

***Hypocrea lixii* y *Trichoderma asperellum* como agentes bio reguladores de *Alternaria solani* y *Corynespora cassiicola* en condiciones de laboratorio e invernadero**

.....
Leticia Vivas V. y Mariuxi R. Molina Y.⁵

Introducción

El cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) en Ecuador de acuerdo a datos estadísticos del MAGAP/SIGAGRO reportan que la superficie sembrada en 2010 fue 2037 ha con producción de 43.025 Tm. Este cultivo es afectado por varios fitopatógenos de suelo y foliares que provocan pérdidas en el rendimiento, aumento en los costos de producción por efectos de control, estudios precedentes reportan que en la provincia de Manabí los productores invierten alrededor del 50% del costo de inversión en labores de combate de plagas, con promedios de 23 aplicaciones durante el ciclo de producción.

Por otra parte, se ha observado que utilizan con productos extremadamente y altamente tóxicos hasta 24 horas antes de cosechar y en ciertos casos inclusive durante la misma, esto trae como consecuencia daños en la salud de personas que laboran en campo y de los consumidores, al agroecosistema; por lo que es necesario buscar alternativas amigables con la naturaleza entre ellos hongos antagonistas que reducen en forma natural el inóculo de fitopatógenos.

Las enfermedades más importantes en las provincias de Guayas y Santa Elena es el tizón temprano o lancha temprana y la mancha corinespora. El tizón temprano causado por *Alternaria solani* es una enfermedad muy destructiva en áreas donde la humedad es alta; afecta al follaje, tallos y frutos, puede causar daños severos al cultivo en cualquier etapa del desarrollo. Los síntomas iniciales son pequeñas lesiones de color negro parduzco que aparece en hojas más viejas, el tejido que rodea la lesión toma un color amarillo; los puntos necróticos aumentan rápidamente de tamaño y cuando su diámetro es de 6 mm o más pueden distinguirse anillos concéntricos en la zona de color castaño claro. Las lesiones en el tallo de las plántulas son pequeños, oscuros y ligeramente hundidos, pero pueden aumentar de tamaño para formar lesiones circulares o alargadas con anillos concéntricos pronunciados quedando el centro de coloración más clara. La infección ocurre en la intersección al cáliz o al tallo. Tanto en estado verde o maduro; a menudo el fruto se cae y puede causar del 30-50% de frutos inmaduros.

5 Universidad de Guayaquil-Ecuador.

Corynespora cassiicola causal de la mancha diana o corinespora también afecta hojas y tallo y frutos. Los síntomas iniciales son pequeñas punteaduras en las hojas, las mismas que aumentan de tamaño, de forma circular y de color marrón pálido. Las lesiones se rodean de halos amarillos, la unión de dos o más lesiones en un folículo pueden dar lugar al colapso rápido del tejido foliar. Las lesiones en el tallo y los pecíolos son de color castaño y de forma alargada. Los foliolos y las hojas se necrosan rápidamente dando la apariencia de una muerte súbita. Las lesiones en frutos jóvenes se inician como motas punteadas, oscuras; en frutos maduros desarrollan lesiones un centro castaño claro que posteriormente se rompen.

Estudios realizados en Costa Rica sobre el control microbiológico de *Phytophthora infestans* en tomate, determinaron que de 137 aislamientos 32 mostraron efecto antagónico y redujeron significativo del tamaño de la lesión en condiciones de laboratorio, de los cuales se seleccionaron cinco los de mayor potencial. Posteriormente, se evaluaron en condiciones de invernadero cuyos resultados mostraron que la cepa *Trichoderma* 069 y *Penicillium* 067 redujeron el número de lesiones y el área foliar afectada por planta con relación a los tratamientos testigo (solo agua) y similar al uso de fungicida.

Por otra parte, se menciona que el antagonista *Trichoderma harzianum* tiene efecto sobre *Rhizoctonia solani*. Reportes sobre la actividad biocontroladora *in vitro* de la cepa A34 de *T. harzianum* sobre *Sclerotium rolfsii* en tomate se observó la eficacia antagónica a partir de la ausencia de síntomas de la enfermedad en plantas protegidas.

