

**Biocontrol de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* por
Trichozam[®] (*Trichoderma harzianum*) y Mycoral[®]
(micorriza vesículo arbuscular) en el cultivo de tomate**

*Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniera Agrónoma en el Grado
Académico de Licenciatura*

Presentado por

María Isabel Córdova Zapata

Zamorano, Honduras

Diciembre, 2003

El autor concede a Zamorano permiso
para reproducir y distribuir copias de este
trabajo para fines educativos. Para otras personas
físicas o jurídicas se reservan los derechos de autor

María Isabel Córdova Zapata

Zamorano, Honduras

Diciembre, 2003

**Biocontrol de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* por
Trichozam® (*Trichoderma harzianum*) y Mycoral® (micorriza
vesículo arbuscular) en el cultivo de tomate**

Proyecto Especial de Graduación

Presentado por:

María Isabel Córdova Zapata

Aprobada:

María Mercedes Doyle, Ph.D.
Asesora Principal

Alfredo Rueda, Ph.D.
Director de Área Temática

Phil Arneson, Ph.D.
Asesor

Jorge Iván Restrepo, M.B.A.
Coordinador de Carrera de
Ciencia y Producción Agropecuaria

Alfredo Rueda, Ph.D.
Asesor

Antonio Flores, Ph.D.
Decano académico

Rogelio Trabanino, MSc.
Asesor

Kenneth L. Hoadley, D.B.A.
Rector

Juan Carlos Rosas, Ph.D.
Asesor

DEDICATORIA

A mis padres Julio y Bolivia, por brindarme todo su amor, su cariño y ejemplo. Gracias a su esfuerzo, me encuentro llegando a la cumbre de mi carrera.

A mis hermanos Luis Francisco, Carlos Andrés y Julio Sebastián, por apoyarme fielmente a lo largo de mi carrera, por creer en mí, darme la mano y entenderme en los momentos más difíciles de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A mi Dios todo poderoso que ha hecho posible que llegue hasta aquí, porque me acompaña siempre y no permite que me aleje nunca de su camino, porque me ha dado fe, esperanza y tranquilidad en los momentos más difíciles de mi vida.

A mis padres, hermanos y a mi familia entera, por apoyarme y creer en mí siempre.

A la Dra. María Mercedes Roca de Doyle, por creer en mí, por enseñarme que todas las personas en la vida merecen una segunda oportunidad, por enseñarme a ser fuerte de carácter e íntegra como mujer, por abrirme la puerta al mundo y mostrarme el camino por donde puedo dirigir mi vida.

Al Dr. Alfredo Rueda, por su especial apoyo para la conclusión de mi cuarto año e incomparable ayuda en la realización de este trabajo.

A Jorge Venegas, Byron Reyes y todo el equipo del Laboratorio de Biofertilización por su inmensa ayuda y dedicación para la realización de este trabajo.

A Dennis, por haber compartido todo este tiempo junto a mí.

A Ligia Acosta, mi amiga del alma, gracias negrita por brindarme tu amistad, siempre serás para mí una persona realmente especial.

A Andrea Ontaneda, Luis Castillo y Elías El Malouf, gracias por ser tan especiales conmigo, por tenerme paciencia y por ayudarme en todo.

A mis compañeros de clase, Arlen Montoya, Cesar Zurita, Reinaldo Chávez, Liner Torres, Vanessa Piedra, Mauricio Galarza, Alex Espinoza, Edwin Terán y Roberto Suazo.

AGRADECIMIENTO A PATROCINADORES

A mis padres, quienes han encaminado sus mayores esfuerzos en mi educación.

A la Escuela Agrícola Panamericana por su aporte para realizar los primeros tres años de mi carrera.

Al programa PROMIPAC, un proyecto de la Agencia Suiza para la Cooperación y el Desarrollo COSUDE, ejecutado por Zamorano por su aporte para la finalización de mi cuarto año.

RESUMEN

Córdova Zapata, María Isabel. 2003. Biocontrol de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* por Trichozam[®] (*Trichoderma harzianum*) y Mycoral[®] (micorriza vesículo arbuscular) en el cultivo de tomate. Proyecto Especial de Graduación de Ingeniero Agrónomo. Zamorano, Honduras. 30 p.

La marchitez vascular del tomate es producida por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. El hongo sobrevive en restos de cultivo de una temporada a otra, es favorecido por temperaturas cálidas y alta humedad relativa. Una respuesta positiva a este problema es la utilización de organismos biocontroladores de enfermedades como *Trichoderma harzianum* y micorriza (VAM). El objetivo de este estudio fue determinar si la marchitez vascular del tomate puede ser manejada biologicamente con Trichozam[®] y Mycoral[®]. Se realizaron análisis *in vitro* y en casa malla. Se utilizó un diseño factorial 2 x 4 distribuido en parcelas divididas con 7 repeticiones por tratamiento. Las variables evaluadas fueron: severidad, número de hojas por planta, porcentaje de: hojas cloróticas, hojas muertas, hojas marchitas y colonización de micorriza en las raíces tratadas. Para el ensayo *in vitro*, se realizaron observaciones microscópicas a cultivos conjuntos en cámara húmeda de *T. harzianum* y *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. El porcentaje de doblez de las hojas presentó diferencias entre el tesigo enfermo y los demás tratamientos, comprobándose así que Trichozam[®], Mycoral[®] y la combinación de los dos ejercieron control. Se determinó que la velocidad de crecimiento de *T. harzianum* es mayor a la de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, además se observó que las esporas de *T. harzianum* tienen cierto tipo de energía kinética que les permite movilizarse, se adhieren a las hifas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y producen hifas que se enrollan en las hifas del patógeno, ofreciendo así un control mecánico.

Palabras clave: Biocontrol, fungoresistencia, inhibición, marchitez, patógeno del suelo.

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Autoría.....	ii
Hoja de firmas.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Agradecimientos a patrocinadores.....	vi
Resumen.....	vii
Contenido.....	viii
Índice de cuadros.....	ix
Índice de figuras.....	x
Índice de anexos.....	xi
 INTRODUCCIÓN	 1
Objetivo general.....	2
Objetivos específicos.....	3
MATERIALES Y MÉTODOS	4
Localización del experimento	4
PRUEBA DE PATOGENICIDAD	4
INTERACCIÓN DE <i>Trichoderma harzianum</i> y MICORRIZA (VAM) EN PLANTAS INOCULADAS CON <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> EN CONDICIONES CONTROLADAS EN CASA MALLA.....	5
Casa malla.....	5
Material hospedero.....	5
Suelo.....	6
Transplante.....	6
Inoculación.....	7
Fertilización.....	7
Riego.....	7
Control de plagas.....	7
Diseño experimental.....	8
Variables analizadas.....	8
EVALUACIÓN DEL MECANISMO DE INHIBICIÓN DE <i>T. harzianum</i> CONTRA <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (In vitro)	10
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	12
CONCLUSIONES	22
RECOMENDACIONES	23
BIBLIOGRAFÍA	24
ANEXOS	26

ÍNDICE DE CUADROS

1. Tratamientos y dosis de Mycoral [®] y Trichozam [®] utilizados en suelo inoculado y no inoculado de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> . El Zamorano, Honduras. 2003.....	6
2. Separación de medias de los tratamientos inoculados y no inoculados con <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> en plantas de tomate. El Zamorano, Honduras. 2003	13
3. Análisis del síntoma de doblez de las hojas causado por <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> en plantas de tomate. El Zamorano, Honduras. 2003...	14
4. Análisis del número de hojas de plantas de tomate inoculadas y no inoculadas con <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> . El Zamorano, Honduras. 2003.....	16
5. Resultados promedios de las variables que se analizaron en el bioensayo. El Zamorano, Honduras. 2003..	16
6. Porcentaje de infección de micorriza en plantas de tomate. El Zamorano, Honduras. 2003.....	17

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Marchitez de la planta ocasionada por <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> ...	5
2. Doble de las hojas causado por <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	5
3. Síntomas de marchitez en plantas de tomate causada por <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	9
4. Vesículas de micorriza en raíces de tomate	9
5. Diseño de cámara húmeda y medio de cultivo (PDA) para el estudio de mecanismos de inhibición de <i>T. harzianum</i> a <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	11
6. Evaluación del crecimiento de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> y <i>T. harzianum</i>	11
7. Curva de crecimiento de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> y <i>T. harzianum</i> en competencia	18
8. Inhibición del crecimiento de <i>T. harzianum</i> (verde) sobre <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (rosado) después de 14 días de sembrados en PDA para distintas repeticiones en el ensayo	19
9. Esporas de <i>T. harzianum</i> alineándose junto a hifas y esporas de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	20

ÍNDICE DE ANEXOS

1. Conteo de esporas de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	26
2. Arreglo espacial de tratamientos en casa malla	28
3. Análisis de suelo utilizado en el bioensayo	29
4. Distribución de tratamientos con y sin inóculo de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	30
5. Método para clarificar y teñir muestras de raíces	31

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, uno de los principales problemas del medio ambiente es la utilización desmedida de fungicidas y fumigantes, que en muchas ocasiones desarrollan fungoresistencia, contaminación ambiental y toxicidad.

