESISTENTES AL IMAZALIL”**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE**

**INGENIERA AGRÓNOMA**

**EMILIA ELIZABETH NUÑEZ LEVANO**

**Sustentada y Aprobada ante el siguiente jurado:**

-----  
Ing. M.S. Andrés Casas Díaz  
**PRESIDENTE**

-----  
Ing. Mg. Sc. Liliana Aragón Caballero  
**ASESORA**

-----  
Ph. D. Walter Apaza Tapia  
**MIEMBRO**

-----  
Ing. Guillermo Parodi Macedo  
**MIEMBRO**

**Lima – Perú**

**2020**

## **DEDICATORIA**

*Con mucho amor y gratitud, este trabajo va dedicado a mis papitos:  
Alejandro Lévano Aburto y Emilia Guillén de Lévano, por su nobleza, humildad,  
trabajo y sacrificio.*

*Soy producto del esfuerzo de ambos y estaré eternamente agradecida.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia, por su energía revitalizante que fue mi motor a continuar y seguir adelante; y en especial a mi madre Margarita Lévano Guillén, porque a lo largo de mi vida me ha demostrado su amor corrigiendo mis fallas y celebrando mis triunfos.

A mi maestra y asesora, la Ingeniera Liliana Aragón, por todo el apoyo brindado durante el proceso de la tesis; desde dedicar una tarde explicándome los procedimientos de laboratorio, hasta acompañándome en la universidad durante una larga jornada de plaseo. Me sería interminable mencionar cada muestra de ayuda y afecto, pero agradezco de todo corazón que haya depositado su confianza en mí, que me haya motivado siempre a seguir adelante y ampliar mis horizontes a nivel profesional.

A la profesora Heidi Huarhua por su tiempo dedicado en enseñarme el trabajo de laboratorio y del uso correcto de equipos. Así mismo, por su empatía y solidaridad en cada momento que nos cruzábamos en el laboratorio.

Al profesor Andrés Casas por su practicidad en resolver dificultades; por su apoyo en conseguir movilidad para el traslado de frutos y en proporcionar el equipo para la aplicación de los tratamientos.

A la profesora Marlene Aguilar por brindarme un contacto clave para mi prueba final en conseguir fruta cuando ya se había cerrado campaña.

Al Sr. José, Sra. Angélica, Srta. Elsa y Sr. Juan por su colaboración durante todo el proceso experimental de la tesis.

A, Stef Miraval, Edith Cevallos, Victor Maturana, Sandra Mendoza, Bryan León, y Anthony Manuel, por apoyarme en la ejecución de diversos procedimientos de gran volumen, así como en las evaluaciones pertinentes.

A la familia Obregón Almora por facilitarme una computadora que ha sido mi mayor herramienta de trabajo en la realización de esta investigación.

A Santiago Yamunaque, por el hermoso vínculo de apoyo mutuo que desarrollamos en estos años.

Y por último, a Deftones, MCR y SOAD.

# ÍNDICE GENERAL

RESUMEN

ABSTRACT

I.	INTRODUCCIÓN .....	1
	OBJETIVOS .....	2
	OBJETIVOS GENERALES: .....	2
	OBJETIVOS ESPECÍFICOS: .....	2
II.	REVISIÓN DE LITERATURA .....	3
	2.1 IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL CULTIVO .....	3
	2.2 EL CULTIVO .....	5
	2.2.1 MANDARINA ( <i>Citrus reticulata</i> Blanco o <i>Citrus nobilis</i> André non Lour). 5	
	2.2.2 CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS .....	6
	2.2.3 REQUERIMIENTO DEL CULTIVO .....	7
	D. CARACTERÍSTICAS DEL FRUTO .....	8
	2.3 PRINCIPALES ENFERMEDADES EN POSCOSECHA .....	12
	2.3.1 <i>Alternaria citri</i> .....	13
	2.3.2 <i>Botrytis cinerea</i> .....	13
	2.3.3 <i>Geotrichum candidum</i> var. <i>Citri</i> .....	14
	2.3.4 <i>Penicillium digitatum</i> .....	14
	2.3.5 CONTROL DE ENFERMEDADES EN POSCOSECHA .....	17
	2.3.6 CEPAS RESISTENTES DE <i>Penicillium digitatum</i> .....	21
	2.3.7 CEPAS RESISTENTES DE PERÚ A IMAZALIL .....	22
	2.4 PROCESO POSCOSECHA DE CÍTRICOS .....	23
	2.4.1 FLUJO DEL PROCESO DE CÍTRICOS DE EXPORTACIÓN .....	26
III.	METODOLOGÍA .....	27
	3.1 UBICACIÓN DEL CAMPO EXPERIMENTAL .....	27

3.2	MATERIALES Y EQUIPOS .....	27
3.3	PROCEDIMIENTO:.....	28
3.3.1	COLECCIÓN, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Penicillium digitatum</i> EN CÍTRICOS .....	28
3.3.2	OBTENCIÓN DEL AISLAMIENTO MÁS VIRULENTO DE <i>Penicillium digitatum</i> (CON MAYOR RESISTENCIA AL IMAZALIL).....	29
3.3.3	APLICACIÓN DE TRATAMIENTOS <i>IN VITRO</i> AL AISLAMIENTO MÁS VIRULENTO .....	36
3.3.4	APLICACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS <i>IN VIVO</i> A LOS FRUTOS INOCULADOS CON EL AISLAMIENTO MÁS VIRULENTO.....	37
3.3.5	DISEÑO ESTADÍSTICO .....	38
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	39
4.1	IDENTIFICACIÓN DE <i>Penicillium digitatum</i> .....	39
4.2	OBTENCIÓN DEL AISLAMIENTO MÁS VIRULENTO DE <i>Penicillium digitatum</i> (CON MAYOR RESISTENCIA AL IMAZALIL).....	41
4.2.1	CRECIMIENTO DEL DIÁMETRO DEL HONGO EN 15 AISLAMIENTOS DE <i>Penicillium digitatum</i> .....	42
4.2.2	CRECIMIENTO DEL MOHO EN FRUTOS INOCULADOS CON 14 AISLAMIENTOS DE <i>Penicillium digitatum</i> .....	44
4.2.3	EVALUACIÓN DEL TUBO GERMINATIVO EN 3 AISLAMIENTOS DE <i>Penicillium digitatum</i> .....	48
4.3	APLICACIÓN DE TRATAMIENTOS <i>IN VITRO</i> AL AISLAMIENTO MÁS VIRULENTO DE <i>Penicillium digitatum</i> .....	51
4.4	APLICACIÓN DE TRATAMIENTOS <i>IN VIVO</i> AL AISLAMIENTO MÁS VIRULENTO DE <i>Penicillium digitatum</i> .....	55
V.	CONCLUSIONES .....	62
VI.	RECOMENDACIONES.....	64
VII.	REFERENCIAS.....	65
VIII.	ANEXOS .....	74

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Categorización de <i>Penicillium digitatum</i> según su resistencia al Imazalil.....	30
Tabla 2. Tratamientos <i>IN VITRO</i> al aislamiento más virulento. ELABORACIÓN PROPIA.....	36
Tabla 3. Tratamientos <i>IN VIVO</i> de <i>Penicillium digitatum</i> aislado de mandarina (Huaral) más virulento. ELABORACIÓN PROPIA. ....	37
Tabla 4. Crecimiento del diámetro de la colonia de 15 aislamientos de <i>P. digitatum</i> en medio envenenado con Imazalil a la dosis de 5ppm. ....	42
Tabla 5. Crecimiento de la esporulación en frutos inoculados con los 14 aislamientos de <i>P. digitatum</i> . ....	44
Tabla 6. Crecimiento de la pudrición en frutos inoculados con los 14 aislamientos de <i>Penicillium digitatum</i> procedentes de Huaral.....	46
Tabla 7. Germinación de conidias en porcentaje, en 2 momentos de observación; a 22 y 48 horas desde el montaje de 3 aislamientos de <i>P. digitatum</i> procedentes de Huaral....	48
Tabla 8. Crecimiento del diámetro de la colonia del aislamiento más virulento de <i>Penicillium digitatum</i> , procedente de Huaral, en 6 tratamientos de control <i>in vitro</i> .....	51
Tabla 9. Porcentaje de control de <i>Penicillium digitatum</i> (cepa resistente a Imazalil, procedente de Huaral) los 5 tratamientos tomando como referencia al Testigo (T.1). ..	53
Tabla 10. Crecimiento radial de la esporulación en frutos inoculados con el aislamiento más virulento de <i>Penicillium digitatum</i> , procedente de Huaral, en 5 tratamientos de control <i>in vivo</i> .....	55
Tabla 11. Crecimiento radial de la esporulación en frutos inoculados con el aislamiento más virulento de <i>P. digitatum</i> , procedente de Huaral, en 5 tratamientos <i>in vivo</i> .....	57

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Histórico de exportaciones de cítricos desde el 2008 al 2018 en Perú. Elaboración: Procitrus. Fuente: Aduanas .....	3
Figura 2. Histórico de exportaciones de cítricos desde el 2008 al 2018 en Perú. Elaboración: Procitrus. Fuente: Aduanas. ....	4
Figura 3. Desarrollo fenológico del fruto iniciándose en el brotamiento dividido por días en naranja ( <i>Citrus sinensis</i> L.Osbeck). (Agusti et al.; 1995).....	10
Figura 4. Estructuras de <i>Penicillium spp.</i> Modificado de (Huerta, 2014). ....	15
Figura 5. Ciclo de vida de <i>Penicillium spp.</i> (Huerta, 2014). ....	16
Figura 6. Flujograma del proceso poscosecha de procesadora de Huaral. Determinación de la efectividad de los tratamientos en las etapas de drenchado, desinfección y encerado en el proceso de fruta cítrica para exportación en procesadora – campaña 2012. Jorge Luis Tamayo Diaz. Comunicación directa. ....	26
Figura 7. Esquema de la metodología seguida para evaluar el crecimiento micelial del diámetro de aislamientos de <i>Penicillium digitatum</i> .....	31
Figura 8. Esquema de la evaluación del crecimiento micelial de <i>P. digitatum</i> en placa Petri.....	32
Figura 9. Esquema de la metodología seguida para evaluar el crecimiento del moho en fruto producido por aislamientos seleccionados de <i>Penicillium digitatum</i> . ....	34
<b>Figura 10.</b> Esquema de los parámetros evaluados del crecimiento del moho producido por de <i>Penicillium digitatum</i> en fruto.....	35
Figura 11. Vista microscópica de <i>Penicillium digitatum</i> a 40X y estructuras: conidias en cadena, conidiofóros y métulas. ....	39
Figura 12. Medidas de conidiofóros de <i>Penicillium digitatum</i> determinadas con el programa LEICA APPLICATION SUITE.....	40
Figura 13. Medidas de conidias de <i>Penicillium digitatum</i> determinadas con el programa LEICA APPLICATION SUITE. ....	40
Figura 14. Crecimiento del micelio de un aislamiento (Huaral) de <i>Penicillium digitatum</i> Altamente Resistente a 0, 1, 2 y 5 ppm de Imazalil (PDA+IMZ) versus el comportamiento de un aislamiento de <i>P. digitatum</i> Sensible al Imazalil con nulo crecimiento micelial a 1,2 y 5 ppm de Imazalil (PDA+IMZ). ....	41

Figura 15. Comportamiento de 15 aislamientos de <i>P. digitatum</i> , procedentes de Huaral, en Imazalil al 5ppm. ....	43
Figura 16. Comportamiento de la esporulación en frutos de 14 aislamientos de <i>Penicillium digitatum</i> , procedente de Huaral, en mandarinas W.Murcott por día de evaluación. ....	45
Figura 17. Comportamiento de la pudrición en fruto de 14 aislamientos de <i>P. digitatum</i> en mandarinas W.Murcott por día de evaluación.....	47
Figura 18. Crecimiento del moho en una mandarina W.Murcott inoculado con un aislamiento de <i>Penicillium digitatum</i> Altamente Resistente, procedente de Huaral, versus una mandarina W.Murcott sin inocular. ....	47
Figura 19. Germinación de conidias a 22 y 48 horas de 3 cepas altamente resistentes de <i>P. digitatum</i> al Imazalil. ....	49
Figura 20. Montajes a las 22 y 48 horas de 3 aislamientos de <i>Penicillium digitatum</i> Altamente Resistentes, procedentes de Huaral, a 10X. ....	50
Figura 21. Comportamiento del aislamiento de <i>Penicillium digitatum</i> , procedente de Huaral, con mayor resistencia al Imazalil sometido a 5 tratamientos de control en placas Petri conteniendo PDA. ....	52
Figura 22. Comportamiento del aislamiento de <i>Penicillium digitatum</i> con mayor resistencia al Imazalil, procedente de Huaral, sometido a 5 tratamientos de control en placas Petri, conteniendo PDA. ....	53
Figura 23. Crecimiento micelial IN VITRO del aislamiento más virulento de <i>Penicillium digitatum</i> , procedente de Huaral en 5 tratamientos de control a los 11 días de siembra. ....	54
Figura 24. Comportamiento de la esporulación del aislamiento de <i>Penicillium digitatum</i> con mayor resistencia al Imazali, procedente de Huaral, sometido a tratamientos de control in vivo.....	56
Figura 25. Comportamiento de la esporulación del aislamiento de <i>Penicillium digitatum</i> con mayor resistencia al Imazalil, aislado de Huaral, sometido a tratamientos de control in vivo.....	56
Figura 26. Comportamiento de la pudrición del aislamiento de <i>P. digitatum</i> con mayor resistencia al Imazalil sometido a tratamientos de control in vivo.....	57
Figura 27. Comportamiento de la esporulación del aislamiento de <i>P. digitatum</i> con mayor resistencia al Imazalil sometido a tratamientos de control in vivo.....	58
Figura 28. Crecimiento micelial IN VIVO del aislamiento más virulento de <i>Penicillium digitatum</i> , procedente de Huaral, en tratamiento T1: TESTIGO (izquierda) vs T2:	

TIMOREX GOLD (derecha), A: 20 frutos totales por tratamiento, B: Avance del moho en 1 fruta por tratamiento (T1 vs T2). ..... 59

## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: ANVA del crecimiento del diámetro de colonia de 15 aislamientos de <i>Penicillium digitatum</i> aislado de frutos, procedente de Huaral, evaluado por día. ....	74
ANEXO 2: Prueba Tukey del crecimiento de diámetro de colonia de 15 aislamientos de <i>Penicillium digitatum</i> aislado de frutos, procedente de Huaral, por día.....	79
ANEXO 3: ANVA del crecimiento del moho (esporulación) de 14 aislamientos aislamientos de <i>Penicillium digitatum</i> aislado de frutos, procedente de Huaral, por día	82
ANEXO 4: Prueba Tukey del crecimiento del moho (esporulación) de 14 aislamientos de <i>Penicillium digitatum</i> aislado de frutos, procedente de Huaral, por día.....	84
ANEXO 5: ANVA del crecimiento del moho (pudrición) de 14 aislamientos de <i>Penicillium digitatum</i> aislado de frutos, procedente de Huaral, por día.....	86
ANEXO 6: Prueba Tukey del crecimiento del moho (pudrición) de 14 aislamientos de <i>Penicillium digitatum</i> aislado de frutos, procedente de Huaral, por día.....	88
ANEXO 7: ANVA del porcentaje de germinación de conidias de 3 aislamientos de <i>Penicillium digitatum</i> aislado de frutos, procedente de Huaral a las 22 hrs.....	90
ANEXO 8: Prueba Tukey del porcentaje de germinación de conidias de 3 aislamientos de <i>Penicillium digitatum</i> aislado de frutos, procedente de Huaral, a las 22 hrs.....	90
ANEXO 9: ANVA del porcentaje de germinación de conidias de 3 aislamientos de <i>Penicillium digitatum</i> aislado de frutos, procedente de Huaral, a las 48 hrs.....	91
ANEXO 10: Prueba Tukey del porcentaje de germinación de 3 aislamientos de <i>Penicillium digitatum</i> aislado de frutos, procedente de Huaral, a las 48 hrs.....	91
ANEXO 11: Anva del crecimiento del diámetro del aislamiento más resistente de <i>Penicillium digitatum</i> al Imazalil, procedente de Huaral, en tratamientos <i>in vitro</i> .....	92
ANEXO 12: Prueba Tukey del Crecimiento del diámetro del aislamiento más resistente de <i>Penicillium digitatum</i> al Imazalil, procedente de Huaral, en tratamientos <i>in vitro</i> ..	97
ANEXO 13: ANVA del crecimiento del moho (esporulación) del aislamiento más resistente de <i>Penicillium digitatum</i> al Imazalil, procedente de Huaral, en tratamientos <i>in vivo</i> .....	100
ANEXO 14: Prueba Tukey del crecimiento del moho (esporulación) del aislamiento más resistente de <i>P. digitatum</i> al Imazalil, procedente de Huaral, en tratamientos <i>in vivo</i> .	103
ANEXO 15: ANVA del crecimiento del moho (pudrición) del aislamiento más resistente de <i>Penicillium digitatum</i> al Imazalil, procedente de Huaral, en tratamientos <i>in vivo</i> ..	105

ANEXO 16: Prueba Tukey del crecimiento del moho (pudrición) del aislamiento más resistente de *P. digitatum* al Imazalil, procedente de Huaral, en tratamientos *in vivo*. 108

## RESUMEN

El control del moho verde producido por *Penicillium digitatum* en las plantas de empaque de cítricos de Perú se basa principalmente en el fungicida imazalil (IMZ). Esto ha incrementado las poblaciones de biotipos resistentes del patógeno. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la resistencia de 15 aislamientos de *P. digitatum* al IMZ. Para ello se utilizaron tres filtros de resistencia para llegar al aislamiento más resistente. La recolección de aislamientos se dio en frutos de mandarina W. Murcott y Nova con presencia de la enfermedad y eliminados en la empacadora. El primer filtro consistió en evaluar 15 aislamientos por su nivel de resistencia a 1, 2 y 5 ppm de imazalil (PDA+IMZ). Catorce sobrevivieron a 5 ppm y se consideraron altamente resistentes. El segundo filtro consistió en comparar la velocidad de infección en frutos de mandarina. Frutos de W. Murcott fueron inoculados con los 14 aislamientos de *P. digitatum* resistentes. Previamente los frutos fueron desinfestados por inmersión durante 60s con hipoclorito de sodio al 1%. Se contabilizó la severidad luego de 15 días a  $20 \pm 2$  °C midiendo el diámetro de la esporulación y podredumbre. Los más altos porcentajes de severidad fueron de tres aislamientos que se sometieron al último filtro que consistió en evaluar la germinación de conidias. Para ello, se realizó una suspensión de conidias hasta  $10^6$  conidias/ml y fueron llevados a portaobjetos con 1 gota de PDA la cual se conservó a 25°C. Hubo solo un aislamiento que fue significativamente superior al resto de los aislamientos y cuyo porcentaje de germinación fue de 97.5% a las 22 horas del montaje. A este último se le consideró el aislamiento más resistente al IMZ. Se dio paso a ensayos de control de la cepa más virulenta de *P. digitatum* al IMZ en condiciones *in vitro* e *in vivo* con los productos “Impala” (Imz), “Timorex Gold” (Aceite esencial de té de *Melaleuca alternifolia*), “Serenade” (*Bacillus subtilis*) y “Tricho D”. Se determinó que el mejor tratamiento para el control *in vitro* fue el Imazalil a 500 ppm, seguido de Serenade con un porcentaje de control del 88% y Timorex Gold con un 61%; y el mejor tratamiento para el control *in vivo* fue el Timorex Gold que retrasó el avance del moho con un control del 35% de la esporulación en el 6to día y con un 45% de control de la pudrición en el 8vo. Se abre paso a ensayos de control utilizando el Timorex Gold (té de *Melaleuca alternifolia*) como métodos alternativos que favorezcan un manejo anti-resistencia.

**Palabras clave:** Moho verde, *Penicillium digitatum*, W. Murcott, Nova, Resistencia, Imazalil.

## ABSTRACT

Postharvest control of green mold produced by *Penicillium digitatum* in citrus packing houses in Peru is mainly based on the use of imazalil fungicide (IMZ). This has increased populations of resistant biotypes of the pathogen. The objective of this work was to evaluate the resistance of 15 isolates of *P. digitatum* to IMZ following three steps. Isolates were collected from W. Murcott and Nova mandarin fruits with the presence of the disease eliminated during packing activities. First step consisted to evaluate 15 isolates for their resistance level, at 1, 2 and 5ppm of imazalil (PDA + IMZ). Fourteen survived to 5ppm and were considered highly resistant. Second step consisted to compare the infection speed on W. Murcott fruits. Fruits were previously clean by immersion for 60 seconds in a solution with 1 % of sodium hypochlorite before being infested with the 14 imazalil-resistant *P. digitatum* isolates. Severity was graded after 15 days at  $20 \pm 2$  °C, measuring the ratio of the sporulation and rotting. Three isolates showed the highest percentages of severity and followed the third step that consisted in evaluate conidia germination. Conidial suspension of the three isolates was carried out until 200 conidia were observed per visual field and then they were taken to slides with 1 drop of PDA which were kept at 25 °C. Only one isolate was significantly higher than the other two isolates whose percentage of germination was 97.5% after 22 hours of assembly. This isolate was considered the most resistant isolation to IMZ. Control trials of the most virulent isolation of *P. digitatum* to IMZ under *in vitro* and *in vivo* conditions with the products "Impala" (Imz), "Timorex Gold" (*Melaleuca alternifolia* tea), "Serenade" (*Bacillus subtilis*) and "Tricho D" (*Trichoderma harzianum*). It was determined that the best treatment for *in vitro* control was Imazalil at 500 ppm, followed by Serenade with a control percentage of 88% and Timorex Gold with 61%; and the best treatment for *in vivo* control was Timorex that delayed mold growth with 35% control of sporulation on the 6th day and with 45% rot control in the 8th. It opens the way to control trials using Timorex Gold (*Melaleuca alternifolia* tea) as an alternative method that favors anti-resistance management.

**Keywords:** Green mold, *Penicillium digitatum*, W. Murcott, Nova, Resistance, Imazalil

## I. INTRODUCCIÓN

La mandarina (*Citrus* sp.) es la fruta que agrupa a diferentes especies como *Citrus reticulata* Blanco, *Citrus unshiu*, *Citrus reshni*, entre otros híbridos; y se caracterizan por producir un fruto tipo hesperidio, parecido a la naranja pero de menor tamaño, con mucho jugo azucarado y aromático que, por tener una cáscara más bien suelta, son de fácil pelado. La planta es leñosa perenne, perteneciente a la familia Rutaceae y proviene de las zonas tropicales de Asia.

La producción de mandarina en el Perú se basa en las variedades Satsumas, Clementinas, Híbridos, entre otras. Las principales regiones productoras de nuestro país son Lima (56%), Ica (25%) y Junín (13%) (Gestión, 2017). Éstas ofrecen ventajas debido a su posibilidad de exportación, a la época de cosecha y/o porque existe una demanda en el mercado nacional. Según la Dirección de Estadística de la FAO, hasta el 2017 el Perú contó con una superficie instalada de tangerinas, mandarinas, clementinas y satsumas de 15204 Ha la cual brinda una producción de 407,9 Miles de TM. En comparación con otros países productores y exportadores como México que cuenta con más del doble de superficie, 33928 Ha y un poco más de volumen producido; con 492,5 Miles de TM (FAOSTAT, 2019).

La mandarina por ser un producto de gran importancia exportable, es necesario tener ciertos cuidados en la cadena productiva. En especial en la etapa de poscosecha; en la que las levaduras y mohos causan podredumbres en las frutas provocando pérdidas de hasta el 25% del total de la producción. Las podredumbres más importantes en cítricos son: pudrición verde *Penicillium digitatum*, pudrición azul *Penicillium italicum* y la pudrición ácida *Geotrichum candidum* (Naqvi, 2004 y Ismail, 2004).

A nivel mundial *Penicillium digitatum* que causa la podredumbre verde, es el patógeno más importante en el almacenamiento durante el período de poscosecha. Éste ingresa a través de heridas o daños mecánicos causados durante la cosecha, empaque o transporte (Hong, 1998). Además Barkai-Golam (2001) menciona que los frutos son susceptibles cuando existe presencia de lluvias y temperaturas entre 20-27°C.

El uso de fungicidas para el control de las enfermedades poscosecha en cítricos es la práctica más utilizada durante el periodo de almacenamiento en cámaras. Los ingredientes activos más empleados son: Imazalil, Propiconazol y Ortofenilfenol para potenciar la actividad fungicida y aumentar el campo de acción (Taverner, 2001). El uso excesivo de estos compuestos químicos ha generado que aparezcan cepas resistentes, produciendo la incapacidad de controlar a la podredumbre verde (Damicone, 2001). Por esta razón, con este trabajo se buscará brindar nuevas alternativas, con el uso de microorganismos antagonistas como *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* o extractos de aceite árbol de Té (*Melaleuca alternifolia*) que tiene efectos fúngicos (Hernández, 2007).

Por lo anterior, es de suma importancia buscar alternativas que puedan manejar la podredumbre verde en este cultivo, de esta manera aumentar la producción exportable y continuar creciendo en el mercado, lo cual nos brindará mejores oportunidades laborales y de desarrollo para nuestro país.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVOS GENERALES:**

Evaluar los efectos de extractos vegetales, *Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum* sobre el control en poscosecha de cepas de *Penicillium digitatum* con resistencia a Imazalil en frutos de mandarina en condiciones *in vitro* e *in vivo* en la Universidad Nacional Agraria La Molina.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

Identificar las cepas resistentes al ingrediente activo: Imazalil.

Evaluar la acción del extracto vegetal (Té de *Melaleuca alternifolia*), *Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum* para el control de cepas resistentes a Imazalil.

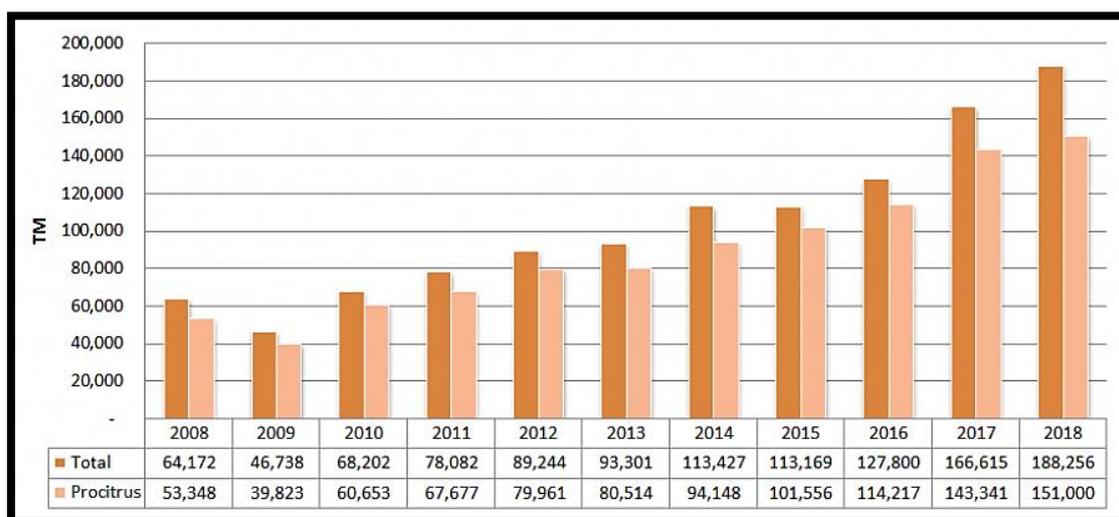
## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL CULTIVO

A la fecha, los principales destinos de exportación de cítricos peruanos son Estados Unidos (37%), Reino Unido (22%), Holanda (13%), Canadá (8%), China (6%), Rusia (4%) e Irlanda (2%). No obstante, la mayor parte de los cítricos peruanos se consumen en el país, como frutos frescos, y los exportados representan entre el 12% y 14% de la producción. (Gestión, Febrero 2019).

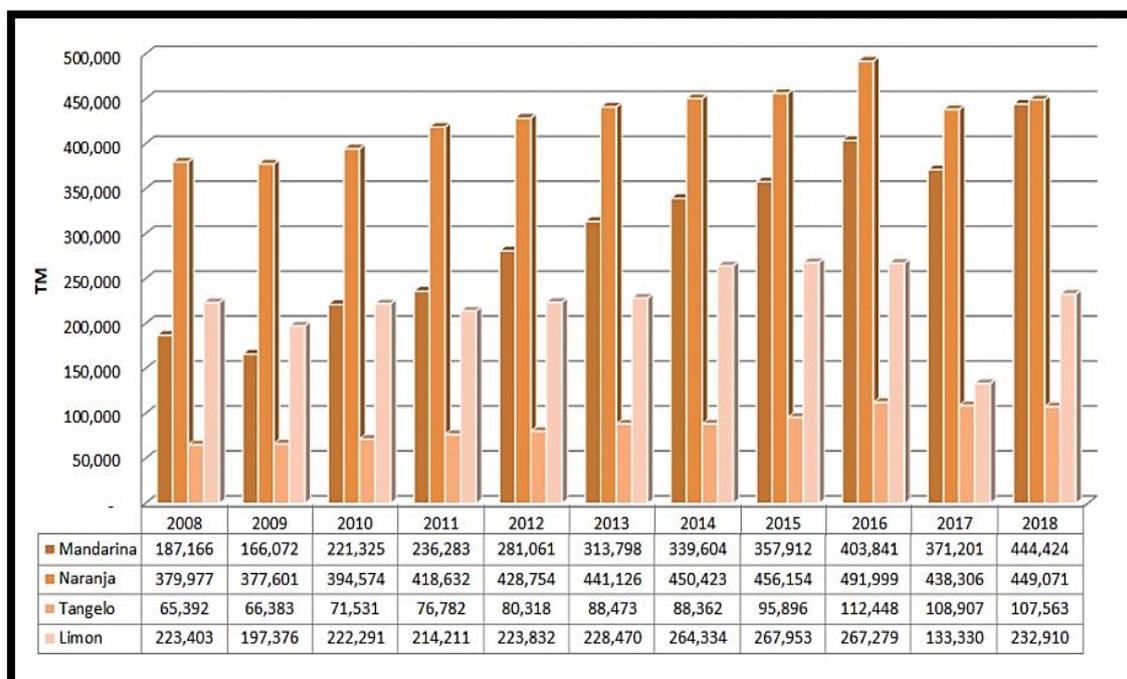
Las exportaciones de cítricos en general sumaron 188,256 TM en el 2018 y rozaron los US\$ 200'000,000, lo que representa un crecimiento de 22% con respecto al 2017, año en que se exportaron 166,615 toneladas. (ProCitrus, 2019)

Los envíos de mandarinas al exterior se han incrementado 16.17% en el 2018, al sumar 137,443 TM, superando así las 118,309 TM del 2017. Aunque la mandarina es el principal fruto cítrico de exportación, el Gerente General de la Asociación de Productores de Cítricos del Perú (ProCitrus), Sergio Del Castillo señala que “hay un interés creciente”, entre los compradores de cítricos, en la naranja y el limón Tahití”.