En Ecuador se ha identificado a *T. asperellum* como antagonista de *S. rolfsii* y *R. solani*, mientras que reportó que la cepa G-08 de este mismo antagonista aplicado al suelo en forma líquida redujo la severidad del complejo de la marchitez del tomate; por otra parte, se menciona que *Hypocrea lixii* y *Trichoderma asperellum* son potenciales antagonistas de *Alternaria solani*.

Los objetivos de la presente investigación fueron: 1) realizar pruebas de eficacia de cepas de hongos antagonistas en condiciones de laboratorio y 2) evaluar el efecto de cuatro cepas de hongos antagonistas para el manejo de *A. solani* en condiciones de invernadero.

Metodología

El estudio se realizó en condiciones de laboratorio e invernadero de la Estación Experimental Litoral Sur del INIAP, ubicado en el Km 26 vía Durán-Tambo.

- Fases de investigación
- Laboratorio
- Inhibición del tubo germinativo de *A. solani* y *C. cassiicola*

Con las cuatro cepas de hongos antagonistas aislados de hojas de tomate e identificadas como *Hypocrea lixii* y *Trichoderma asperellum* se determinó su efecto sobre la germinación de *A. solani* y *C. cassiicola*. El hongo *H. lixii* aislada de la muestra del km 20 de la autopista Durán-Boliche y *T. asperellum* a las cepas de Isidro Ayora, El Azúcar y Río Verde; las dos primeras cepas corresponden a muestras de la provincia de Guayas y las dos últimas a la provincia de Santa Elena.

De cada cepa se evaluaron tres concentraciones 1×10^6 , 1×10^8 y 1×10^{10} sobre la germinación de conidios de *A. solani* y *C. cassiicola*, con cada una de ellas se prepararon suspensiones en agua (AA) previamente esterilizado, luego se colocaron en Cajas Petri; para la liberación de los conidios se colectaron tejidos infectados y se graparon en papel *krat* y se dejaron a temperatura ambiente. Después de 24 horas se procedió a evaluar la germinación y deformación de las esporas de *A. solani* y *C. cassiicola* y del antagonista; los datos fueron transformados a porcentaje.

Tratamientos

Los tratamientos estuvieron conformados por cuatro cepas de hongos antagonistas y tres dosis de cada una, se incluyeron un testigo comercial y un absoluto, lo que totaliza 14 tratamientos y se describen en la tabla 1.

El porcentaje de germinación del antagonista y de los dos fitopatógenos estudiados fue analizado en un diseño completamente al azar con arreglo factorial A x B + 2. Se usaron cinco unidades experimentales (repeticiones). La comparación de las medias se realizó con la prueba de rangos múltiples de Duncan $p = 0.05$

Tabla 1
Tratamientos en el estudio de laboratorio

Código	Descripción
IA D1	<i>T. asperellum</i> Isidro Ayora 1×10^{-6}
IA D2	<i>T. asperellum</i> Isidro Ayora 1×10^{-8}
IA D3	<i>T. asperellum</i> Isidro Ayora 1×10^{-10}
Km 20 D1	<i>Hypocrea lixii</i> Kilómetro 20 1×10^{-6}
Km 20 D2	<i>Hypocrea lixii</i> Kilómetro 20 1×10^{-8}
Km 20 D3	<i>Hypocrea lixii</i> Kilómetro 20 1×10^{-10}
EA D1	<i>T. asperellum</i> El Azúcar 1×10^{-6}
EA D2	<i>T. asperellum</i> El Azúcar 1×10^{-8}
EA D3	<i>T. asperellum</i> El Azúcar 1×10^{-10}
RV D1	<i>T. asperellum</i> Río Verde 1×10^{-6}
RV D2	<i>T. asperellum</i> Río Verde 1×10^{-8}
RV D3	<i>T. asperellum</i> Río Verde 1×10^{-10}
Timorex	Timorex (dosis comercial)
Testigo	Sin aplicación