Dentro de los organismos que causan enfermedades en plantas, el género *Fusarium* agrupa el mayor número agentes causales de enfermedades de las plantas y es el género de mayor difusión en el mundo. Se ha comprobado que estos organismos son responsables de un sinnúmero de alteraciones incluyendo marchitez, pudrición de las raíces y tallos de diferentes cultivos, y enfermedades en almácigos (“damping-off” o mal del talluelo). De todas las alteraciones, la más importante es la marchitez (Toruño, 1999).

La marchitez vascular del tomate, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, se encuentra distribuida en todo el mundo causando grandes pérdidas en el cultivo. El hongo sobrevive en restos de cultivo de una temporada a otra y posee estructuras de resistencia que le permiten perdurar en el suelo por espacio de seis años. Es favorecido por temperaturas cálidas asociada a alta humedad relativa. El hongo penetra en la planta a nivel del suelo ya sea por el tallo o por las raíces superficiales y luego es trasladado por haces vasculares a toda la planta (González, 2003).

Una respuesta positiva y concreta a la campaña mundial de “limpieza del planeta”, es la utilización de control biológico de enfermedades de plantas a través de microorganismos antagónicos competitivos. Especies del género *Trichoderma* han merecido la atención máxima como agente de biocontrol de patógenos fúngicos de suelo (Stefanova, 1999).

Trichoderma es un hongo hiperparásito que se encuentra naturalmente en todos los suelos (Lardizábal, 2002) y actúa por medio de una combinación de competencia por nutrientes, producción de metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas, y micoparasitismo. Además, produce sustancias promotoras del crecimiento de las plantas. El hongo coloniza las semillas y protege las plántulas en la fase post-emergente de patógenos fúngicos y la aplicación directa al suelo ofrece además una protección mayor a los cultivos (Stefanova, 1999).

En Cuba, a partir de 1990, se efectuaron diversos estudios dirigidos al biocontrol de hongos del suelo de tabaco, hortalizas y otros cultivos con aislamientos de *Trichoderma* que fueron seleccionados *in vitro* por su elevada capacidad hiperparásita. Posteriormente fueron utilizados en forma de biopreparados para combatir *Phytophthora nicotianae*, *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani* y otros fitopatógenos en condiciones de campo, obteniendo resultados satisfactorios (Stefanova *et al.*, 1999).

Al igual que *Trichoderma*, los hongos micorrízicos arbusculares, por su efecto como agentes de bioregulación del crecimiento, biofertilizantes y biocontrol, han tenido especial atención para el control biológico de enfermedades (Alarcón y Ferrera - Cerrato, 1999).

Según Raddatz (2001), las plantas en las que se ha probado la Micorriza Vesículo-Arbuscular (VAM), presentan un mayor crecimiento radicular y foliar, mejor absorción de fósforo y otros nutrimentos, mayor tolerancia a enfermedades del suelo y al ataque de parásitos, mejor tolerancia a la falta de agua, mejor estructura del suelo al agregar las partículas en torno a la raíz y mayor producción de hormonas estimulantes del crecimiento. La penetración de micorriza al hospedero ocurre en la raíz por medio de una hifa o apresorio que es el extremo hinchado de la hifa.

Investigaciones recientes han demostrado que plantas inoculadas con hongos formadores de micorriza, especialmente del género endomicorriza, incrementan la resistencia a varias enfermedades radiculares y la micorriza puede actuar como un agente efectivo de biocontrol contra *Fusarium oxysporum*, *P. parasitica*, *F. solani* y *Rhizoctonia solani* (Alarcón y Ferrera - Cerrato, 1999).

Hasta el momento MYCORAL® ha sido probado exitosamente en el incremento de rendimientos y manejo de enfermedades de diferentes cultivos de hortalizas, forestales, frijol y café, en condiciones experimentales controladas en invernadero. También se ha podido comprobar el efecto positivo de MYCORAL® en la adaptación al campo de plantas de banano (*Musa spp.*) producidas *in vitro*, en Zamorano. (Domínguez y Arias, 2003).

En el presente estudio se evaluó el efecto que las dosis comerciales de TRICHOZAM® (*Trichoderma harzianum*) producido por el Laboratorio de Control Biológico de Zamorano y MYCORAL® (micorriza vesículo arbuscular) producido por el Laboratorio de Biofertilización de Zamorano, ejercen sobre la marchitez vascular de tomate ocasionada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Además se evaluó la interacción y el mecanismo de protección que tiene *Trichoderma harzianum* con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* en condiciones controladas de laboratorio.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Determinar si la enfermedad producida por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* en plantas de tomate, puede ser manejada biológicamente con aplicaciones de TRICHOZAM®, producto comercial que contiene *T. harzianum* y MYCORAL®, producto comercial que contiene tres especies seleccionadas de micorriza vesículo arbuscular (*Glomus*, *Acaulospora* y *Entrophospora*).

Objetivos específicos

- Validar la patogenicidad de un aislamiento de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* obtenido de tomate con marchitez vascular mediante los postulados de Koch.
- Determinar si existe una inhibición en el desarrollo de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* *in vitro*, en presencia de *T. harzianum* y determinar el mecanismo de inhibición.
- Determinar si la marchitez producida en plantas de tomate inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* puede ser controlada en la casa malla con aplicaciones de *T. harzianum* y micorriza vesículo arbuscular.
- Determinar si existe alguna interacción entre *T. harzianum* y micorriza para controlar la enfermedad de marchitez vascular.

MATERIALES Y MÉTODOS

LOCALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO

El experimento fue realizado en la casa malla y en el laboratorio de Diagnóstico Molecular de Fitopatología de la carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano – Honduras. Zamorano se encuentran ubicadas a 14 ° latitud Norte y 87 ° latitud Sur, a 800 msnm, presenta una temperatura promedio anual de 22 ° C y una precipitación promedio anual de 1100 mm.

PRUEBA DE PATOGENICIDAD

Postulados de Koch

Se siguieron los postulados de Koch mediante cuatro pasos:

➤ Postulado 1

Se observaron y colectaron muestras de plantas que presentaban síntomas característicos de esta enfermedad (marchitez general de la planta, amarillamiento unilateral de las hojas, doblez hacia abajo del peciolo de las hojas) (Figuras 1 y 2) en plantas de tomate de la variedad Bute, en la zona de Danlí – Honduras. Estas plantas tenían 76 días de edad cuando se hizo el análisis visual.

➤ Postulado 2

Se aisló el patógeno en cultivo puro haciendo cortes en secciones del tallo que presentaban necrosis en el xilema. Los cortes fueron sembrados en medio de cultivo de PDA (papa dextrosa agar).

➤ Postulado 3

Una vez que se identificaron la morfología y las estructuras características de *F. oxysporum* mediante observación microscópica, se procedió a inocular plantas de tomate sanas de la misma variedad. Para esto se utilizó una solución de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* de 6.08×10^5 esporas/ml (Anexo 1). Las plántulas fueron proporcionadas por la Zamoempresa de Cultivos Intensivos (ZECI) a los 21 días después de sembradas. El suelo estaba compuesto de tierra y compost. Este sustrato fue proporcionado por el laboratorio de biofertilización de Zamorano y fue esterilizado a 121°C durante 30 minutos en un autoclave. Se hizo la inoculación en el suelo tres días antes del transplante.

➤ Postulado 4

Las plantas inoculadas mostraron los mismos síntomas de infección que las plantas del Postulado 1. De estas plantas se reaisló el patógeno en cultivo puro a partir del hospedero inoculado y enfermo, ratificándose los síntomas observados en las primeras plantas.



Figura 1. Marchitez de la planta ocasionada por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.



Figura 2. Doblez de las hojas causado por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

INTERACCIÓN DE *T. harzianum* y MICORRIZA (VAM) EN PLANTAS INOCULADAS CON *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* EN CONDICIONES CONTROLADAS EN LA CASA MALLA

Casa malla

La casa malla se encuentra ubicada en la parte posterior al Departamento de Protección Vegetal de Zamorano. Cuenta con un área de 16 m² y 4 m de altura, está cubierta por plástico de color amarillo y serán de 60 % de sombra. Alrededor de la casa malla existe una barrera viva de 2 m de altura (Anexo 2).

Material hospedero

Se utilizaron 48 plantas de tomate de la variedad Bute. Las semillas fueron sembradas en el semillero de la ZECI en bandeja de plástico negro con capacidad para 128 plántulas, se utilizó un sustrato ya preparado y pasteurizado de la marca Sunshine®. La bandeja permaneció durante tres días en un cuarto oscuro, para inducir la germinación y posteriormente se trasladó a un macrotúnel durante 21 días.

