

**EFFECTO DE *Hypocrea lixii* SOBRE EL TIZÓN TEMPRANO DEL TOMATE
Alternaria solani EN CONDICIONES DE INVERNADERO**

Nelka Tandazo-Falquez

¹Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Guayaquil. Cda. Universitaria
"Salvador Allende", Malecón del Salado entre Av. Delta y Av. Kennedy;
nelka.tandazof@ug.edu.ec; martha.morag@ug.edu.ec;
fulton.lopezb@ug.edu.ec.

Roberto Coello-Peralta

²Coordinación de Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y
Zootecnia, Universidad de Guayaquil, Km 27 ½ vía a Daule, Ecuador.
rdcoello1218@hotmail.com

Martha Mora-Gutiérrez

Fulton López Bermudez¹.

Espirales revista multidisciplinaria de investigación
ISSN: 2550-6862
Vol. 2 No. 14
Marzo 2018

RESUMEN

El tizón temprano del tomate o alternariosis, es causada por *Alternaria solani*. El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto de *Hypocrea lixii* sobre el tizón temprano del tomate causada por *Alternaria solani*, en condiciones de invernadero, la misma que se desarrolló entre el mes de octubre del 2014 a mayo del 2015.

El presente estudio, tuvo cinco tratamientos por cada experimento es decir de dosis y frecuencias, se utilizó un diseño completamente aleatorio (DCA) con 10 unidades experimentales. Los tratamientos del estudio de dosis fueron: 1×10^6 , 1×10^8 y 1×10^{10} conidios por ml y cinco frecuencias de aplicación. 10, 15, 20, 28 y 44 días después de trasplante; en ambos ensayos se incluyeron dos testigos uno absoluto y uno químico; además, se registraron datos de incidencia y severidad de la enfermedad mediante la escala de 0 a 5 grados, donde 0= sin síntomas y 5= más del 50% del área foliar manchada.

Se determinó que la dosis de 1×10^{10} de *Hypocrea lixii* fue la de menor incidencia de daños por *Alternaria solani* con 5,8%; la frecuencia con menor porcentaje de plantas afectadas fue cada 20 días.

Palabras clave: *Alternaria solani*, *Hypocrea lixii*, antagonismo

ABSTRACT

The early blight of the tomato or alternariosis, is caused by *Alternaria solani*. The objective of this research was to determine the effect of *Hypocrea lixii* on early tomato blight caused by *Alternaria solani*, under greenhouse conditions, the same that was developed between the month of October 2014 to May 2015.

The present study, had five treatments for each experiment that is to say of doses and frequencies, a completely randomized design (DCA) with 10 experimental units was used. The treatments of the dose study were: 1×10^6 , 1×10^8 and 1×10^{10} conidia per ml and five application frequencies. 10, 15, 20, 28 and 44 days after transplant; in both trials two absolute and one chemical controls were included; In addition, data on incidence and severity of the disease were recorded using the scale of 0 to 5 degrees, where 0 = no symptoms and 5 = more than 50% of the stained leaf area.

It was determined that the dose of 1×10^{10} of *Hypocrea lixii* was the lowest incidence of damage by *Alternaria solani* with 5.8%; the frequency with the lowest percentage of affected plants was every 20 days.

Key words: *Alternaria solani*, *Hypocrea lixii*, antagonism

I. INTRODUCCIÓN

El tomate *Lycopersicon esculentum* Mill es una planta solanácea de origen americano, se considera oriundo de Ecuador, Perú y la zona norte de Chile. Su consumo es mundial, en cuanto a los países que lo cultivan son la Unión Europea y Estados Unidos, que proviene al margen de la producción local de países vecinos como México y Canadá. En América los principales productores son: Brasil (35.08%), México (22.5%) y Argentina (11.7%), mientras que los que suministran a la Unión Europea son: España, Holanda (comercio intracomunitario) y Marruecos. (MAGAP, 2012)

En Ecuador, es cultivado en las provincias de Manabí, Guayas, Santa Elena, en la región Costa; en Chimborazo, Tungurahua, Pichincha, Carchi en la Sierra, en baja escala en el Oriente y Galápagos. En el país durante el año 2010 se cultivaron 297 hectáreas con esta especie, de las cuales se cosecharon 264 y produjeron 5.034 toneladas métricas (TM) de fruta fresca, con un rendimiento promedio de 17,71 TM/ha, (MAGAP-SIGAGRO, 2011).

El cultivo de tomate es muy afectado por una serie de microorganismos como virus, bacterias, hongos, entre otros. Siendo los

hongos los que más problemas ocasionan, por lo que los agricultores recurren al uso de productos químicos que contribuyen al aumento en los costos de producción; al punto que en Manabí- Ecuador, más del 50% del costo de producción se destina al control de plagas.