Inoculación del fitopatógeno y aplicación de los hongos antagonistas

Se sembraron semillas de tomate, cultivar Floradade en macetas con capacidad de 8 kg que contenían suelo esterilizado; la inoculación del fitopatógeno se realizó en plántulas de siete días de edad, para este propósito se realizó una suspensión del crecimiento micelial del fitopatógeno en agua destilada estéril, esta se asperjó con un atomizador manual, luego se mantuvieron con humedad ambiental que para el efecto colocó un humidificador dos horas en la mañana y dos en la tarde. Después de una semana de inoculadas las plántulas con los fitopatógenos se procedió a aplicar las cepas de *H. lixii* y *T. asperellum* en dosis de 1×10^{10} esporas por mililitro.

Para preparar la solución de los antagonistas se tomó crecimiento micelial de cada uno de ellos y diluyó en agua destilada estéril y con la ayuda de una cámara de Newbauer se contaron el número de esporas, luego se formuló de acuerdo a la concentración requerida. Posteriormente, se hizo una segunda aspersión con los primeros síntomas visibles de la enfermedad y se aplicaron con un atomizador manual. Las evaluaciones se realizaron semanalmente durante dos meses.

Tratamientos y diseño experimental

Cada cepa del antagonistas constituyó un tratamiento y se incluyeron dos testigos: un comercial (Timorex) y un absoluto, lo que totalizó seis tratamientos y fueron los siguientes:

- *H. lixii* cepa Km 20
- *T. asperellum* cepa Isidro Ayora
- *T. asperellum* cepa Río Verde
- *T. asperellum* Cepa El Azúcar
- Testigo químico
- Testigo absoluto

Se utilizó un diseño completamente al azar con 5 unidades experimentales (macetas). Se registraron datos de temperatura y humedad relativa se hicieron correlaciones con los porcentajes de foliolos afectados por *A. solani* y *C. casicola*.

Variables registradas

Inhibición de tubos germinativos

A las 24 horas después de efectuar la liberación de las esporas se contó el número de esporas y de ellas el número que germinaron. Esta información se expresó en porcentajes.

Incidencia y severidad

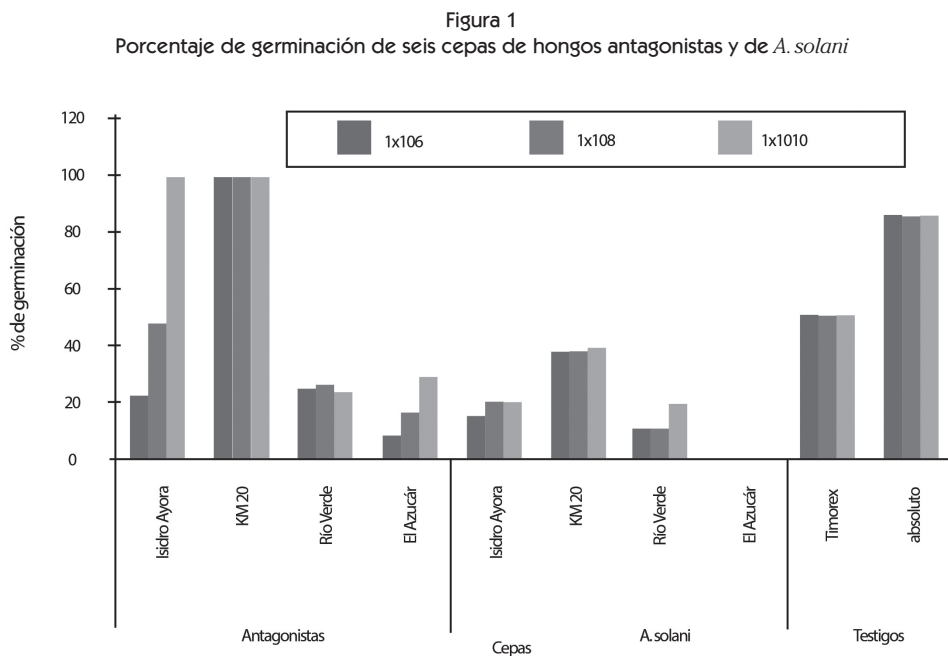
En condiciones de invernadero se contaron el número de plantas con síntomas de la enfermedad. Para severidad se utilizaron la escala de Horsfall-Barratt modificada por Large (1996), donde: 0 = planta sana, 1 = 0-1% de área foliar afectada, 2 = 1-3%, 3 = 3-9%, 4 = 9-24%, 5 = 24-50%, 6 = 50-76%, 7 = 76-91%, 8 = 91-99% del área foliar afectada y 9 = planta muerta.