**Figura 1.** Histórico de exportaciones de cítricos desde el 2008 al 2018 en Perú. Elaboración: ProCitrus. Fuente: Aduanas

Aunque el consumo interno crece, no lo hace al ritmo de la producción, lo que ha generado una caída de los precios en el mercado nacional. La producción nacional de mandarina, naranja y limón registró un importante crecimiento del 2017 al 2018, debido a la innovación tecnológica y una mejor explotación de las hectáreas cultivadas; sin embargo, la producción de tangelo decayó.



**Figura 2.** Histórico de exportaciones de cítricos desde el 2008 al 2018 en Perú. Elaboración: ProCitrus. Fuente: Aduanas.

En el país hay unas 65,000 hectáreas cultivadas de cítricos y 9,000 de ellas corresponden a miembros de ProCitrus, que no prevé un incremento de estas extensiones en el 2019.

En el X Seminario Internacional de Cítricos (2019), se señaló que el Perú es el primer país exportador en mandarinas en América, enviando 137,443 TM, en comparación al 2017 cuando se envió unos 118,309 TM, registrando un incremento de 16.17%

Las exportaciones de cítricos en valores FOB representaron 200,000 millones de dólares en la campaña del 2018.

## 2.2 EL CULTIVO

### 2.2.1 MANDARINA (*Citrus reticulata* Blanco o *Citrus nobilis* André non Lour.)

La mandarina proviene de las zonas tropicales de Asia. Su origen se localiza en Asia oriental, en una zona que abarca desde la vertiente meridional del Himalaya hasta la China meridional, Indochina, Thailandia, Malasia e Indonesia. (Agusti 2012, p.21)

El género de los cítricos (Rutaceae, Aurantioideae) es nativo de las zonas cálidas del sur y sudeste de Asia hasta las zonas templadas de China, Australia e islas del Pacífico sudoccidental. Tiene una larga historia de domesticación, y especies ampliamente difundidas en cultivo, muchas veces, se han naturalizado en las zonas cálidas y templadas del mundo (Scora, 1975). La clasificación genética de los cítricos es compleja, debido a la presencia frecuente de procesos de hibridación y apomixis (Xiang y Roose, 1988; García *et al.*, 1999). Dado que los híbridos pueden fijarse en distintos cultivares, el género presenta características morfológicas variables (Swingle, 1943).

A nivel mundial, los países productores de mandarinas del hemisferio norte son China, España, Turquía, Egipto, Marruecos, Japón e Irán; mientras que en el hemisferio sur los principales países productores son Brasil, Argentina, Perú y Sudáfrica. En el Perú se tienen 11,549 Ha (FAO 2014) y las variedades comerciales de mandarinas se diferencian en dos grandes familias: satsumas y clementinas, además de los híbridos. Las variedades que mayormente Perú exporta son los satsumas, clementinas y W. Murcott (MINAGRI, 2014).

## 2.2.2 CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS

La mandarina (*Citrus reticulata* Blanco) es una planta arbórea perenne, cuenta con un periodo de vida desde el punto de vista económico a partir del tercer o cuarto año luego de la instalación definitiva en campo y puede perdurar de forma productiva de 20 años a 30 años. Su porte es pequeño, de 2 a 6m de altura sino se realizan las podas necesarias, dificultando las labores culturales que se realizan durante la campaña. El tronco con frecuencia es torcido, generalmente sin espinas y con ramillas angulosas. Posee hojas enteras, coriáceas, elípticas o lanceoladas, unifoliadas de tamaño pequeño, y con el peciolo provisto de alas estrechas. Sus hojas son de color verdes oscuro brillante en el haz, y verde amarillento en el envés que al triturar desprenden fragancia. Las yemas son mixtas (Davenport, 1990) pudiendo desarrollar brotes vegetativos, de flor solitaria, campanero (vegetativo con flor terminal), inflorescencias con y sin hojas (ramilletes mixto y floral respectivamente). Las flores son hipóginas (de ovario súpero), tienen 5 sépalos verdes, 5 pétalos blancos, 20-40 estambres soldados, con polen no siempre fértil, blancas, muy perfumadas, con cinco pétalos y numerosos estambres. (Jackson & Looney, 2003). El aprovechamiento comestible se da en los frutos, que en el caso de la mandarina es el más dulce del género *Citrus*; cuentan con un exocarpo que presenta vesículas que contienen aceites esenciales, mesocarpo pomposo y de color blanco y endocarpo en el que se presentan tricomas con jugo, rodeado por una corteza resistente de color naranja. (Manner *et al.*, 2006).

Los cítricos cultivados tienen un solo tronco, con 3 ó 4 ramas principales, que nacen a una altura de 50-80 cm. Según la densidad y crecimiento de las ramas, éstas contribuyen al aspecto general del árbol y su arquitectura puede modificarse con las podas. La forma de las ramas verticales es redondeada, mientras que las horizontales son aplanadas, como consecuencia de la actividad diferencial del cambium, dando origen a un crecimiento hipotrófico que influye en la forma del dosel de los árboles (Agusti, 2003). Las hojas son oblongo-ovales, de longitud de 3.5 a 8 cm de longitud y 1.5-4 cm de anchura, con la base y el ápice obtusos; presentan pecíolos con alas muy cortas, y glándulas que contienen aceites. Las ramas jóvenes están orientadas transversalmente, de color verde y con espinas axilares, mientras que las ramas adultas son circulares en la sección transversal y sin espinas. El fruto es un hesperidio (baya carnosa), indehisciente que varía mucho en tamaño, color, forma y calidad del jugo, con forma aplanada ovoide. El endocarpio es

carnoso y se divide en secciones separadas por tabiques delgados, donde se aloja la pulpa que contiene las vesículas que producen el jugo (Manner *et al.*, 2006). En el caso de las mandarinas la corteza es delgada y se separa fácilmente de la pulpa.

### **2.2.3 REQUERIMIENTO DEL CULTIVO**

#### **A. SUELO**

El árbol del mandarino se desarrolla de manera óptima en suelos profundos, de texturas livianas y que necesariamente presenten un buen drenaje pues esta especie es extremadamente sensible a la anoxia radical, por lo que se recomienda descartar aquellos suelos de textura pesada y que presenten napas freáticas a poca profundidad o cualquier tipo de compactación que impida un buen drenaje. Es recomendable que el suelo tenga un pH entre 5 y 8, valor que varía con el portainjerto que se esté utilizando. En general, la característica más limitante para su desarrollo es la salinidad del suelo, la que afecta su crecimiento y desarrollo. Además, suelos con elevados contenidos de carbonatos y cal activa inducen síntomas de clorosis férrica (PUC, 2007).

#### **B. CLIMA**

Los cítricos, entre ellos la mandarina alcanzan su máximo desarrollo en las áreas subtropicales (30-40° latitud norte sur) donde su producción es estacional y la calidad del fruto para el consumo en fresco es excelente. (MINAGRI 2014).

De acuerdo a la ficha técnica del MINCETUR se indica que la mandarina es el fruto del mandarino, cuyo árbol proviene de un clima cálido o templado, cuyo rango de temperatura ideal se encuentra entre 12°C y 26°C con un 80% de humedad, y cuya producción se obtiene a partir del cuarto año después del trasplante (MINCETUR – SIICEX, 2014).

Las altas temperaturas en el día disminuirán la acidez, afectando su relación con los azúcares y, temperaturas medias promueven mayor síntesis de carbohidratos. Las temperaturas menores a 13°C en etapa de maduración provocarán un cambio de color.

La planta es más resistente al frío y más tolerante a la sequía que el naranjo, pero los frutos son sensibles. El factor limitante es la temperatura mínima, ya que no tolera temperaturas inferiores a 3°C; pues la temperatura es la que determina su desarrollo vegetativo, floración, cuajado y calidad de los frutos. Las temperaturas altas constantes mantienen altos niveles de clorofilas y su color es persistentemente verde. (MINAGRI, 2014).

### **C. AGUA**

Los suelos deben tener una proporción equilibrada de elementos gruesos y finos (textura), para garantizar una buena aireación y facilitar el paso del agua, además de proporcionar una estructura que mantenga un buen estado de humedad y una buena capacidad de cambio catiónico (MINAGRI, 2014)

Los requerimientos hídricos pueden oscilar entre 1.500 y 2.500 mm anuales, regiones con precipitaciones superiores a 3.500 mm son consideradas marginales. La humedad relativa alta favorece el desarrollo de enfermedades fungosas (Villegas, 1997).

### **D. CARACTERÍSTICAS DEL FRUTO**

El fruto de mandarina es un hesperidio que encierra la pulpa jugosa en un número variable de celdas llamadas gajos, con tricomas (apéndice de la epidermis del fruto) que contienen el jugo, el cual es rico en vitamina C, flavonoides y aceites esenciales. En la corteza de los frutos cítricos se distinguen dos partes. La externa, coloreada y llamada flavedo; y la parte interna, o albedo, mucho más gruesa, esponjosa y blanquecina. La forma de los frutos es variable, oblonga o esférica según las variedades, que también difieren en tamaño y color (Gonzales, 2014). De los frutos cítricos, la mandarina es globosa y deprimida en la base. Mide entre 4-7cm de longitud y de 5-8cm de diámetro.

## **E. FENOLOGÍA DEL FRUTO**

La transición del fruto desde el cuajado hasta la madurez tiene lugar en fases sucesivas, con características bien definidas, pero variables en duración, según las condiciones ambientales, especies y variedades (Agustí, 2004). En los cítricos, el desarrollo del fruto sigue una curva sigmoideal, desde la antesis hasta la maduración (Davies y Albrigo, 1994), caracterizada por tres periodos bien diferenciados conocidos como fases.

Fase I o periodo de crecimiento exponencial, va desde el final de la antesis hasta la caída fisiológica de los frutos. En esta fase se presenta un rápido crecimiento del fruto originado por la división celular en la que se producen casi todas las células que van a constituir la fruta madura (Agustí, 2003). La duración de esta fase oscila entre un mes y un mes y medio dependiendo de las condiciones climáticas y del cultivar.

Fase II, las células se diferencian en los diversos tipos de tejidos (sacos de jugo, albedo, flavedo, etc.); se presenta elongación celular y las vesículas se llenan de agua, azúcares y ácidos.

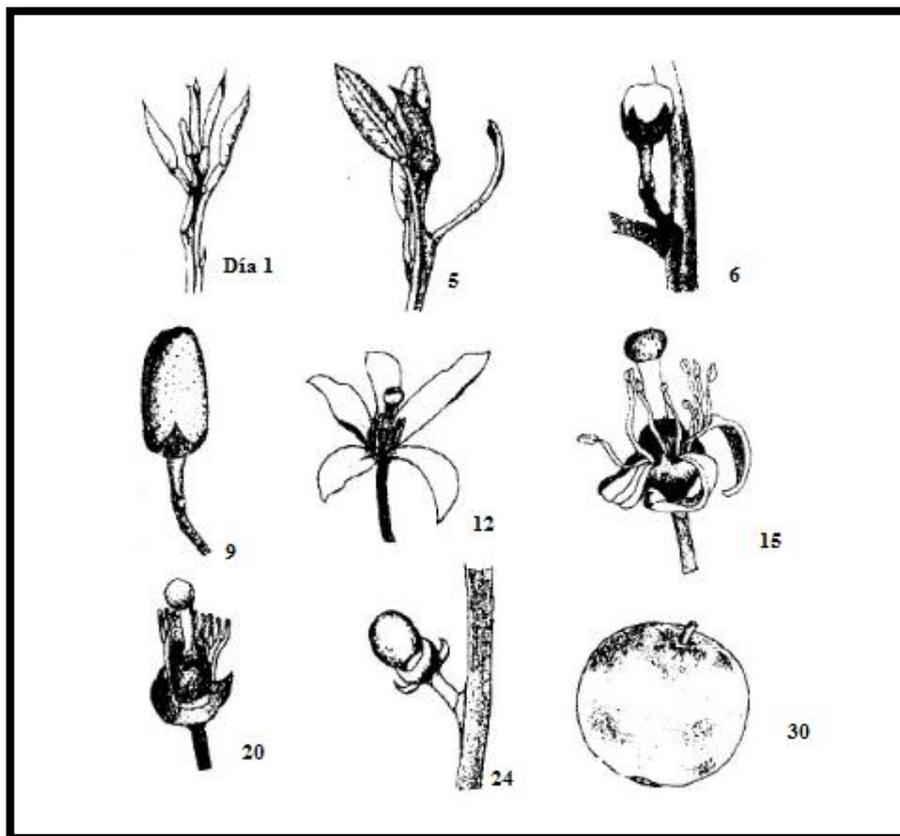
Y la fase III presenta una reducida tasa de crecimiento y comprende todos los cambios relacionados con la maduración (Agustí, 2008; Agustí *et al.*, 2004)

En el caso de la naranja y tomándolo de referencia para la mandarina, el fruto inicia su fenología cuando empieza a crecer el brote, rompiendo el estado de reposo de las yemas florales, estas comienzan a hincharse lo cual finaliza con los sépalos de las yemas ligeramente separadas eso lo podemos visualizar al tercer día posterior al hinchamiento. Al tercer día inicia la apertura de yemas en el que los primordios florales son visibles. Las flores se hacen visibles pero aun encerradas en el botón y se distribuyen aisladas, en inflorescencias con o sin hojas; los pétalos crecen y los sépalos se abren. Al noveno día inicia la floración realizándose la apertura de las primeras flores, alrededor del 10% de flores se encuentran abiertas, posterior a unos 15 días luego del rompimiento del reposo tenemos un 50% de flores abiertas e inicia la caída de los primero pétalos ya que la planta realiza una autorregulación de la cantidad floral. Las flores que restan se marchitan y es el inicio del cuajado.

El desarrollo del fruto se inicia con el crecimiento del ovario, este continua su desarrollo rodeado por los sépalos en modo de corona. Al día 24 se inicia la caída de frutos para

regular la carga de estos en la planta, simultáneamente a ésta etapa los frutos alcanzan el 40% del tamaño final.

El fruto tendrá alrededor del 90% del tamaño deseado para el día 30. El inicio de la coloración del fruto depende de las condiciones climáticas, es necesario tener temperaturas menores a 12 °C para conseguir el cambio de color que es el surgimiento de carotenoides que nos brindan la coloración naranja. El fruto maduro para el consumo se logra en el día 40 el cual debe de tener un contenido de sólidos solubles entre el 75% y 85% de azúcares. El contenido de ácidos mínimo debe de oscilar en un (0.4 a 0.5) % y en la escala de grados Brix debe tener como mínimo 9° (Agusti et al., 1995), pudiendo ser cercano al de la mandarina ante la ausencia de estudios en fisiología del fruto sobre esta especie. (Figura 3)



**Figura 3.** Desarrollo fenológico del fruto iniciándose en el brotamiento dividido por días en naranja (*Citrus sinensis* L.Osbeck). (Agusti et al.; 1995).

## F. CULTIVARES COMERCIALES

Existen decenas de variedades desarrolladas en el mundo, sin embargo la variedad que se cultive ha de adaptarse a las condiciones del medio ambiente, suelo y clima para que los árboles vegeten bien, proporcionen cosechas abundantes y de calidad, a un coste de producción lo más bajo posible. Por otra parte, la fruta que se obtenga ha de responder a las exigencias de los mercados de los consumidores para que alcancen en ellos buenas cotizaciones. Si se cumplen todas estas condiciones, la variedad cultivada alcanzará una máxima rentabilidad. (SOLER, 2006).

Entre las variedades de mandarina que se encuentran instaladas en nuestro país podemos mencionar los siguientes grupos:

- a) Grupo Satsumas (*Citrus unshiu*): Var. Clausellina, Var. Okitsu, Var. Owari,
- b) Grupo Clementinas (*Citrus reticulata* Blanco): Var. Clementinas, Var. Clemenules, Oronules.
- c) Grupo Híbridos: Fortuna, Kara, Pixie, Nova (híbrido entre Clementina x ‘tangelo’ Orlando), W.Murcott
- d) Grupo Tangores: Murcott, Ortanique, Tango (híbrido entre mandarina y naranja).
- e) Otras: Dancy, Malvasio. (MINAGRI, 2014)

A continuación describiremos las 2 variedades que se usaran en el experimento:

### NOVA

Es un híbrido de mandarina Clementina x ‘tangelo’ Orlando, obtenido en Florida. Las plantas son de porte medio a pequeño. Produce fruta medianamente grande, muy jugosa con abundantes semillas, que madura entre mayo y junio (Palacios, 2005).

Ramos (2003) indica que el fruto de esta variedad es de muy buena calidad para mercado en fresco o industria tiene cáscara delgada, correosa y fácil de pelar, produce muchas semillas en huertas con polinizador. Es similar a Orlando, pero está ganando popularidad debido a que produce mayores rendimientos y mayor calidad de fruto. Se puede cosechar de septiembre a diciembre, por lo que entra al mercado antes que otras mandarinas.

## **W. MURCOTT**

Es un ‘tangor’ obtenido en Florida, representado por plantas de porte mediano. El árbol es de tamaño y vigor moderado con escasas semillas, mejor coloración de la fruta y fácilmente desprendible. La fruta es de tamaño medio, de muy buena calidad organoléptica con cáscara delgada de difícil pelado y madura tardíamente (Palacios, 2005).

De acuerdo Sergio del Castillo Valderrama (2017), gerente general de Asociación de Productores de Cítricos del Perú (ProCitrus), indicó que la variedad W. Murcott es una variedad cuyas características se adecúan muy bien al mercado, ya que es una fruta viajera (llega bien a destino), además es la variedad cuya producción crece más en Perú. (Agraria.Pe, 23 marzo 2017).

De acuerdo al buscador “Citrus Variety Collection” de la Universidad Riverside de California, la fruta de W. Murcott generalmente es plana con una cáscara delgada, suave y de color naranja que es fácil de pelar. El fruto es de baja semilla en ausencia de polinización cruzada, pero llena de semillas cuando se poliniza de forma cruzada. La pulpa es de color naranja y jugosa, con un sabor rico y dulce. Al igual que con la mayoría de las mandarinas, W. Murcott es susceptible de ser portador alternativo. (citrusvariety.ucr.edu/2019).

### **2.3 PRINCIPALES ENFERMEDADES EN POSCOSECHA**

Durante el periodo de poscosecha, los cítricos son afectados por una amplia gama de microorganismos, manifestándose en forma de signos y síntomas generando un nivel de deterioro que afecta al fruto para su comercialización (Hernández, 2007).

Los síntomas de pudrición generados, son comúnmente causados por las siguientes 3 (tres) especies: *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* y *Penicillium ulaiense* (Eckert e Eaks, 1989). De estas especies, *Penicillium digitatum* es considerado el patógeno responsable de más del 90% de pérdidas de cítricos en poscosecha. (Smilanick, 2006). Otras especies como *Alternaria citri*, *Geotrichum candidum*, *Botrytis cinerea*,

*Colletotrichum gloesporioides* y *Rhizopus stolonifer* pueden originar graves pérdidas ocasionales.

Los patógenos que parecen con más frecuencia generando problemas en el periodo de poscosecha en la mandarina son las siguientes:

### **2.3.1 *Alternaria citri***

Los síntomas de la enfermedad pueden tener el aspecto de manchas de un color que va de café a negro, aplanados o hundidos con márgenes bien definidos, o bien pueden tener el aspecto de áreas podridas, grandes y difusas, que pueden ser superficiales o hundidos en la pulpa del fruto o de la hortaliza. El hongo se desarrolla adecuadamente dentro de un amplio rango de temperaturas, puede crecer en los tejidos de su hospedante (a los que pudre) produciendo poco o nada de micelio sobre la superficie de ellos, pero a menudo forma sobre la superficie del área podrida una masa de micelio que es blanca al principio pero que después cambia a café o negro. Algunas de las enfermedades más graves ocasionadas por este patógeno después de la cosecha son la pudrición de los limones y la pudrición negra de los cítricos. (AGRIOS, 1996).

### **2.3.2 *Botrytis cinerea***

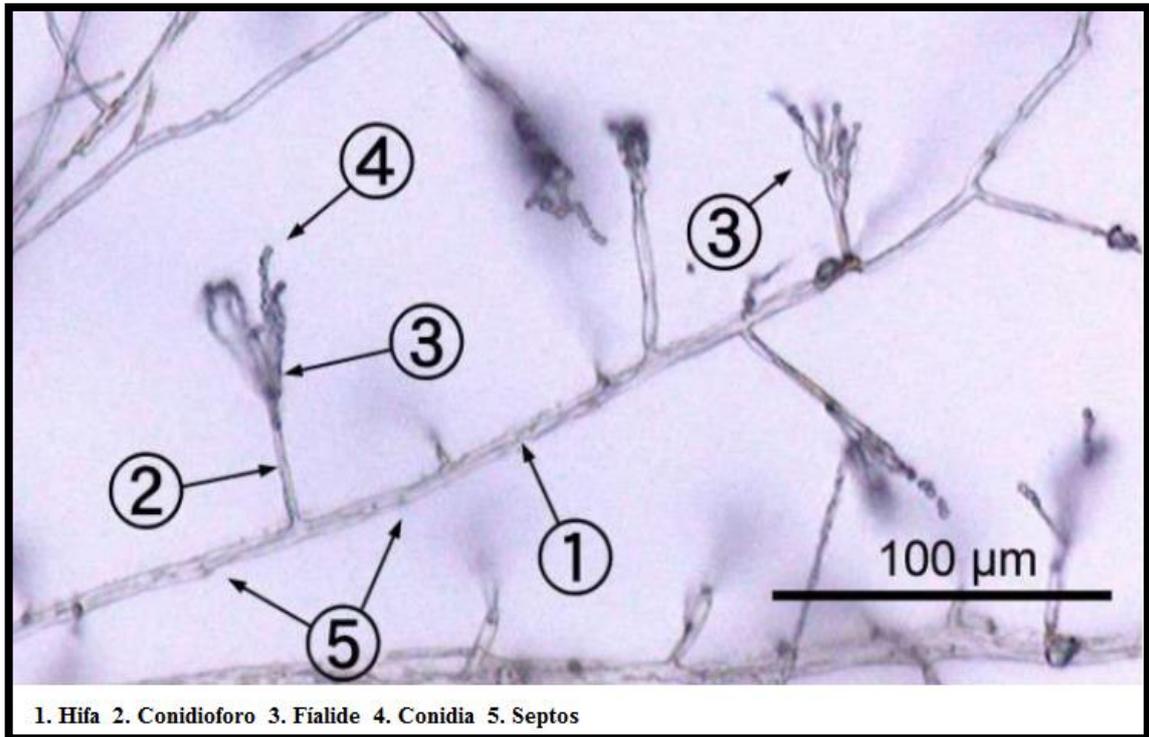
Causa los "mohos grises" o las "pudriciones por el moho gris" de frutos y hortalizas, tanto en el campo como durante el almacenamiento. La pudrición puede iniciarse en la inflorescencia o en el extremo del pedúnculo del fruto, o bien en cualquier herida, hendidura o incisión de los tejidos de los órganos almacenados. Dicha pudrición tiene el aspecto de un área bien definida, parduzca y aguanosa, la cual penetra profundamente y avanza con gran rapidez en los tejidos del órgano. En la mayoría de los hospedantes y bajo condiciones de humedad se desarrolla una capa de moho aterciopelado, granular y de color grisáceo o gris pardusco sobre la superficie de las áreas putrefactas. Los mohos grises muestran mayor severidad en ambientes húmedos y fríos, continúan desarrollándose, aunque con mayor lentitud, incluso a 0°C (AGRIOS, 1996).

### 2.3.3 *Geotrichum candidum* var. *Citri*

Este patógeno ocasiona las "pudriciones ácidas" de los cítricos, tomates, zanahorias y otros frutos y hortalizas. La pudrición ácida es una de las pudriciones más desagradables y de peor aspecto de los frutos y hortalizas susceptibles. El hongo se encuentra ampliamente distribuido en los suelos, en los frutos y hortalizas en proceso de descomposición y contamina a estos últimos antes o durante su cosecha. *Geotrichum candidum* var. *citri* penetra en los frutos y otros órganos comúnmente después de la cosecha, a nivel de las cicatrices del tallo, grietas de la cáscara del fruto e incisiones de varios tipos. Las áreas infectadas son blandas húmedas y son pinchadas con gran facilidad. La pudrición avanza rápido, al principio en el interior del fruto y luego lo cubre por completo. Posteriormente, la cáscara del fruto a menudo se agrieta a nivel de la zona infectada y es frecuente que se llene de numerosas hifas blancas, gaseosas o en forma de espuma. Asimismo, sobre la superficie del fruto se desarrolla una capa delgada aguanosa de micelio compacto y de color crema, mientras que todo el interior del fruto se transforma en una masa aguanosa, descompuesta y de olor agrio. Éste se ve favorecido por las altas temperaturas (de 24 a 30°C) y humedad, pero muestra actividad a temperaturas tan bajas como 2°C (AGRIOS, 2005).

### 2.3.4 *Penicillium digitatum*

Es un hongo imperfecto que permanece al filo Ascomycota, clase Eurotiomycetes, familia Trichocomaceae. Es un parásito que se encuentra en todo tipo de material vegetal degradando celulosa, quitina, almidón, azúcares y lignina. Es además considerado como un patógeno saprófito del suelo, el cual tiene un modo infectivo que es activado cuando el fruto se encuentra en periodo avanzado de maduración o completamente maduro. (AGRIOS, 1996). Por esa razón, la contaminación se da lugar en el campo durante la recolección, transporte, almacenamiento y durante el periodo de distribución. Las estructuras de esta clase son muy características (Figura 4).



**Figura 4.** Estructuras de *Penicillium spp.* Modificado de (Huerta, 2014).

## A. SINTOMA

*Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc. causa la llamada pudrición “moho verde” la que genera una descomposición del fruto de hasta el 90%. Éste penetra en los tejidos de su hospedante a través de aberturas en la cáscara o corteza e incluso a través de lenticelas. Las pudriciones causadas por *Penicillium digitatum* al principio tienen el aspecto de manchas blandas, aguanosas, ligeramente decoloradas y de tamaño variable, las cuales pueden aparecer en cualquier parte del fruto. Estas manchas son superficiales al principio, pero se hunden con rapidez y, a la temperatura ambiente, gran parte del fruto o se descompone en tan sólo unos cuantos días. Poco después de que se desarrolla la pudrición, un moho verde comienza a crecer sobre la superficie de la cáscara o corteza del fruto, cerca de la parte central de la mancha. Posteriormente, el hongo prosigue su desarrollo y produce esporas (AGRIOS, 1996).

## B. CICLO DE VIDA

La preproducción de *Penicillium digitatum* inicia con la fase de reproducción asexual llamada también “fase conídica”, por la producción de conidias y ascas. Una fase de meiosis forma ascosporas (n) las cuales se encuentran en el interior de las ascas que se están formando. Si existen las condiciones de desarrollo ideal para el patógeno éste realizará únicamente reproducción asexual que es la etapa infectiva. Si las condiciones no son las ideales, se unirán los gametangios para generar estructuras de conservación (Figura 5), (Huerta, 2014).