Algunos hongos ascomicetes e imperfectos suelen ocasionar inflorescencia y enfermedades en el follaje, tallos, frutos e incluso las raíces. Algunos fitopatógenos se multiplican en el xilema y en el floema de la planta y producen diversos trastornos bioquímicos como: bloqueo del transporte de agua y nutrientes desde la raíz hacia las hojas, o el flujo de la savia desde las hojas hacia el resto de la planta.

Una de las enfermedades muy prevalente en el cultivo del tomate es el tizón temprano del tomate, y es producido por un hongo llamado *Alternaria solani* que afecta a hojas y produce lesiones en el tallo, peciolo y frutos. (Arreaga J, Hernández M, 2004).

1. 1. *Alternaria solani*.

TAXONOMIA

| | |
|--------------------|---------------------------|
| Reino : | <i>Fungi</i> |
| División : | <i>Ascomycota</i> |
| Subdivisión : | <i>Pezizomycotina</i> |
| Clase : | <i>Dothidiomycetes</i> |
| Orden : | <i>Pleosporales</i> |
| Familia: | <i>Pleosporaceae</i> |
| Género: | <i>Alternaria</i> |
| Especie: | <i>solani</i> |
| Nombre Científico: | <i>Alternaria solani</i> |
| Nombre común : | Tizón temprano del tomate |

La *Alternaria solani* es un hongo que forma colonias que van de color marrón gris a negro, los conidióforos se encuentran solos o formando pequeños grupos, son rectos o flexuosos, septados de color variable (de marrón pálido a marrón oliváceo). La conidia es solitaria, multicelular de cuerpo elipsoidal, tiene de 9 a 11 septas transversales y de 0- 3 septas longitudinales. (Benítez T *et al*, 2004).

1. 2. Síntomas del Tizón temprano del tomate:

Los primeros síntomas en el follaje son pequeñas manchas de color café o negro, rodeado de un halo amarillo, que aparece en las hojas banderas o más viejas. Cuando las lesiones miden aproximadamente 6 mm de diámetro se observan anillos concéntricos que le dan un aspecto de tabla de tiro al blanco. Los síntomas de las hojas más viejas son aparición de manchas de color café rodeada de zonas de color amarillo que crecen hasta 2 centímetros y muestran por lo general el aspecto de un blanco de tiro y pueden cubrir toda la hoja volviéndolas de color amarillo (Arreaga J, Hernández M, 2004).

En las hojas se presentan manchas pequeñas circulares o angulares, con marcados anillos concéntricos, las plantas muy atacadas pueden perder todas sus hojas, exponiendo los frutos a los rayos directos del sol, produciéndose escaldaduras. En los tallos se presentan zonas necróticas de forma alargada (con anillos concéntricos), causando en las plántulas lo que se denomina como “pudrición del collar”. Si la planta no muere, permanece enana y su producción es muy reducida (Arias M, 2004).

Además, en tallo y peciolo produce lesiones negras alargadas, en las que se pueden observar anillos concéntricos. Los frutos son atacados a partir de las cicatrices del cáliz, provocando lesiones pardo-oscuros ligeramente deprimidas y recubiertas de numerosas esporas del hongo; así mismo, la infección del fruto ocurre generalmente en la base del pedúnculo y se muestra con manchas hundidas, oscuras y acartonadas; estas manchas también presentan los anillos concéntricos, formando una depresión cerca al pedúnculo (Jacas J, *et al*, 2005).

1. 3. Control biológico antagonista:

Una de las tendencias en la actualidad es la búsqueda de alternativas como es el uso de hongos antagonistas del grupo de los Hyphomycetes, entre ellos los géneros *Trichoderma*, *Penicillium* y *Gliocladium*. (Infante et al. 2009)

En Cuba han realizados experimentos de control biológico con Gluticid a dosis de 3.0 kg/ha obteniendo una buena eficacia especialmente en el tizón temprano del tomate. En cambio, en Costa Rica se están realizando experiencias utilizando microorganismos de montaña (M/M), lo que consiste en recogerlo de la hojarasca y la multiplican con melaza y agua, que luego lo riegan en los campos para evitar el ataque del tizón temprano.

El uso de hongos y bacterias antagonistas han ayudado en el control de enfermedades ocasionadas por patógenos del suelo (Infante et al 2009). El estudio de las cepas de *Trichoderma* como agente de control biológico es debido a su alta capacidad reproductora, y su habilidad de sobrevivir en condiciones ambientales desfavorables, su capacidad para modificar la rizósfera logra una mayor utilización de sus nutrientes por lo que es muy agresivo contra hongos fitopatógenos. (Benítez, *et al*, 2004).