Resultados y discusión

Porcentaje de germinación de las cepas de hongos antagonista y de A. solani

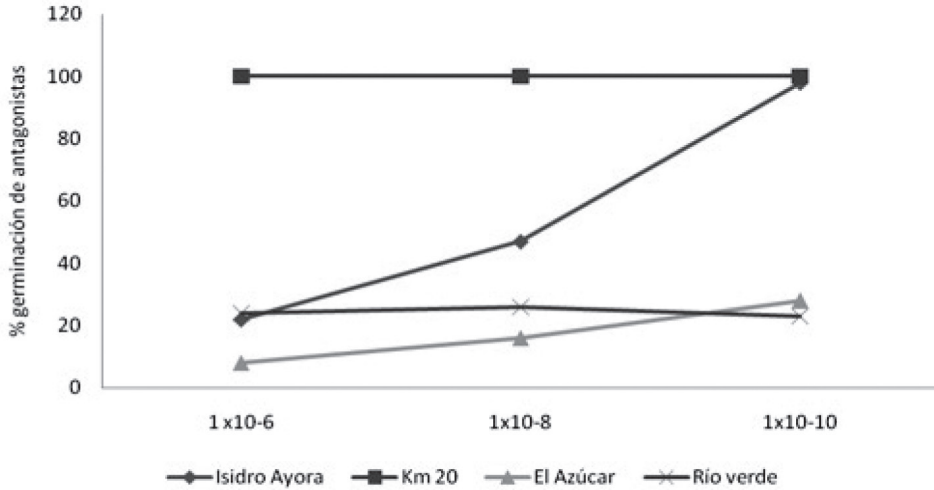
Hypocrea lixi (cepa Km 20) tuvo el mayor porcentaje de germinación en las tres dosis, seguido de *T. asperellum* cepa Isidro Ayora en dosis 1×10^{10} .

Los menores porcentajes de esporas de *A. solani* germinada fueron en las cepas Río Verde e Isidro Ayora; mientras que los testigos mostraron los mayores porcentajes:



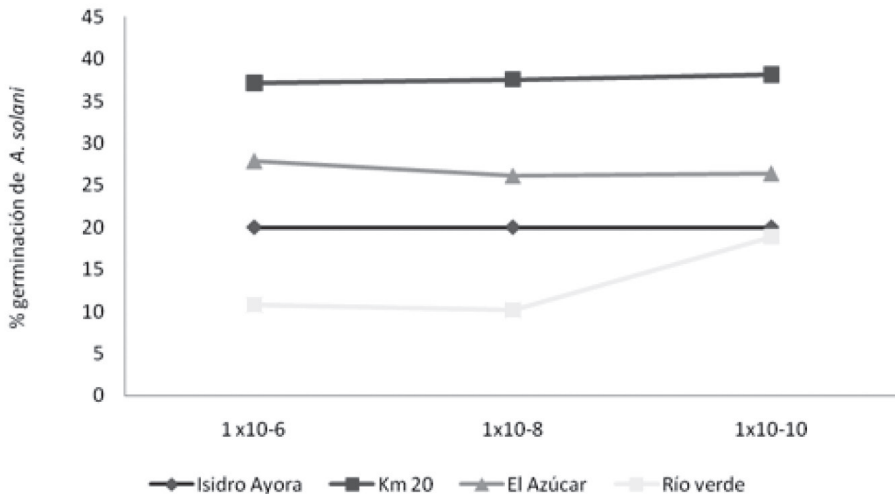
Las interacciones entre las cepas y dosis muestran que *H. lixi* (cepa km 20) en las tres dosis tuvieron el mayor porcentaje de germinación:

Figura 2
Interacción del porcentaje de germinación de cuatro cepas de antagonistas en condiciones de laboratorio



Las interacciones entre cepas de antagonistas sobre la germinación de esporas *A. solani* muestran que el mejor efecto fue con *T.asperellum* cepa Río Verde, cuyos valores estuvieron con menos del 20% (figura 3).

Figura 3
Porcentaje de germinación de *A. solani* frente a cuatro cepas de antagonistas en condiciones de laboratorio



Inhibición de tubos germinativos y daños en esporas de *A. solani* y *C. cassicola*

El efecto de las cepas del antagonistas sobre las esporas de *A. solani* no mostraron interacción entre las dosis, solamente entre cepas, por lo que se analizaron entre ellas tomando a las dosis como repeticiones. *T. asperellum* cepa El Azúcar fue la de menor efecto debido a que mostró el valor más alto 43.76% de esporas sin daños y estadísticamente diferente; la cepa Isidro Ayora tuvo el menor valor seguida de *H. lixi* e iguales estadísticamente entre sí:

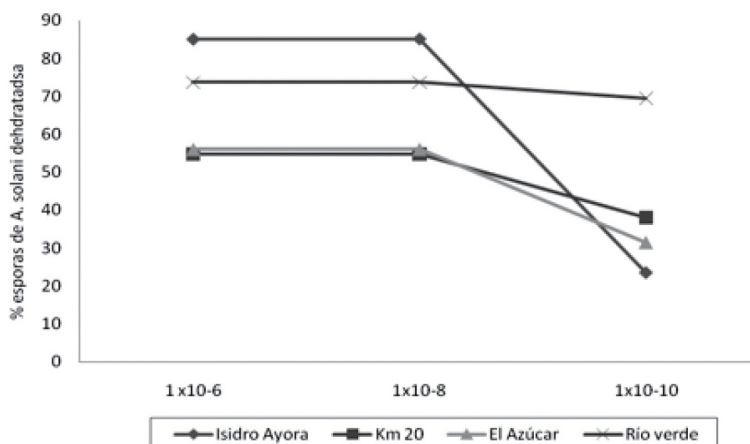
Tabla 2
Porcentaje de esporas de *A. solani* sin daños cuando se trataron con cuatro cepas de hongos antagonistas en condiciones de laboratorio

Cepas	Dosis			Promedio
	1×10^6	1×10^8	1×10^{10}	
Isidro Ayora	1.45	85.00	20.00	35.48 b ^{1/}
Km 20	0.00	63.00	46.00	36.33 b
El Azúcar	31.19	73.89	26.19	43.76 a
Río verde	8.33	92.52	13.33	38.06 ab
C.V. (%)	12.12			

1/Cifras de las columnas con la(s) misma(s) letra(s) son iguales estadísticamente de acuerdo a la prueba de rangos múltiples de Duncan $P = 0.05$

El efecto de las cepas de antagonistas y sus dosis sobre esporas de *A. solani* deshidratadas mostraron interacciones. Las cepas Isidro Ayora y Río Verde tuvieron los mayores porcentajes de esporas deshidratadas:

Figura 4
Porcentaje de esporas de *A. solani* deshidratadas por efecto de seis cepas de antagonistas en condiciones de laboratorio