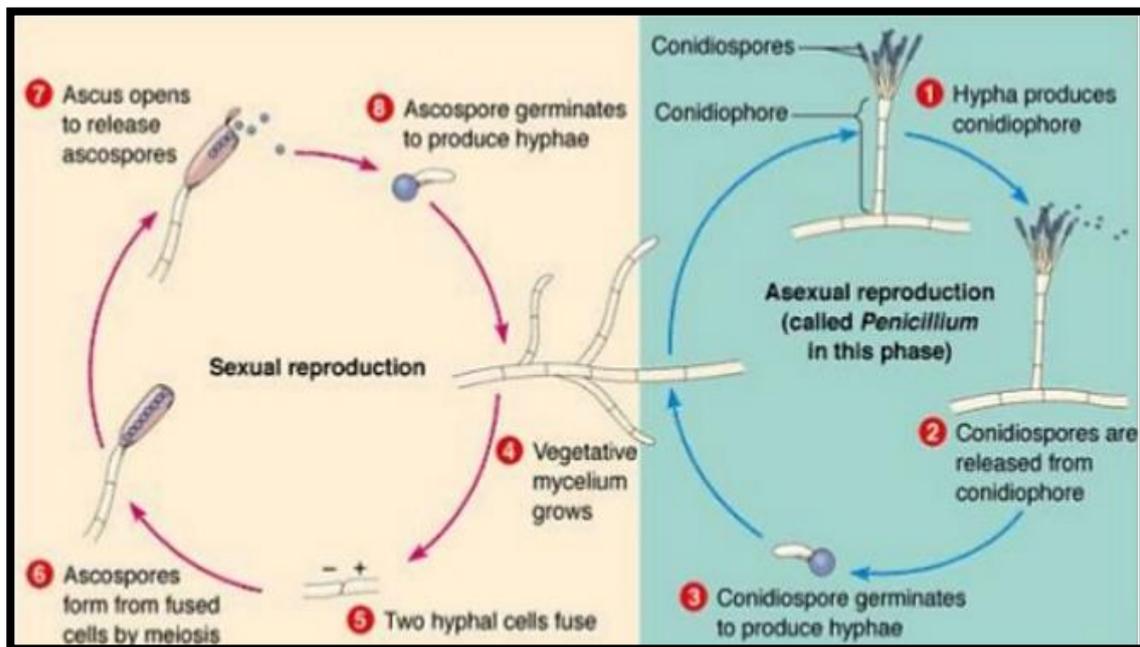


Figura 5. Ciclo de vida de *Penicillium* spp. (Huerta, 2014).

## C. DESARROLLO EN ALMACENAMIENTO

El área esporulante tiene un color verde olivo y a menudo se encuentra rodeada por una banda estrecha o amplia de micelio blanco, delante del cual hay una banda de tejido aguanoso. El desarrollo superficial del hongo se produce sobre manchas de cualquier tamaño, siempre y cuando la atmósfera sea húmeda y cauda. Cuando el aire es seco y frío, el moho superficial es raro, aunque los frutos estén totalmente descompuestos. Bajo

condiciones de almacenamiento, pequeños cojinetes de micelio productores de esporas aparecen sobre la superficie de las manchas.

Los frutos en proceso de descomposición huelen a humedad y, en condiciones secas, pueden contraerse y transformarse en una “momia” mientras que en condiciones húmedas cuando los hongos y levaduras secundarias entran también en ellos, se reduce a una masa blanda y húmeda (AGRIOS, 1996).

### **2.3.5 CONTROL DE ENFERMEDADES EN POSCOSECHA**

#### **A. PRODUCTOS QUÍMICOS**

Los ingredientes activos más utilizados en las plantas de almacenamiento son el imazalil (IMZ), Procloraz (PRO), Orto-fenil fenato (OPP) y Tiabendazol (TBZ) (Smilanick, et al., 2008). Estos productos son igualmente utilizados en el Perú.

#### **IMAZALIL (IMZ)**

Imazalil pertenece a la familia de los imidazoles, cuyo modo de acción es la inhibición de la biosíntesis de ergosterol, interviniendo en el bloqueo de la 1-4 alfa lanosterol desmetilasa. Por lo que inhibe el paso de desmetilación C-14 (FRAC, 2016). Empleado principalmente como sulfato, soluble en agua. Se trata de un fungicida sistémico de amplio espectro con una potente acción frente *Oidium*, *Penicillium spp.*, *Monilia*, *Fusarium*, *Alternaria* y *Botrytis*. No obstante, el uso de éste ingrediente activo está generando que surjan cepas resistentes.

### **PROCLORAZ (PRO)**

Procloraz es un fungicida de amplio espectro, con efecto preventivo frente a los ascomicetos y deuteromicetos en numerosos cultivos, tiene un mecanismo de acción que inhibe la síntesis del ergosterol. Tiene acciones translaminares. Actualmente se tiene fijado un LMR para los cítricos que es 10ppm. (Phytoma, 2016).

### **ORTO-FENIL FENATO (OPP)**

El Orto-Fenil Fenato es el primer fungicida de síntesis utilizado para el control de enfermedades de poscosecha, funcionando de manera eficiente durante más de 50 años. Este es un biocida de amplio espectro. El modo de acción primario es generar deficiencias en la pared celular, membrana citoplasmática y citoplasma; en este último caso el 2-fenilfenol genera problemas en la permeabilidad de la membrana.

El modo de acción secundario es debido a sus propiedades fisicoquímicas. Cuando el producto penetra en el interior de las heridas de los frutos cítricos, entra en contacto con los ácidos naturales de la fruta los cuales tienen un pH ácido, que provoca su precipitación, cauterizando las heridas y matando a las esporas fúngicas. Por tanto, su actividad es básicamente por contacto. (Eckert, 1986).

Este ingrediente activo a diferencia de otros no genera resistencia en *Penicillium digitatum*.

### **TIABENDAZOL (TBZ)**

Fungicida polivalente que pertenece a la familia de los Benzimidazoles, los cuales tienen el modo de acción que afecta la división celular en la formación de huso acromático. Empleado en poscosecha, semilla, suelo, aplicaciones foliares y fumigaciones en lugares de almacenaje. Fungicida de amplio espectro: *Venturia*, *sp.*, *Rhizoctonia* *sp.*, *Fusarium* *sp.*, *Colletotrichum* *sp.*, *Botrytis* *sp.* (FRAC, 2016).

## **B. PRODUCTOS BIOLÓGICOS**

Con el fin de prevenir todo riesgo para la alimentación humana y animal, y garantizar la salud y calidad de los cultivos; mercados internacionales, han adoptado una serie de normas para la protección de los vegetales y productos vegetales frescos (frutas, hortalizas, entre otros) para controlar su circulación en el mercado. Estos mercados de destino de exportación, exigen estándares que impliquen la reducción de uso de niveles de pesticidas químicos, elaborando una serie de normas y reglamentos para considerar a sus productos como “orgánicos”; es decir, que fueron producidos con métodos de producción orgánica claramente definidos. (FAO, 2019).

El uso de productos biológicos, permite entonces, ser una alternativa natural, altamente comercial y beneficiosa ya que no representa un riesgo ni para el ambiente, ni para la salud humana. Además, existe la tendencia de evitar el uso de fungicidas químicos debido al riesgo que representan sus residuos, que muchas veces puede sobrepasar el límite máximo permitido.

Lo anterior debido a que los hongos fitopatógenos pueden volverse resistentes a los fungicidas y es necesario utilizar mayor cantidad del compuesto químico para combatir al patógeno y por consiguiente, se generará mayor cantidad de residuos tóxicos. Una alternativa al control químico del fitopatógeno es mediante el uso de agentes biocontroladores, es decir, microorganismos que impiden o inhiben el desarrollo del hongo patógeno (Serrano y Galindo, 2007).

El control biológico se define como la reducción de la densidad del inóculo o de las actividades de un patógeno que produce una enfermedad, por uno o más organismos, en forma natural a través de la manipulación del medio ambiente, hospedante o antagonista, o por la introducción de una población de uno o más antagonistas (Cook y Baker, 1983).

Por eso este trabajo desea utilizar los siguientes antagonistas:

### ***Bacillus subtilis***

Es una bacteria gram positiva que forma endosporas y es capaz de producir antibióticos. Los productos de actividad antimicrobial son predominantemente péptidos. El potencial de *B. subtilis* para producir los antibióticos ha sido reconocida hace más de 50 años (Bryan, 1996; Stein, 2005).

*Bacillus subtilis* actúa como fungistático y fungitóxico. Además otros mecanismos de acción son a través de la competencia por el espacio físico, de nutrientes y lo más importante es que induce la resistencia sistemática en la planta, indicado por una mayor producción de peroxidasas (European comisión health & consumer protection directorate-general, 2006; Lisboa, 2003).

*Bacillus subtilis* genera metabolitos conocidos como lipopéptidos (iturinas, agrastalinas y surfactinas) que actúan de manera sinérgica para inhibir la germinación de esporas, altera el tubo germinativo del patógeno y la membrana celular del micelio del hongo. (Nysdec, 2001).

### ***Trichoderma harzianum***

Es un hongo micoparásito necrótofo, que es ampliamente utilizado como agente de biocontrol ya que ataca una gran variedad de hongos fitopatógenos. Este realiza un ataque directo a la hifa del patógeno hospedante seguido por la utilización de los nutrientes. La actividad del antagonista se debe principalmente a la producción de antibióticos, toxinas y enzimas hidrolíticas que generan la muerte del hospedante. (AGRIOS 2004).

El biocontrol de *Trichoderma harzianum* consiste en la competencia, parasitismo, antibiosis e inducción de mecanismos de defensa de la planta. La rápida colonización del fruto, excluye al patógeno del sitio de infección y coloniza tejidos senescentes y finalmente puede inducir mecanismos de defensa a través de deposiciones de la pared celular y enzimas de defensa (Kubicek, *et al*, 1998).

En medio *in vitro* la primera interacción detectable de la hifa del micoparásito es creciendo directamente hacia el hospedante, este fenómeno aparece como un crecimiento quimiotrópico de *Trichoderma* en respuesta al estímulo del patógeno (Arora, 2004). En el momento que llegan a interactuar los dos microorganismos, el micoparásito se enrolla alrededor de la hifa del patógeno. El enrollamiento parece ser controlado por lectinas presentes en las hifas del hongo hospedante (Barak *et al*, 1985). *Trichoderma harzianum* posee en sus paredes celulares residuos de D-glucosa y D-manosa que inhiben la actividad de la lactina; necesario para el desarrollo del enrollamiento. (Inbar y Chet, 1992).

### **C. ACEITE ESENCIAL DE ÁRBOL DE TÉ *Melaleuca alternifolia***

El árbol de té australiano *Melaleuca alternifolia* es un árbol utilizado desde hace varios milenios por los aborígenes australianos. Actualmente se utiliza el aceite esencial, que destaca por sus propiedades antibacterianas y antifúngicas. Es un líquido incoloro se obtiene de las hojas y ramas tiernas por destilación (Hammer, 2006). El componente mayoritario es el terpinen-4-ol, alcohol monoterpénico cuyo porcentaje debe superar el 30% que genera pérdida de material celular, inhibe la respiración y formación de tubos germinales. La dosis se sitúan generalmente entre 0.03 y 0.5% (Hammer, 2004).

#### **2.3.6 CEPAS RESISTENTES DE *Penicillium digitatum***

El término resistencia a los fungicidas, tal como se utiliza por FRAC, se refiere a una reducción adquirido, heredable en la sensibilidad de un hongo a un agente antifúngico específico. El desarrollo de resistencia a los fungicidas es un proceso evolutivo. Los hongos, al igual que otros organismos, están en constante cambio. A partir de estos cambios se proporcionan una ventaja o desventaja en términos de la capacidad de la descendencia de sobrevivir y reproducirse otra generación. (FRAC, 2019)

La frecuencia reproductiva, es decir, la velocidad en que un solo individuo genere un gran número de progenie es rápida. Incluso la rapidez con que completan su ciclo de vida es alta.

El fungicida está ejerciendo una presión de selección sobre la población del patógeno ya que está matando a la población inicial, pero no mata a la población cambiada o mutante (FRAC, 2016).

El concepto microbiológico de resistencia establece que una cepa es resistente cuando su CIM (Concentración inhibitoria mínima) es más elevada que la habitual para esa especie. En cambio, según el concepto agronómico, un hongo es resistente a un fungicida cuando sigue produciendo el síntoma en el hospedante, a pesar de que la concentración del producto sea una dosis alta (Kedrridge y Cols, 1986). Lo anterior suele ocurrir cuando se excede el número de aplicaciones con un mismo producto sin realizar una rotación de este. Las poblaciones de cepas con resistencia al producto aumentan y llegan a ser inmunes a las dosis más altas del producto aplicado.

### **2.3.7 CEPAS RESISTENTES DE PERÚ A IMAZALIL**

A nivel mundial el control de *Penicillium spp.*, se basa principalmente en el uso de fungicidas de síntesis. El principal producto utilizado es el Imazalil (IMZ), (Smilanick, et al., 2008). No obstante, en ambientes donde se ha hecho un uso continuo de ellos, se han observado incrementos en las poblaciones del patógeno capaces de resistir las dosis comerciales de estos fungicidas. En California, la proporción de aislamientos resistentes a IMZ, aumentó en plantas de empaque de un 43,1% en 1988 a 74,2% en 1994 (Pérez, 2011).

En el Perú el manejo de la enfermedad ha sido tradicionalmente basado en la aplicación de fungicidas. Desde 1990 hasta el presente, la aplicación de Imazalil se ha convertido en rutina para todas las empacadoras peruanas. Esta situación es altamente preocupante, debido a que se ha alcanzado el límite máximo sugerido para mantener el nivel de residuo del producto en cantidades admisibles (5 mg kg<sup>-1</sup>). (FAO, 2019)

Actualmente no se cuenta con otras alternativas ajustadas para las condiciones particulares de Perú, aunque se conoce que para lograr un manejo antiresistencia, es conveniente realizar aplicaciones conjuntas o en secuencia de productos químicos con diferente principio activo (Zhang, 2007).

## 2.4 PROCESO POSCOSECHA DE CÍTRICOS

Una de las empresas procesadoras de cítricos que actualmente sufre el daño de cepas de *P. digitatum* resistentes al Imazalil dedicada al procesamiento de naranjas y mandarinas ubicada en Huaral, cerca de campos costeros de dichos cítricos. El proceso poscosecha de cítricos en dicha procesadora consta de las siguientes etapas:

- Recepción de Materia Prima (Cítricos)

Las frutas cítricas llegan a la procesadora en camiones de cargas almacenadas en jabas plásticas, la cual este es descargado en el área respectiva y se realiza el pesaje respectivo, asimismo se realiza un muestreo aleatorio por el Área de Aseguramiento de la Calidad, realizando una Evaluación físico química (IM: Índice de Madurez, Grados Brix, Porcentaje de Acidez, Defectos físicos y el porcentaje por calibre, clasificándolo de la siguiente manera: 3X(83-78mm), 2X(78-73mm), 1X(73-68mm), 1(68-63mm), 2(63-58mm), 3(58-53mm) del más grande al más pequeño respectivamente.

- Drenchado

Una vez realizado la descarga los pallets (parihuela de madera con una cantidad específica de jabas plásticas con el fruto cítrico) son sometidos a un drenchado la cual consiste en someter a la fruta a una ducha de agua con fungicida (Imazalil a 500 ppm).

- Volcado

Las jabas plásticas que contienen cítricos son colocadas en un riel la cual esta trasladada a las jabas a una poza de desinfección.

- Desinfección

Los frutos son sometidos a un poza de desinfección la cual contiene Bicarbonato de Sodio al 3%, Hipoclorito de Sodio 200ppm y Detergente Neutro 0.05%.

- **Lavado**  
Luego de ser sometidos a la desinfección los frutos son llevados por unos rodillos a una ducha de agua para el lavado respectivo.
- **Secado**  
Antes de pasar por el encerado los frutos deben de estar secos por ende pasan previamente por unos secadores (ventiladores de aire y horno).
- **Encerado**  
La cera aplicada consiste de carnauba, además se añade fungicidas (Imazalil 4000 ppm y Tiabendazol 5000ppm), esto es aplicado por unos rociadores automáticos.
- **Secado**  
La cera aplicada al fruto es secada por unos hornos a una temperatura de 40oC.
- **Clasificación por Calidad (Tria)**  
En esta área denominada también como tría se escogen los frutos que van pasar al mercado local y son separados.
- **Calibrado**  
Esta etapa del proceso es realizado por un calibrador automático que consta de un software para realizar la calibración respectiva, teniendo la siguiente clasificación: 3X, 2X, X, 1, 2, 3.
- **Empaque**  
En esta etapa se selecciona manualmente las categorías a empacar realizando una diferenciación y empacadas en una caja de cartón por tipo de calibre.
- **Paletizado**  
Todas las cajas de frutas empacadas de acuerdo a sus categorías son apiladas en una parihuela de madera y colocadas zunchos en su alrededor con su rotulo respectivo.

- **Enfriamiento por Túnel**  
Todos los pallets son ingresados a un túnel de enfriamiento, la cual se enfría al fruto gradualmente hasta llegar a la temperatura adecuada.
- **Almacenamiento en Cámaras de Frío**  
Una vez enfriados los pallets estos son almacenados en las respectivas cámaras de frío para su posterior despacho.
- **Embarques en Contenedores**  
Los pallets almacenados son embarcados en contenedores la cual estos tienen temperatura controlada en su interior.

#### 2.4.1 FLUJO DEL PROCESO DE CITRICOS DE EXPORTACIÓN



**Figura 6.** Flujograma del proceso poscosecha de procesadora de Huaral. Determinación de la efectividad de los tratamientos en las etapas de drenchado, desinfección y encerado en el proceso de fruta cítrica para exportación en procesadora – campaña 2012. Jorge Luis Tamayo Diaz. Comunicación directa.

### III. METODOLOGÍA

#### 3.1 UBICACIÓN DEL CAMPO EXPERIMENTAL

El ensayo se llevó a cabo en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía en el campus de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

Distrito	:	La Molina
Provincia	:	Lima
Departamento	:	Lima
Latitud	:	12° 05°S
Longitud	:	76°57°O
Altitud	:	243.7 m.s.n.m.

#### 3.2 MATERIALES Y EQUIPOS

- **Materiales:** Frutos cítricos de descarte con presencia de *Penicillium digitatum*, frutas cítricas sanas, Placas Petri, reglas, mechero, alcohol 70° y 96°, papel toalla, parafilm, pipeta, aguja de siembra, triángulo de Drigalski, sacabocado de 5mm de diámetro, bolsas de polipropileno, bolsas “ziplock”, tubos de ensayo, bisturí, objeto y porta objeto, hilo, olla metálica de 12L, vasos Beakers de 50, 100ml, 500ml, y 2000ml, 2L de Lejía Clorox (4% de Hipoclorito de Sodio), cronómetro, guantes plásticos, pizeta con agua destilada estéril, coladores, cámaras húmedas (tapers de plástico con rejillas de metal y papel toalla humedecida en alcohol), estilete.

- **Insumos:** Agua destilada, Agua estéril, Agua de mesa, PDA (Papa-Destrosa-Agar), producto TRICHO D® (*Trichoderma harzianum*), IMPALA® (Imazalil), TIMOREX GOLD® (Aceite esencial del árbol de té *Melaleuca alternifolia*), SERENADE® (*Bacillus subtilis*).
- **Herramientas y equipos:** balanza., microondas, cámara de flujo laminar, refrigeradora (7-8°C), incubadora (25°C), cámara húmeda, estereoscopio, microscopio.

### 3.3 PROCEDIMIENTO:

El ensayo consistió en 4 fases:

- **Fase 1:** Colección, aislamiento e identificación de *Penicillium digitatum* en mandarina Nova y W. Murcott.
- **Fase 2:** Obtención del aislamiento más virulento de *Penicillium digitatum* (con mayor resistencia al ingrediente activo Imazalil) a través de 3 filtros de evaluación.
- **Fase 3:** Aplicación de los tratamientos *IN VITRO* al aislamiento más virulento.
- **Fase 4:** Aplicación de los tratamientos *IN VIVO* a los frutos inoculados con el aislamiento más virulento.

#### 3.3.1 COLECCIÓN, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Penicillium digitatum* EN CÍTRICOS

Los aislamientos fueron extraídos de mandarinas W. Murcott y Nova, cosechadas de zonas costeras y colectadas en una planta procesadora ubicado en Huaral. Se colectaron 25 frutas enfermas ubicadas en la zona de descarte con presencia del hongo *Penicillium digitatum*. Estas presentaron síntomas de una colonia circular de moho verde y con presencia de cierta pudrición (Pérez, 2016).

Las 25 frutas enfermas fueron trasladadas en bolsas Ziplock hasta las instalaciones de la UNALM, donde se llevó a cabo el ensayo. Se realizó una desinfección de los frutos con

alcohol al 96% sin dañar el micelio. Posterior a ello se aisló la zona con presencia del síntoma y con ayuda de un estilete y del estereoscopio, se recogió parte del micelio para ser sembrado en 50 Placas Petri con Papa-Destrosa-Agar (PDA), 2 placas por fruto.

Las 50 placas Petri, (de los 25 aislamientos) fueron colocadas en una incubadora durante 7 días a 25 °C (+/- 1 °C) y humedad relativa de 95%. Estas fueron evaluadas de manera diaria durante los 7 días que se encuentre en la incubadora. (Pérez et al, 2011). Se realizó el repique en caso las placas iniciales se hayan contaminado.

Posteriormente de los 25 aislamientos colectados por fruto, se escogieron solo 15 que demostraron características similares en el crecimiento micelial y que estuvieron completamente aisladas de cualquier contaminante.

Para caracterizarlos, se repicó en medio de cultivo de agar PDA por varias veces hasta obtener colonias puras, cultivadas en medios adecuados y con todas las precauciones y reglas de asepsia y desinfección. Se guardaron 3 días a 25 °C. Con una muestra de la parte blanquecina del micelio en portaobjeto, se llevó a microscopio y se visualizó las estructuras del patógeno como: conidias en cadena, conidióforos y fiálides.

La identificación del género *Penicillium* fue siguiendo la clave Illustrated genera of imperfect fungi (Barnett H., 1998). Para la identificación de la especie *P. digitatum* según sus características morfológicas se siguió la clave Clave determinativa de las especies del género *Penicillium* (Lostau J., 1950).

### **3.3.2 OBTENCIÓN DEL AISLAMIENTO MÁS VIRULENTO DE *Penicillium digitatum* (CON MAYOR RESISTENCIA AL IMAZALIL)**

Para reconocer los aislamientos más con mayor resistencia al fungicida, se repicaron en placas petri con papa-dextrosa-agar (PDA) envenenadas con Imazalil (IMZ) a una dosis de 1ppm, 2 ppm, y 5ppm (Figura 7 – A, B). Las 3 concentraciones del ingrediente activo fueron recomendadas según la interpretación de la resistencia del hongo proveniente de la exposición de la especialista española Dra. Celia Murciano en el II Simposio de Postcosecha organizado por ProCitrus y Citrosol en 2017. Debido a que eran concentraciones bajas, se realizó una dilución inicial y luego se diluyó en medio PDA

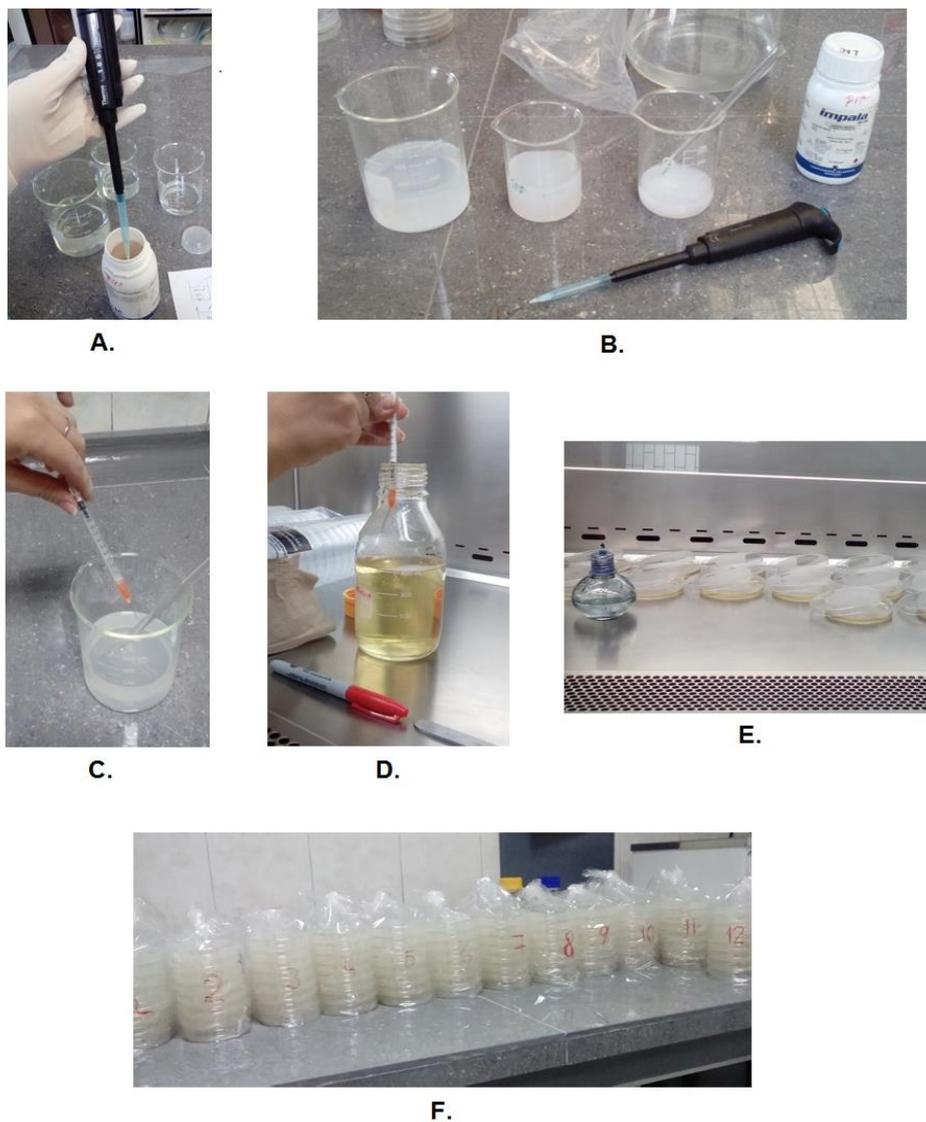
(Figura 7 – C, D y E). Se compararon dichas dosis frente a un testigo (PDA), teniendo en cuenta realizar 4 repeticiones por tratamiento por aislamiento, es decir 16 placas por aislamiento. (Figura 7 – F).

Del total colectado, los aislamientos resistentes a Imazalil (IMZ) pasaron a la siguiente evaluación y categorización:

**Tabla 1:** Categorización de *Penicillium digitatum* según su resistencia al Imazalil

<b>RESULTADO</b>	<b>Interpretación Global</b>
Sensible a 1 ppm	Sensible (S)
Resistente a 1 ppm	Ligera Resistencia (R)
Resistente a 2 ppm	Resistencia (R)
Resistente a 5 ppm	Alta Resistencia (AR)

**Fuente:** CITROSOL, II Simposio de Postcosecha organizado por ProCitrus y Citrosol



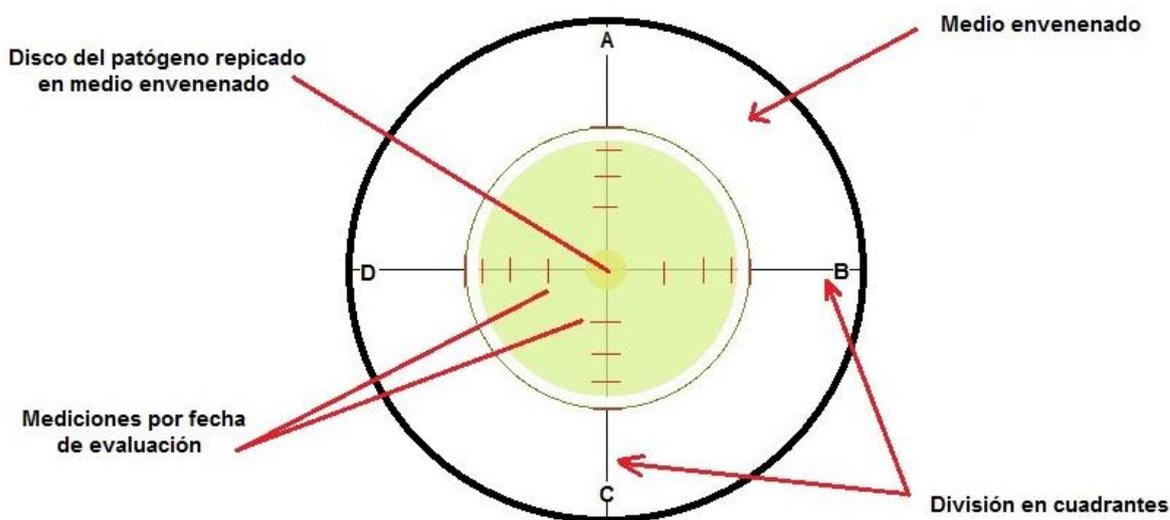
**Figura 7.** Esquema de la metodología seguida para evaluar el crecimiento micelial del diámetro de aislamientos de *Penicillium digitatum*.

Los aislamientos fueron sometidos a 25°C por 7 días y aquellos que fueron altamente resistentes (es decir que lograron crecer en el medio de 5ppm) fueron evaluados según el crecimiento del diámetro del micelio. Éste fue el primer filtro de evaluación de la resistencia.

## PARÁMETROS EVALUADOS

### 1) *Crecimiento del diámetro del hongo:*

Durante los días de crecimiento del hongo hasta el llenado total en la placa Petri, se marcó diariamente el crecimiento del micelio en la parte posterior. La evaluación culmina una vez en que la colonia testigo haya colonizado totalmente la placa. Se marcó la placa en forma de cruz tratando que al centro quede el disco del repique, y se formen 4 cuadrantes: A, B, C, y D. Cada día se marcaría el micelio con respecto a las líneas. Procedimiento basado en el trabajo “Eficacia de fungicidas químicos para el control in vitro de diferentes fitopatógenos en condiciones controladas”. (Alburquerque D., 2018)



**Figura 8.** Esquema de la evaluación del crecimiento micelial de *P. digitatum* en placa Petri

### 2) *Crecimiento del hongo en frutos inoculados:*

Aquellos aislamientos que fueron considerados altamente resistentes fueron escogidos para éste segundo filtro. Se utilizaron mandarinas W. Murcott calibre 1, cosechadas recientemente, sin lesiones aparentes y sin ningún tratamiento poscosecha. Se inocularon 5 mandarinas por aislamiento.