Así mismo, Torres Iannacom y Gómez, 2008 reportaron que *Trichoderma harzianum* es la especie más fuertes que otras especies de *Trichoderma* debido a que reducen la severidad de la enfermedad del tizón temprano del tomate y especialmente cuando se usa *Hypocrea lixii* como el hongo antagonista.

En Ecuador se ha identificado a *T. asperellum* como antagonista de *Sclerotium rolfsii* y *Rhizoctonia solani* (Capuz, 2009), mientras que Cevallos (2010) reportó que la cepa G-008 de este mismo antagonista aplicado al suelo en forma líquida redujo la severidad del complejo de la marchitez del tomate después de dos ciclos de cultivo. Por otra parte Molina (2011) reporta que *Hypocrea lixii* tuvo efecto sobre esporas de *A. solani* en condiciones de laboratorio.

1.4. *Hypocrea lixii*

Taxonomía

| | |
|--------------------|--------------------------|
| Reino : | <i>Fungi</i> |
| División : | <i>Ascomycota</i> |
| Subdivisión : | <i>Pezizomycota</i> |
| Clase : | <i>Sordariomycetes</i> |
| Orden : | <i>Hypocreales</i> |
| Familia: | <i>Hypocreomycetidae</i> |
| Género: | <i>Trichoderma</i> |
| Especie: | <i>Trichoderma</i> |
| Nombre Científico: | <i>Hypocrea lixii</i> |

El *Hypocrea lixi* es un hongo del género *Trichoderma* presentan una eficiencia en el control de fitopatógenos que atacan partes aéreas y de la raíz de las plantas; además está catalogado entre los agentes de control biológico más eficientes debido al amplio espectro antagonista que presentan las enzimas extracelulares que producen, además, poseen actividad antibiótica, microparasitismo y posee habilidad de incrementar el desarrollo y crecimiento de las plantas. Es importante destacar que un factor que puede afectar la densidad de población de *Trichoderma* spp, en el suelo, es la época del año: otoño e invierno (Harman *et al*, 2004).

El modo de acción del *Hypocrea lixii* es complejo y comprende quimiotaxis, antibiosis y parasitismo. Parece ser que la primera interacción entre el parásito y el hospedero es un desarrollo quimiotrópico; en la que las hifas del parásito se dirigen hacia el hospedero y este responde a la secreción de lectinas; es posible que las lectinas se combinen con residuos de galactosa de las paredes celulares de *Trichoderma* y éste identifique a su presa produciendo enzimas hidrolíticas como: quitinasas, b-1,3-glucanasas y proteinasas que desintegran las paredes celulares de las hifas, produciendo esclerocios del hongo patógeno hasta causarle la muerte (Morán, 2008; Capuz, 2009).

Por otra parte, los fungicidas son productos químicos, que al ser rociados causan daño al ecosistema; así como a las personas que laboran en las actividades agrícolas y a los frutos que son consumidos por los habitantes. En el caso de los plaguicidas utilizados en hortalizas, en un estudio en mercados de Quito, se reveló que el nivel promedio de

metamidofos en tomate fue mayor a 15 ppm, siete veces más alto que el límite permitido por la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FDA).

La presente investigación servirá para evitar el uso indiscriminado para el control de plagas, pues, existen casos en que las aspersiones se realizan hasta 24 horas antes de la cosecha, con productos a base de ingredientes activos de categoría peligrosa que provocan deterioros en la salud, especialmente en las vías respiratorias y afecciones a la piel de las personas que laboran en el campo y de los consumidores, por ello el uso de microorganismos que reducen en forma natural la invasión de fitopatógenos.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Lugar y tiempo de Estudio

El estudio se realizó en un invernadero de construcción artesanal cuyo largo fue 9 metros, 6 metros de ancho y 3,5 metros de alto, ubicado en los predios de la ciudadela Salvador Allende de la Universidad de Guayaquil, situada en la ciudad de Guayaquil, perteneciente a la provincia del Guayas. la misma que se desarrolló entre el mes de octubre del 2014 a mayo del 2015.

2.2. Universo y Muestra

El universo fue de 100 macetas y el tamaño de la muestra correspondió a 10 plantas por cada tratamiento, las mismas que se ubicaron en los predios de la Universidad de Guayaquil.

2.3. Tipo de investigación

El tipo de investigación es Experimental – prospectivo porque se conoció el efecto de *Hypocrea lixii* sobre *Alternaria solani* con respecto al uso de fungicidas y su control absoluto. Además, se consideró los siguientes criterios de exclusión: 1.- Tomates cultivados sin uso de fungicidas. 2.- Manejo de otros microorganismos que no fueran: *A. solani* e *Hypocrea lixii*.