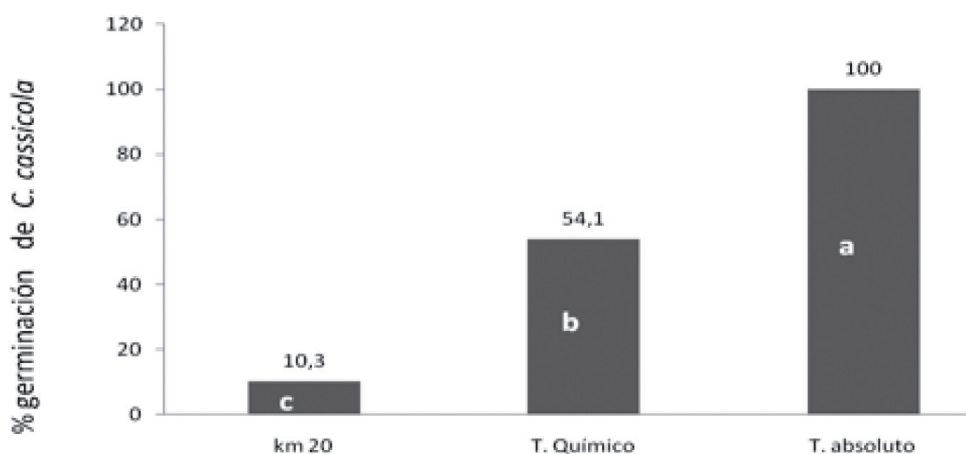


Con respecto al porcentaje de esporas de *A. solani* deshidratadas por efecto de seis cepas antagonistas muestran que *T. asperellum* cepa Río Verde en las tres dosis tuvieron el mismo comportamiento, seguido de la cepa Isidro Ayora con las dos primeras dosis, posiblemente se deba al efecto de micoparasitismo o de antibiosis, pues, Torres, Iannacone y Gómez (2008) mencionan que ciertas especies de *Trichoderma* ejercen sobre el patógeno tres tipos fundamentales como son competencia directa por espacio y nutrientes, producción de metabolitos antibióticos de naturaleza volátil o no y parasitismo directo.

Efecto de *H. lixii* sobre la germinación de esporas de *C. cassiicola*

En condiciones de laboratorio *H. lixii* mostró efecto sobre la germinación de *C. cassiicola*, con respecto a los testigos químico y absoluto y fue diferente de los demás tratamientos (figura 5). En las demás cepas no hubo liberación de conidios.

Figura 5
Efecto de tres cepas de hongos antagonistas sobre la germinación de *C. cassiicola* en condiciones de laboratorio



Invernadero

El efecto de seis cepas de hongos antagonistas de *A. solani* en el cultivo Floradade muestran un comportamiento variable durante la evaluación. Los promedios generales indican diferencias significativas entre tratamientos; los menores valores fueron para las cepas Pedro Carbo, EELS y km 20 con 2.94; 3.12 y 3.64% en su orden, todos ellos estadísticamente diferentes. Los mayores porcentajes fueron con las cepas de El Azúcar, Río Verde y el testigo absoluto siendo estos dos últimos iguales entre:

Tabla 3
Porcentaje de foliolos con *A. solani* en el cultivar Floradade
en condiciones de invernadero

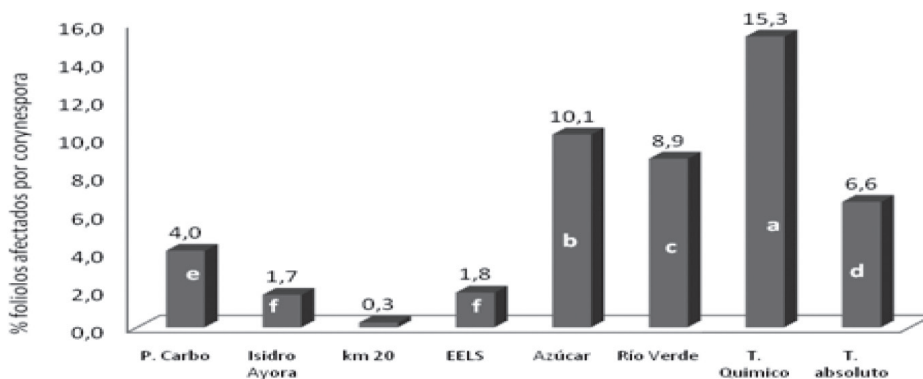
Fechas	Cepas					
	Isidro Ayora	Km 20	El Azúcar	Río Verde	Timorex	Testigo
14-jun	6.27	2.73	24.02	18.62	2.43	6.16
21-jun	3.76	4.44	7.1	7.48	2.45	5.3
28-jun	3.78	4.19	5.98	6.31	2.1	6.1
05-jul	2.74	3.2	5.98	4.91	12.23	19.6
Media	4.14 d	3.64 e	10.77 a	9.33b	4.80 c	9.29b
C.V.	2.19%					