La evaluación consistió en evaluar el crecimiento del moho verde en frutas inoculadas (y previamente desinfectadas con Hipoclorito de Sodio al 1%), evaluando la esporulación y pudrición en centímetros.

Se usó la olla metálica como recipiente de desinfección de las mandarinas. La olla, de 12L aprox, contenía 20 frutos ordenados en su superficie. En la olla, limpia y sin impurezas se vertió 500ml de lejía y 1500ml de agua de mesa, para diluir la Lejía Clorox de 4% a 1%. Se agitó la mezcla, y se colocaron las mandarinas rápidamente en la olla. (Figura 8 - A). Para evitar que floten se usó la tapa de la olla, y estuvieron en la olla por 2 minutos. Cumplido el tiempo, se retiraron las mandarinas; se usaron guantes plásticos y se lavaron una por una con agua destilada estéril en pizeta. (Figura 8 - B). Se trasladaron en colador y se colocaron encima de 3 capas de papel toalla separadas entre sí por 30 minutos hasta que estén secas por completo para poder realizar la inoculación. (Figura 8 - C).

Se desinfectaron las cámaras húmedas con alcohol 70° y papel toalla. Se depositaron 2 capas de papel toalla (recién abierto del paquete) debajo de la rejilla metálica y se humedecieron con 50ml de agua destilada estéril. (Eduardo R., 1980).

Una vez listas las cámaras húmedas y las frutas ya secas en su totalidad, se realizó a la inoculación. (Figura 8 - D). Se limpió la zona con alcohol, se usaron los mecheros y se trajeron las 14 placas (de los 14 aislamientos seleccionados). (Figura 8 - E).

Con el sacabocado se hicieron 5 discos del micelio de cada aislamiento. (Figura 8 - F). Con el mismo sacabocado, (desinfectado en alcohol y flameado), se hizo un corte en la cáscara de a mandarina hasta atravesar el albedo. (Figura 8 - G). Con ayuda del estilete se llevó el disco del micelio al corte realizado en la mandarina. (Figura 8 - H). Se volvió a sellar con la cáscara de la mandarina, y con parafilm. (Figura 8 - I).

Se llevaron las frutas inoculadas a las cámaras húmedas y se mantuvieron ahí durante toda la evaluación. (Figura 8 – J y K). Se evaluó la esporulación y pudrición producida alrededor del disco del micelio en momentos clave. (Figura 9)



A.



B.



C.



D.



E.



F.



G.



H.



I.

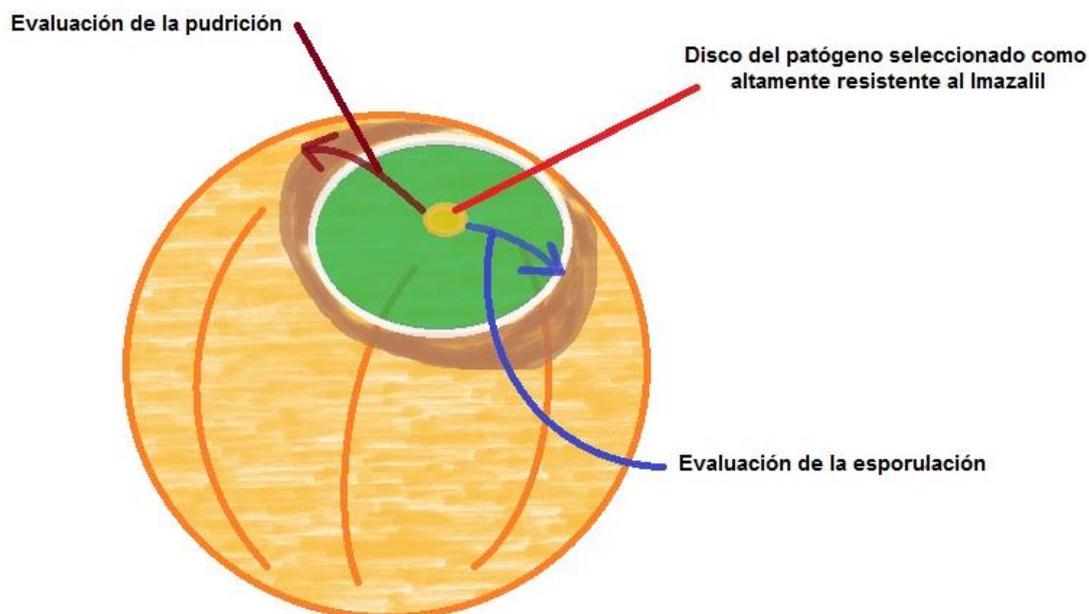


J.



K.

**Figura 9.** Esquema de la metodología seguida para evaluar el crecimiento del moho en fruto producido por aislamientos seleccionados de *Penicillium digitatum*



**Figura 10.** Esquema de los parámetros evaluados del crecimiento del moho producido por de *Penicillium digitatum* en fruto.

Aquellos aislamientos que presentaron los valores más altos de los parámetros mencionados fueron considerados los más virulentos y por tanto se llevaron al último filtro de selección de la cepa más virulenta.

### 3) *Evaluación del tubo germinativo:*

Se empleó una modificación de la metodología recomendada según Dhingra (1995), Gonzales (2011) y Cañedo (2004). Fue la siguiente:

- a. Se preparó el medio de cultivo de PDA. Posteriormente con una pipeta pasteur se depositaron dos gotas de 20uL de medio en un portaobjeto.
- b. Se realizó por separado una suspensión de conidias de los aislamientos seleccionados, hasta obtener  $10^6$  conidias/ml. Para ello se utilizó la Cámara de Neubauer, y con una pipeta Pasteur se depositaron 2 gotas sobre las mismas gotas del medio PDA. Posteriormente se taparon con objeto, y se colocaron los montajes en placas Petri.

- c. Se realizaron 5 montajes por aislamiento seleccionado y se colocaron los montajes a temperatura entre 24 y 26 °C.
- d. Se realizó el primer conteo de conidias totales, registrando las germinadas y las no germinadas, a las de 22 horas después de realizado el montaje y luego a las 48 horas del montaje.
- e. Finalmente, se obtuvo un porcentaje de conidias germinadas respecto al total de conidias observadas por aislamiento. De tal manera que con dicho porcentaje se conoció qué aislamiento posee las conidias con mayor capacidad de germinación.

### 3.3.3 APLICACIÓN DE TRATAMIENTOS *IN VITRO* AL AISLAMIENTO MÁS VIRULENTO

Identificada la cepa de *Penicillium digitatum* con mayor resistencia al Imazalil (IMZ), se procedió a repicar dicha cepa en medios envenenados (PDA + FUNGICIDA) a sus dosis comerciales (a excepción del tratamiento Testigo). En el caso del ingrediente activo Imazalil se consideraron 2 dosis (la dosis comercial y la dosis propuesta para el primer filtro). Los tratamientos fueron los siguientes:

**Tabla 2:** Tratamientos *IN VITRO* al aislamiento más virulento. ELABORACIÓN PROPIA.

TRATAMIENTOS	NOMBRE COMERCIAL	INGREDIENTE ACTIVO	DOSIS
T1	TESTIGO (PDA)	-	-
T2	IMPALA® 50 CE	Imazalil	5ppm
T3	IMPALA® 50 CE	Imazalil	500ppm
T4	TIMOREX GOLD®	Aceite esencial del árbol de té <i>Melaleuca alternifolia</i>	5 ml/L
T5	TRICHO D®	<i>Trichoderma harzianum</i>	0.75g/L
T6	SERENADE®	<i>Bacillus subtilis</i>	7.5ml/L

Se emplearon 10 placas por tratamiento, pero solo se evaluaron 4 que crecieron sin contaminante.

Se realizó la misma metodología empleada en el primer filtro. La evaluación culminó cuando el aislamiento sembrado en el tratamiento testigo llegó a completarse en toda la placa.

### 3.3.4 APLICACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS *IN VIVO* A LOS FRUTOS INOCULADOS CON EL AISLAMIENTO MÁS VIRULENTO.

En laboratorio, la fruta fue desinfectada superficialmente, mediante inmersión por 60s en una solución al 1% de hipoclorito de sodio y enjuagada una vez en abundante agua destilada. A continuación, permaneció a temperatura ambiente durante 1 hora para permitir el secado. Se preparó la mezcla de fungicidas en baldes de 8L con agua destilada estéril. Los tratamientos fueron los siguientes:

**Tabla 3:** Tratamientos *IN VIVO* de *Penicillium digitatum* aislado de mandarina (Huaral) más virulento. ELABORACIÓN PROPIA.

TRATAMIENTOS	NOMBRE COMERCIAL	INGREDIENTE ACTIVO	DOSIS
T0	CONTROL SIN HERIDA SIN INOCULACIÓN		
T0	CONTROL CON HERIDA SIN INOCULACIÓN		
T1	TESTIGO CON HERIDA CON INOCULACIÓN		
T2	TIMOREX GOLD®	Aceite esencial del árbol de té <i>Melaleuca alternifolia</i>	5 ml/L
T3	TRICHO D®	<i>Trichoderma harzianum</i>	0.75g/L
T4	SERENADE®	<i>Bacillus subtilis</i>	7.5ml/L
T5	IMPALA® 50 CE	Imazalil	500ppm

Debido a no coincidir con la época de cosecha de mandarina W.Murcott, se trabajó la prueba *in vivo* final con el cítrico Murcott. Se utilizaron frutas cosechadas sin lesiones aparentes y sin ningún tratamiento poscosecha. Se inocularon 20 frutos por tratamiento.

El procedimiento *in vivo* se realizó de forma similar a las actividades y tiempos que se utilizan en la actualidad en las plantas procesadoras. Para simular el proceso de Drenchado se utilizó una mochila a presión para la aplicación de los tratamientos por medio de aspersión encima de una cinta de parafilm de 30cm de grosor.

Se realizó la aplicación de los distintos tratamientos durante 30 segundos. Se retiraron las frutas y se dejaron secar encima de papel toalla durante otros 30 minutos.

Terminado el tiempo de secado, se inocularon los frutos con una suspensión de conidias del aislamiento más virulento de *Penicilium digitatum*. Primero se realizó una herida a la fruta con un punzón de 1 mm de diámetro, luego con ayuda de la micropipeta se realizó la inoculación de 10ul de una solución de conidias suspendida de  $1 \times 10^6$  conidias/cc. (Eckert y Brown, 1986).

Luego, los frutos inoculados fueron llevados a cámaras húmedas, a una temperatura de 21° a 25° y a una humedad relativa mayor de 80%, y durante los siguientes días se evaluó la longitud de la esporulación y pudrición por día.

### **3.3.5 DISEÑO ESTADÍSTICO**

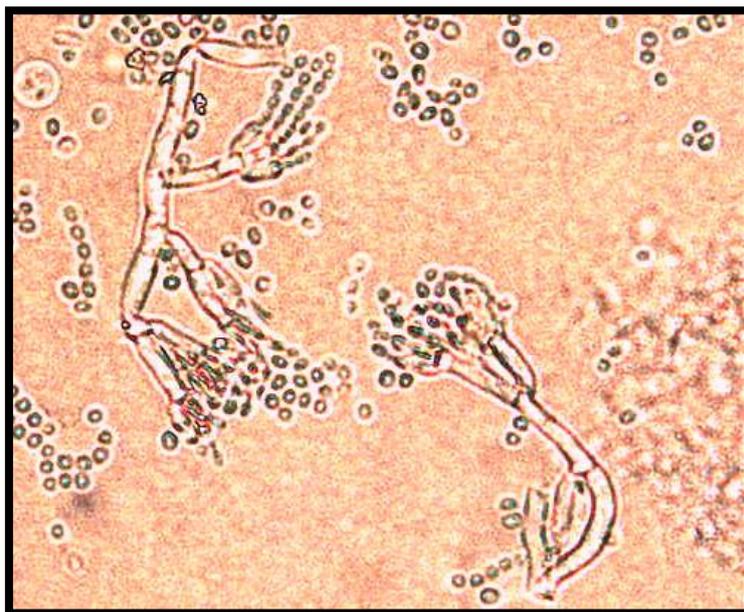
El diseño experimental fue completamente al azar (DCA). Los datos se analizaron con el programa “Statistix 10” y las pruebas de comparación de medidas de Tukey (P=0.05). Se calculó las medias, el coeficiente de varianza, y mediante el ANVA, se determinó si existieron diferencias estadísticas entre los tratamientos, a fin de encontrar los tratamientos más efectivos en el control de las cepas resistentes de *Penicillium digitatum*.

Cabe decir que se determinó primero el coeficiente de variabilidad de éste parámetro ya que éste determina la variación del experimento en función del error experimental y la magnitud de la variable en estudio. De acuerdo a Calzada-Benza, el valor CV en experimentos agronómicos no debe ser mayor del 30; ya que de ser mayor, restará confiabilidad a los resultados estadísticos. En experimentos conducidos en invernadero, laboratorios o centros bajo control ambiental, el CV permitido debe ser menor del 15 % (Calzada, 1970).

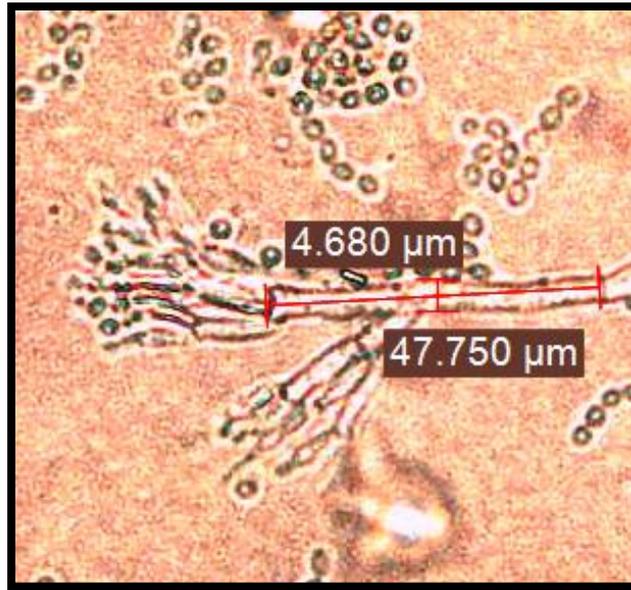
## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 IDENTIFICACIÓN DE *Penicillium digitatum*

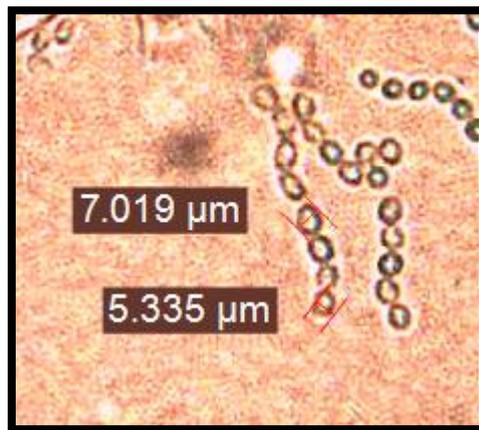
De 15 montajes del patógeno, se observaron en microscopio a 40X conidias globosas y elípticas, con conidióforos cortos apretados a divergentes y métulas en forma ramificada. (Figura 10). Con el programa “LEICA APPLICATION SUITE”, se determinó una longitud promedio del diámetro de conidias de 4 micras, cuyos conidióforos presentaron 45 micras de longitud por 4 micras de diámetro en promedio. (Figura 11). Esto coincide con la descripción morfológica reportada en la “Clave Determinativa De Las Especies” del Dr. José Lostau, en la cual detalla a la especie *Penicillium digitatum* con conidias de rango de 4-6 micras por 6-8 micras y con conidióforos de 30 - 100 micras de longitud por 4-5 de diámetro. (Lostau, 1950).



**Figura 11.** Vista microscópica de *Penicillium digitatum* a 40X y estructuras: conidias en cadena, conidióforos y métulas.



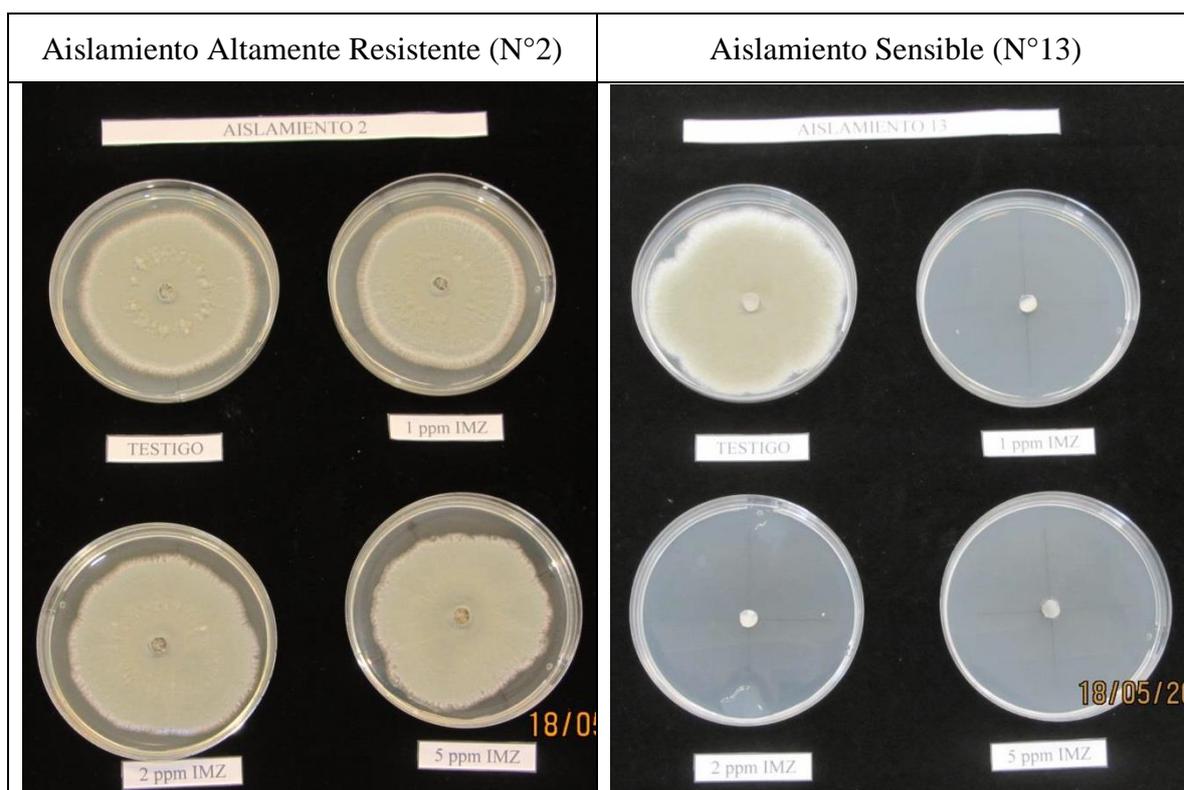
**Figura 12.** Medidas de conidióforos de *Penicillium digitatum* determinadas con el programa LEICA APPLICATION SUITE.



**Figura 13.** Medidas de conidias de *Penicillium digitatum* determinadas con el programa LEICA APPLICATION SUITE.

#### 4.2 OBTENCIÓN DEL AISLAMIENTO MÁS VIRULENTO DE *Penicillium digitatum* (CON MAYOR RESISTENCIA AL IMAZALIL)

En la primera prueba, todos los aislamientos a excepción del aislamiento 13, lograron crecer en medio envenenado de 1,2 y 5 ppm, demostrando que son “Altamente resistentes” al Imazalil. El aislamiento 13, que fue inhibido en su totalidad desde 1ppm, y solo creció en el medio PDA (Testigo), se consideró aislamiento “Sensible”; de acuerdo a la categorización de resistencias de CITROSOL en el II Simposio de Postcosecha (Murciano, 2017). En la Figura 14 se aprecia el comportamiento en placa Petri del aislamiento 2 el cual fue “Altamente resistente” (al igual que los demás aislamientos) versus el del Aislamiento 13 que fue el único “Sensible”.



**Figura 14.** Crecimiento del micelio de un aislamiento (Huaral) de *Penicillium digitatum* Altamente Resistente a 0, 1, 2 y 5 ppm de Imazalil (PDA+IMZ) versus el comportamiento de un aislamiento de *P. digitatum* Sensible al Imazalil con nulo crecimiento micelial a 1,2 y 5 ppm de Imazalil (PDA+IMZ).

Se evaluó entonces, el crecimiento del diámetro de la colonia de los 14 aislamientos altamente resistentes, para continuar con la obtención de la cepa más virulenta.

#### 4.2.1 CRECIMIENTO DEL DIÁMETRO DEL HONGO EN 15 AISLAMIENTOS DE *Penicillium digitatum*

Entre los aislamientos el porcentaje del coeficiente de variabilidad (CV%) fue menor a 15% en todos los días evaluados, lo cual es aceptable para experimentos conducidos en invernadero, laboratorios o centros bajo control ambiental, (Calzada, 1970). (Tabla 4).

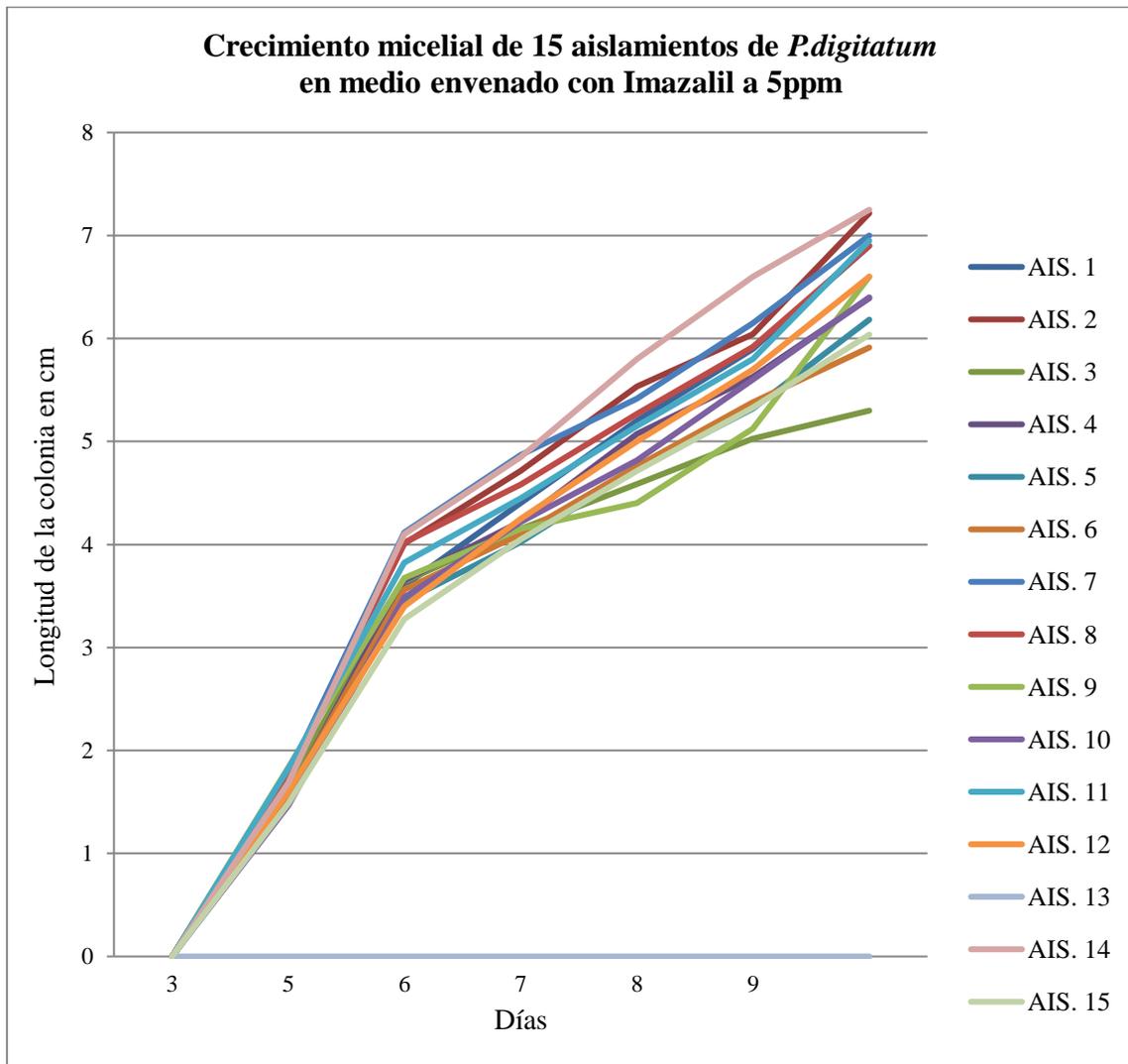
En el Anva del parámetro del diámetro de la colonia (ANEXO 1), el valor p para los días evaluados fue 0, por tanto es altamente significativo (Calzada, 1970) y se procedió a realizar el análisis comparativo. Realizada la prueba estadística Tukey al 0.05% (ANEXO 2), se afirma que si existieron diferencias significativas en el crecimiento del diámetro in vitro (Tabla 4).

**Tabla 4:** Crecimiento del diámetro de la colonia de 15 aislamientos de *P. digitatum* en medio envenenado con Imazalil a la dosis de 5ppm.

IMPAL A dosis 5ppm	Diámetro de colonia (cm) / No. Día					
	Días					
	3	5	6	7	8	9
AIS. 1	1.6* e**	3.6 ab	4.4 ab	5.2 abcd	5.9 ab	6.9 ab
AIS. 2	1.8 abc	4.0 ab	4.7 ab	5.5 ab	6.0 ab	7.2 a
AIS. 3	1.7 abcde	3.6 ab	4.2 ab	4.6 cd	5.0 b	5.3 c
AIS. 4	1.6 cde	3.7 ab	4.2 ab	5.1 abcd	5.6 ab	6.4 abc
AIS. 5	1.5 cde	3.5 ab	4.0 b	4.7 bcd	5.3 b	6.2 abc
AIS. 6	1.6 bcde	3.6 ab	4.1 ab	4.8 bcd	5.4 b	5.9 bc
AIS. 7	1.8 ab	4.1 a	4.9 a	5.4 abc	6.2 ab	7.0 ab
AIS. 8	1.7 abcd	4.0 ab	4.6 ab	5.3 abc	5.9 ab	6.9 ab
AIS. 9	1.8 a	3.7 ab	4.2 ab	4.4 d	5.1 b	6.6 ab
AIS. 10	1.5 e	3.5 ab	4.2 ab	4.8 bcd	5.6 ab	6.4 abc
AIS. 11	1.8 a	3.8 ab	4.5 ab	5.2 abcd	5.8 ab	7.0 ab
AIS. 12	1.6 bcde	3.4 ab	4.3 ab	5.0 abcd	5.7 ab	6.6 ab
AIS. 13	0.0 f	0.0 c	0.0 c	0.0 e	0.0 c	0.0 d
AIS. 14	1.7 abcde	4.1 a	4.9 a	5.8 a	6.6 a	7.3 a
AIS. 15	1.5 de	3.3 b	4.1 b	4.7 bcd	5.3 b	6.0 bc
<b>MEDIA</b>	1.54	3.45	4.06	4.70	5.31	6.11
<b>CV (%)</b>	5.27	8.66	7.56	7.31	8.41	7.33

\* = promedio de diámetro de colonia de 4 placas en cm. \*\* = diferencia significativa de la prueba Tukey con un valor de 0.05 de significancia.

De acuerdo anterior, los aislamientos con valores más altos de crecimiento de colonia por día fueron los aislamientos 14, 2, 7, 11 y 8, que de acuerdo a la prueba Tukey, demostraron diferencia significativa en algunos días. La diferencia de longitud del diámetro de la colonia entre aislamientos se observa en la Figura 15.



**Figura 15.** Comportamiento de 15 aislamientos de *P. digitatum*, procedentes de Huaral, en Imazalil al 5ppm.

Se puede apreciar en la Figura 15, durante los primeros días de evaluación, el crecimiento promedio del diámetro en placa de los aislamientos altamente resistentes fue rápido y muy similar entre sí, y a partir del 6to día, los aislamientos crecieron en diferente longitud por día.

#### 4.2.2 CRECIMIENTO DEL MOHO EN FRUTOS INOCULADOS CON 14 AISLAMIENTOS DE *Penicillium digitatum*

Para el segundo filtro, se realizó evaluación estadística de la esporulación y pudrición.

En cuanto a la esporulación, el coeficiente de variabilidad fue menor al 15%, lo cual demuestra que está dentro del porcentaje permitido para las evaluaciones conducidas en laboratorio. (Calzada, 1970). En el ANVA de la esporulación de *P. digitatum* en frutos (ANEXO 3), el valor p para el día 7 de evaluación fue menor de 0.05 lo cual agrega confiabilidad a los resultados estadísticos y se corrobora la alta significancia (Diaz Ballve L., 2018).

Debido a esto, en el ANEXO 4 solo se observaron diferencias significativas con la prueba Tukey en la esporulación a los 7 días destacando el aislamiento 7 y 14 (Figura 16), pero no hubo diferencias significativas en las fechas siguientes (Tabla 5).