Suelo

El medio utilizado para este experimento estaba compuesto de tierra y compost, y fue proporcionado por el laboratorio de biofertilización de Zamorano. Se realizó el análisis químico de nutrientes del medio (Anexo 3). Se esterilizó el suelo a una temperatura de 121°C durante 30 minutos en un autoclave para eliminar cualquier rastro de organismos vivos. Se utilizaron 84 kg de suelo.

Transplante

El transplante se realizó 25 días después de siembra, en maceteros de 6 pulgadas de diámetro. En este paso se realizaron las inoculaciones de *T. harzianum* y micorriza, respectivamente, de acuerdo a cada tratamiento (Cuadro 1).

Cuadro 1. Tratamientos y dosis de Mycoral® y Trichozam® utilizados en suelo inoculado y no inoculado con *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. El Zamorano, Honduras. 2003.

Trat. No.	Presencia de <i>F. oxysporum</i>	Tratamiento	Concentración	Dosis	Aplicación
T1	Si	Testigo Absoluto			
T2	Si	MYCORAL®	40 esporas/100g	50 g/pilón	Bajo el pilón al transplante
T3	Si	TRICHOZAM®	5x10 ⁸ conidios/g	20 mg/pilón	Adherido al pilón al transplante
T4	Si	MYCORAL® + TRICHOZAM®	40 esporas/100 g 5x10 ⁸ conidios/g	50 g/pilón 20 mg/pilón	Bajo y adherido al pilón al transplante
T5	No	Testigo Absoluto			
T6	No	MYCORAL®	40 esporas/100 g	50 g/pilón	Bajo el pilón al transplante
T7	No	TRICHOZAM®	5x10 ⁸ conidios/g	20 mg/pilón	Adherido al pilón al transplante
T8	No	MYCORAL® + TRICHOZAM®	40 esporas/100 g 5x10 ⁸ conidios/g	50 g/pilón 20 mg/pilón	Bajo y adherido al pilón al transplante

Inoculación

Se utilizó la generación F2 del aislamiento primario (cepa madre o F1) obtenido de los Postulados de Koch anteriormente mencionados. Para elaborar el inóculo se licuaron durante tres segundos, 1000 ml de agua estéril junto con el contenido de 5 platos petri de cultivo puro de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* sembrado en PDA. Seguidamente, con ayuda de una pipeta pasteur se extrajo una alícuota de la solución previamente agitada para realizar el conteo de conidias utilizando un hematocímetro y un microscopio de luz con magnificación de 40X. Se realizaron dos lecturas para establecer un promedio de 0.9×10^5 esporas/ml.

El suelo fue inoculado con el patógeno tres días antes del transplante. Para esto, se utilizaron 100 ml de inoculante por cada 1.5 kg. de suelo que contenía cada macetero. Se mantuvo una humedad constante en los maceteros para facilitar la colonización del patógeno.

Para la micorriza se utilizó una dosis de 50 g de producto comercial Mycoral[®] por pilón, agregando éste en la base del pilón al momento del transplante. La concentración de Mycoral[®] es de 40 esporas por 100 g de suelo.

Para *T. harzianum*, se realizó una solución de 1.12 g de producto comercial Trichozam[®] con 1 L de agua; esta concentración se calculó con base en la cantidad de producto comercial que se utilizaría para una plantación de tomate en una hectárea, utilizando la dosis de 500 g/ha. Posteriormente se sumergieron los pilones de las plantas en la solución durante 10 min. antes del transplante.

Fertilización

Hasta los 40 días de edad, las plantas fueron fertilizadas foliarmente con una solución de Triple 20[®], utilizando una dosis de 2g/L de agua. Durante los primeros 25 días se fertilizó mediante el riego por nebulización en el macrotúnel del semillero, y en la casa malla se fertilizó con un atomizador manual, en horas de la mañana a un intervalo de tres días por semana, esta fertilización no se hizo con base en los requerimientos nutricionales del cultivo, por lo tanto, como se verá en los resultados, esta fertilización resultó insuficiente y causó amarillamiento en las hojas.

Riego

El riego se suministró en horas frías de la mañana o de la tarde, manteniendo una humedad uniforme en el suelo. Se utilizó agua potable que abastece las instalaciones de Zamorano.

Control de plagas.

A los 45 dds se hizo una aplicación de Neem[®], dosis de 4 cc/L de agua para el control de mosca blanca. A los 60 dds se aplicó Confidor[®] (Imidacloprid), dosis de 1g/L de agua. Las dos aplicaciones se hicieron con un atomizador manual cubriendo toda el área foliar.

Diseño experimental

El experimento fue establecido con un diseño factorial 2X4 distribuido en parcelas divididas. Las parcelas principales fueron: las parcelas inoculadas con el patógeno y las parcelas sanas a las cuales se les aplicaron los diferentes tratamientos de Mycoral[®], Trichozam[®] y la combinación de los dos productos. Cada tratamiento tenía 7 repeticiones. Los tratamientos se mantuvieron separados espacialmente (1 m) para evitar contaminación cruzada entre tratamientos (Anexo 4).

Para el análisis estadístico se utilizó el programa MINITAB[®] con un nivel de significancia 0.10.

Variables analizadas

A los 68 dds, se analizaron los siguientes síntomas de las plantas: número de hojas por planta, % de clorosis en las hojas, % de hojas muertas, % de hojas marchitas, % de doblez de las hojas y severidad de marchitamiento vascular.

➤ Número de hojas por planta

Se realizó un conteo desde la primera hoja basal hasta la última hoja, incluyendo en esta variable las hojas muertas.

➤ Porcentaje de clorosis de las hojas

Para esto se tomó en cuenta las hojas que presentaron clorosis total, debido a que no se pudo diferenciar la clorosis unilateral de las hojas característica de esta enfermedad.

➤ Porcentaje de hojas muertas

Se tomaron en cuenta las hojas totalmente secas, ya sea que se desprendieron o no de la planta.

➤ Porcentaje de hojas marchitas

Se tomaron en cuenta las hojas que presentaban decaimiento y baja turgencia.

➤ Severidad

El análisis de severidad de la enfermedad se determinó una escala de valores que indicaba el grado de enfermedad tomando en cuenta el porcentaje de las variables anteriores (Figura 3).

Escala:

0: plantas sanas

1: daño leve

2: daño moderado

3: daño severo

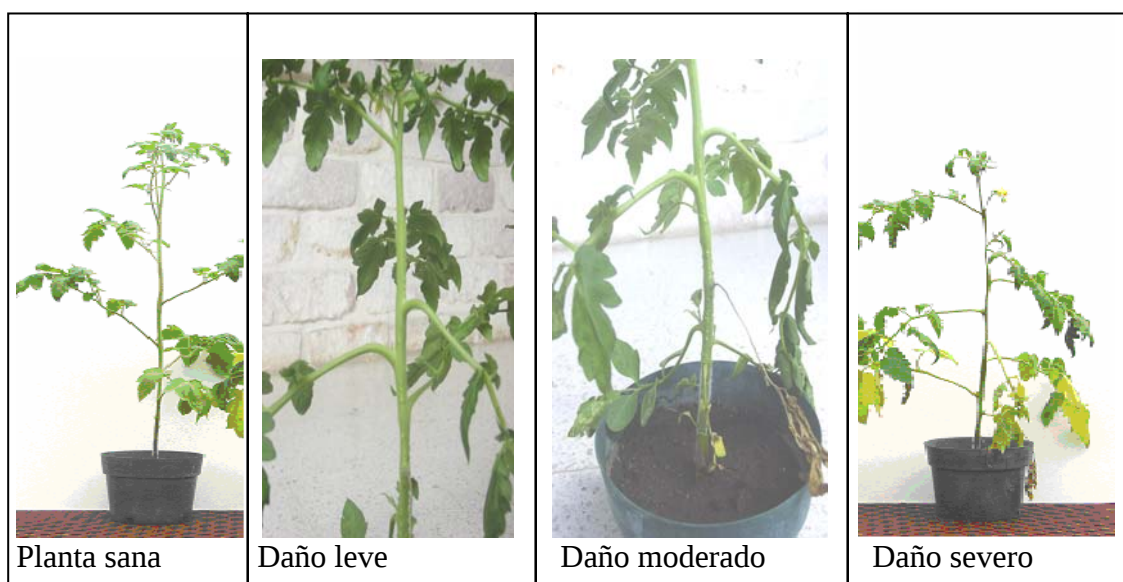


Figura 3. Síntomas de marchitez en plantas de tomate causada por *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Empezando desde la izquierda, planta sana, planta con daño leve, planta con daño moderado y planta con daño severo.