1/Cifras de las columnas con la(s) misma(s) letra(s) son iguales estadísticamente de acuerdo a la prueba de rangos múltiples de Duncan P = 0.05

Prueba de eficacia de seis cepas de hongos antagonistas sobre *C. cassiicola*

El efecto de seis cepas de hongos antagonistas sobre *C. cassiicola* en el cultivar Floradade muestran diferencias significativas entre tratamientos (anexo 5). La cepa km 20 que corresponde a *Hypocrea lixi* tuvo el menor porcentaje de foliolos infectados con 0.3 estadísticamente diferente de los demás tratamientos, seguida de las cepas Isidro Ayora y EELS con 1.7 y 1.8% e iguales entre sí; los mayores porcentajes fueron en los testigos químico y absoluto:

Figura 6
Efecto de seis cepas de antagonistas sobre *C. cassiicola*
en el cultivar Floradade en condiciones de invernadero



Con respecto al porcentaje de esporas de *A. solani* deshidratadas por efecto de seis cepas antagonistas muestran que la Río Verde en las tres dosis evaluadas tuvo el mismo comportamiento, seguido de la cepa Isidro Ayora con las dos primeras dosis, posiblemente se deba al efecto de micoparasitismo o de antibiosis, pues, Torres, Iannacone y Gómez (2008) mencionan que ciertas especies de *Trichoderma* ejercen sobre el patógeno tres tipos fundamentales como son competencia directa por espacio y nutrientes, producción de metabolitos antibióticos de naturaleza volátil o no y parasitismo directo.

En condiciones de invernadero la cepa km 20 que es *Hypocrea lixii* (teleomorfo de *T. harzianum*) que tuvo un mejor resultado con respecto al porcentaje de folíolos afectados por *A. solani*, similar respuesta obtuvieron Torres, Iannacone y Gómez (2008) quienes reportan que *Trichoderma harzianum* fue más eficiente que las otras tres especies de *Trichoderma* debido que redujo la severidad de la enfermedad.

Con respecto a la temperatura si bien, donde se efectuó el estudio la temperaturas fluctuaron entre 24 y 35° C, mediante el análisis de regresión se observó en los dos cultivares similar comportamiento sobre el porcentaje de folíolos afectados por *A. solani*, en la que se muestra que 24 °C es la temperatura favorable para este patógeno; temperaturas entre 25 a 30° C son óptimas para el crecimiento de especies de *Trichoderma* como lo reportan Torres, Iannacone y Gómez (2008).