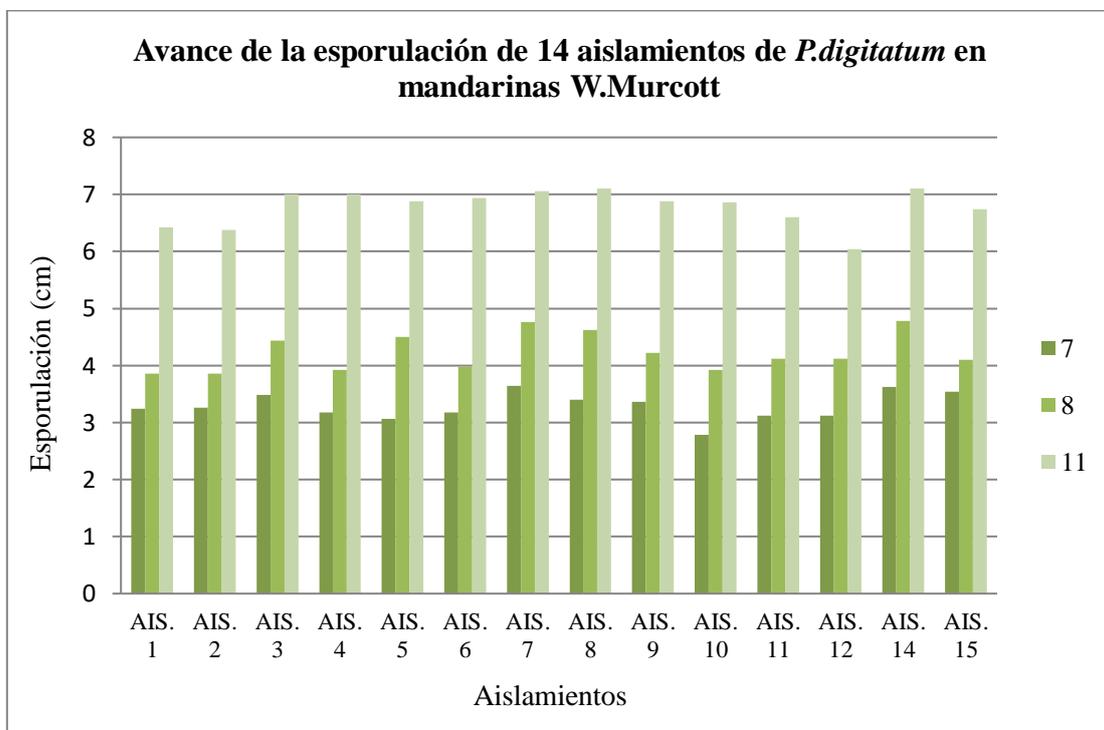
**Tabla 5:** Crecimiento de la esporulación en frutos inoculados con los 14 aislamientos de *P. digitatum*.

<b>Radio de micelio - esporulación (cm) /Día</b>			
<b>AISLAMIENTOS</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>11</b>
<b>AIS. 1</b>	3.2* ab**	3.9 a	6.4 a
<b>AIS. 2</b>	3.3 ab	3.9 a	6.4 a
<b>AIS. 3</b>	3.5 ab	4.4 a	7.0 a
<b>AIS. 4</b>	3.2 ab	3.9 a	7.0 a
<b>AIS. 5</b>	3.6 ab	4.8 a	7.1 a
<b>AIS. 6</b>	3.2 ab	4.0 a	6.9 a
<b>AIS. 7</b>	3.6 a	4.8 a	7.1 a
<b>AIS. 8</b>	3.4 ab	4.6 a	7.1 a
<b>AIS. 9</b>	3.4 ab	4.2 a	6.9 a
<b>AIS. 10</b>	2.8 b	3.9 a	6.9 a
<b>AIS. 11</b>	3.1 ab	4.1 a	6.6 a
<b>AIS. 12</b>	3.1 ab	4.1 a	6.0 a
<b>AIS. 14</b>	3.1 a	4.5 a	6.9 a
<b>AIS. 15</b>	3.5 ab	4.1 a	6.7 a
<b>MEDIA</b>	3.28	4.23	6.79
<b>CV (%)</b>	11.30	10.82	9.04

\* = promedio de crecimiento de la esporulación de 5 frutos. \*\* = diferencia significativa de la prueba Tukey con un valor de 0.05 de significancia.

Lado menciona en “Evaluación de alternativas para el control poscosecha de aislamientos de *Penicillium digitatum* resistentes a imazalil” muestra resultados similares en la esporulación de frutos no tratados e inoculados con cepas resistentes al Imazalil (Lado, 2010).

De acuerdo a la Tabla 5, solo en el día 7 se hallaron diferencias significativas en los aislamientos 7 y 14, presentando mayor valor de esporulación, y el 10 como el menor valor de esporulación. Los días siguientes no se encontraron diferencias significativas entre los aislamientos según el crecimiento de la esporulación.



**Figura 16.** Comportamiento de la esporulación en frutos de 14 aislamientos de *Penicillium digitatum*, procedente de Huaral, en mandarinas W.Murcott por día de evaluación.

Se puede apreciar en la Figura 16 que todos los aislamientos tienen el mismo comportamiento pero con diferentes valores de esporulación por día. Para los 3 días de evaluación, los que presentaron altos valores de esporulación fueron 7 y 14.

Para el parámetro de pudrición, el coeficiente de variabilidad nuevamente fue menor al 15%, coincidiendo con lo indicado por Calzada en “Métodos Estadísticos para la investigación I.” En el ANVA del parámetro de comportamiento temporal de la pudrición en frutos inoculados (ANEXO 5), se puede apreciar que el p-valor fue cercano al 0 en el tercer día de evaluación, a diferencia de los primeros días de evaluación, de tal forma que en la prueba Tukey del mismo parámetro (ANEXO 6), no se aprecian diferencias significativas en las 2 primeras fechas de medición pero sí a partir de los 11 días. (Tabla 6).

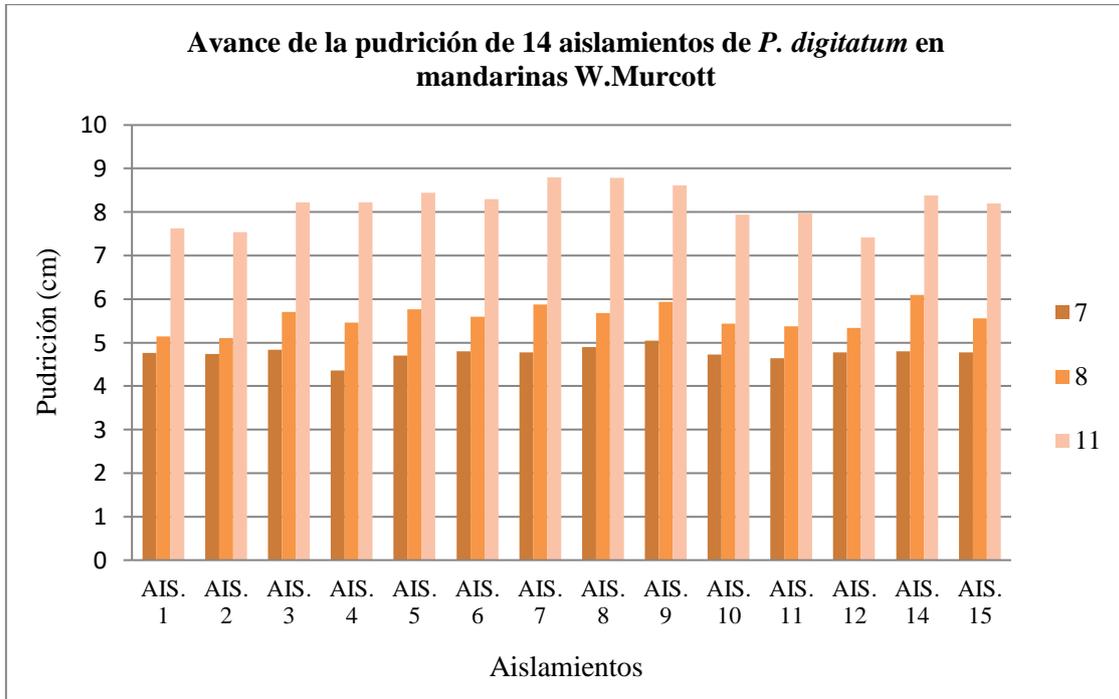
**Tabla 6:** Crecimiento de la pudrición en frutos inoculados con los 14 aislamientos de *Penicillium digitatum* procedentes de Huaral.

<b>Radio de micelio - pudrición (cm) /Día</b>			
<b>AISLAMIENTOS</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>11</b>
<b>AIS. 1</b>	4.8* a**	5.1 a	7.6 abc
<b>AIS. 2</b>	4.7 a	5.1 a	7.5 abc
<b>AIS. 3</b>	4.8 a	5.7 a	8.2 abc
<b>AIS. 4</b>	4.4 a	5.5 a	8.2 abc
<b>AIS. 5</b>	4.7 a	5.8 a	8.4 abc
<b>AIS. 6</b>	4.8 a	5.6 a	8.3 abc
<b>AIS. 7</b>	4.8 a	5.9 a	8.8 a
<b>AIS. 8</b>	4.9 a	5.7 a	8.8 ab
<b>AIS. 9</b>	5.0 a	5.9 a	8.6 abc
<b>AIS. 10</b>	4.7 a	5.4 a	7.9 abc
<b>AIS. 11</b>	4.6 a	5.4 a	8 abc
<b>AIS. 12</b>	4.8 a	5.3 a	7.4 c abc
<b>AIS. 14</b>	4.8 a	6.1 a	8.4 abc
<b>AIS. 15</b>	4.8 a	5.6 a	8.2 abc
<b>CV (%)</b>	7.46	8.54	6.95

\* = promedio de crecimiento de la pudrición de 5 frutos. \*\* = diferencia significativa de la prueba Tukey con un valor de 0.05 de significancia.

Los valores de pudrición a los 11 días de la inoculación sí poseen diferencia estadística entre los aislamientos, siendo los aislamientos 7 y 8 los que presentaron altos valores de

severidad, tal como se aprecia en la Figura 17. En los días previos no se encontraron diferencias significativas entre los aislamientos según el crecimiento de la pudrición por día.



**Figura 17.** Comportamiento de la pudrición en fruto de 14 aislamientos de *P. digitatum* en mandarinas W.Murcott por día de evaluación.



**Figura 18.** Crecimiento del moho en una mandarina W.Murcott inoculado con un aislamiento de *Penicillium digitatum* Altamente Resistente, procedente de Huaral, versus una mandarina W.Murcott sin inocular

Para el siguiente y último filtro, se utilizaron los aislamientos 7,8 y 14 porque presentaron los valores más altos en esporulación al inicio (7 y 14) y de pudrición final (7 y 8).

#### 4.2.3 EVALUACIÓN DEL TUBO GERMINATIVO EN 3 AISLAMIENTOS DE *Penicillium digitatum*

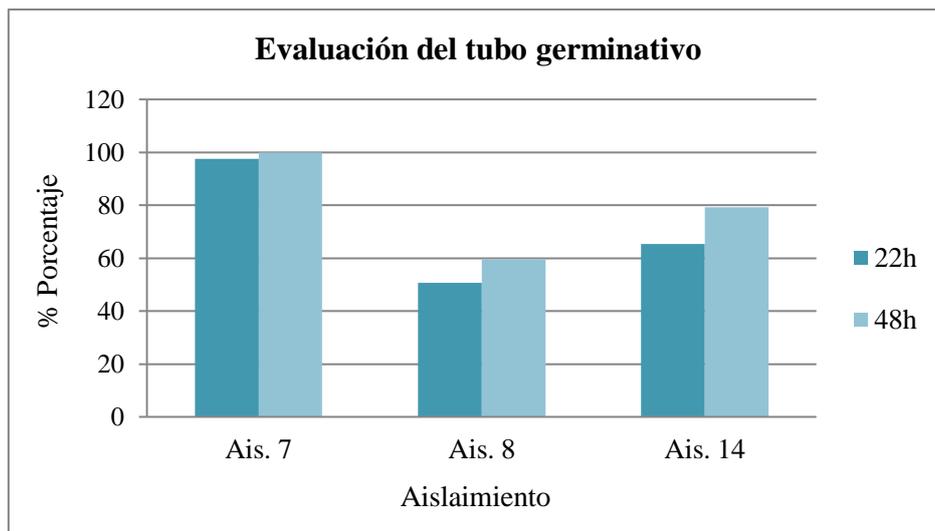
A las 22 horas, se hallaron diferencias significativas en el porcentaje de germinación entre el aislamiento 7 y 14, siendo el que presentaba mayor valor el 7 con un 97.51% frente a los otros dos aislamientos de 65.4% y 50.6%. (Tabla7)

Caso similar registró Smilanick (2005), el cual evaluó la germinación de esporas de aislamientos sensibles y resistentes de *P. digitatum* al IMZ en PDB sometiendo a diferentes niveles de pH, y a las 24h encontró que el porcentaje de esporas germinadas fue mayor del 98%.

**Tabla 7:** Germinación de conidias en porcentaje, en 2 momentos de observación; a 22 y 48 horas desde el montaje de 3 aislamientos de *P. digitatum* procedentes de Huaral

<b>Porcentaje de germinación de conidias (%)</b>		
<b>AISLAMIENTO</b>	<b>22 hrs</b>	<b>48hrs</b>
<b>AIS. 7</b>	97.51* a*	100.00 a
<b>AIS. 8</b>	50.61 b	59.59 a
<b>AIS. 14</b>	65.43 ab	79.30 a

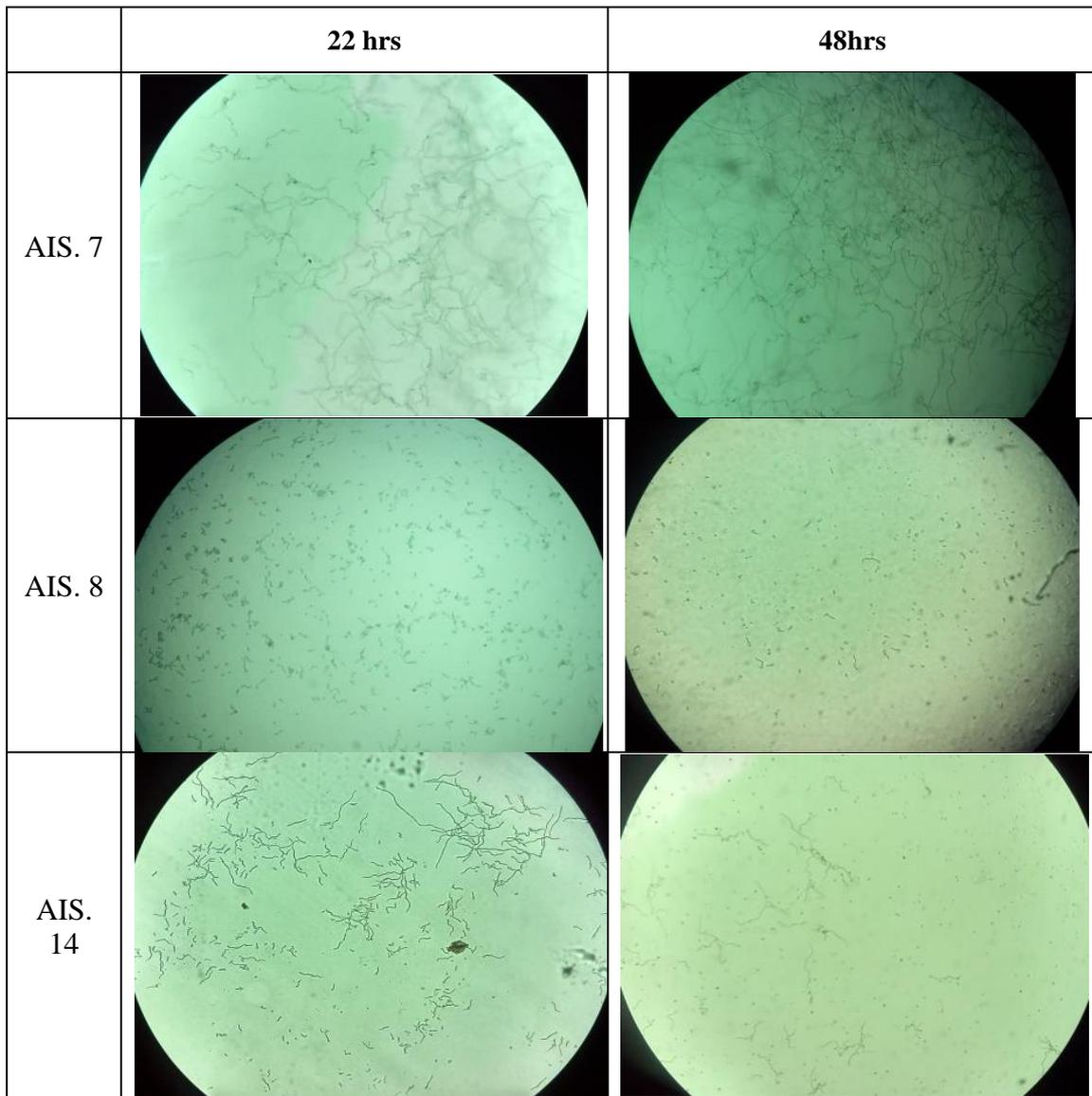
\* = promedio de 5 montajes por aislamiento. \*\* = diferencia significativa de la prueba Tukey con un valor de 0.05 de significancia.



**Figura 19.** Germinación de conidias a 22 y 48 horas de 3 cepas altamente resistentes de *P. digitatum* al Imazalil.

A las 48 horas, los aislamientos no presentaron diferencias significativas en el porcentaje de germinación de conidias. Sin embargo, el aislamiento 7, llegó a un 100% de germinación promedio final en los 5 montajes realizados a diferencia de los otros 2 aislamientos (Figura 19).

En la Figura 20 se puede apreciar el campo visual de 1 de los 15 montajes por aislamiento a las 22 horas y 48 horas de siembra y montaje. Se observa el cambio de conidias globosas a conidias con tubo germinativo en una suspensión de  $10^6$  conidias/ml, recomendación de Dhingra (1995).



**Figura 20.** Montajes a las 22 y 48 horas de 3 aislamientos de *Penicillium digitatum* Altamente Resistentes, procedentes de Huaral, a 10X.

Por tanto, el aislamiento número 7 fue considerado el más virulento y el elegido para realizar las pruebas finales de control.

### 4.3 APLICACIÓN DE TRATAMIENTOS *IN VITRO* AL AISLAMIENTO MÁS VIRULENTO DE *Penicillium digitatum*

En el ANVA del parámetro de crecimiento del diámetro de colonia (ANEXO 11), el valor p para todos los días de evaluación fue de 0 lo cual indica que existe alta significancia en a los resultados estadísticos (Diaz Ballve L., 2018). En el ANEXO 12, los resultados de la prueba Tukey indican que al 0.05 de nivel de significancia se puede afirmar que existe diferencia estadísticas entre los tratamientos por fecha de evaluación, indicados en la Tabla 8.

**Tabla 8:** Crecimiento del diámetro de la colonia del aislamiento más virulento de *Penicillium digitatum*, procedente de Huaral, en 6 tratamientos de control *in vitro*

TRAT	Diámetro de colonia (cm) / No. Día								
	Días								
	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<b>T. 1</b>	2.7*a**	3.3 ab	4.2 a	4.9 a	5.6 a	6.1 a	6.8 a	7.4 a	7.8 a
<b>T. 2</b>	2.4 a	2.9 b	3.5 b	3.9 b	4.3 b	4.5 b	4.6 b	4.8 b	5.0 b
<b>T. 3</b>	0.0 d	0.0 e	0.0 e	0.0 d					
<b>T. 4</b>	1.4 b	1.7 c	2.0 c	2.3 c	2.5 c	2.6 c	2.8 c	2.9 c	3.1 c
<b>T. 5</b>	2.8 a	3.5 a	4.5 a	5.2 a	5.9 a	6.4 a	7.0 a	7.6 a	8.0 a
<b>T. 6</b>	0.7 c	0.7 d	0.8 d	0.8 d	0.9 d	0.9 d	1.0 d	1.0 d	1.0 d

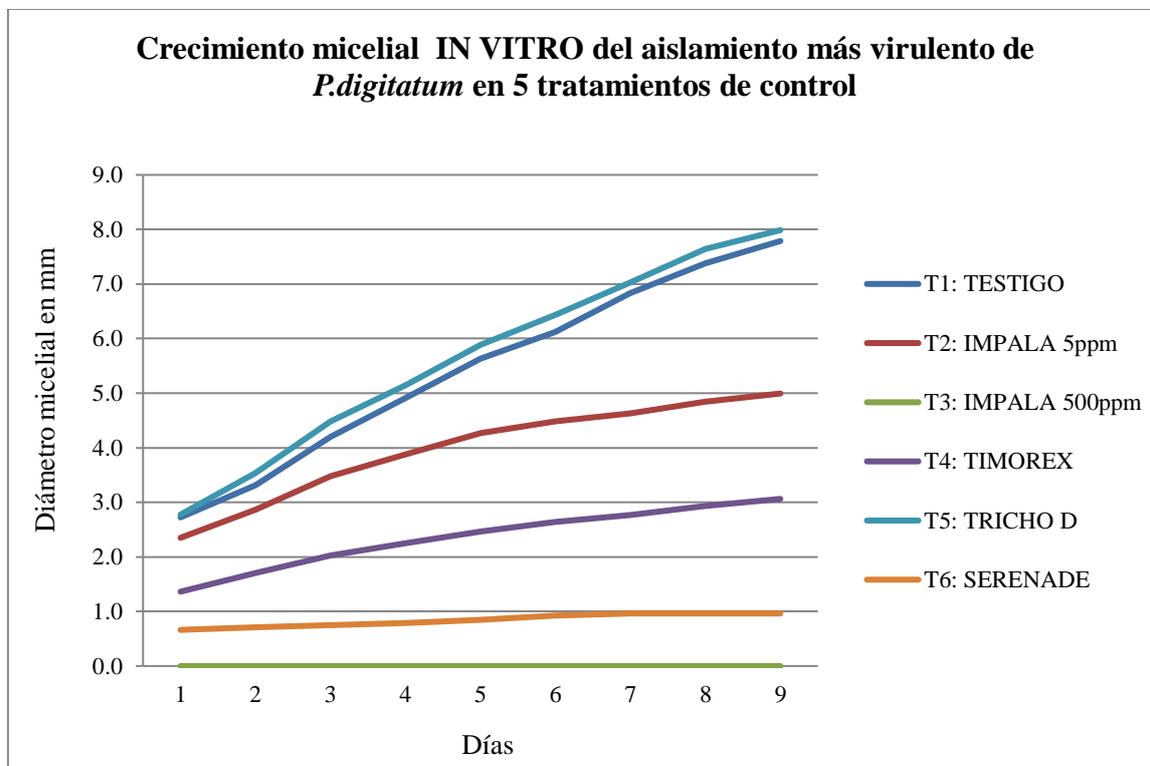
\* = promedio de 4 placas por tratamiento. \*\* = diferencia significativa de la prueba Tukey con un valor de 0.05 de significancia.

De acuerdo a la Tabla 8, el mejor tratamiento *in vitro* fue el Tratamiento 3 (Imazalil a 500ppm), ya que inhibió por completo el crecimiento de la colonia. El segundo tratamiento con mayor control fue el Tratamiento 6 (Serenade -*Bacillus subtilis*), siendo incluso igual de significativo que el Tratamiento 3 desde el día 7 en adelante.

El tratamiento que retrasó el crecimiento de la colonia seguido del T.3 y T.6 fue el Tratamiento 4 (Timorex Gold – Té de *Melalueuca alternifolia*).

Por último, los Tratamientos 1 (PDA), 2 (Imazalil a 5ppm) y 5 (Tricho D – *Trichoderma harzianum*) fueron los más bajos en cuanto a la efectividad del control del patógeno *in vitro*. Incluso, el T.5 (Tricho D – *Trichoderma harzianum*) favoreció el crecimiento del

micelio ya que presentó valores de crecimiento mayores que del tratamiento control T.1 (PDA).



**Figura 21.** Comportamiento del aislamiento de *Penicillium digitatum*, procedente de Huaral, con mayor resistencia al Imazalil sometido a 5 tratamientos de control en placas Petri conteniendo PDA

Como indica la Figura 21, el crecimiento del diámetro micelial del aislamiento más virulento de *P. digitatum* en medio *in vitro* fue mayor en los tratamientos T.5 y T.1.

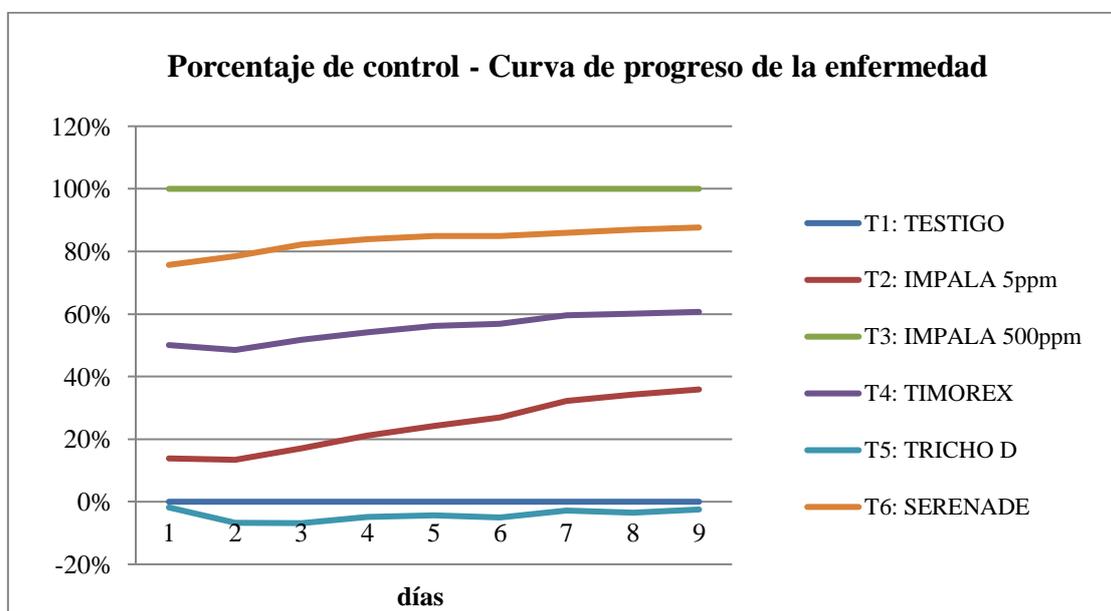
Comparando los tratamientos según su porcentaje de control, es decir, teniendo al Tratamiento 1 (Testigo) con un 0% de control; podemos afirmar que el tratamiento que inhibió por completo su crecimiento fue el T.3 y que los tratamientos que lograron retrasar su crecimiento, fueron el T.6 y T.4, tal como se observa en la Tabla 9.

Esto quiere decir que el T.5 no fue eficiente para su control, sino al contrario, favoreció su crecimiento, ya que presenta un valor negativo (-3%) que el Tratamiento 1 (testigo).

**Tabla 9:** Porcentaje de control de *Penicillium digitatum* (cepa resistente a Imazalil, procedente de Huaral) los 5 tratamientos tomando como referencia al Testigo (T.1)

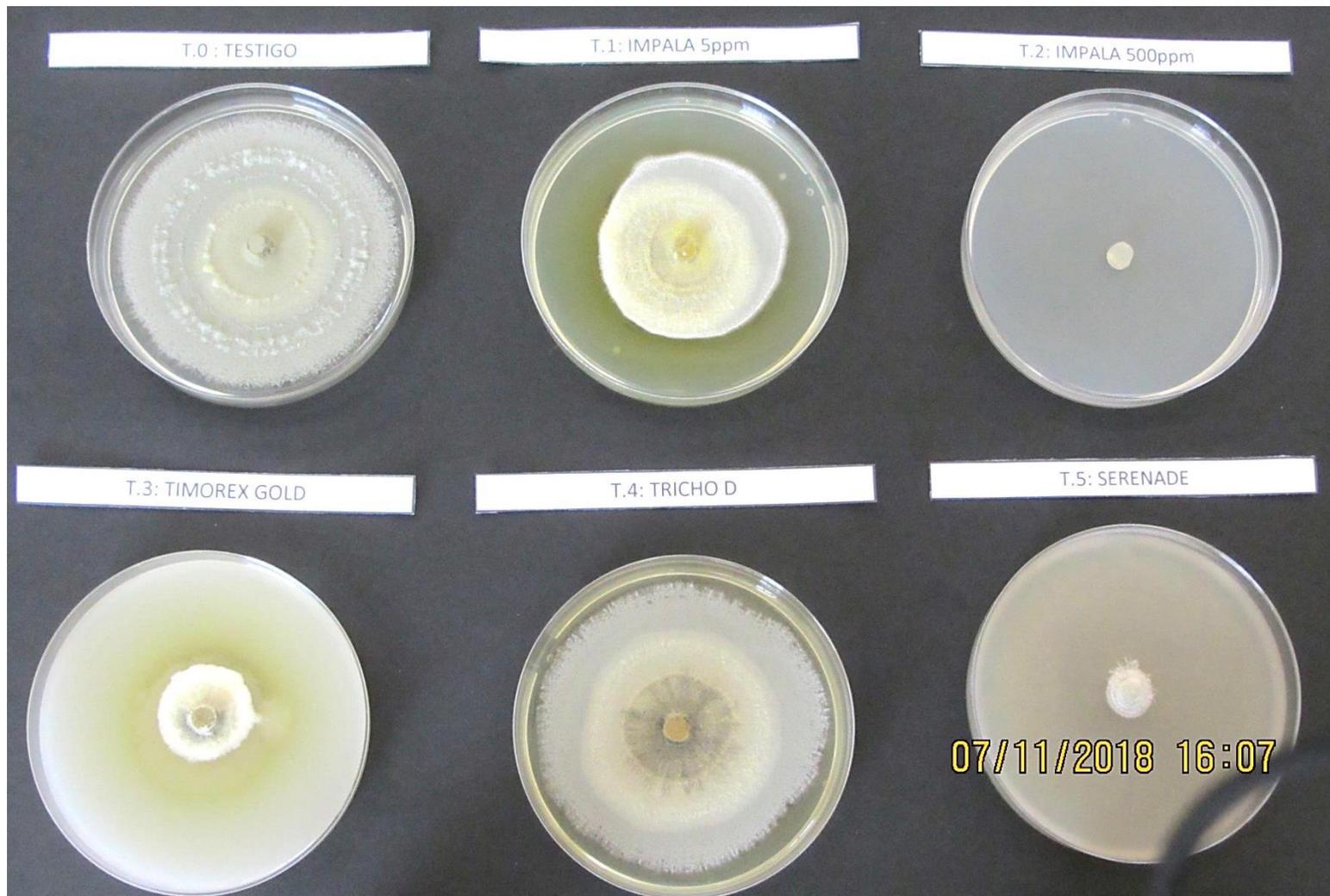
TRAT	Porcentaje de Control								
	Días								
	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<b>T. 1</b>	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
<b>T. 2</b>	14%	13%	17%	21%	24%	27%	32%	34%	36%
<b>T. 3</b>	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
<b>T. 4</b>	50%	48%	52%	54%	56%	57%	60%	60%	61%
<b>T. 5</b>	-2%	-7%	-7%	-5%	-4%	-5%	-3%	-4%	-3%
<b>T. 6</b>	76%	78%	82%	84%	85%	85%	86%	87%	88%

En la Figura 22 se aprecia la curva del progreso de la enfermedad, y de acuerdo a los datos de la Tabla 9. Se corrobora que el mejor tratamiento para el control *in vitro* de la cepa más virulenta de *P. digitatum* fue el T3: Imazalil a 500 ppm, seguido de T6: Serenade (*Bacillus subtilis*), que tuvo un 88% de control y T5: Timorex Gold (té de *Melaleuca alternifolia*), que tuvo un 61% de control al finalizar la evaluación, a 11 días de siembra en medio envenenado.