Se extrajeron las plantas con raíz del macetero, se eliminó la tierra adyacente a la raíz y se midieron las plantas desde la punta de la raíz principal hasta el brote apical. Seguidamente se hizo un corte longitudinal de la raíz, tallo y hojas de la planta, se identificaron las secciones del xilema necrosadas por la enfermedad y se las midió (cms) con el fin de confirmar la presencia de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

➤ **Porcentaje de colonización de micorriza arbuscular**

Se extrajeron 10 porciones de raíces secundarias de todas las plantas y una muestra homogénea de 100 g de suelo por tratamiento para el conteo de esporas. Se utilizó el método de tinción con azul de tripano al 0.05% para clarificar y teñir muestras de raíces (Figura 4). Se utilizó el protocolo de A. G. Jarstfer (Universidad de Florida) en el laboratorio de Biotecnología de Zamorano (Anexo 5).

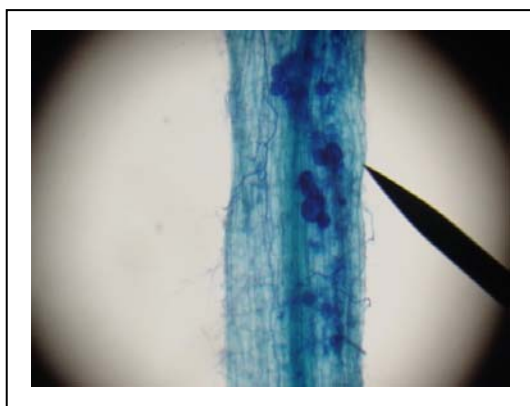


Figura 4. Vesículas de micorriza en raíces de tomate.

➤ **Prueba de presencia de *T. harzianum***

Se sumergieron las raíces de todos los tratamientos en agua destilada por 10 minutos. Seguidamente, con ayuda de un asa, se extrajo una muestra del contenido previamente agitado y se sembró en PDA.

EVALUACIÓN DEL MECANISMO DE INHIBICIÓN DE *T. harzianum* CONTRA *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (In vitro)

La evaluación de la inhibición de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* por *T. harzianum* se realizó en el laboratorio de Fitopatología de Zamorano. Para el aislamiento y cultivo de los hongos se mantuvo una asepsia proporcionada por mecheros Bunsen y alcohol al 70%. Los cultivos se mantuvieron a temperatura ambiente (22 °C).

Aislamiento de patógeno

Se realizó el aislamiento de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* de plantas de tomate anteriormente inoculadas con el patógeno. Se utilizó un medio de crecimiento artificial de PDA (Papa Dextrosa Agar).

Reproducción de *T. harzianum*

T. harzianum se resembró en PDA como medio de cultivo. La cepa madre fue proporcionada por el Laboratorio de Control Biológico de Zamorano.

Análisis microscópico para observar el mecanismo de inhibición

Para poder observar la interacción y así inferir en el mecanismo de inhibición entre *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* y *T. harzianum* se diseñó un arreglo especial de cámara húmeda (Figura 5). De esta manera se pudo tener un crecimiento continuo de los dos hongos. El diseño consistió en un plato petri provisto de papel filtro sobre el cual se colocó un soporte hecho con una varilla de vidrio doblado en forma triangular para separar un portaobjeto del papel filtro. En el portaobjeto se colocaron 1000 microlitros de PDA, se sembraron los dos hongos, en dos puntos separados uno del otro y seguidamente se colocó un cubreobjeto sobre el PDA, a los dos días se observó el crecimiento y la interacción entre los dos hongos. Para la observación se utilizó un microscopio de luz con magnificación de 40X y 100X.

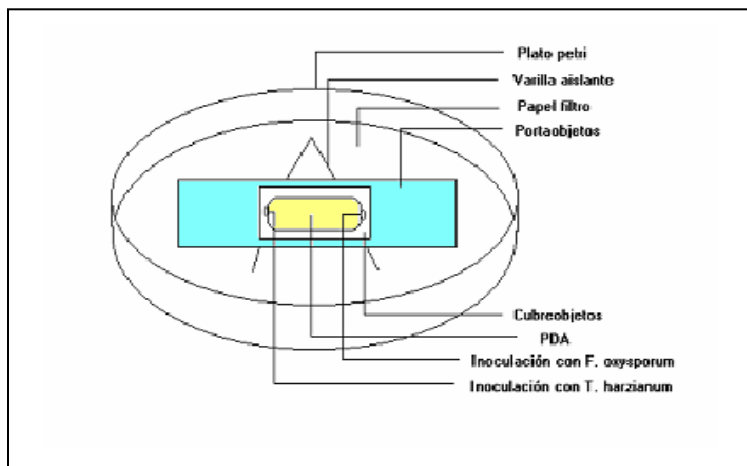


Figura 5. Diseño de cámara húmeda y medio de cultivo (PDA) para el estudio de mecanismos de inhibición de *T. harzianum* a *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Evaluación de la inhibición del crecimiento de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* mediante *T. harzianum*

Para medir el crecimiento se sembraron *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *T. harzianum* en un mismo plato petri provisto de PDA, se colocaron pequeñas dimensiones de los hongos a una distancia de 10 cm entre ellos y seguidamente se midió el crecimiento en cm^2 mediante una cuadrícula. La toma de datos fue hecha dos días después de la siembra y a partir de esto diariamente durante 5 días seguidos en horas de la tarde (4 – 5 PM).

En esta fase se observó la rapidez de crecimiento de los hongos y el mecanismo de interacción entre estos (Figura 6). Se utilizó un análisis de regresión lineal mediante el programa estadístico MINITAB®.



Figura 6. Evaluación del crecimiento de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *Trichoderma harzianum*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PRUEBA DE PATOGENICIDAD

Se identificaron la morfología y las estructuras características del hongo *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Las plantas inoculadas con el patógeno mostraron síntomas leves de marchitez y el reaislamiento del patógeno confirmó la presencia de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

INTERACCIÓN DE *T. harzianum* y MICORRIZA (VAM) EN PLANTAS INOCULADAS CON *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* EN CONDICIONES CONTROLADAS EN LA CASA MALLA

En esta etapa del experimento se analizaron los cambios fisiológicos que sufre la planta al ser infectada por el patógeno.

Se tuvieron dos problemas o alteraciones en el ensayo: primero, la cantidad de luz y temperatura en la casa malla no fueron uniformes para todas las plantas ya que a su alrededor se encuentra una barrera viva que obstaculizó la entrada de luz en las primeras dos semanas después del trasplante a las plantas no inoculadas por el patógeno, además un tercio del techo estaba cubierto parcialmente por plástico sin sarán, lo que aumentó la temperatura en la casa malla en horas del medio día (28 - 30 °C). Segundo, se tuvo la presencia de mosca blanca que ocasionó la infección de virus en algunas plantas.

No se tomaron en cuenta estos factores de variabilidad de condiciones ambientales al momento de plantear el diseño estadístico, que como se verá dentro de las recomendaciones no es el mejor para este tipo de análisis. Todas las variables que se analizan a continuación se pueden observar en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Separación de medias de los tratamientos inoculados y no inoculados con *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* en plantas de tomate. El Zamorano, Honduras. 2003.

Tratamientos	Severidad (escala)	Hojas dobladadas (%)	Hojas cloróticas (%)	Hojas marchitas (%)	Hojas muertas (%)	Número de hojas
No inoculados con <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	0.60 a*	1.92 a	10.32 a	3.20 a	1.21 a	12.67 a
Inoculados con <i>F.</i> <i>oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	1.23 b	11.12 b	14.00 b	5.24 b	11.17 b	13.64 a

* Letras iguales no presentan diferencias significativas bajo la prueba Tukey (P<0.10)

Severidad

Se observó diferencia entre las plantas que se inocularon con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y las plantas que no lo fueron.

Entre los tratamientos que se aplicaron a las plantas inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* no se observaron diferencias, esto se atribuye a que la variable de severidad fue considerada como la conjunción de las variables que se mencionarán posteriormente, por lo tanto, factores que se presentaron en la ejecución del ensayo como falta de fertilización adecuada, diferente grado de luz y presencia de virus pueden alterar o enmascarar los valores obtenidos. Para evitar este inconveniente, se recomienda realizar un diseño de bloques completamente al azar, el mismo que disminuirá el grado de error provocado por la desuniformidad de las condiciones en la casa malla.

Porcentaje de doblez en las hojas

Se observó diferencia significativa entre tratamientos inoculados y no inoculados con el patógeno, además se presentaron diferencias entre el testigo enfermo y los tratamientos de Mycoral[®], Trichozam[®] y la combinación de estos dos productos (Cuadro 3). Esta diferencia nos demuestra que las plantas del testigo enfermo presentaron el mayor porcentaje de doblez en las hojas. Se determina entonces que el síntoma de doblez es el que caracterizó mayormente la presencia de la enfermedad en este estudio al comparar los resultados del testigo enfermo con los del testigo sano.