Conclusiones

- Se identificaron en hojas de tomate a *Hypocrea lixii* que corresponde al Teleomorfo de *T. harzianum* en la muestra del km 20 y *Trichoderma asperellum* de muestras de tomate de Isidro Ayora en la provincia de Guayas, este último también en El Azúcar y Río Verde en Santa Elena; en las muestras de Pedro Carbo y EELS no se pudieron identificar debido a posibles mezclas.
- En pruebas de antagonismo sobre *A. solani* las cepas km 20 y EELS tuvieron el mejor efecto sobre crecimiento micelial de *A. solani*, así como el mayor porcentaje de germinación de las esporas.
- El daño más evidente de los hongos antagonistas sobre esporas de *A. solani* fue la deshidratación lo que no le permitió una germinación normal especialmente con la cepa Río Verde.
- El mejor porcentaje de germinación de esporas de *C. cassicola* tratadas con la cepa km 20 que corresponde a *H. lixi*.
- En invernadero el cultivar Floradade los menores porcentajes de folíolos infectados por *A. solani* fueron en los tratamientos con las cepas de antagonistas de Pedro Carbo y EELS y el mayor con la de El Azúcar.
- En el cultivar Miramar los menores porcentajes de folíolos afectados por *A. solani* fueron en los tratamientos EELS y testigo comercial.
- Las condiciones de temperatura y humedad relativa favorables para el desarrollo de la enfermedad estuvieron entre 24 a 26° C y 60% de acuerdo a la correlación.
- Las cepas de hongos antagonistas EELS y km 20 tuvieron el mejor efecto sobre el porcentaje de folíolos afectado por *C. cassicola*.

Recomendaciones

- Realizar muestreos en otras áreas productoras de hortalizas para determinar si existen otras cepas nativas con efecto antagonico sobre *Alternaria solani* y *Corynespora cassiicola*.
- Evaluar en condiciones de campo estas cepas de hongo antagonistas para determinar dosis, frecuencias y épocas de aplicación.

Referencias

- Blancard, D.
2005 *Enfermedades del tomate, observar, identificar, luchar*. Madrid: Mundi Prensa.
- Blanquez, C. H.
2001 *La mancha diána. En plagas y enfermedades del tomate*. Madrid: Mundi Prensa.
- Capuz, R.
2009 "Identificación de microorganismos antagonistas de fitopatógenos de suelo y su efecto *in vitro* e invernadero en especies hortícolas". Tesis de grado de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Guayaquil.
- Carvajal, T.
1997 "En manual de cultivos hortícolas (estación Experimental Portoviejo)".
- Cevallos, S.
2010 "Estudios de eficacia de *Trichoderma* cepa G008 sobre el complejo Marchitez del Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill)". Tesis de grado de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Guayaquil.
- Fernández-Larrea, O.
2001 *Temas interesantes a cerca del control microbiológico de plagas*. Cuba: Instituto de investigaciones de Sanidad Vegetal.
- INIAP
2011 "Informe técnico del proyecto alternativas biológicas para el combate de insectos plagas y de fitopatógenos de suelo en cultivos hortícolas en las provincias de Guayas y Manabí". Estación Experimental del Litoral Sur "Dr. Enrique Ampuero Pareja", Yaguachi.
- MAGAP/SIGAGRO.
2010 Recuperado en julio de 2011. www.magap.gov.ec
- Molina, M.
2011 "Identificación y evaluación de antagonistas del tizón temprano (*Alternaria solani*) en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill)". Tesis de grado de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Guayaquil.
- Paulus, A. O.
2001 "La podredumbre negra del cuello. En plagas y enfermedades del tomate". Madrid: Mundi Prensa.
- Reyes, R., Barranco, B., García, G. y Jiménez, G.
2002 "Actividad *in Vitro* de *Trichoderma harzianum* sobre *Sclerotium rolfsii* en plántulas de tomate". *Manejo Integrado de Plagas*. N° 66, p. 45-48.
- Sánchez, G.V., Bustamante, E y Shatottok, R.
1998 "Selección de de antagonistas para el control microbiológico de *Phytophthora infestans* en tomate". *Manejo Integrado de Plagas*. Costa Rica. N° 48, p 25-34.

- 1999 "Control microbiológico de *Phytophthora infestans* en tomate". *Manejo Integrado de Plagas*. Costa Rica. N° 51, p. 47-58.
- Torres, E., Iannacone, J. y Gómez, H.
- 2008 "Biocontrol del *Moho foliar* del tomate *Cladosporium fulvum* empleando cuatro hongos antagonistas". *Revista de Ciencias Agronómicas Bragantía*. Vol. 67 (001): 169-178.