**Figura 22.** Comportamiento del aislamiento de *Penicillium digitatum* con mayor resistencia al Imazalil, procedente de Huaral, sometido a 5 tratamientos de control en placas Petri, conteniendo PDA.

En la Figura 23 se aprecian los resultados de 1 placa representativa de la prueba *in vitro*.



**Figura 23.** Crecimiento micelial IN VITRO del aislamiento más virulento de *Penicillium digitatum*, procedente de Huaral en 5 tratamientos de control a los 11 días de siembra.

#### 4.4 APLICACIÓN DE TRATAMIENTOS *IN VIVO* AL AISLAMIENTO MÁS VIRULENTO DE *Penicillium digitatum*

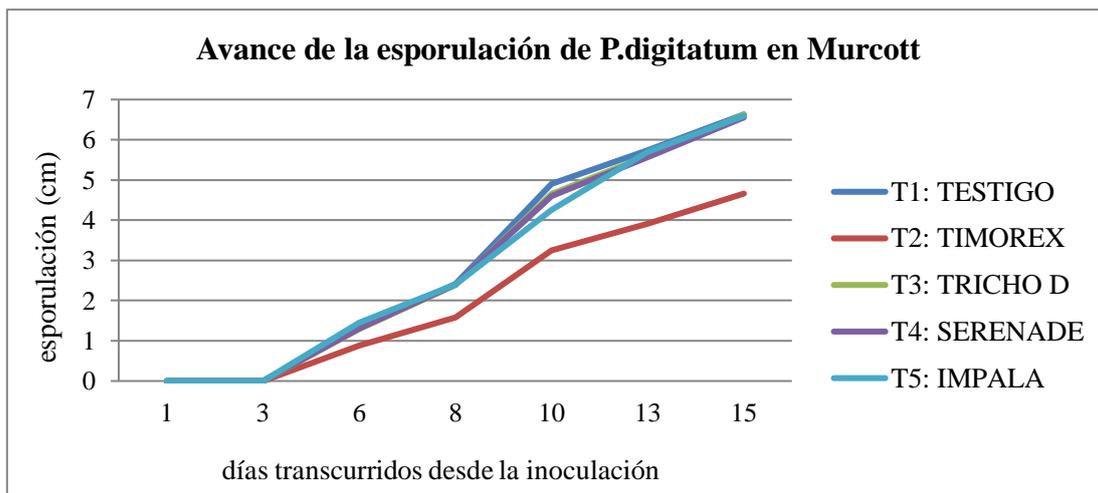
Ninguno de los tratamientos aplicados en fruto fueron totalmente eficaces para el control total del moho verde producido por la cepa más virulenta de *P. digitatum* al imazalil. Resultados similares presenta Visintin et al. en la investigación “Manejo de mohos poscosecha de cítricos mediante antagonistas microbianos” en el que concluye que “...la aplicación de antagonistas por aspersion en línea experimental no aseguró una población efectiva y estable de la biocontroladora”. (Visintin et al., 2010)

Con respecto a la **esporulación** evaluada en la última prueba del ensayo, gracias a la prueba Tukey se determinó que hasta los 6 días no existía diferencia significativa entre los tratamientos, hasta que a partir del día 8, el tratamiento que presentó menores valores de radio de esporulación fue el T.2: Timorex Gold (Té de *Melalucua alternifolia*) (Tabla 9). Esto se aprecia claramente en la Figura 24, el T2 retrasa el crecimiento del micelio a diferencia de los demás tratamientos de control.

**Tabla 10:** Crecimiento radial de la esporulación en frutos inoculados con el aislamiento más virulento de *Penicillium digitatum*, procedente de Huaral, en 5 tratamientos de control *in vivo*

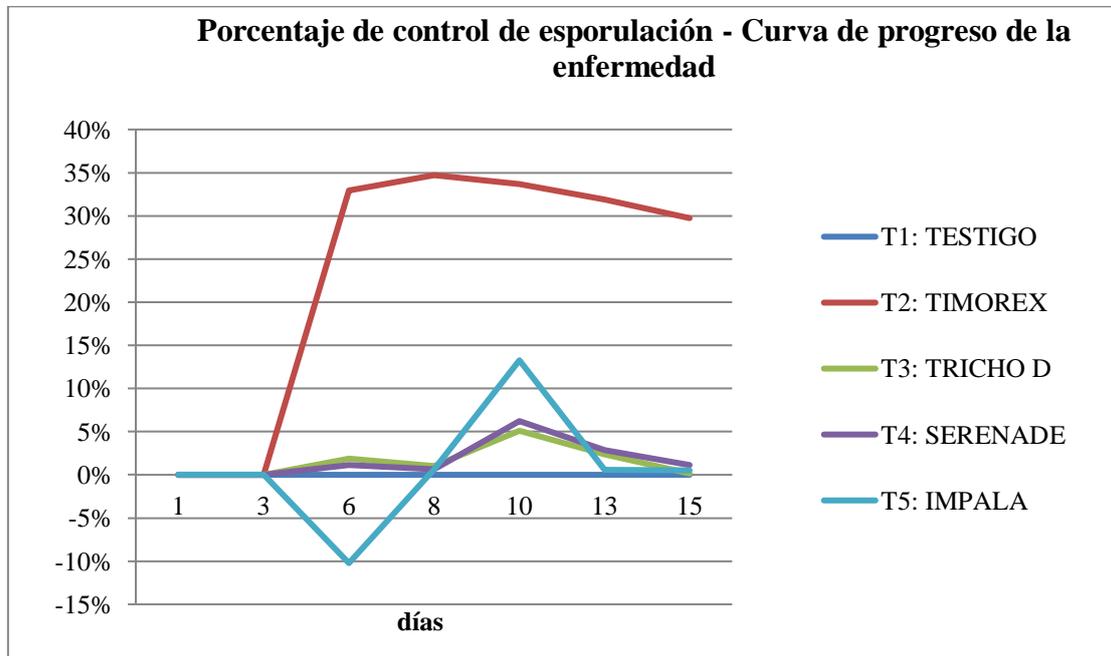
TRAT	Radio de esporulación (cm) / No. Día						
	Días						
	1	3	6	8	10	13	15
<b>T. 1</b>	0	0	1.32* a**	2.42 a	4.90 a	5.74 a	6.63 a
<b>T. 2</b>	0	0	0.89 a	1.58 b	3.25 c	3.91 b	4.66 b
<b>T. 3</b>	0	0	1.29 a	2.39 a	4.65 ab	5.60 a	6.62 a
<b>T. 4</b>	0	0	1.31 a	2.41 a	4.59 ab	5.57 a	6.56 a
<b>T. 5</b>	0	0	1.46 a	2.41 a	4.25 b	5.70 a	6.59 a

\* = promedio de 20 frutos por tratamiento. \*\* = diferencia significativa de la prueba Tukey con un valor de 0.05 de significancia.



**Figura 24.** Comportamiento de la esporulación del aislamiento de *Penicillium digitatum* con mayor resistencia al Imazali, procedente de Huaral, sometido a tratamientos de control in vivo

En la Figura 25 se observa el efecto del control de los tratamientos, observándose que el T2: Timorex Gold (Té de *Melalueuca alternifolia*) llegó a un 35% como mayor porcentaje de control y luego descendiendo a un 30% de control, a diferencia de los demás tratamientos.



**Figura 25.** Comportamiento de la esporulación del aislamiento de *Penicillium digitatum* con mayor resistencia al Imazalil, aislado de Huaral, sometido a tratamientos de control in vivo

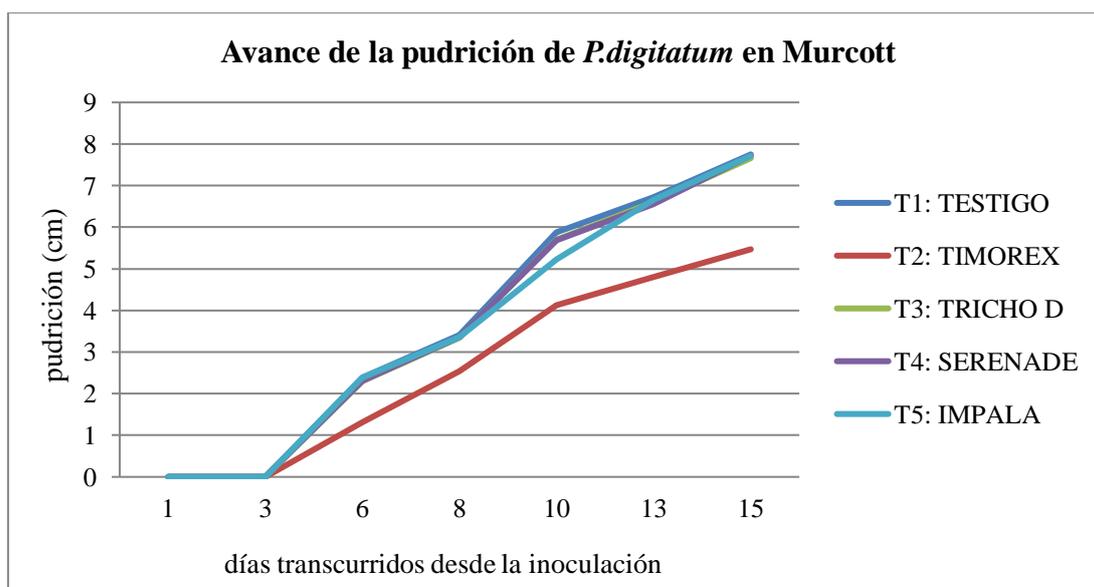
Con respecto a la **podrición**, la prueba Tukey (con un valor de significancia del 0.05), determinó que el tratamiento que retrasó el crecimiento radial, fue el T.2: Timorex Gold-Té de *Melalueuca alternifolia*.

De acuerdo a la Tabla 12, éste fue el único que se diferenció de los demás tratamientos, tal como se refleja en la Figura 26.

**Tabla 11:** Crecimiento radial de la esporulación en frutos inoculados con el aislamiento más virulento de *P. digitatum*, procedente de Huaral, en 5 tratamientos *in vivo*

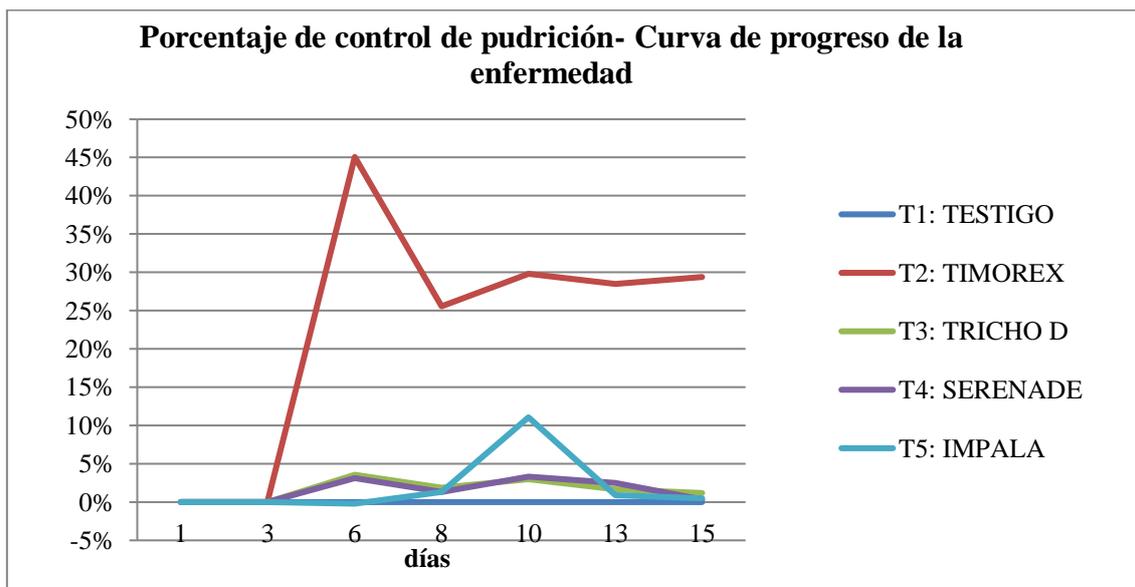
TRAT	Radio de pudrición (cm) / No. Día						
	Días						
	1	3	6	8	10	13	15
T. 1	0	0	2.39* a**	3.41 a	5.88 a	6.72 a	7.75 a
T. 2	0	0	1.31 b	2.54 b	4.13 b	4.81 b	5.47 b
T. 3	0	0	2.30 a	3.34 a	5.70 a	6.61 a	7.66 a
T. 4	0	0	2.31 a	3.36 a	5.69 a	6.55 a	7.75 a
T. 5	0	0	2.40 a	3.40 a	5.20 a	6.70 a	7.70 a

\* = promedio de 20 frutos por tratamiento. \*\* = diferencia significativa de la prueba Tukey con un valor de 0.05 de significancia.



**Figura 26.** Comportamiento de la pudrición del aislamiento de *P. digitatum* con mayor resistencia a Imazalil sometido a tratamientos de control *in vivo*

En la Figura 27, se observa el efecto del control de los tratamientos, observándose que el T2: Timorex Gold (Té de *Melalueuca alternifolia*) llegó a un 45% como mayor porcentaje de control, luego decayendo a un promedio de 25% a 30% de control en los días siguientes. Los demás tratamientos no superaron el 5% de control, y solo Impala demostró al 10mo día un control de 10% que luego fue disminuyendo.



**Figura 27.** Comportamiento de la esporulación del aislamiento de *P. digitatum* con mayor resistencia al Imazalil sometido a tratamientos de control in vivo

Observamos que el T5: Impala no fue efectivo para el control de la cepa más resistente a este ingrediente activo: Imazalil. Los resultados obtenidos coinciden con lo reportado por Smilanick et al. (2005), en donde el IMZ aplicado solo (500 mg l-1) no controló los aislamientos resistentes a dicho principio activo.

Cabe señalar que todos los frutos inoculados presentaron presencia del moho verde característico del *P. digitatum* a excepción de los tratamientos testigo sin herida, testigo con herida y sin inoculación y 3 de 20 frutos del T.2: Timorex Gold (Té de *Melalueuca alternifolia*). (Figura 28 – A)

Aquellos que presentaron mayor avance del crecimiento radial del moho fue el Tratamiento Testigo con herida e inoculación (referencial) y aquellos que presentaron menor velocidad de avance del crecimiento micelial en fruto fue el T.2: Timorex Gold (Té de *Melalueuca alternifolia*). (Figura 28 – B)



**Figura 28.** T1: TESTIGO (izquierda) vs T2: TIMOREX GOLD (derecha), A: 20 frutos totales por tratamiento, B: Avance del moho en 1 fruta por tratamiento (T1 vs T2).

Analizando los resultados *in vivo* e *in vitro*; la diferencia entre estos puede deberse a que, en los tratamientos *in vivo* hay muchos factores que pueden influir en el resultado; la homogeneidad del mojado de los frutos, la adsorción del fungicida en la piel de los frutos, el tiempo del lavado, y el tiempo de contacto entre el patógeno y el fungicida. En los ensayos *in vitro* se controlan mucho mejor todas estas variables (ya que ponemos en contacto el hongo con una cantidad muy controlada de fungicida durante varios días), y por tanto los resultados son distintos.

Las diferencias con los resultados obtenidos en esta investigación podrían explicarse por el tiempo de contacto y/o por el tiempo entre la inoculación y la aplicación del tratamiento. Según Schirra, et al. (2005) la sensibilidad *in vitro* es menor aunque se aplique la misma concentración y temperatura el Imazalil. Las aplicaciones de este principio activo son más efectivas para el control de *P. digitatum* cuando son realizadas dentro de las 12-15 h luego de la inoculación del patógeno (Kanetis et al., 2007).

Pese a que ninguno de los tratamientos inhibió o controló por completo el crecimiento del diámetro micelial en placas Petri, ni tampoco se alcanzaron niveles aceptables de control (<15% a 20° C) para fruta tratada, existió diferencia estadística suficiente para afirmar que el tratamiento con TIMOREX GOLD redujo la presencia en fruto de esporulación y pudrición del moho causado por patógeno más virulento de *P. digitatum* al Imazalil. . Esto puede deberse a que este producto es un aceite vegetal que inhibe la respiración y formación de tubos germinales de patógenos postcosecha.

Cabe señalar que para reducir la aparición de resistencias de *P. digitatum* al Imazalil, es recomendable primero, control en la higienización de la planta de tratamiento poscosecha, principalmente en los almacenes donde se ha detectado el mayor número de cepas resistentes al estar sometidos a una presión de forma continua.

De mismo modo, es necesario poder detectar de manera rápida y eficiente la existencia o no de aislamientos resistentes con el fin de llevar a cabo tratamientos postcosecha más eficaces, evitando dosis excesivas o el incremento de los niveles de residuos.

Sería preciso profundizar en los diferentes mecanismos implicados en la adquisición de resistencias de los patógenos que causan mayor repercusión económica.

Para reducir el daño ocasionado por patógenos que ocasionan enfermedades en postcosecha es recomendable realizar limpieza y desinfección para controlar la

proliferación de microorganismos tanto en ambiente como en superficies. Así como también una periódica verificación de la desinfección, controlando la correcta aplicación de desinfectantes.

Es necesaria también la adecuada higienización de los caldos de tratamiento en todos los elementos del packing, así como también una correcta desinfección de equipos y materiales en contacto con los frutos de todo el proceso postcosecha.

Debido a que la infección de *Penicillium digitatum* ocurre a través de heridas en la cáscara de la fruta, un método de control es evitar todo tipo de heridas o detectarlas a tiempo, desde el volcado hasta el almacenamiento. Además, el mayor tamaño de las heridas provoca la liberación de grandes cantidades de aceites desde las glándulas destruidas de la cáscara, solo beneficiosas para el crecimiento de *Penicillium sp.* (Brown y col., 2000).

Se recomienda también que la aplicación del drencher sea homogénea en planta procesadora ya que es el primer momento de lavado y desinfección.

## V. CONCLUSIONES

1. A 5ppms se ha detectado que las cepas de *Penicillium digitatum*, procedentes de Huaral (de frutos de descarte de la planta de procesamiento) se comportan como resistentes a Imazalil y según 3 parámetros de evaluación, se logró identificar las cepas más resistentes a este ingrediente activo.
2. De las 15 cepas de *Penicillium digitatum*, procedentes de Huaral (de frutos de descarte de la planta de procesamiento) colectadas, luego del primer filtro o evaluación, se obtuvieron 14 cepas resistentes, que era un 93.3% de cepas totales.
3. De los 14 aislamientos de *Penicillium digitatum*, procedentes de Huaral (de frutos de descarte de la planta de procesamiento), altamente resistentes al ingrediente activo Imazalil; 3 tuvieron altos niveles de esporulación y pudrición en fruto, y solo 1 tuvo alto poder germinativo (97.5% en 22 horas de realizado al montaje, frente a los otros dos aislamientos de 65.4% y 50.3%). Aquel aislamiento se consideró el más virulento.
4. Se logró evaluar los efectos del aceite esencial (té de *Melaleuca alternifolia*) y de controladores biológicos (*Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum*) sobre el control en poscosecha de la cepa más virulenta de *Penicillium digitatum* con resistencia a Imazalil en frutos de mandarina en condiciones *in vitro* e *in vivo* en la Universidad Agraria La Molina.
5. El mejor tratamiento para el control *in vitro* de la cepa más virulenta de *P. digitatum* fue el Imazalil a 500 ppm, seguido de Serenade (*Bacillus subtilis*), que tuvo un porcentaje de control del 88% y Timorex Gold (té de *Melaleuca alternifolia*) con un 61%.
6. El mejor tratamiento para el control *in vivo* de la cepa más virulenta de *P. digitatum* fue el Timorex Gold (té de *Melaleuca alternifolia*), retrasó el avance

del moho, con un control del 35% de la esporulación en el 6to día y con un 45% de control de la pudrición en el 8vo. Ambos porcentajes de control disminuyeron con el avance de los días pero fueron mayores a comparación de los demás tratamientos.

## VI. RECOMENDACIONES

1. Sería necesario continuar ensayando con el producto Timorex Gold (té de *Melaleuca alternifolia*) ya que presentó en ambos ensayos disminución en el crecimiento del patógeno de *P. digitatum* más virulento al Imazalil, tanto en prueba in vitro como in vivo.  
Convendría incrementar a dosis mayores del producto Timorex Gold (té de *Melaleuca alternifolia*) y evaluar su eficacia en ensayos in vivo.
2. Se recomienda realizar ensayos in vivo con un número elevado de frutos y réplicas, para intentar minimizar las variaciones en los resultados. Debido a que tanto el fruto como el patógeno son seres vivos, no siempre se comportarán igual, por tanto al usar un número alto de réplicas, la variabilidad se reduce.
3. Sería recomendable evaluar la eficacia de Timorex Gold (té de *Melaleuca alternifolia*) en mandarinas de distintas variedades y de distintas partidas dentro de la misma variedad (principio de campaña y final de campaña), ya que podrían observarse resultados diferentes.
4. Sería conveniente repetir los ensayos in vivo con otros tratamientos poscosecha complementarios, como por ejemplo, encerado en frutos, y tratamiento en frío.

## VII. REFERENCIAS

1. IV CENSO AGROPECUARIO. 2012. 63p. Recuperado de <http://proyectos.inei.gob.pe/web/DocumentosPublicos/ResultadosFinalesIVCENAGRO.pdf>
2. ABBOTT, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18:265-267.
3. AGRIOS, G. 1996. *Fitopatología*. México. Limusa. 2 ed. pp.461-462. 838p.
4. AGRIOS, G. 2005. *Fitopatología*. Academic Press, pp.564-568. 952p.
5. AGUSTÍ, M., ALMELA, V.; AZNAR, M.; ERES, V. 1995. Desarrollo y tamaño final del fruto en los agrios. *Generalitat Valenciana, Serie D.T n. 32*, 80p. Valencia, España.
6. AGUSTÍ, M. 2004. *Fruticultura*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. 493p.
7. AGUSTÍ, M. 2008. Crecimiento y maduración del fruto. pp. 519-535. En: Azcón-Bieto y Talón, M. (eds.). *Fundamentos de fisiología vegetal*. 2a ed. McGraw-Hill Interamericana de España, Madrid. 724p.
8. AGUSTÍ, M. 2012. *Citricultura*. 2a ed. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid- México. 422p.
9. ALBURQUEQUE, D. & GUSQUI, R., (2018). Eficacia de fungicidas químicos para el control in vitro de diferentes fitopatógenos en condiciones controladas. *Arnaldoa*, 25(2), 489-498. Recuperado de <https://dx.doi.org/http://doi.org/10.22497/arnaldoa.252.25209>

10. ARORA, D. ed. 2004. Fungal biotechnology in agricultural, food, and environmental applications. CRC Press. 509p.
  
11. BARAK, R., ELAD, Y., MIRELMAN, D. and Chet, I. 1985. Lectins: a possible basis for specific recognition in the interaction of *Trichoderma* and *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 75: 458-462.
  
12. BARKAI-GOLAN. 2001. Postharvest diseases of fruits and vegetables- Development and control 268-269. 418p.
  
13. BARNETT H., Hunter B. Illustrated genera of imperfect fungi. St. Paul, Minnesota, APS PRES, 1998.
  
14. BEÑATENA, H. N. 1972. Clasificación Botánica de los Citrus Cultivados. Bol.Tec.N ° 1. EEA INTA Concordia, E.R., Argentina. 5p.
  
15. BRYAN, A. 1996. Bacteriología principios y práctica Continental. 347 p.
  
16. BROWN, G.E.; DAVIS, C.; CHAMBERS, M. (2000). Control of citrus green mold with Aspire is impacted by the type of injury, en: Postharv. Biol. Technol. 18, pp. 57-65.
  
17. CALZADA B, J. 1970. Métodos estadísticos para la investigación. 3. Ed., Lima, Perú. 643 p. Recuperado de <https://tarwi.lamolina.edu.pe/~fmendiburu/indexfiler/academic/metodos1/capitulo2.pdf>
  
18. CAÑEDO, V., AMMES,T. 2004. Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. Lima, Perú; Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú, 62p. Recuperado de <http://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/09/AN65216.pdf>
  
19. CICOLSA ,1998. Necesidades de La Agroindustria Frutícola. Armenia: Sin Publicar.

20. COOK J.R., BAKER, K.F., 1983. The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. American Phytopathological Society, St. Paul.
21. DAMICONE, J. 2001. Fungicide resistance management. Oklahoma Cooperative Extension Service. Extension Plant Pathologist. F- 7663. 8p.
22. DAVENPORT, T.L. 1990. Citrus flowering. Horticultural Reviews 12: 349-408.
23. DAVIES, F.S., ALBRIGO, L.G., 1994. Citrus. Cab International, Oxon.
24. DIAZ BALLVE L., RÍOS F., “El valor p. Interpretación, orígenes y su utilización actual”, NOTAS DE METODOLOGÍA Y BIOESTADÍSTICA, Revista Argentina De Terapia Intensiva, 2018 - 35 N° 31
25. DHINGRA, O, SINCLAIR, J. 1995. Basic plant pathology methods, 2nd ed. 434p. (pág. 267)
26. ECKERT, J. W., AND EAKS, I. L. 1989. Postharvest disorders and diseases of citrus. The citrus industry - vol 5: 179-260.
27. ECKERT J.W. AND BROWN G.E. 1986 Evaluation of postharvest fungicide treatments for Citrus fruits In: Methods for evaluating pesticides for control of plant pathogens. Kenneth D. Hickey (Ed). St. Paul: APS Press. pp. 92 - 97. 571p.
28. FAOSTAT, 2019, Producción de mandarinas en Perú, Recuperado de <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>
29. FRENCH, E. y T. HEBERT. 1980. Métodos de investigación fitopatológica, Bib. Orton IICA / CATIE, 1980. 289 p.
30. FRAC. (s. f.). 2016. Definition of fungicide resistance. Recuperado de <http://www.frac.info/resistance-overview>.

31. FOGLIATA, G, TORRES L, PLOPER L. Detection of imazalil-resistant 6. Strains of *Penicillium digitatum* Sacc. in citrus packing houses off Tucuman Province and their behavior against current employed alternative fungicides. Rev Ind Agric Tucuman. 2001; 77:71-5.
32. GESTIÓN (19 de junio de 2017), CCL: Exportación peruana de mandarinas casi se duplicó en cinco años. Diario Gestión. Recuperado de <https://gestion.pe/economia/ccl-exportacion-peruana-mandarinas-duplico-cinco-anos-137605-noticia/>
33. GONZALES, F.P.H. 2011. Control postcosecha de *Penicillium digitatum* en frutos de naranja. Colegio de postgraduados. México. 32-34 p. Recuperado de <https://mx.123dok.com/document/wyeel91y-control-postcosecha-de-penicillium-digitatum-en-frutos-de-naranja.html>
34. GONZALES, P .C.A. Identificación de Materiales de Naranja para la Agroindustria de Jugos y Concentrados de Exportación, Adaptados a las Condiciones Agroecológicas de la Zona Cafetera Central. UNAD Programa de Agronomía. 2014. 123p.
35. HAMMER. K, A. CARSON. C,F. RILEY. T, V. 2004. Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy (2004) 53, 1081–1085. 5p.
36. HAMMER. K, A CARSON. C, F. A Review of the toxicity of *Metaleuca alternifolia* (tea tree) oil. Food Chem Toxicol 2006; 44: 616-525.
37. HERNÁNDEZ, L.A.N., BEUTISTA, B. S., VELÁZQUEZ, V. M. G., HERNÁNDEZ R. A. 2007. Uso de microorganismos antagonistas en el control de enfermedades de poscosecha en frutos. Revista Mexicana de Fitopatología 25: 66-74.