Cuadro 3. Análisis del síntoma de doblez de las hojas causado por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* en plantas de tomate. El Zamorano, Honduras. 2003.

Trat No.	Presencia de <i>F. oxysporum</i>	Tratamiento	Hojas con doblez
T1	Si	Testigo Enfermo	20.4 a*
T2	Si	MYCORAL [®]	7.5 b
T3	Si	TRICHOZAM [®]	7.8 b
T4	Si	MYCORAL [®] + TRICHOZAM [®]	8.6 b
T5	No	Testigo Sano	0.0 b
T6	No	MYCORAL [®]	0.0 b
T7	No	TRICHOZAM [®]	3.6 b
T8	No	MYCORAL [®] + TRICHOZAM [®]	4.0 b

* Letras iguales no presentan diferencias significativas bajo la prueba Tukey (P<0.10).

Los tratamientos T2, T3 y T4, todos con inoculación de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* no presentaron diferencia entre ellos, pero si fueron diferentes al testigo enfermo, lo que nos demuestra que tanto Mycoral[®], como Trichozam[®] ejercen control sobre el patógeno. Además estos tratamientos (T2, T3 y T4) se desempeñaron de la misma manera que los tratamientos no inoculados.

Estos resultados se atribuyen a que Mycoral[®] contiene tres aislamientos de micorriza (*Glomus*, *Acaulospora* y *Entrophospora*) que hacen que la planta sea más vigorosa, y por lo tanto más resistente al ataque de patógenos; por otro lado, micorriza se coloca en puntos específicos de la planta donde por lo general se inserta el patógeno (principio de llave y cerradura) impidiendo así la infección del patógeno (Raddatz, 2001).

Trichozam[®] por su parte también ejerció cierto tipo de control sobre el patógeno, ratificándose así sus propiedades de antagonista (Stefanova, 1999).

No se pudieron determinar diferencias entre los tratamientos de Mycoral[®], Trichozam[®] y la interacción de éstos, esto se atribuye a que tanto micorriza como *T. harzianum* a pesar de que ejercieron algún tipo de control, no tuvieron el tiempo necesario para establecerse correctamente. Para evitar este error se debe realizar primero la inoculación con los productos al pilón de las plantas y después de 3 días realizar la inoculación del patógeno

en el suelo, así los productos tendrán tiempo de establecerse en la raíz y se podrá diferenciar su desempeño individualmente¹.

Porcentaje de clorosis de las hojas

Se presentó diferencia significativa entre los tratamientos inoculados y no inoculados con el patógeno. Los tratamientos que presentaron mayor porcentaje de hojas cloróticas fueron los tratamientos inoculados.

Según Jones (1997), el primer síntoma que se detecta en la enfermedad del marchitamiento vascular es el amarillamiento unilateral de las hojas viejas; en este experimento, no se pudo diferenciar claramente este síntoma en particular, por lo cual, se tomó en cuenta el amarillamiento total de las hojas, el mismo que se adjudica a la falta de fertilización adecuada.

Como se mencionó anteriormente, micorriza y *T. harzianum* no tuvieron el tiempo necesario para su establecimiento adecuado, es por eso que no se observan diferencias entre los tratamientos con estos productos.

Porcentaje de hojas marchitas

Se presentaron diferencias entre los tratamientos inoculados y no inoculados con el patógeno. Vale la pena recalcar, que como se mencionó anteriormente, la casa malla no contó con condiciones uniformes de luz y temperatura. En éste caso, las plantas con los tratamientos inoculados con el patógeno estuvieron expuestas a altas temperaturas y cantidad de luz, a diferencia de los tratamientos no inoculados, es por esto que, el porcentaje de hojas marchitas no se atribuye mayormente a la presencia del patógeno, sino a la diferencia de condiciones que tuvieron los tratamientos. Se reitera que para este tipo de ensayos es conveniente realizar un diseño de bloques completamente al azar para eliminar en su mayoría en efecto de la desuniformidad de condiciones de la casa malla.

Porcentaje de hojas muertas

Se observaron diferencias entre los tratamientos inoculados con el patógeno y los tratamientos no inoculados. Como se mencionó en el análisis de la variable anterior, esto pudo darse por la diferencia de condiciones en la casa malla; de igual manera, no se presentaron diferencias entre los tratamientos de Mycoral[®], Trichozam[®] y la interacción de éstos debido a la falta de tiempo para el establecimiento adecuado de los hongos.

Número de hojas por planta

Para esta variable, no se observó diferencia significativa entre los resultados promedios de los tratamientos inoculados y no inoculados con el patógeno (Cuadro 3), pero sí se observó diferencia entre el tratamiento T4 (*F. oxysporum* + Mycoral[®] + Trichozam[®]) que presentó mayor número de hojas, con el tratamiento T8 (Sano +Mycoral[®] + Trichozam[®]) que las presentó en menor número (Cuadro 4).

¹ Raddatz, E. 2003. Establecimiento de micorriza (Entrevista). El Zamorano, Honduras.

Cuadro 4. Análisis del número de hojas de plantas de tomate inoculadas y no inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. El Zamorano, Honduras. 2003.

Tratamiento No.	Presencia de <i>F. oxysporum</i>	Tratamiento	No. Hojas
T1	Si	Testigo Enfermo	12.2 ab*
T2	Si	MYCORAL [®]	14.4 ab
T3	Si	TRICHOZAM [®]	12.7 ab
T4	Si	MYCORAL [®] + TRICHOZAM [®]	15.1 a
T5	No	Testigo Sano	13.4 ab
T6	No	MYCORAL [®]	12.7 ab
T7	No	TRICHOZAM [®]	13.0 ab
T8	No	MYCORAL [®] + TRICHOZAM [®]	11.5 b

* Letras iguales no presentan diferencias significativas bajo la prueba Tukey (P<0.10)

Este resultado no fue lo que se esperaba, pero pudo deberse a que la cepa del patógeno no fue tan virulenta como se creía y no infectó la planta de tal forma que esta variable fuese afectada. Esta hipótesis se basa también en que el testigo enfermo no presentó síntomas severos en la mayoría de las variables analizadas (Cuadro 5).

Cuadro 5. Resultados promedios de las variables que se analizaron en el bioensayo. El Zamorano, Honduras. 2003.

Trat No.	<i>F. oxysporum</i>	Tratamiento	No. Hojas	Hojas Cloróticas (%)	Hojas Marchitadas (%)	Hojas Muertas (%)	Hojas Doble (%)	Severidad (Escala)
T1	Si	Testigo Enfermo	12.2	9.6	6.9	12.8	20.4	1.38
T2	Si	MYCORAL [®]	14.4	12.1	3.2	7.6	7.5	0.98
T3	Si	TRICHOZAM [®]	12.7	17.2	3.3	11.2	7.8	1.15
T4	Si	MYCORAL [®] + TRICHOZAM [®]	15.1	16.2	7.4	12.9	8.6	1.41
T5	No	Testigo Sano	13.4	10.1	5.1	0.0	0.0	0.54
T6	No	MYCORAL [®]	12.7	9.6	4.0	1.1	0.0	0.51
T7	No	TRICHOZAM [®]	13.0	10.3	2.3	3.6	3.6	0.71
T8	No	MYCORAL [®] + TRICHOZAM [®]	11.5	11.2	1.1	0.0	4.0	0.64

Algunas cepas de patógenos pierden virulencia con el tiempo, debido al almacenamiento pronunciado y condiciones de almacenamiento no aptas, hay que tomar en cuenta que la cepa de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* se encontraba almacenada por lo menos 6 meses antes de la inoculación a una temperatura de 4 °C en medio de cultivo de PDA, se asume que durante este tiempo, el patógeno perdió cierto grado de virulencia ya que no se expresaron los síntomas de marchitez a nivel severo.

Porcentaje de colonización de micorriza

Mediante la implementación del protocolo de tinción con azul de tripano al 0.05%, se pudo observar el porcentaje de infección de la micorriza en raíces de las plantas de tomate que fueron expuestas a los tratamientos en los que intervino la micorriza, también se utilizaron los testigos absolutos (sin micorriza) para verificar cualquier caso de contaminación (Cuadro 6).

Para las plantas no inoculadas (Testigos Absolutos) con micorriza no se tuvo ninguna infección, confirmando así que no existió contaminación de micorriza en los tratamientos.

Las plantas que crecieron en suelo infestado de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* que sí fueron inoculadas con la micorriza presentaron una diferencia significativa entre el tratamiento T2 (*F. oxysporum* + micorriza) y T4 (*F. oxysporum* + micorriza + *T. harzianum*). El mayor porcentaje de infección de micorriza se presentó en el tratamiento T2 seguido del tratamiento T4.