2.4. Tratamientos estudiados

Los tratamientos en el estudio de dosis fueron los siguientes:

| Nº DE TRATAMIENTO | CONCENTRACIONES conidios/ml |
|-------------------|---|
| 1 | <i>Hypocrea lixii</i> 1 x 10 ⁶ conidios /ml |
| 2 | <i>Hypocrea lixii</i> 1 x 10 ⁸ conidios /ml |
| 3 | <i>Hypocrea lixii</i> 1 x 10 ¹⁰ conidios /ml |

| | |
|---|---|
| 4 | Testigo químico (planta + patógeno + fungicida) |
| 5 | Testigo Absoluto (planta + patógeno) |

El estudio de frecuencias de aplicación de *H. lixii* fueron:

| No | Número de repeticiones conidios / ml |
|----|--|
| 1 | <i>Hypocrea lixii</i> aplicado 10 días después del trasplantes (ddt) |
| 2 | <i>Hypocrea lixii</i> aplicado 15 días después del trasplante (ddt) |
| 3 | <i>Hypocrea lixii</i> aplicado a los 20 días con frecuencia semanal (28 y 44 días) |
| 4 | Testigo Químico (planta + patógeno + fungicida) |
| 5 | Testigo Absoluto (planta + patógeno) |

2.5. Diseño de investigación

Para la investigación se utilizó un diseño experimental completamente aleatorio (DCA) con cinco tratamientos y dos réplicas para el estudio de dosis y frecuencias de aplicación del antagonista. Para la comparación de las medias se utilizó la prueba de rangos múltiples de Tukey.

2.6. Análisis de varianza que se utilizó durante el estudio

La fuente de variación y grados de libertad utilizados en ambos estudios fue el siguiente:

| Fuente de variación | Grados de libertad |
|---------------------|--------------------|
| Tratamientos | 4 |
| Error experimental | 15 |
| Total | 19 |

Para comparación de las medias se usaron las pruebas de rangos múltiples de Tukey ($p= 0.05$).

2.7. TÉCNICAS APLICADAS EN LA INVESTIGACIÓN

2.7.1. MANEJO DEL EXPERIMENTO EN EL LABORATORIO

En el laboratorio se realizaron las siguientes actividades:

- Identificar la presencia de *Alternaria solani*
- Reactivación de la *Hypocrea lixii*

- c) Inoculación del fitopatógeno
- d) Contaje de conidios en cámara de newbauer
- e) Inoculación del Antagonista

2.7.1.1. Identificar la presencia de *Alternaria solani*

A. solani fue aislada de hojas de tomate. Para ello las hojas fueron cortadas en pedazos de 1cm cuadrado aproximadamente y luego desinfectadas en una solución de hipoclorito de sodio al 10% durante tres minutos y después enjuagada con agua destilada estéril (ADE) por tres veces para eliminar residuos de cloro.

Posteriormente, se colocó la muestra en cajas petri que contenía medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA), para después incubar a temperatura ambiente durante cinco días. Transcurrido este tiempo se tomó el crecimiento del hongo con un asa de platino y se colocó en una placa porta objeto, el que previamente contenía una gota de ácido láctico, luego se observó en el microscopio de luz con un objetivo de 40X, el mismo que mediante claves se determinó la presencia de *Alternaria*. (Vivas, 2011; Vivas-Molina, 2011).

2.7.1.2. Reactivación de *Hypocrea lixii*

H. lixii fue proporcionada por el laboratorio de Fitopatología de la Estación Experimental Litoral Sur del INIAP, para ello se tomó un gramo del crecimiento del hongo en arroz pilado y se colocó en 100 ml de agua destilada estéril y se colocó en medio de cultivo en agar Sabouraud. Con el crecimiento del hongo se tomó una pequeña porción del micelio y se procedió a multiplicarlo masivamente en medio de cultivo, para ello se distribuyó en forma de estrías y luego se incubó a 25°C, durante cinco días. Una vez que esporuló se observó en el microscopio con el objetivo de 40X para comprobar su presencia.

2.7.1.3. Inoculación del fitopatógeno

Para este propósito se realizó una suspensión de crecimiento micelial del hongo de toda una caja de petri en 1000 ml de agua destilada estéril, después, se le agregó 10 ml por cada planta de tomate y en cada tratamiento con un atomizador manual.

2.7.1.4. Contaje de conidios en cámara de neubauer

Para preparar la solución madre de *Hypocrea lixii*, se midió en un matraz 100 ml de agua destilada estéril, se agregó el contenido micelial de una caja, se agitó fuertemente con la ayuda de perlas de vidrio, luego con una jeringa estéril se tomó un ml y se colocó en la cámara de neubauer, con la ayuda de un contador se procedió a contar en el microscopio con el objetivo de 10X (Figura 1). Luego se aplicó la fórmula:

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Total de conidios contados} \times 250.000}{\text{Número de cuadros contados}}$$



Figura 1. Cámara de Neubauer para conteo de esporas

2.7.1.6. Preparación de diluciones

Una vez que se contó las esporas se procedió a calcular el volumen de la dilución para obtener las dosis requeridas para esta investigación. El esquema del proceso se observa en la Figura 2.