38. HONG, C. X., MICHAILEDIS, T. J., HOLTZ, B. A. 1998. Effects of wounding, inoculum density, and biological control agents on postharvest brown rot of stone fruits. *Plant Dis.* 82:1210-1216.
39. HUERTA, D, F. 2014. Presentación sobre 5 Tipos de Penicilios *P. chrysogenum*, *P. digitatum*, *P. italicum*, *P. roqueforti*. Recuperado de <http://es.slideshare.net/ferchohuertadector/penicillium-34153581>.
40. INBAR, J. and Chet, I. 1992. Biomimics of fungal cell-cell recognition by use of lectin-coated nylon fibers. *Journal of. Bacteriol* 174: 1055-1059.
41. ISMAIL, M., Zhang, J. 2004. Post-harvest citrus diseases and their control. *Outlooks on Pest Management* 15, 29–35.
42. JACKSON, D.I. & N.E. LOONEY. 2003. Producción de frutas de climas templados y subtropicales. Ed. Acribia. Zaragoza (España). 268 p.
43. KANETIS L., Förster H. and Adaskaveg J. E. 2007. Comparative efficacy of the new postharvest fungicides azoxystrobin, fludioxonil, and pyrimethanil for managing citrus green mold. *Plant Disease*, 91(11): 1502-1511.
44. KUBICEK, C., Harman, G., Ondik, K. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium*: enzymes, biological control, and commercial applications. CRC Press. 400 p.
45. LADO J., LUQUE E., 2010. Evaluación de alternativas para el control poscosecha de aislamientos de *Penicillium digitatum* resistentes a imazalil, *Agrociencia Uruguay - Volumen 15* 1:55-63- 2011
46. LEÓN, J., (23 de marzo de 2017), Variedades de mandarinas W. Murcott y Satsuma tienen potencial en el mercado asiático, *Agraria.Pe*. Recuperado de <http://www.agraria.pe/noticias/variedades-de-mandarinas-wmurcott-y-satsuma-tienen-potencial-13460>

47. LOSTAU, J., 1950. Clave determinativa de las especies del género *Penicillium*, Publicaciones de la Universidad de Murcia (España). 117 p.
48. MANNER, H., R. Buker, V. Easton, D. Ward y C. Elevitch. 2006. Citrus species (citrus). En: Elevitch, C.R. (ed.). Species Profiles for Pacific Island Agroforestry. Permanent Agriculture Resources (PAR), Hawaii, USA. 35 p.
49. MINAGRI, 2014. Portal – Cítricos. Recuperado de <http://minagri.gob.pe/portal/download/pdf/herramientas/organizaciones/dgca/citricos.pdf>
50. Ministerio de Comercio Exterior y Turismo (MINCETUR). 2014. Sistema Integrado de Información de Comercio Exterior (SIICEX).Perú. Recuperado de <http://www.siicex.gob.pe/siicex/resources/fichaproducto/117pdf2014Jul23.pdf>
51. MURCIANO, C.- CITROSOL, Identificación de resistencias, II Simposio de Postcosecha organizado por ProCitrus y Citrosol, 2017.
52. NAQVI, S.A.M.H. 2004. Diseases of Fruits and Vegetables: Diagnosis and Management. 1441p. Recuperado de <http://base.dnsgb.com.ua/files/book/Agriculture/Plant-Pathology/Diseases-of-Fruits.pdf>
53. NYSDEC (New York State Department of Environmental Conservation, US). 2001. *Bacillus subtilis* NYSDECC- Conditional Registration. Bureau of Pesticides Management. Página visitada el 15 de Agosto de 2017. Recuperado de [http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/fung-nemat/aceticacidetridiazole/bacillus\\_subtilis/bacillus\\_label\\_401.html](http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/fung-nemat/aceticacidetridiazole/bacillus_subtilis/bacillus_label_401.html).
54. PALACIOS, J. 2005. Citricultura. Imp. Alfa Beta. Buenos Aires, Argentina. 518p.
55. PÉREZ E., O. Blanco, C. Berreta, I. Dol, J. Lado. 2011. Evaluación de alternativas para el control poscosecha de aislamientos de *Penicillium digitatum* resistentes a imazalil. Agrocienia Uruguay - Volumen 15 1:55-63.

56. PHYTOMA. (s.f). Evolucion historica de las materias activas fungicidas de postcosecha de Phytoma.com. Recuperado de <http://www.phytoma.com/tienda/articulos-editorial/236-201-agosto-septiembre-2008/3772-evolucion-historica-de-las-materias-activas-fungicidas-de-postcosecha>.
57. PUC, 2007 Enciclopedia de riego en frutales, Irrifrut 2.0.
58. RAMOS, J., FIRA – Boletín informativo: “Riesgos y oportunidades de la red de valor naranja – Un enfoque competitivo”. Núm. 319 Volumen XXXIV 10a. Época Año XXXI México, Marzo 2003
59. SÁNCHEZ, J. Portal Árboles ornamentales, “CITRUS RETICULATA Blanco” Recuperado de <http://www.arbolesornamentales.es/Citrusreticulata.htm>
60. SERRANO, L. y GALINDO, E.G. Control biológico de organismos fitopatógenos: Un reto multidisciplinario. *Ciencia*, 58(1), 77-88 (2007).
61. SCHIRRA M., D’Aquino S., Palma A., Marceddu S., Angioni A., Cabras P., Scherm B. and Migheli Q. 2005. Residue level, persistence and storage performance of citrus fruit treated with fludioxonil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(17): 6718-6724.
62. SCORA, R. 1975. On the history and origin of Citrus. *Bull. Torrey Bot. Club* 102: 369-375.
63. SMILANICK J.L., Mansour M.F., Mlikota-Gabler F., and Goodwine W.R. 2006. The effectiveness of pirimetanil to inhibit germination og *Penicillium digitatum* and to control citrus green mold after harvest. *Postharvest Biol and Technol.*, 42:75-85.
64. SMILANICK J.L., Mansour M.F., Mlikota-Gabler F. and Sorenson D. 2008. Control of citrus postharvest green mold and sour rot by potassium sorbate

- combined with heat and fungicides. *Postharvest Biology and Technology*, 47(2): 226-238.
65. SMILANICK, J. L., Mansour, M. F., Margosan, D. A., Mlikota Gabler, F., and Goodwine, W. R. 2005. Influence of pH and NaHCO<sub>3</sub> on effectiveness of imazalil to inhibit germination of *Penicillium digitatum* and to control postharvest green mold on citrus fruit. *Plant Dis.* 89:640-648.
66. SOLER A.J., Soler F. Guillermo. *Cítricos y Variedades, técnicas de cultivo*. 2006. Fundación Ruralcaja Valencia. 242 p.
67. STEIN, T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology* 56(4): 845-857.
68. SWINGLE, W. T. 1943. The botany of citrus and its wild relatives of the orange subfamily. En Webber, H. J. & L. D. Batchelor (eds.), *The citrus industry I*, 1st ed., University of California Press, Berkeley. pp. 129-474.
69. TAMAYO, J. L., 2014. Determinación de la efectividad de los tratamientos en las etapas de drenchado, desinfección y encerado en el proceso de fruta cítrica para exportación en procesadora torre blanca – campaña 2012. (Tesis: Licenciado en Bromatología y Nutrición). Comunicación directa. Huacho, Perú. 38p.
70. TAVERNER, P., 2001. Mould wasleg-control-a new of other citrus producing countries. *Packer Newsletter* 64, pp: 1-77.
71. TRIPATHI P, Dubey N. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest Citol Technol.* 2004; 32:235-45.
72. VILLEGAS, G. (1997). Epidemiología de la mancha foliar de los cítricos ocasionada por *Alternaria tenuissima* (Nees & Nees Fries) Wiltshire sobre tangelo *Minneola* en dos localidades. Universidad de Caldas. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Programa de Agronomía, 150 p. (Tesis: Magister en

Fitopatología). Manizales, Colombia.

73. VISINTIN ET AL. (2010). “Manejo de mohos poscosecha de cítricos mediante antagonistas microbianos”. Ciencia, Docencia y Tecnología, Año XXI, N°40, Mayo de 2010
74. XIANG, C. & M. L. ROOSE. 1988. Frequency and characteristics of nucellar and zygotic seedlings in 12 citrus rootstocks. *Scientia Hort.* 37: 47-59.
75. ZHANG J. 2007. The potential of a new fungicide fludioxonil for stem-end rot and green mold control on Florida citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 46(3): 262-270.

## VIII. ANEXOS

**ANEXO 1:** ANVA del crecimiento del diámetro de colonia de 15 aislamientos de *Penicillium digitatum* aislado de frutos, procedente de Hualal, evaluado por día.

### Completely Randomized AOV for D3

Source	DF	SS	MS	F	P
AISLAMIEN	14	10.9356	0.78111	118.40	0.0000
Error	45	0.2969	0.00660		
Total	59	11.2325			

Grand Mean 1.5408      CV 5.27

Homogeneity of Variances	F	P
Levene's Test	1.45	0.1717
O'Brien's Test	0.93	0.5393
Brown and Forsythe Test	0.98	0.4838

### Welch's Test for Mean Differences

Source	DF	F	P
AISLAMIEN	14.0	M	M
Error	M		

Component of variance for between groups      0.19363  
Effective cell size      4.0

### AISLAMIEN      Mean

Ais. 1	1.5125
Ais. 10	1.5000
Ais. 11	1.8250
Ais. 12	1.6000
Ais. 13	0.0000
Ais. 14	1.7000
Ais. 15	1.5250
Ais. 2	1.7500
Ais. 3	1.6750
Ais. 4	1.5500
Ais. 5	1.5500
Ais. 6	1.5750
Ais. 7	1.7750
Ais. 8	1.7250
Ais. 9	1.8500

Observations per Mean      4  
Standard Error of a Mean      0.0406  
Std Error (Diff of 2 Means)      0.0574

### Completely Randomized AOV for D5

Source	DF	SS	MS	F	P
AISLAMIEN	14	54.9123	3.92231	43.93	0.0000
Error	45	4.0175	0.08928		
Total	59	58.9298			

Grand Mean 3.4483      CV 8.66

<b>Homogeneity of Variances</b>		<b>F</b>	<b>P</b>
Levene's Test		1.89	0.0546
O'Brien's Test		1.21	0.3038
Brown and Forsythe Test		0.93	0.5317

**Welch's Test for Mean Differences**

<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
AISLAMIEN	14.0	M	M
Error	M		

Component of variance for between groups 0.95826  
 Effective cell size 4.0

**AISLAMIEN Mean**

Ais. 1	3.4500
Ais. 10	3.5000
Ais. 11	3.8250
Ais. 12	3.4000
Ais. 13	0.0000
Ais. 14	4.1000
Ais. 15	3.3000
Ais. 2	4.0000
Ais. 3	3.6500
Ais. 4	3.6500
Ais. 5	3.4500
Ais. 6	3.5750
Ais. 7	4.1250
Ais. 8	4.0250
Ais. 9	3.6750
Observations per Mean	4
Standard Error of a Mean	0.1494
Std Error (Diff of 2 Means)	0.2113

**Completely Randomized AOV for D6**

<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
AISLAMIEN	14	75.2693	5.37638	56.93	0.0000
Error	45	4.2500	0.09444		
Total	59	79.5193			

Grand Mean 4.0633 CV 7.56

<b>Homogeneity of Variances</b>		<b>F</b>	<b>P</b>
Levene's Test		1.69	0.0918
O'Brien's Test		1.08	0.3983
Brown and Forsythe Test		0.92	0.5407

**Welch's Test for Mean Differences**

<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
AISLAMIEN	14.0	M	M
Error	M		

Component of variance for between groups 1.32048  
 Effective cell size 4.0

**AISLAMIEN Mean**

Ais. 1	4.3000
Ais. 10	4.2000
Ais. 11	4.4500
Ais. 12	4.2500

Ais. 13	0.0000
Ais. 14	4.8500
Ais. 15	4.0500
Ais. 2	4.7250
Ais. 3	4.1500
Ais. 4	4.2250
Ais. 5	4.0250
Ais. 6	4.1000
Ais. 7	4.8750
Ais. 8	4.6000
Ais. 9	4.1500
Observations per Mean	4
Standard Error of a Mean	0.1537
Std Error (Diff of 2 Means)	0.2173

**Completely Randomized AOV for D7**

Source	DF	SS	MS	F	P
AISLAMIEN	14	102.577	7.32695	62.06	0.0000
Error	45	5.313	0.11806		
Total	59	107.890			

Grand Mean 4.7017      CV 7.31

Homogeneity of Variances	F	P
Levene's Test	2.30	0.0178
O'Brien's Test	1.47	0.1621
Brown and Forsythe Test	2.22	0.0219

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
AISLAMIEN	14.0	M	M
Error	M		

Component of variance for between groups      1.80222  
 Effective cell size      4.0

AISLAMIEN	Mean
Ais. 1	5.2000
Ais. 10	4.8250
Ais. 11	5.1500
Ais. 12	5.0000
Ais. 13	0.0000
Ais. 14	5.8000
Ais. 15	4.7250
Ais. 2	5.5250
Ais. 3	4.6000
Ais. 4	5.0750
Ais. 5	4.7500
Ais. 6	4.7750
Ais. 7	5.4250
Ais. 8	5.2750
Ais. 9	4.4000
Observations per Mean	4
Standard Error of a Mean	0.1718
Std Error (Diff of 2 Means)	0.2430

**Completely Randomized AOV for D8**

Source	DF	SS	MS	F	P
AISLAMIEN	14	130.523	9.32310	46.81	0.0000

Error	45	8.962	0.19917
Total	59	139.486	

Grand Mean 5.3083      CV 8.41

<b>Homogeneity of Variances</b>		<b>F</b>	<b>P</b>
Levene's Test		2.64	0.0069
O'Brien's Test		1.69	0.0916
Brown and Forsythe Test		2.55	0.0088

**Welch's Test for Mean Differences**

<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
AISLAMIEN	14.0	M	M
Error	M		

Component of variance for between groups	2.28098
Effective cell size	4.0

**AISLAMIEN      Mean**

Ais. 1	5.9750
Ais. 10	5.6000
Ais. 11	5.8000
Ais. 12	5.7000
Ais. 13	0.0000
Ais. 14	6.6000
Ais. 15	5.3500
Ais. 2	6.0500
Ais. 3	5.0250
Ais. 4	5.6250
Ais. 5	5.3250
Ais. 6	5.3750
Ais. 7	6.1500
Ais. 8	5.9250
Ais. 9	5.1250
Observations per Mean	4
Standard Error of a Mean	0.2231
Std Error (Diff of 2 Means)	0.3156

**Completely Randomized AOV for D9**

<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
AISLAMIEN	14	175.196	12.5140	62.48	0.0000
Error	45	9.012	0.2003		
Total	59	184.209			

Grand Mean 6.1050      CV 7.33

<b>Homogeneity of Variances</b>		<b>F</b>	<b>P</b>
Levene's Test		2.34	0.0156
O'Brien's Test		1.50	0.1501
Brown and Forsythe Test		2.03	0.0368

**Welch's Test for Mean Differences**

<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
AISLAMIEN	14.0	M	M
Error	M		

Component of variance for between groups	3.07843
Effective cell size	4.0

**AISLAMIEN      Mean**

Ais. 1	6.8250	
Ais. 10	6.4000	
Ais. 11	6.9500	
Ais. 12	6.6000	
Ais. 13	0.0000	
Ais. 14	7.2500	
Ais. 15	6.0500	
Ais. 2	7.2000	
Ais. 3	5.3000	
Ais. 4	6.4000	
Ais. 5	6.1750	
Ais. 6	5.9250	
Ais. 7	7.0000	
Ais. 8	6.9000	
Ais. 9	6.6000	
Observations per Mean		4
Standard Error of a Mean		0.2238
Std Error (Diff of 2 Means)		0.3164

**ANEXO 2:** Prueba Tukey del crecimiento de diámetro de colonia de 15 aislamientos de *Penicillium digitatum* aislado de frutos, procedente de Hualal, por día

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of D3 by AISLAMIENTO**

<b>AISLAMIEN</b>	<b>Mean</b>	<b>Homogeneous Groups</b>
Ais. 9	1.8500	A
Ais. 11	1.8250	A
Ais. 7	1.7750	AB
Ais. 2	1.7500	ABC
Ais. 8	1.7250	ABCD
Ais. 14	1.7000	ABCDE
Ais. 3	1.6750	ABCDE
Ais. 12	1.6000	BCDE
Ais. 6	1.5750	BCDE
Ais. 4	1.5500	CDE
Ais. 5	1.5500	CDE
Ais. 15	1.5250	DE
Ais. 1	1.5125	E
Ais. 10	1.5000	E
Ais. 13	0.0000	F

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0574  
 Critical Q Value 5.068 Critical Value for Comparison 0.2058  
 There are 6 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of D5 by AISLAMIENTO**

<b>AISLAMIEN</b>	<b>Mean</b>	<b>Homogeneous Groups</b>
Ais. 7	4.1250	A
Ais. 14	4.1000	A
Ais. 8	4.0250	AB
Ais. 2	4.0000	AB
Ais. 11	3.8250	AB
Ais. 9	3.6750	AB
Ais. 4	3.6500	AB
Ais. 3	3.6500	AB
Ais. 6	3.5750	AB
Ais. 10	3.5000	AB
Ais. 5	3.4500	AB
Ais. 1	3.4500	AB
Ais. 12	3.4000	AB
Ais. 15	3.3000	B
Ais. 13	0.0000	C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.2113  
 Critical Q Value 5.068 Critical Value for Comparison 0.7571  
 There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of D6 by AISLAMIENTO**

<b>AISLAMIEN</b>	<b>Mean</b>	<b>Homogeneous Groups</b>
Ais. 7	4.8750	A

Ais. 14	4.8500	A
Ais. 2	4.7250	AB
Ais. 8	4.6000	AB
Ais. 11	4.4500	AB
Ais. 1	4.3000	AB
Ais. 12	4.2500	AB
Ais. 4	4.2250	AB
Ais. 10	4.2000	AB
Ais. 3	4.1500	AB
Ais. 9	4.1500	AB
Ais. 6	4.1000	AB
Ais. 15	4.0500	B
Ais. 5	4.0250	B
Ais. 13	0.0000	C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.2173  
Critical Q Value 5.068 Critical Value for Comparison 0.7787  
There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means  
are not significantly different from one another.

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of D7 by AISLAMIENTO**

AISLAMIEN	Mean	Homogeneous Groups
Ais. 14	5.8000	A
Ais. 2	5.5250	AB
Ais. 7	5.4250	ABC
Ais. 8	5.2750	ABC
Ais. 1	5.2000	ABCD
Ais. 11	5.1500	ABCD
Ais. 4	5.0750	ABCD
Ais. 12	5.0000	ABCD
Ais. 10	4.8250	BCD
Ais. 6	4.7750	BCD
Ais. 5	4.7500	BCD
Ais. 15	4.7250	BCD
Ais. 3	4.6000	CD
Ais. 9	4.4000	D
Ais. 13	0.0000	E

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.2430  
Critical Q Value 5.068 Critical Value for Comparison 0.8706  
There are 5 groups (A, B, etc.) in which the means  
are not significantly different from one another.

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of D8 by AISLAMIENTO**

AISLAMIEN	Mean	Homogeneous Groups
Ais. 14	6.6000	A
Ais. 7	6.1500	AB
Ais. 2	6.0500	AB
Ais. 1	5.9750	AB
Ais. 8	5.9250	AB
Ais. 11	5.8000	AB
Ais. 12	5.7000	AB
Ais. 4	5.6250	AB
Ais. 10	5.6000	AB
Ais. 6	5.3750	B

Ais. 15	5.3500	B
Ais. 5	5.3250	B
Ais. 9	5.1250	B
Ais. 3	5.0250	B
Ais. 13	0.0000	C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.3156  
 Critical Q Value 5.068 Critical Value for Comparison 1.1308  
 There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means  
 are not significantly different from one another.

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of D9 by AISLAMIENTO**

<b>AISLAMIEN</b>	<b>Mean</b>	<b>Homogeneous Groups</b>
Ais. 14	7.2500	A
Ais. 2	7.2000	A
Ais. 7	7.0000	AB
Ais. 11	6.9500	AB
Ais. 8	6.9000	AB
Ais. 1	6.8250	AB
Ais. 12	6.6000	AB
Ais. 9	6.6000	AB
Ais. 10	6.4000	ABC
Ais. 4	6.4000	ABC
Ais. 5	6.1750	ABC
Ais. 15	6.0500	BC
Ais. 6	5.9250	BC
Ais. 3	5.3000	C
Ais. 13	0.0000	D

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.3164  
 Critical Q Value 5.068 Critical Value for Comparison 1.1339  
 There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means  
 are not significantly different from one another.

**ANEXO 3:** ANVA del crecimiento del moho (esporulación) de 14 aislamientos  
aislamientos de *Penicillium digitatum* aislado de frutos, procedente de Huaral, por día

**Completely Randomized AOV for D7**

Source	DF	SS	MS	F	P
AISLAMIEN	12	3.7087	0.30906	2.25	0.0209
Error	57	7.8440	0.13761		
Total	69	11.5527			

Grand Mean 3.2843      CV 11.30

Homogeneity of Variances	F	P
Levene's Test	1.69	0.0933
O'Brien's Test	1.27	0.2642
Brown and Forsythe Test	0.85	0.6030

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
AISLAMIEN	12.0	4.61	0.0012
Error	20.5		

Component of variance for between groups      0.03200  
Effective cell size      5.4

AISLAMIEN	N	Mean	SE
Ais. 1	5	3.2400	0.1659
Ais. 10	5	2.7800	0.1659
Ais. 11	5	3.1200	0.1659
Ais. 12	5	3.1200	0.1659
Ais. 14	10	3.5800	0.1173
Ais. 2	5	3.2600	0.1659
Ais. 3	5	3.4800	0.1659
Ais. 4	5	3.1800	0.1659
Ais. 5	5	3.0600	0.1659
Ais. 6	5	3.1800	0.1659
Ais. 7	5	3.6400	0.1659
Ais. 8	5	3.4000	0.1659
Ais. 9	5	3.3600	0.1659

**Completely Randomized AOV for D8**

Source	DF	SS	MS	F	P
AISLAMIEN	12	5.9549	0.49624	2.37	0.0148
Error	57	11.9280	0.20926		
Total	69	17.8829			

Grand Mean 4.2286      CV 10.82

Homogeneity of Variances	F	P
Levene's Test	0.79	0.6581
O'Brien's Test	0.62	0.8140
Brown and Forsythe Test	0.46	0.9292

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
AISLAMIEN	12.0	2.06	0.0704
Error	21.1		

Component of variance for between groups 0.05357  
 Effective cell size 5.4

<b>AISLAMIEN</b>	<b>N</b>	<b>Mean</b>	<b>SE</b>
Ais. 1	5	3.8600	0.2046
Ais. 10	5	3.9200	0.2046
Ais. 11	5	4.1200	0.2046
Ais. 12	5	4.1200	0.2046
Ais. 14	10	4.4400	0.1447
Ais. 2	5	3.8600	0.2046
Ais. 3	5	4.4400	0.2046
Ais. 4	5	3.9200	0.2046
Ais. 5	5	4.5000	0.2046
Ais. 6	5	3.9800	0.2046
Ais. 7	5	4.7600	0.2046
Ais. 8	5	4.6200	0.2046
Ais. 9	5	4.2200	0.2046

**Completely Randomized AOV for D11**

<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
AISLAMIEN	12	6.1897	0.51581	1.37	0.2071
Error	57	21.4560	0.37642		
Total	69	27.6457			

Grand Mean 6.7857 CV 9.04

<b>Homogeneity of Variances</b>		<b>F</b>	<b>P</b>
Levene's Test		0.81	0.6429
O'Brien's Test		0.62	0.8171
Brown and Forsythe Test		0.33	0.9809

**Welch's Test for Mean Differences**

<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
AISLAMIEN	12.0	1.80	0.1151
Error	20.9		

Component of variance for between groups 0.02602  
 Effective cell size 5.4

<b>AISLAMIEN</b>	<b>N</b>	<b>Mean</b>	<b>SE</b>
Ais. 1	5	6.4200	0.2744
Ais. 10	5	6.8600	0.2744
Ais. 11	5	6.6000	0.2744
Ais. 12	5	6.0400	0.2744
Ais. 14	10	6.9200	0.1940
Ais. 2	5	6.3800	0.2744
Ais. 3	5	7.0000	0.2744
Ais. 4	5	7.0000	0.2744
Ais. 5	5	6.8800	0.2744
Ais. 6	5	6.9400	0.2744
Ais. 7	5	7.0600	0.2744
Ais. 8	5	7.1000	0.2744
Ais. 9	5	6.8800	0.2744

**ANEXO 4: Prueba Tukey del crecimiento del moho (esporulación) de 14 aislamientos de *Penicillium digitatum* aislado de frutos, procedente de Huaral, por día**

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of D7 by AISLAMIEN**

AISLAMIEN	Mean	Homogeneous Groups
Ais. 7	3.6400	A
Ais. 14	3.5800	A
Ais. 3	3.4800	AB
Ais. 8	3.4000	AB
Ais. 9	3.3600	AB
Ais. 2	3.2600	AB
Ais. 1	3.2400	AB
Ais. 4	3.1800	AB
Ais. 6	3.1800	AB
Ais. 11	3.1200	AB
Ais. 12	3.1200	AB
Ais. 5	3.0600	AB
Ais. 10	2.7800	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.2032 TO 0.2346

Critical Q Value 4.886 Critical Value for Comparison 0.7019 TO 0.8105

There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of D8 by AISLAMIEN**

AISLAMIEN	Mean	Homogeneous Groups
Ais. 7	4.7600	A
Ais. 8	4.6200	A
Ais. 5	4.5000	A
Ais. 14	4.4400	A
Ais. 3	4.4400	A
Ais. 9	4.2200	A
Ais. 12	4.1200	A
Ais. 11	4.1200	A
Ais. 6	3.9800	A
Ais. 10	3.9200	A
Ais. 4	3.9200	A
Ais. 1	3.8600	A
Ais. 2	3.8600	A

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.2506 TO 0.2893

Critical Q Value 4.886 Critical Value for Comparison 0.8656 TO 0.9995

There are no significant pairwise differences among the means.

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of D11 by AISLAMIEN**

AISLAMIEN	Mean	Homogeneous Groups
Ais. 8	7.1000	A
Ais. 7	7.0600	A
Ais. 3	7.0000	A
Ais. 4	7.0000	A
Ais. 6	6.9400	A
Ais. 14	6.9200	A

Ais. 5	6.8800	A
Ais. 9	6.8800	A
Ais. 10	6.8600	A
Ais. 11	6.6000	A
Ais. 1	6.4200	A
Ais. 2	6.3800	A
Ais. 12	6.0400	A

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.3360 TO  
0.3880

Critical Q Value 4.886 Critical Value for Comparison 1.1609 TO  
1.3405

There are no significant pairwise differences among the means.