En el caso de las plantas que crecieron en suelos libres del patógeno *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, los tratamientos T6 (Sano + micorriza) y T8 (Sano + micorriza + *T. harzianum*) obtuvieron diferencias entre los ellos, presentando un porcentaje mayor de infección de micorriza el tratamiento T8 seguido del tratamiento T6.

Cuadro 6. Porcentaje de infección de micorriza en plantas de tomate. El Zamorano, Honduras. 2003.

No.	<i>F. oxysporum</i>	Tratamiento	Infección (%)
T1	Si	Testigo Absoluto	0 c
T2	Si	MYCORAL®	96 a
T4	Si	MYCORAL® + TRICHOZAM®	26 b
T5	No	Testigo Absoluto	0 c
T6	No	MYCORAL®	52 b
T8	No	MYCORAL® + TRICHOZAM®	85 a

* Letras iguales no presentan diferencias significativas bajo la prueba Tukey (P<0.10)

Los tratamientos que no tuvieron diferencia y con mayor porcentaje de infección de micorriza fueron el T2 y T8, que se puede atribuir a la competencia que tuvo micorriza por los exudados de las plantas y que estuvo representada ya sea por *F. oxysporum* ó por *T. harzianum*, pero no los dos a la vez, para los dos casos micorriza prevaleció sobre éstos.

Tampoco tuvieron diferencia significativa los tratamientos T4 y T6, para el caso de T4 el porcentaje de infección es menor debido a que presenta dos competidores, el patógeno y *T. harzianum* juntos, aquí la competencia por exudados de las plantas es alta y es por esto que el porcentaje de infección de micorriza se ve afectado. En el tratamiento T6 se asume que la inoculación de micorriza no fue realizada correctamente, debido a que, que por lo general se espera que en este ambiente libre de patógenos o agentes extraños el establecimientos de micorriza sea mayor (Raddatz, 2001).

Detección de presencia de *T. harzianum*

Se detectó la presencia de *T. harzianum* en los tratamientos que fueron inoculados con este hongo. Se obtuvo un crecimiento abundante en medio de cultivo artificial de PDA.

EVALUACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO DE *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* MEDIANTE *T. harzianum*.

Se evaluaron los datos mediante un análisis de regresión que produjo dos ecuaciones, las mismas que indican las velocidades de crecimiento de los dos hongos en un medio artificial de crecimiento como PDA (Figura 7).

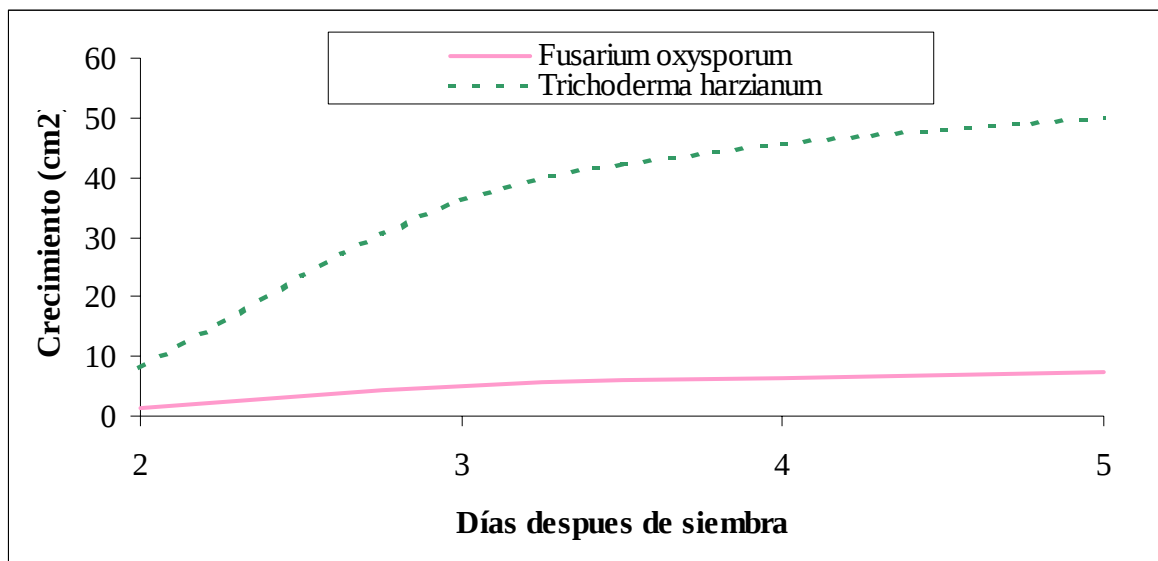


Figura 7. Curva de crecimiento de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *T. harzianum* en competencia

Crecimiento de *T. harzianum* = $-78.0029 + 55.3779 (\text{días}) - 5.99023 (\text{días}^2)$
 $(r^2 = 0.95; P < 0.001)$

Crecimiento de *F. oxysporum* = $-8.99305 + 6.58486 (\text{días}) - 0.667955 (\text{días}^2)$
 $(r^2 = 0.86; P < 0.001)$

Donde días = número de días de haberse inoculado en PDA.

Se observó un crecimiento más rápido y agresivo en *T. harzianum* a diferencia que *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Esto se debe a que *T. harzianum* tiene un tiempo corto de esporulación y aprovecha mejor los nutrientes que *F. oxysporum*. La combinación de pequeñas cantidades de antibióticos y enzimas líticas de *Trichoderma* inhiben la germinación de esporas y elongación del tubo germinal del hongo huésped (Herrera – Estrella, 1998). Además, cuando *T. harzianum* se pone en contacto con hifas de otro organismo susceptible, tiende a segregar sustancias supresoras de crecimiento, que hacen que el otro organismo detenga su crecimiento (Herrera – Estrella, 1998).

A pesar de que *F. oxysporum* es también un hongo agresivo, no tiene la capacidad para igualar y mucho menos superar la velocidad de crecimiento de *T. harzianum*.

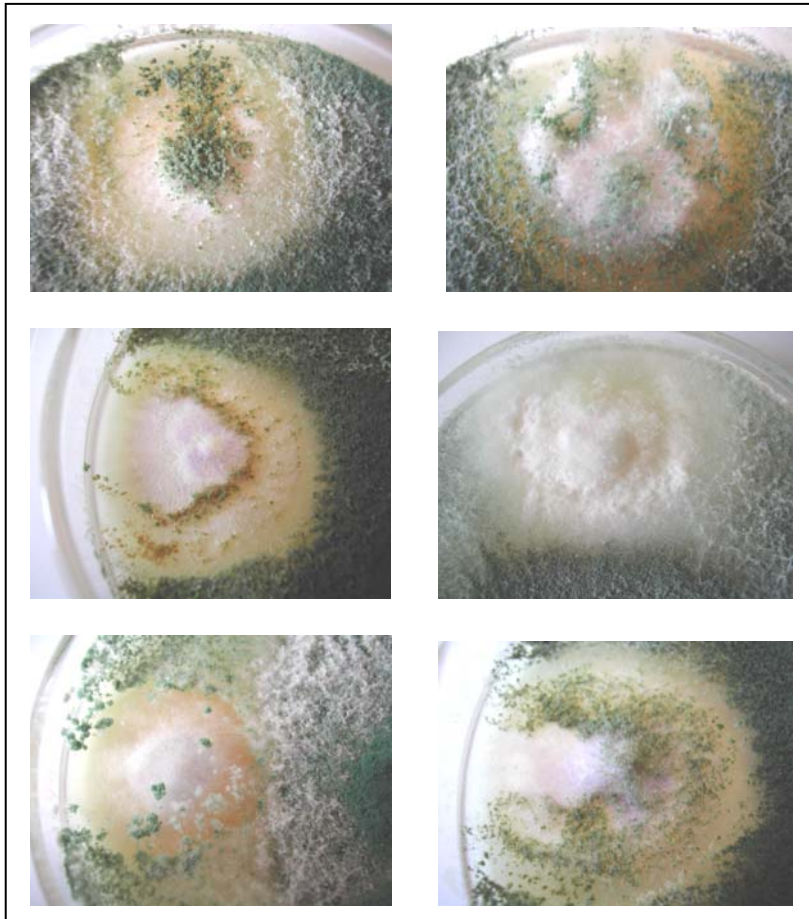


Figura 8. Inhibición del crecimiento de *T. harzianum* (verde) sobre *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (rosado) después de 14 días de sembrados en PDA para distintas repeticiones del ensayo.

Mecanismos de inhibición

Se observó que *T. harzianum* tiene una mayor capacidad para invadir el medio artificial de crecimiento (PDA) con relación a *F. oxysporum*.

Microscópicamente, se pudo observar que *T. harzianum* esporula primero y con mayor cantidad de esporas que *F. oxysporum*, y que las esporas de *T. harzianum* tienen afinidad a las esporas e hifas del patógeno. Se observó la tendencia a colocarse en hileras rodeando las esporas y las hifas (Figura 9). Posteriormente, la espora germina y produce hifas, que crecen rápidamente y se enrollan alrededor de la hifa del patógeno ofreciendo un bloqueo tanto en espacio como en nutrientes para *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

En estudios realizados mediante microscopía electrónica por Herrera – Estrella en 1998, se afirma que este enrollamiento ocurre por medio de estructuras en forma de apresorios, que ayudan a la penetración de las hifas del patógeno..