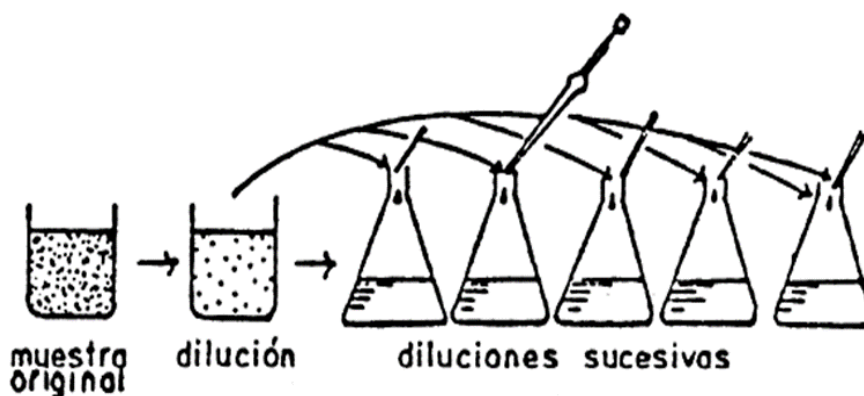


Figura 2. Esquema del proceso de dilución del antagonista.

2.7.1.6. Inoculación del antagonista

Después de haber inoculado al fitopatógeno y con el primer síntoma de la enfermedad se aplicó el antagonista (*H. lixii*), utilizando las tres dosis mencionadas.

Las aspersiones del antagonista en el estudio de frecuencia se aplicaron a los 10, 15, 20, 28 y 44 días, igualmente se utilizó un atomizador manual.

2.7.1.7. 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. (Vivas, 2011; Vivas-Molina, 2011).

2.7.2. MANEJO DEL EXPERIMENTO EN EL CAMPO

2.7.2.1. Preparación del semillero y siembra

La semilla se sembró en tierra preparada comercialmente certificada libre de patógenos, después se colocó en las bandejas germinadoras y se plantó una a tres semillas, luego se esperó a que germine después de dos semanas, finalmente se trasplantó en las macetas y se le suministró el riego necesario.

2.7.2.2. Preparación de tierra y llenado de macetas

En un plástico grande se colocó 30 sacos de tierra de sembrado para prepararla y librarla de nematodos y todo tipo de microorganismos que están en la tierra para eso se le agrego 1 kg de captan, el mismo que fue esparcido uniformemente, luego con palas se la mezcla y se la tapó por espacio de 15 días. Pasado ese tiempo se volvió a mezclar con una paleta y se procede al llenado de las macetas. En las macetas con capacidad de 8 Kg. se trasplantó las plántulas de tomate cultivar Floradade.

2.7.2.3. Trasplante

Después de 18 - 21 días de edad de las plántulas en el semillero fueron trasplantadas en los maceteros plásticos.

Una vez que se obtuvieron las plantas se procedió a inocularlas con el fitopatógeno *Alternaria solani* en una sola aplicación y después de comprobar que había infestación se procedió a aplicar el antagonista

Hypocrea lixii según las dosis utilizadas. De acuerdo a los tratamientos ya descritos.

2.7.2.4. Labores Agrícolas

Preparación del suelo

La preparación del suelo en el que se ubicaron las macetas, se realizó primeramente el corte de la maleza, luego se niveló el terreno y se le agregó un herbicida aminapac y después de una semana se adicionó cal con creolina quedando el suelo listo para ubicar las macetas.

Riego

Como el experimento fue en maceteros se procedió a construir un sistema de riego a base de llaves de paso para implantar el goteo, el mismo que se planificó con un caudal de 80 gotas por minuto y se regó 5 minutos una vez al día cuando bajara el sol.

Control de malezas

El deshierbe fue en forma manual (100 maceteros) para evitar competencias con el cultivo.

Fertilización

Se realizó aplicaciones de NPK (30-10-10), 3 gramos por cada planta, mediante espeques, su función es llegar hacia la raíz para que sean absorbidos por la planta, luego de mes y medio se volvió a fertilizar agregándole NPK (40-20-10), en dosis de 3 g en cada macetero.

También se hizo aplicaciones de calcio en dosis de 5 ml de producto en 4 litros de agua para suplir el requerimiento de este elemento en la planta y así evitar que los frutos presentes hundimiento por falta del mismo.

Poda

Se hicieron dos podas. Al mes del trasplante se realizó una poda manual donde se eliminó los chupones para permitir que las ramas crecieran mejor. La segunda poda se hizo a los dos meses de la siembra la misma que consistió en descartar las hojas viejas.