**ANEXO 5:** ANVA del crecimiento del moho (pudrición) de 14 aislamientos de *Penicillium digitatum* aislado de frutos, procedente de Huaral, por día

**Completely Randomized AOV for D7**

Source	DF	SS	MS	F	P
AISLAMIEN	12	1.44300	0.12025	0.95	0.5021
Error	57	7.18500	0.12605		
Total	69	8.62800			

Grand Mean 4.7600      CV 7.46

Homogeneity of Variances	F	P
Levene's Test	3.54	0.0006
O'Brien's Test	2.62	0.0073
Brown and Forsythe Test	2.33	0.0164

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
AISLAMIEN	12.0	1.72	0.1345
Error	20.9		

Component of variance for between groups      -1.083E-03  
Effective cell size      5.4

AISLAMIEN	N	Mean	SE
Ais. 1	5	4.7600	0.1588
Ais. 10	5	4.7200	0.1588
Ais. 11	5	4.6400	0.1588
Ais. 12	5	4.7800	0.1588
Ais. 14	10	4.7900	0.1123
Ais. 2	5	4.7400	0.1588
Ais. 3	5	4.8400	0.1588
Ais. 4	5	4.3600	0.1588
Ais. 5	5	4.7000	0.1588
Ais. 6	5	4.8000	0.1588
Ais. 7	5	4.7800	0.1588
Ais. 8	5	4.9000	0.1588
Ais. 9	5	5.0400	0.1588

**Completely Randomized AOV for D8**

Source	DF	SS	MS	F	P
AISLAMIEN	12	4.7864	0.39887	1.76	0.0778
Error	57	12.9170	0.22661		
Total	69	17.7034			

Grand Mean 5.5771      CV 8.54

Homogeneity of Variances	F	P
Levene's Test	1.31	0.2364
O'Brien's Test	1.00	0.4644
Brown and Forsythe Test	0.67	0.7694

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
AISLAMIEN	12.0	3.05	0.0122
Error	21.0		

Component of variance for between groups 0.03215  
 Effective cell size 5.4

<b>AI SLAMIEN</b>	<b>N</b>	<b>Mean</b>	<b>SE</b>
Ais. 1	5	5.1400	0.2129
Ais. 10	5	5.4400	0.2129
Ais. 11	5	5.3800	0.2129
Ais. 12	5	5.3400	0.2129
Ais. 14	10	5.8300	0.1505
Ais. 2	5	5.1000	0.2129
Ais. 3	5	5.7000	0.2129
Ais. 4	5	5.4600	0.2129
Ais. 5	5	5.7600	0.2129
Ais. 6	5	5.6000	0.2129
Ais. 7	5	5.8800	0.2129
Ais. 8	5	5.6800	0.2129
Ais. 9	5	5.9400	0.2129

**Completely Randomized AOV for D11**

<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
AI SLAMIEN	12	12.2277	1.01898	3.15	0.0017
Error	57	18.4210	0.32318		
Total	69	30.6487			

Grand Mean 8.1757 CV 6.95

<b>Homogeneity of Variances</b>		<b>F</b>	<b>P</b>
Levene's Test		0.69	0.7501
O'Brien's Test		0.55	0.8752
Brown and Forsythe Test		0.26	0.9926

**Welch's Test for Mean Differences**

<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
AI SLAMIEN	12.0	3.60	0.0050
Error	20.9		

Component of variance for between groups 0.12988  
 Effective cell size 5.4

<b>AI SLAMIEN</b>	<b>N</b>	<b>Mean</b>	<b>SE</b>
Ais. 1	5	7.6200	0.2542
Ais. 10	5	7.9400	0.2542
Ais. 11	5	7.9800	0.2542
Ais. 12	5	7.4200	0.2542
Ais. 14	10	8.2900	0.1798
Ais. 2	5	7.5400	0.2542
Ais. 3	5	8.2200	0.2542
Ais. 4	5	8.2200	0.2542
Ais. 5	5	8.4400	0.2542
Ais. 6	5	8.3000	0.2542
Ais. 7	5	8.8000	0.2542
Ais. 8	5	8.7800	0.2542
Ais. 9	5	8.6200	0.2542

**ANEXO 6:** Prueba Tukey del crecimiento del moho (pudrición) de 14 aislamientos de *Penicillium digitatum* aislado de frutos, procedente de Huaral, por día

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of D7 by AISLAMIEN**

<b>AISLAMIEN</b>	<b>Mean</b>	<b>Homogeneous Groups</b>
Ais. 9	5.0400	A
Ais. 8	4.9000	A
Ais. 3	4.8400	A
Ais. 6	4.8000	A
Ais. 14	4.7900	A
Ais. 12	4.7800	A
Ais. 7	4.7800	A
Ais. 1	4.7600	A
Ais. 2	4.7400	A
Ais. 10	4.7200	A
Ais. 5	4.7000	A
Ais. 11	4.6400	A
Ais. 4	4.3600	A

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.1945 TO 0.2245  
 Critical Q Value 4.886 Critical Value for Comparison 0.6718 TO 0.7757

There are no significant pairwise differences among the means.

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of D8 by AISLAMIEN**

<b>AISLAMIEN</b>	<b>Mean</b>	<b>Homogeneous Groups</b>
Ais. 9	5.9400	A
Ais. 7	5.8800	A
Ais. 14	5.8300	A
Ais. 5	5.7600	A
Ais. 3	5.7000	A
Ais. 8	5.6800	A
Ais. 6	5.6000	A
Ais. 4	5.4600	A
Ais. 10	5.4400	A
Ais. 11	5.3800	A
Ais. 12	5.3400	A
Ais. 1	5.1400	A
Ais. 2	5.1000	A

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.2607 TO 0.3011  
 Critical Q Value 4.886 Critical Value for Comparison 0.9008 TO 1.0401

There are no significant pairwise differences among the means.

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of D11 by AISLAMIEN**

<b>AISLAMIEN</b>	<b>Mean</b>	<b>Homogeneous Groups</b>
Ais. 7	8.8000	A
Ais. 8	8.7800	AB
Ais. 9	8.6200	ABC
Ais. 5	8.4400	ABC
Ais. 6	8.3000	ABC
Ais. 14	8.2900	ABC
Ais. 3	8.2200	ABC
Ais. 4	8.2200	ABC

Ais. 11	7.9800	ABC
Ais. 10	7.9400	ABC
Ais. 1	7.6200	ABC
Ais. 2	7.5400	BC
Ais. 12	7.4200	C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.3114 TO  
0.3595

Critical Q Value 4.886 Critical Value for Comparison 1.0757 TO  
1.2421

There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means  
are not significantly different from one another.

**ANEXO 7:** ANVA del porcentaje de germinación de conidias de 3 aislamientos de *Penicillium digitatum* aislado de frutos, procedente de Huaral a las 22 hrs

**Completely Randomized AOV for HRS22**

Source	DF	SS	MS	F	P
AISLAMIEN	2	5747.5	2873.76	3.98	0.0473
Error	12	8674.2	722.85		
Total	14	14421.7			

Grand Mean 71.184      CV 37.77

Homogeneity of Variances	F	P
Levene's Test	7.59	0.0074
O'Brien's Test	5.58	0.0194
Brown and Forsythe Test	4.54	0.0340

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
AISLAMIEN	2.0	8.25	0.0232
Error	5.3		

Component of variance for between groups      430.181  
Effective cell size      5.0

AISLAMIEN	Mean
Ais. 14	65.428
Ais. 7	97.512
Ais. 8	50.612
Observations per Mean	5
Standard Error of a Mean	12.024
Std Error (Diff of 2 Means)	17.004

**ANEXO 8:** Prueba Tukey del porcentaje de germinación de conidias de 3 aislamientos de *Penicillium digitatum* aislado de frutos, procedente de Huaral, a las 22 hrs

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of HRS22 by AISLAMIEN**

AISLAMIEN	Mean	Homogeneous Groups
Ais. 7	97.512	A
Ais. 14	65.428	AB
Ais. 8	50.612	B

Alpha      0.05      Standard Error for Comparison      17.004  
Critical Q Value      3.783      Critical Value for Comparison      45.489  
There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

**ANEXO 9:** ANVA del porcentaje de germinación de conidias de 3 aislamientos de *Penicillium digitatum* aislado de frutos, procedente de Huaral, a las 48 hrs

**Completely Randomized AOV for HRS48**

Source	DF	SS	MS	F	P
AISLAMIEN	2	4082.4	2041.21	3.13	0.0804
Error	12	7819.1	651.59		
Total	14	11901.5			

Grand Mean 79.632      CV 32.06

Homogeneity of Variances	F	P
Levene's Test	11.06	0.0019
O'Brien's Test	8.13	0.0059
Brown and Forsythe Test	4.49	0.0350

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
AISLAMIEN	2.0	M	M
Error	M		

Component of variance for between groups      277.925  
Effective cell size      5.0

AISLAMIEN	Mean
Ais. 14	79.30
Ais. 7	100.00
Ais. 8	59.59
Observations per Mean	5
Standard Error of a Mean	11.416
Std Error (Diff of 2 Means)	16.144

**ANEXO 10:** Prueba Tukey del porcentaje de germinación de 3 aislamientos de *Penicillium digitatum* aislado de frutos, procedente de Huaral, a las 48 hrs

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of HRS48 by AISLAMIEN**

AISLAMIEN	Mean	Homogeneous Groups
Ais. 7	100.00	A
Ais. 14	79.302	A
Ais. 8	59.594	A

Alpha      0.05      Standard Error for Comparison      16.144  
Critical Q Value      3.783      Critical Value for Comparison      43.189  
There are no significant pairwise differences among the means.

**ANEXO 11:** Anva del crecimiento del diámetro del aislamiento más resistente de *Penicillium digitatum* al Imazalil, procedente de Huaral, en tratamientos *in vitro*

**Completely Randomized AOV for D3**

Source	DF	SS	MS	F	P
TRAT	5	26.7658	5.35317	95.52	0.0000
Error	18	1.0087	0.05604		
Total	23	27.7746			

Grand Mean 1.6458      CV 14.38

Homogeneity of Variances		F	P
Levene's Test		1.89	0.1462
O'Brien's Test		1.21	0.3444
Brown and Forsythe Test		1.16	0.3647

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
TRAT	5.0	M	M
Error	M		

Component of variance for between groups      1.32428  
Effective cell size      4.0

TRAT	Mean
T1	2.7250
T2	2.3500
T3	0.0000
T4	1.3625
T5	2.7750
T6	0.6625
Observations per Mean	4
Standard Error of a Mean	0.1184
Std Error (Diff of 2 Means)	0.1674

**Completely Randomized AOV for D4**

Source	DF	SS	MS	F	P
TRAT	5	42.3283	8.46567	112.75	0.0000
Error	18	1.3516	0.07509		
Total	23	43.6799			

Grand Mean 2.0229      CV 13.55

Homogeneity of Variances		F	P
Levene's Test		1.79	0.1667
O'Brien's Test		1.14	0.3743
Brown and Forsythe Test		1.07	0.4085

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
TRAT	5.0	M	M
Error	M		

Component of variance for between groups      2.09764  
Effective cell size      4.0

TRAT	Mean
------	------

T1 3.3125  
T2 2.8688  
T3 0.0000  
T4 1.7063  
T5 3.5375  
T6 0.7125  
Observations per Mean 4  
Standard Error of a Mean 0.1370  
Std Error (Diff of 2 Means) 0.1938

**Completely Randomized AOV for D5**

Source	DF	SS	MS	F	P
TRAT	5	69.3485	13.8697	137.27	0.0000
Error	18	1.8188	0.1010		
Total	23	71.1673			

Grand Mean 2.4912 CV 12.76

**Homogeneity of Variances**

	F	P
Levene's Test	1.97	0.1321
O'Brien's Test	1.26	0.3227
Brown and Forsythe Test	1.38	0.2780

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
TRAT	5.0	M	M
Error	M		

Component of variance for between groups 3.44216  
Effective cell size 4.0

**TRAT Mean**

T1 4.2000  
T2 3.4813  
T3 0.0000  
T4 2.0287  
T5 4.4875  
T6 0.7500  
Observations per Mean 4  
Standard Error of a Mean 0.1589  
Std Error (Diff of 2 Means) 0.2248

**Completely Randomized AOV for D6**

Source	DF	SS	MS	F	P
TRAT	5	93.3133	18.6627	141.97	0.0000
Error	18	2.3663	0.1315		
Total	23	95.6796			

Grand Mean 2.8292 CV 12.82

**Homogeneity of Variances**

	F	P
Levene's Test	2.26	0.0929
O'Brien's Test	1.44	0.2566
Brown and Forsythe Test	2.09	0.1142

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
TRAT	5.0	M	M
Error	M		

Component of variance for between groups 4.63280  
 Effective cell size 4.0

TRAT	Mean
T1	4.9125
T2	3.8750
T3	0.0000
T4	2.2500
T5	5.1500
T6	0.7875
Observations per Mean	4
Standard Error of a Mean	0.1813
Std Error (Diff of 2 Means)	0.2564

**Completely Randomized AOV for D7**

Source	DF	SS	MS	F	P
TRAT	5	122.409	24.4818	137.08	0.0000
Error	18	3.215	0.1786		
Total	23	125.624			

Grand Mean 3.1854 CV 13.27

Homogeneity of Variances	F	P
Levene's Test	2.60	0.0615
O'Brien's Test	1.66	0.1946
Brown and Forsythe Test	2.75	0.0511

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
TRAT	5.0	M	M
Error	M		

Component of variance for between groups 6.07580  
 Effective cell size 4.0

TRAT	Mean
T1	5.6375
T2	4.2688
T3	0.0000
T4	2.4688
T5	5.8875
T6	0.8500
Observations per Mean	4
Standard Error of a Mean	0.2113
Std Error (Diff of 2 Means)	0.2988

**Completely Randomized AOV for D8**

Source	DF	SS	MS	F	P
TRAT	5	144.303	28.8607	114.91	0.0000
Error	18	4.521	0.2512		
Total	23	148.824			

Grand Mean 3.4340 CV 14.59

Homogeneity of Variances	F	P
Levene's Test	2.77	0.0504
O'Brien's Test	1.77	0.1699
Brown and Forsythe Test	3.06	0.0359

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
TRAT	5.0	M	M
Error	M		

Component of variance for between groups 7.15238  
 Effective cell size 4.0

**TRAT Mean**

T1	6.1250
T2	4.4788
T3	0.0000
T4	2.6375
T5	6.4375
T6	0.9250
Observations per Mean	4
Standard Error of a Mean	0.2506
Std Error (Diff of 2 Means)	0.3544

**Completely Randomized AOV for D9**

Source	DF	SS	MS	F	P
TRAT	5	175.271	35.0542	107.75	0.0000
Error	18	5.856	0.3253		
Total	23	181.127			

Grand Mean 3.7042 CV 15.40

**Homogeneity of Variances F P**

Levene's Test	2.65	0.0577
O'Brien's Test	1.70	0.1864
Brown and Forsythe Test	2.71	0.0540

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
TRAT	5.0	M	M
Error	M		

Component of variance for between groups 8.68222  
 Effective cell size 4.0

**TRAT Mean**

T1	6.8375
T2	4.6312
T3	0.0000
T4	2.7687
T5	7.0250
T6	0.9625
Observations per Mean	4
Standard Error of a Mean	0.2852
Std Error (Diff of 2 Means)	0.4033

**Completely Randomized AOV for D10**

Source	DF	SS	MS	F	P
TRAT	5	206.717	41.3435	99.38	0.0000
Error	18	7.489	0.4160		
Total	23	214.206			

Grand Mean 3.9594 CV 16.29

<b>Homogeneity of Variances</b>		<b>F</b>	<b>P</b>
Levene's Test		3.23	0.0296
O'Brien's Test		2.07	0.1171
Brown and Forsythe Test		3.63	0.0191

**Welch's Test for Mean Differences**

<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
TRAT	5.0	M	M
Error	M		

Component of variance for between groups 10.2319  
 Effective cell size 4.0

**TRAT Mean**

T1	7.3750
T2	4.8438
T3	0.0000
T4	2.9375
T5	7.6375
T6	0.9625
Observations per Mean	4
Standard Error of a Mean	0.3225
Std Error (Diff of 2 Means)	0.4561

**Completely Randomized AOV for D11**

<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
TRAT	5	230.597	46.1194	91.00	0.0000
Error	18	9.122	0.5068		
Total	23	239.720			

Grand Mean 4.1542 CV 17.14

<b>Homogeneity of Variances</b>		<b>F</b>	<b>P</b>
Levene's Test		3.90	0.0143
O'Brien's Test		2.49	0.0695
Brown and Forsythe Test		4.53	0.0075

**Welch's Test for Mean Differences**

<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
TRAT	5.0	M	M
Error	M		

Component of variance for between groups 11.4032  
 Effective cell size 4.0

**TRAT Mean**

T1	7.8250
T2	5.0000
T3	0.0000
T4	3.1000
T5	8.0250
T6	0.9750
Observations per Mean	4
Standard Error of a Mean	0.3560
Std Error (Diff of 2 Means)	0.5034

**ANEXO 12: Prueba Tukey del Crecimiento del diámetro del aislamiento más resistente de *Penicillium digitatum* al Imazalil, procedente de Huaral, en tratamientos *in vitro***

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of D3 by TRAT**

TRAT	Mean	Homogeneous Groups
T5	2.7750	A
T1	2.7250	A
T2	2.3500	A
T4	1.3625	B
T6	0.6625	C
T3	0.0000	D

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.1674  
 Critical Q Value 4.495 Critical Value for Comparison 0.5320  
 There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of D4 by TRAT**

TRAT	Mean	Homogeneous Groups
T5	3.5375	A
T1	3.3125	AB
T2	2.8688	B
T4	1.7063	C
T6	0.7125	D
T3	0.0000	E

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.1938  
 Critical Q Value 4.495 Critical Value for Comparison 0.6158  
 There are 5 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of D5 by TRAT**

TRAT	Mean	Homogeneous Groups
T5	4.4875	A
T1	4.2000	A
T2	3.4813	B
T4	2.0287	C
T6	0.7500	D
T3	0.0000	E

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.2248  
 Critical Q Value 4.495 Critical Value for Comparison 0.7144  
 There are 5 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of D6 by TRAT**

TRAT	Mean	Homogeneous Groups
T5	5.1500	A
T1	4.9125	A
T2	3.8750	B
T4	2.2500	C
T6	0.7875	D
T3	0.0000	D

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.2564  
 Critical Q Value 4.495 Critical Value for Comparison 0.8148  
 There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means  
 are not significantly different from one another.

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of D7 by TRAT**

TRAT	Mean	Homogeneous Groups
T5	5.8875	A
T1	5.6375	A
T2	4.2688	B
T4	2.4688	C
T6	0.8500	D
T3	0.0000	D

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.2988  
 Critical Q Value 4.495 Critical Value for Comparison 0.9498  
 There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means  
 are not significantly different from one another.

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of D8 by TRAT**

TRAT	Mean	Homogeneous Groups
T5	6.4375	A
T1	6.1250	A
T2	4.4788	B
T4	2.6375	C
T6	0.9250	D
T3	0.0000	D

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.3544  
 Critical Q Value 4.495 Critical Value for Comparison 1.1263  
 There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means  
 are not significantly different from one another.

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of D9 by TRAT**

TRAT	Mean	Homogeneous Groups
T5	7.0250	A
T1	6.8375	A
T2	4.6312	B
T4	2.7687	C
T6	0.9625	D
T3	0.0000	D

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.4033  
 Critical Q Value 4.495 Critical Value for Comparison 1.2819  
 There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means  
 are not significantly different from one another.

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of D10 by TRAT**

TRAT	Mean	Homogeneous Groups
T5	7.6375	A
T1	7.3750	A
T2	4.8438	B
T4	2.9375	C
T6	0.9625	D
T3	0.0000	D

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.4561  
 Critical Q Value 4.495 Critical Value for Comparison 1.4496  
 There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means  
 are not significantly different from one another.

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of D11 by TRAT**

TRAT	Mean	Homogeneous Groups
T5	8.0250	A
T1	7.8250	A
T2	5.0000	B
T4	3.1000	C
T6	0.9750	D
T3	0.0000	D

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.5034  
 Critical Q Value 4.495 Critical Value for Comparison 1.5999  
 There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means  
 are not significantly different from one another.

**ANEXO 13:** ANVA del crecimiento del moho (esporulación) del aislamiento más resistente de *Penicillium digitatum* al Imazalil, procedente de Huaral, en tratamientos *in vivo*

**Completely Randomized AOV for D6**

Source	DF	SS	MS	F	P
TRAT	4	0.69200	0.17300	2.28	0.1087
Error	15	1.13750	0.07583		
Total	19	1.82950			

Grand Mean 1.2550      CV 21.94

Homogeneity of Variances		F	P
Levene's Test		2.76	0.0669
O'Brien's Test		1.77	0.1884
Brown and Forsythe Test		2.69	0.0719

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
TRAT	4.0	2.80	0.1105
Error	7.1		

Component of variance for between groups      0.02429  
Effective cell size      4.0

TRAT	Mean
T1	1.3250
T2	0.9000
T3	1.3000
T4	1.3000
T5	1.4500
Observations per Mean	4
Standard Error of a Mean	0.1377
Std Error (Diff of 2 Means)	0.1947

**Completely Randomized AOV for D8**

Source	DF	SS	MS	F	P
TRAT	4	2.17940	0.54485	8.85	0.0007
Error	15	0.92380	0.06159		
Total	19	3.10320			

Grand Mean 2.2400      CV 11.08

Homogeneity of Variances		F	P
Levene's Test		2.80	0.0639
O'Brien's Test		1.79	0.1825
Brown and Forsythe Test		2.47	0.0898

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
TRAT	4.0	2.16	0.1749
Error	7.1		

Component of variance for between groups      0.12082  
Effective cell size      4.0

TRAT	Mean
T1	2.4200
T2	1.5800
T3	2.3950
T4	2.4000
T5	2.4050
Observations per Mean	4
Standard Error of a Mean	0.1241
Std Error (Diff of 2 Means)	0.1755

**Completely Randomized AOV for D10**

Source	DF	SS	MS	F	P
TRAT	4	6.68128	1.67032	22.81	0.0000
Error	15	1.09830	0.07322		
Total	19	7.77958			

Grand Mean 4.3290      CV 6.25

Homogeneity of Variances		F	P
Levene's Test		1.51	0.2481
O'Brien's Test		0.97	0.4531
Brown and Forsythe Test		0.66	0.6323

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
TRAT	4.0	12.72	0.0021
Error	7.4		

Component of variance for between groups      0.39928  
 Effective cell size      4.0

TRAT	Mean
T1	4.9000
T2	3.2500
T3	4.6500
T4	4.5950
T5	4.2500
Observations per Mean	4
Standard Error of a Mean	0.1353
Std Error (Diff of 2 Means)	0.1913

**Completely Randomized AOV for D13**

Source	DF	SS	MS	F	P
TRAT	4	9.7645	2.44113	71.60	0.0000
Error	15	0.5114	0.03409		
Total	19	10.2759			

Grand Mean 5.2980      CV 3.49

Homogeneity of Variances		F	P
Levene's Test		2.01	0.1442
O'Brien's Test		1.29	0.3185
Brown and Forsythe Test		0.86	0.5088

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
TRAT	4.0	20.44	0.0009
Error	6.4		

Component of variance for between groups 0.60176  
 Effective cell size 4.0

**TRAT Mean**

T1 5.7150  
 T2 3.9050  
 T3 5.6000  
 T4 5.5700  
 T5 5.7000

Observations per Mean 4  
 Standard Error of a Mean 0.0923  
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.1306

**Completely Randomized AOV for D15**

Source	DF	SS	MS	F	P
TRAT	4	12.0569	3.01423	54.43	0.0000
Error	15	0.8306	0.05537		
Total	19	12.8875			

Grand Mean 6.2120 CV 3.79

**Homogeneity of Variances**

	F	P
Levene's Test	2.28	0.1087
O'Brien's Test	1.46	0.2634
Brown and Forsythe Test	1.23	0.3402

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
TRAT	4.0	11.65	0.0040
Error	6.6		

Component of variance for between groups 0.73971  
 Effective cell size 4.0

**TRAT Mean**

T1 6.6300  
 T2 4.6600  
 T3 6.6200  
 T4 6.5550  
 T5 6.5950

Observations per Mean 4  
 Standard Error of a Mean 0.1177  
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.1664

**ANEXO 14:** Prueba Tukey del crecimiento del moho (esporulación) del aislamiento más resistente de *P. digitatum* al Imazalil, procedente de Huaral, en tratamientos *in vivo*

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of D6 by TRAT**

TRAT	Mean	Homogeneous Groups
T5	1.4500	A
T1	1.3250	A
T3	1.3000	A
T4	1.3000	A
T2	0.9000	A

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.1947  
 Critical Q Value 4.368 Critical Value for Comparison 0.6014  
 There are no significant pairwise differences among the means.

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of D8 by TRAT**

TRAT	Mean	Homogeneous Groups
T1	2.4200	A
T5	2.4050	A
T4	2.4000	A
T3	2.3950	A
T2	1.5800	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.1755  
 Critical Q Value 4.368 Critical Value for Comparison 0.5419  
 There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of D10 by TRAT**

TRAT	Mean	Homogeneous Groups
T1	4.9000	A
T3	4.6500	AB
T4	4.5950	AB
T5	4.2500	B
T2	3.2500	C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.1913  
 Critical Q Value 4.368 Critical Value for Comparison 0.5909  
 There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of D13 by TRAT**

TRAT	Mean	Homogeneous Groups
T1	5.7150	A
T5	5.7000	A
T3	5.6000	A
T4	5.5700	A
T2	3.9050	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.1306  
 Critical Q Value 4.368 Critical Value for Comparison 0.4032  
 There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of D15 by TRAT**

<b>TRAT</b>	<b>Mean</b>	<b>Homogeneous Groups</b>
T1	6.6300	A
T3	6.6200	A
T5	6.5950	A
T4	6.5550	A
T2	4.6600	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.1664  
Critical Q Value 4.368 Critical Value for Comparison 0.5139  
There are 2 groups (A and B) in which the means  
are not significantly different from one another.

**ANEXO 15:** ANVA del crecimiento del moho (pudrición) del aislamiento más resistente de *Penicillium digitatum* al Imazalil, procedente de Huaral, en tratamientos *in vivo*

**Completely Randomized AOV for D6**

Source	DF	SS	MS	F	P
TRAT	4	3.55300	0.88825	21.66	0.0000
Error	15	0.61500	0.04100		
Total	19	4.16800			

Grand Mean 2.1400      CV 9.46

Homogeneity of Variances		F	P
Levene's Test		2.20	0.1179
O'Brien's Test		1.41	0.2783
Brown and Forsythe Test		2.10	0.1319

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
TRAT	4.0	7.14	0.0132
Error	6.9		

Component of variance for between groups      0.21181  
Effective cell size      4.0

TRAT	Mean
T1	2.3750
T2	1.3000
T3	2.3250
T4	2.3000
T5	2.4000
Observations per Mean	4
Standard Error of a Mean	0.1012
Std Error (Diff of 2 Means)	0.1432

**Completely Randomized AOV for D8**

Source	DF	SS	MS	F	P
TRAT	4	2.22668	0.55667	7.44	0.0016
Error	15	1.12250	0.07483		
Total	19	3.34918			

Grand Mean 3.2010      CV 8.55

Homogeneity of Variances		F	P
Levene's Test		2.48	0.0884
O'Brien's Test		1.59	0.2288
Brown and Forsythe Test		1.51	0.2500

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
TRAT	4.0	1.90	0.2178
Error	6.8		

Component of variance for between groups      0.12046  
Effective cell size      4.0

TRAT	Mean
T1	3.4050
T2	2.5350
T3	3.3400
T4	3.3650
T5	3.3600
Observations per Mean	4
Standard Error of a Mean	0.1368
Std Error (Diff of 2 Means)	0.1934

**Completely Randomized AOV for D10**

Source	DF	SS	MS	F	P
TRAT	4	8.0763	2.01907	14.00	0.0001
Error	15	2.1633	0.14422		
Total	19	10.2396			

Grand Mean 5.3210      CV 7.14

Homogeneity of Variances		F	P
Levene's Test		1.13	0.3802
O'Brien's Test		0.72	0.5900
Brown and Forsythe Test		0.51	0.7323

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
TRAT	4.0	7.33	0.0107
Error	7.4		

Component of variance for between groups      0.46871  
 Effective cell size      4.0

TRAT	Mean
T1	5.8750
T2	4.1250
T3	5.7000
T4	5.6800
T5	5.2250
Observations per Mean	4
Standard Error of a Mean	0.1899
Std Error (Diff of 2 Means)	0.2685

**Completely Randomized AOV for D13**

Source	DF	SS	MS	F	P
TRAT	4	10.8078	2.70196	54.88	0.0000
Error	15	0.7385	0.04923		
Total	19	11.5463			

Grand Mean 6.2705      CV 3.54

Homogeneity of Variances		F	P
Levene's Test		1.97	0.1504
O'Brien's Test		1.26	0.3275
Brown and Forsythe Test		0.81	0.5399

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
TRAT	4.0	16.82	0.0013
Error	6.7		

Component of variance for between groups 0.66318  
 Effective cell size 4.0

**TRAT Mean**

T1 6.7300  
 T2 4.8050  
 T3 6.6050  
 T4 6.5525  
 T5 6.6600

Observations per Mean 4  
 Standard Error of a Mean 0.1109  
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.1569

**Completely Randomized AOV for D15**

Source	DF	SS	MS	F	P
TRAT	4	16.1095	4.02737	34.31	0.0000
Error	15	1.7606	0.11737		
Total	19	17.8701			

Grand Mean 7.2640 CV 4.72

**Homogeneity of Variances**

	F	P
Levene's Test	2.33	0.1034
O'Brien's Test	1.49	0.2546
Brown and Forsythe Test	1.54	0.2401

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
TRAT	4.0	7.96	0.0126
Error	6.3		

Component of variance for between groups 0.97750  
 Effective cell size 4.0

**TRAT Mean**

T1 7.7500  
 T2 5.4700  
 T3 7.6600  
 T4 7.7250  
 T5 7.7150

Observations per Mean 4  
 Standard Error of a Mean 0.1713  
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.2423

**ANEXO 16:** Prueba Tukey del crecimiento del moho (pudrición) del aislamiento más resistente de *P. digitatum* al Imazalil, procedente de Huaral, en tratamientos *in vivo*

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of D6 by TRAT**

TRAT	Mean	Homogeneous Groups
T5	2.4000	A
T1	2.3750	A
T3	2.3250	A
T4	2.3000	A
T2	1.3000	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.1432  
 Critical Q Value 4.368 Critical Value for Comparison 0.4422  
 There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of D8 by TRAT**

TRAT	Mean	Homogeneous Groups
T1	3.4050	A
T4	3.3650	A
T5	3.3600	A
T3	3.3400	A
T2	2.5350	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.1934  
 Critical Q Value 4.368 Critical Value for Comparison 0.5974  
 There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of D10 by TRAT**

TRAT	Mean	Homogeneous Groups
T1	5.8750	A
T3	5.7000	A
T4	5.6800	A
T5	5.2250	A
T2	4.1250	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.2685  
 Critical Q Value 4.368 Critical Value for Comparison 0.8293  
 There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of D13 by TRAT**

TRAT	Mean	Homogeneous Groups
T1	6.7300	A
T5	6.6600	A
T3	6.6050	A
T4	6.5525	A
T2	4.8050	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.1569  
 Critical Q Value 4.368 Critical Value for Comparison 0.4845  
 There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of D15 by TRAT**

<b>TRAT</b>	<b>Mean</b>	<b>Homogeneous Groups</b>
T1	7.7500	A
T4	7.7250	A
T5	7.7150	A
T3	7.6600	A
T2	5.4700	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.2423  
Critical Q Value 4.368 Critical Value for Comparison 0.7482  
There are 2 groups (A and B) in which the means  
are not significantly different from one another.