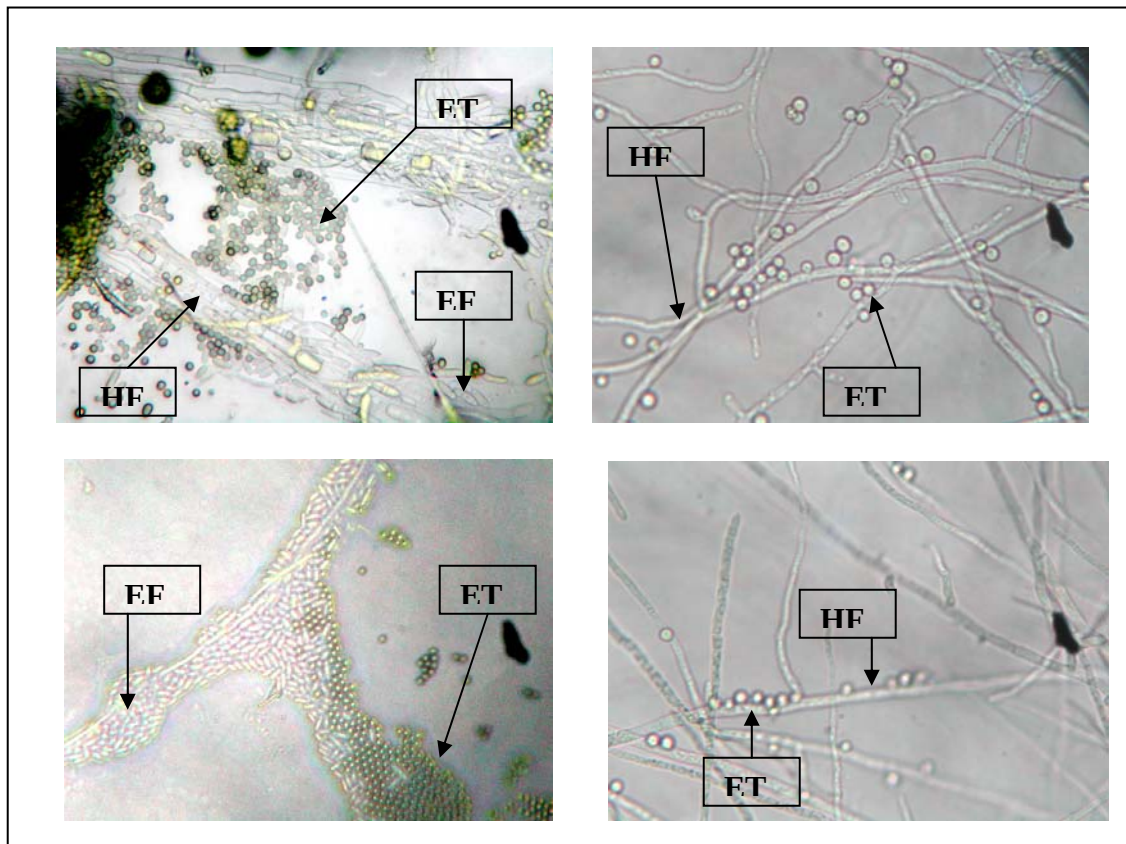


Figura 9. Esporas de *T. harzianum* alineándose junto a hifas y esporas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*

ET: Esporas de *T. harzianum*

EF: Esporas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*

HF: Hifas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Se pudo observar que las esporas de *T. harzianum* tienen cierto tipo de energía kinética que les permite desplazarse de un lugar a otro. Esto apoya la teoría en la que se afirma que *T. harzianum* posee un crecimiento quimiotrópico hacia su huésped (Herrera - Estrella, 1998).

CONCLUSIONES

1. La virulencia de la cepa de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* se disminuyó en el proceso de reaislamiento posiblemente por el almacenamiento prolongado de la cepa en refrigeración.
2. A pesar de la falta de virulencia del patógeno, se tuvieron síntomas ligeros de la enfermedad producida por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* en plantas de tomate.
3. El doblez de las hojas resultó ser el síntoma de mejor apreciación para la enfermedad de la marchitez vascular en tomate.
4. La interacción entre Mycoral[®] y Trichozam[®] controló la enfermedad de marchitez vascular del tomate en igual grado que Mycoral[®] y Trichozam[®] por separado.
5. Micorriza infecta las raíces en mayor cantidad que *T. harzianum* y *F. oxysporum*, pero en conjunto *T. harzianum* y *F. oxysporum* dificultan la infección de micorriza.
6. *T. harzianum* tiene un crecimiento más rápido que *F. oxysporum* en medio artificial de crecimiento de PDA.
7. *T. harzianum* ofrece un bloqueo mecánico para el crecimiento de *F. oxysporum*.
8. Las esporas de *T. harzianum* tiene cierto tipo de energía kinética que les permite movilizarse en PDA.

RECOMENDACIONES

1. Realizar pruebas de campo similares a las realizadas en la casa malla.
2. Para las pruebas en el campo, donde no es posible la inoculación por el patógeno, realizar pruebas que confirmen su presencia.
3. Evaluar los tratamientos con una cepa de *F. oxysporum* con una fuerte virulencia comprobada para observar claramente los síntomas de la enfermedad.
4. Establecer un sistema de almacenamiento y reactivación del patógeno que disminuya la pérdida de virulencia.
5. Adecuar la casa malla para estandarizar las condiciones para todo el espacio.
6. Utilizar el diseño de bloques completamente al azar para eliminar el error experimental.
7. Utilizar mayor número de repeticiones por tratamiento para disminuir el error experimental.
8. Realizar pruebas para comprobar presencia de *F. oxysporum* en el suelo.
9. Utilizar técnicas bioquímicas para identificar sustancias producidas por *T. harzianum*.

BIBLIOGRAFÍA

Alarcón, A.; Ferrera-Cerrato, R. 1999. Manejo de la micorriza arbuscular en sistemas de propagación de plantas frutícolas (en línea). Consultado 2 agosto 2003. Disponible en <http://www.chapingo.mx/terra/contenido/17/3/art179-190.pdf>

Domínguez, R.; Vega, K. 2003. Ensayo de validación de Mycoral (Micorriza vesículo Arbuscular) en yuca con agricultores de Honduras (en línea). Consultado 2 agosto 2003. Disponible en http://rds.org.hn/miembros/cidicco/ensayo_de_validacion_de_mycoral.htm

Gonzáles, P. 2003. Enfermedades del tomate. Marchitamiento vascular del tomate (en línea). Facultad de agronomía / Unidad de Fitoopatología. Montevideo. Uruguay. Consultado 10 agosto 2003. Disponible en http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/enfermedades/fusarium_tom.html

Herrera – Estrella, A. 1998. Control Biológico (Avance y Perspectiva). Asociación Nacional de Universidades e Instituciones de Educación Superior (ANUIES). México. Consultado 15 octubre 2003. Disponible en <http://www.hemerodigital.unam.mx/ANUIES>

Jarstfer, A. G. 1970. Método para clarificar y teñir muestras de raíces. University of Florida, Soil Science Department, 2171 McCarty Hall, Gainesville, FL 32611-0151 USA.

Lardizábal, R. 2002. El uso de Trichoderma spp. Boletín Técnico de Producción No. 30. Centro de Desarrollo de Agronegocios. 4p.

Jones, J. B. 1997. Compendium of Tomato Diseases. 3 ed. United States of America. APS Press. 73 p.

Raddatz, E. 2001. VAM, y la resistencia de las plantas contra causantes de daños. Cali. Colombia, 52 p.

Stefanova, M. 1999. Producción y aplicación de Trichoderma spp como antagonista de hongos fitopatógenos (en línea). Laboratorio de Bacteriología. La Habana. Cuba. Consultado 23 de enero 2003. Disponible en <http://www.aguascaliente.gob.mx/agro/produce/TRICHODE.htm>

Stefanova, M.; Leiva, A.; Larrinaga, L.; Coronado, M. F. 1999. Actividad metabólica de cepas de Trichoderma spp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo (en línea). Departamento de Microbiología. Cuba. Consultado 23 de enero de 2003. Disponible en http://www.redpav-fpolar.info.ve/fagroluz/v16_5/v165z006.html

Toruño, G. 1999. Control de *Fusarium oxysporum* en semilleros de repollo en la localidad de Mirafior, Estelí, Nicaragua, mediante el uso de solarización y encalamiento como tratamientos alternativos al uso de agroquímicos. Tesis, Zamorano, Honduras. 35p.