Tutorado

A las tres semanas después del trasplante se realizó el tutorado para guiar el crecimiento y mantener el soporte del cultivo del tomate. El objetivo del tutorado es mejorar la ventilación e iluminación de toda la

planta, así como optimizar los espacios para evitar que el fruto caiga al suelo y tenga un mejor desarrollo.

Aporque

Al mes y medio del trasplante se realizó el aporque que consistió en acumular tierra alrededor del tallo de la planta de tomate para fortalecer los mismos.

Control Fitosanitario

La mosca blanca (*Bemisia tabaci*) pone sus huevos en las partes jóvenes de las plantas, como las hojas. Su control se lo realizó con cipermetrina (C₂₂H₁₉Cl₂NO₃), que es un insecticida piretroide de amplio espectro, no sistémico, usando 1.5 cm, en 2 litros de agua en una bomba de 5 litros, la misma que se roció por dos ocasiones debido a la persistencia de este insecto. (Vivas, 2011; Vivas-Molina, 2011).

2.8. Materiales y equipos utilizados

Los materiales y equipos a utilizarse están disponibles en el laboratorio de Biología y suelo de la Facultad de Ciencias Agrarias.

Equipos: Microscopio (Leica CME), Bomba de Riego 5 L, Estufa (Mammert), Autoclave (Olmart), Atomizadores manual (Aquaflex).

Materiales: Cajas de petri (Marienfeld), Matraces (pirex), Vasos de precipitación (Pirex), Pipetas (Eppendorf), Jeringa descartables (Lisfar), Mascarillas (3M 8210), Guantes desechables (Dura Shield), Bandeja germinadora (Ten-rop), Maceteros (Protexer), placas porta objetos (Corning 7980), Tierra estéril (Propia de la zona), Invernadero (construcción de Madera).

III. RESULTADOS

3.1. Presencia de *Alternaria solani* causante del Tizón Temprano en el cultivo del tomate mediante microscopía óptica.

En las hojas del cultivo de tomate se identificó la *Alternaria solani*, primeramente a través de la sintomatología, la misma que consistió en manchas circulares, negruzcas a manera de tiro al blanco en el haz de la hoja, luego se lo cultivó en agar Sabouraud, (Figura 3) para posteriormente observar las colonias mediante microscopía óptica.



Figura 3. Cultivo de *Alternaria solani* en agar Sabouraud.

El hongo se lo observó como un micelio filamentososo con conidióforos simples tabicados en cuyos extremos se encuentra unos conidios muriformes de color pardo con septos transversales y verticales de disposición irregular (Figura 4).



Figura 4. Observación de micelios de *Alternaria solani* a través de microscopía óptica.

3.2. EVALUAR EL EFECTO DE LA MEJOR DOSIS DE APLICACIÓN DE *Hypocrea lixii* SOBRE *Alternaria solani* EN CONDICIONES DE INVERNADERO.

El mayor porcentaje promedio de plantas afectadas por *Alternaria solani* en condiciones de invernadero en la primera réplica, lo presentó en los tratamientos 1 y 5 que corresponden a 1×10^6 y testigo absoluto en su orden, los que fueron iguales estadísticamente entre sí, al igual que la dosis 1×10^8 y al testigo químico. El tratamiento 1×10^{10} fue el de menor incidencia y fue diferente de los demás tratamientos. Se obtuvo un coeficiente de variación (CV) del 40,08%, cabe recalcar que el CV es alto lo que se debe a que entre repeticiones hubo valores bajos y altos (Cuadro 1).

Cuadro 1. Porcentaje de plantas afectadas por *Alternaria solani* en condiciones de invernadero, primera réplica.

| Tratamientos | DÍAS DESPUÉS DEL TRASPLANTE | | | | | |
|--|-----------------------------|----|----|----|-----|--------------------|
| | 10 | 15 | 20 | 28 | 44 | MEDIA |
| 1. <i>Hypocrea lixii</i> 1 X10 ⁶ | 10 | 50 | 60 | 80 | 100 | 60 a ^{1/} |
| 2. <i>Hypocrea lixii</i> 1X10 ⁸ | 30 | 30 | 60 | 60 | 70 | 50 a |
| 3. <i>Hypocrea lixii</i> 1X 10 ¹⁰ | 10 | 10 | 20 | 30 | 30 | 20 b |
| 4. Testigo químico | 40 | 50 | 50 | 50 | 50 | 48 a |
| 5. Testigo absoluto | 50 | 50 | 50 | 70 | 80 | 60 a |
| C.V. | 40.08% | | | | | |

^{1/}Cifras de la columna con la misma letra son estadísticamente iguales entre sí de acuerdo a la prueba de rangos múltiples de Tukey p =0.05

Durante los 44 días después del trasplante las evaluaciones fueron aumentando el porcentaje de plantas afectadas en todos los tratamientos; como se observa en el (Cuadro1), el tratamiento 1x10⁶ conidios por ml, en esta edad todas las plantas mostraron daños y llegaron a morir; el testigo absoluto en la última lectura llegó a 80% de plantas con la enfermedad (Figura 5).

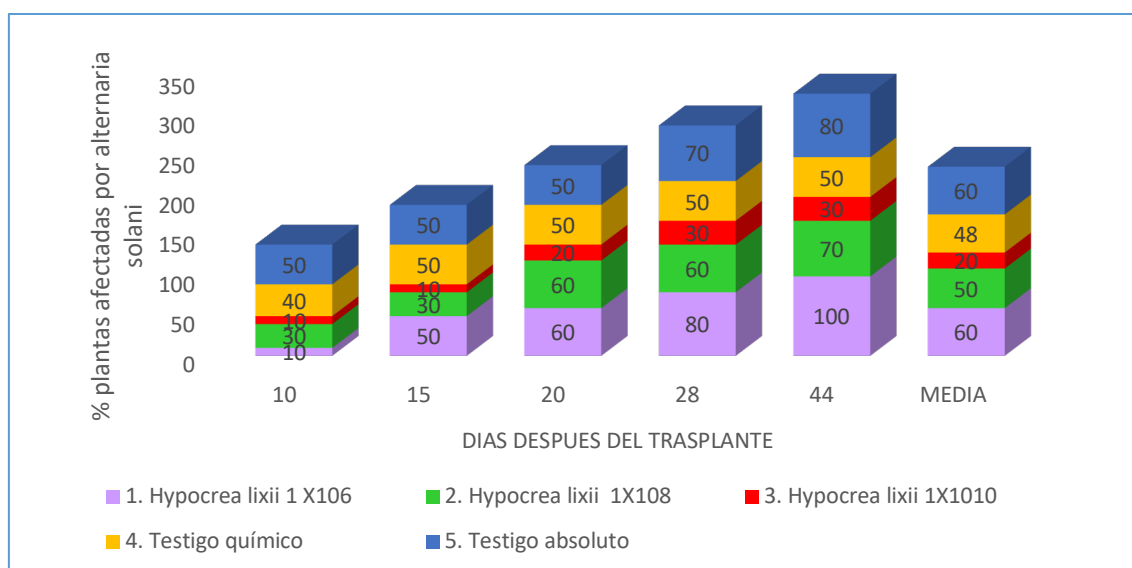


Figura 5. Porcentaje de plantas con presencia de *Alternaria solani* durante 44 días de evaluación. UG, 2015.

La segunda réplica muestra que la dosis 1x10¹⁰ de *H. lixii* tuvo el menor porcentaje de plantas afectadas por *A. solani* y fue estadísticamente diferente de los demás tratamientos. Los valores más altos los mostró el testigo absoluto, seguido de los tratamientos químico y la dosis más baja del antagonista, todos ellos fueron iguales estadísticamente entre sí. El coeficiente de variación fue de 31.30% (Cuadro 2).

Cuadro 2. Porcentajes plantas afectadas por *Alternaria solani* en condiciones de invernadero, segunda réplica.

| Concentración conidios /ml | Días después del trasplante | | | | | Media |
|---|-----------------------------|----|----|----|----|----------------------|
| | 10 | 15 | 20 | 28 | 44 | |
| 1. <i>Hypocrea lixii</i> 1 x10 ⁶ | 1 | 3 | 1 | 90 | 99 | 38,8 a ^{1/} |
| 2. <i>Hypocrea lixii</i> 1x10 ⁸ | 25 | 4 | 1 | 60 | 80 | 34,0 a |
| 3. <i>Hypocrea lixii</i> 1x10 ¹⁰ | 1 | 1 | 9 | 9 | 9 | 5,8 b |
| 4. Testigo químico | 91 | 60 | 7 | 50 | 50 | 51,6 a |
| 5. Testigo absoluto | 99 | 80 | 7 | 50 | 91 | 65,4 a |
| C.V. | | | | | | 31.30% |

^{1/} Cifras de la columna con la misma letra son estadísticamente iguales entre sí de acuerdo a la prueba de rangos múltiples de Tukey p =0.05

5.3. ESTABLECER LA FRECUENCIA DE APLICACIÓN DE *H. lixii* PARA EL MANEJO DE *Alternaria solani* EN CONDICIONES DE INVERNADERO.