ANEXOS

Anexo 1. Conteo de esporas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Materiales

Hemocitómetro, pipetas de 1 ml de capacidad, suspensión de esporas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Procedimiento

El hemacitómetro es una pieza de vidrio en forma de H en el centro con dos cámaras de conteo. El fondo de cada una de las cámaras tiene un rayado de 9 mm dividido en 9 cuadrados principales de 1 mm por cada lado. El mm² del centro está dividido en 25 grupos de 16 cuadrados pequeños; cada grupo está separado por líneas triples. La superficie reticular se encuentra a 0.1 mm debajo del cubreobjetos, por lo tanto, el volumen del líquido sobre 1 mm² es de 0.1 mm³.

Coloque el entreobjetos limpio sobre la cámara de conteo de tal manera que llegue a estar en contacto con los altorrelieves de la cámara. Con la ayuda de una pipeta deposite una gota de la suspensión de esporas en el margen del cubreobjetos. La gota se deslizará rápidamente entre el cubreobjetos y el área reticular del portaobjetos. Permita que se asienten las esporas durante 1 0 2 minutos y observe la distribución de las esporas. Estas deben estar uniformemente distribuidas por todos los cuadrados de la cámara. Se puede emplear Tween 80 (0.02%) o cualquier otro dispersante para mejorar la distribución de las esporas.

Generalmente, las esporas pequeñas se cuentan en el mm² central, el cual está compuesto de 25 grupos de 16 cuadrados pequeños. Cada uno de estos grupos mide 0.04 mm². Cuente el número de esporas en los 4 grupos de las esquinas y el central. Sume el total de esporas en los 5 grupos y calcule el número de esporas/ml de la siguiente manera:

$$0.2 \text{ mm} \times 0.2 \text{ mm} \times 0.1 \text{ mm} = 0.004 \text{ mm}^3$$

$$X = \frac{E}{5} \times \frac{1}{0.004}$$

x = E x 50 en donde X = No. de esporas / mm³

E = Esporas en los 5 cuadrados de 0.04 mm².

Las esporas grandes se cuentan en 5 cuadrados principales de 1 mm de lado: los cuatro de las esquinas el central. Cada cuadrado mide 1 mm². Cuente el número de esporas en los 4 cuadrados de las esquinas y el central. Sume el total de esporas en los 5 cuadrados y calcule el número de esporas/ ml de la siguiente forma:

$$1\text{mm} \times 1\text{mm} \times 0.01 \text{ mm} = 0.1 \text{ mm}^3.$$

$$X = \frac{E}{5} \times \frac{1}{0.1}$$

$$X = E \times 2 \text{ en donde, } \begin{array}{l} X = \text{No. de esporas/mm}^3 \\ E = \text{Esporas en los 5 cuadrados de 1 mm}^2. \end{array}$$

$$1 \text{ ml (cc)} = 1000 \text{ mm}^3$$

$$X = E \times 2 \times 1000$$

$$X = E \times 2000 \text{ en donde, } \begin{array}{l} X = \text{No. de esporas/ml} \\ E = \text{Esporas en los 5 cuadrados de 1mm}^2. \end{array}$$

Castaño – Zapata, J. 1986. Prácticas de Laboratorio de Fitopatología. Departamento de Protección Vegetal. Escuela Agrícola Panamericana. Zamorano, Honduras. 46 p.

Anexo 2. Arreglo espacial de tratamientos en casa malla.



Anexo 3. Análisis de suelo utilizado en el bioensayo.

SOLICITANTE: MARIA ISABEL CORDOVA INSTITUCION: E.A.P. LOCALIZACION: Aldea Municipio DE LA MUESTRA: ZAMORANO DEPARTAMENTO: FCO. MORAZAN CULTIVO A SEMBRAR: RECOMENDACION: Si No X															RESULTADO DE ANALISIS DE SUELOS Fecha de entrada: 6/06/2003 Fecha de salida: 11/06/2003									
Solucion extractora Mehlich 3: P, K, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn, Zn																								
# Lab.	Muestra	Textura	% Arena	% Limo	% Arcilla	pH (H ₂ O)	% M.O.	% N _{total}	ppm (Extractable)															
									P	K	Ca	Mg	S	Cu	Fe	Mn	Zn	B						
1173	Suelo esterilizado para tomate					6.59	4.96	0.25	610	786	3320	350												

Responsable: 

Anexo 4. Distribución de tratamientos con y sin inóculo de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. El Zamorano, Honduras. 2003.

Tratamiento	Inóculo <i>F. oxysporum</i>													
	Con							Sin						
Testigo absoluto	T1	T1	T1	T1	T1	T1	T1	T5	T5	T5	T5	T5	T5	T5
Mycoral [®]	T2	T2	T2	T2	T2	T2	T2	T6	T6	T6	T6	T6	T6	T6
Trichozam [®]	T3	T3	T3	T3	T3	T3	T3	T7	T7	T7	T7	T7	T7	T7
Mycoral [®] x Trichozam [®]	T4	T4	T4	T4	T4	T4	T4	T8	T8	T8	T8	T8	T8	T8

Anexo 5. Método para clarificar y teñir muestras de raíces

SUGERENCIAS:

- A. Utilizar equipo apropiado para mayor seguridad y protección personal (anteojos, guantes y delantal).
- B. Utilizar “cassettes” plásticos (denso polymer tissue “cassettes” de Fisher Scientific) para retener las muestras de raíces.
- C. Todas las etapas que incluyan calentamiento de químicos deben ser manejadas y supervisadas cuidadosamente.
- D. Lea cuidadosamente todas las instrucciones antes de empezar el proceso.

PROCEDIMIENTO DE CLARIFICACIÓN:

1. Preparar los “cassettes” con muestras de raíces y manténgalos en agua hasta que todo esté listo para iniciar el proceso.
2. En un “beaker” vierta una solución de KOH al 10% de modo que cubra todos los cassettes.
3. Caliente el KOH hasta 80 °C de temperatura.
4. Coloque los cassettes en el KOH caliente durante:
 - 15 minutos para cebolla y otras raíces tiernas,
 - 30 minutos para la mayoría de raíces (p.e. maíz, gramíneas)
5. Lave con agua cinco veces.

NOTA: Si las muestras de raíces tienen pigmentos oscuros (p.e. cafés, negros, morados) después de clarificarlas con KOH, coloque los cassettes en un beaker con 30% de agua oxigenada a temperatura ambiente (10 minutos a < 50 °C) hasta que las muestras se aclaren. Revíselas constantemente para evitar daños en las estructuras de las raíces. Enjuague cinco veces con agua y proceda. En caso de no tener agua oxigenada, cubra los cassettes con HCl (5.0 ml) y agua (200 ml). Mezcle y desagüe bien. Repítalo otra vez (**no enjuague los cassettes con agua**).

PROCEDIMIENTO DE TINCIÓN:

1. En un beaker, vierta suficiente cantidad de Azul de Tripiano (0.05%) para cubrir los cassettes.
2. Caliente el tinte azul sin los cassettes hasta 80 °C de temperatura.
3. Coloque los cassettes en el tinte caliente y mantenga la temperatura en 80 °C. Después de 30 minutos, deje enfriar hasta que la temperatura sea menor de 50 °C; luego filtre el tinte para remover pedazos de raíces y almacenarlo bajo refrigeración en un frasco. Enjuague los cassettes una sola vez con agua.
4. En una placa, monte varias raíces para su observación y cúbralas con el cubreobjetos presionando levemente. Las raíces se deben manipular con pinza y guantes ya que el tinte es cancerígeno. En caso de no visualizar claramente las estructuras del hongo, coloque las raíces en un plato petri para enjuagarlas y luego observe.

5. Si no se van a analizar las muestra el mismo día, colóquelas en el refrigerador en una bolsa plástica etiquetada.

PREPARACIÓN DEL TINTE AZUL DE TRIPANO (0.05%)

En un frasco, añada y mezcle constantemente los siguiente ingredientes en el siguiente orden:

- 1) 800 ml glicerina
- 2) 800 ml ácido láctico
- 3) 800 ml agua destilada
- 4) 1.2 g del tinte Azul de Tripano

Método por:

JARSTFER, A.G. 1970. University of Florida, Soil Science Department, 2171 McCarty Hall, Gainesville, FL 32611-0151 USA.

CUIDADOS:

- o Entre cada muestra, lave los tamices con agua a presión para evitar contaminación. En caso de ser necesario, use jabón.
- o Las esporas pueden ser contadas fácilmente en un plato petri dividido en cuadrículas.
- o Recupere las raíces recolectadas en el tamiz más grande para observar los propágulos del hongo y / o el grado de colonización.
- o Normalmente se usa el tamiz de 425 micrones para recolectar esporas de tamaños desconocidos provenientes de muestras del campo.

El KOH y el Azul de Tripano pueden ser reutilizados