En la primera réplica se determinó que la frecuencia de 20 días con dos aplicaciones en el ciclo de cultivo tuvo el menor valor de plantas con síntomas de *Alternaria solani* y fue diferente de los demás tratamientos; los valores más altos fueron el testigo absoluto y cada 10 días, los mismos que fueron iguales estadísticamente a los demás tratamientos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Porcentaje de plantas con síntomas de *Alternaria solani*, primera réplica UG. 2015.

| Tratamientos | Días después del trasplante (ddt) | | | | | Media |
|---------------------------------|-----------------------------------|----|----|----|----|----------------------|
| | 10 | 15 | 20 | 28 | 44 | |
| <i>Hypocrea lixii</i> 10 ddt | 1 | 25 | 60 | 90 | 99 | 55,0 a ^{1/} |
| <i>Hypocrea lixii</i> 15 ddt | 3 | 4 | 60 | 60 | 80 | 41,4 a |
| <i>Hypocrea lixii</i> 20 ddt | 1 | 1 | 3 | 7 | 7 | 3,8 b |
| Testigo químico | 9 | 35 | 50 | 50 | 50 | 38,8 a |
| Testigo absoluto | 24 | 35 | 50 | 80 | 90 | 55,8 a |
| C.V. | | | | | | 38.96% |

^{1/} Cifras de la columna con la misma letra son estadísticamente iguales entre sí de acuerdo a la prueba de rangos múltiples de Tukey p =0.05

En las cinco evaluaciones el tratamiento a base de *H. lixii* aplicado cada 20 días se mantuvo a través del tiempo, en los demás tratamientos se nota un incremento del porcentaje de plantas afectadas (Figura 6).

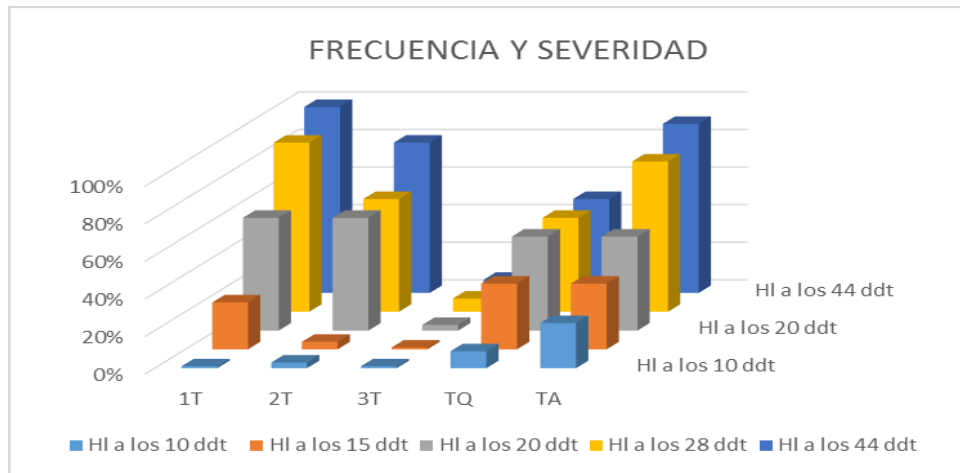


Figura 6. Porcentaje de plantas con presencia de *Alternaria solani* durante 44 días de evaluación en el estudio de frecuencias de aplicación de *H. lixii* en la primera réplica.

En la segunda réplica los porcentajes promedios de plantas afectadas por *A. solani* tuvieron el mismo comportamiento, pues, el tratamiento aplicado cada 20 días fue el de menor valor con 9% y fue diferente de los demás tratamientos. Los mayores valores fueron para el testigo absoluto seguido de la frecuencia de cada 10 días y el testigo químico los mismos que fueron iguales entre sí (Cuadro 4).

Cuadro 4. Porcentaje de plantas con síntomas de *Alternaria solani*, segunda réplica UG. 2015.

| Tratamientos | Días después del trasplante (ddt) | | | | | Media |
|------------------------------|-----------------------------------|----|----|----|----|----------------------|
| | 10 | 15 | 20 | 28 | 44 | |
| <i>Hypocrea lixii</i> 10 ddt | 30 | 30 | 50 | 60 | 91 | 52,2 a ^{1/} |
| <i>Hypocrea lixii</i> 15 ddt | 9 | 15 | 50 | 60 | 80 | 42,8 a |
| <i>Hypocrea lixii</i> 20 ddt | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9,0 b |
| Testigo químico | 15 | 20 | 50 | 50 | 50 | 37,0 a |
| Testigo absoluto | 24 | 24 | 50 | 80 | 91 | 53,8a |
| C.V. | | | | | | 38.96% |

^{1/} Cifras de la columna con la misma letra son estadísticamente iguales entre sí de acuerdo a la prueba de rangos múltiples de Tukey p =0.05

En las cinco evaluaciones el tratamiento a base de *H. lixii* aplicado cada 20 días se mantuvo a través del tiempo, mientras que los demás tuvieron un incremento en el porcentaje de plantas afectadas (Figura 7).

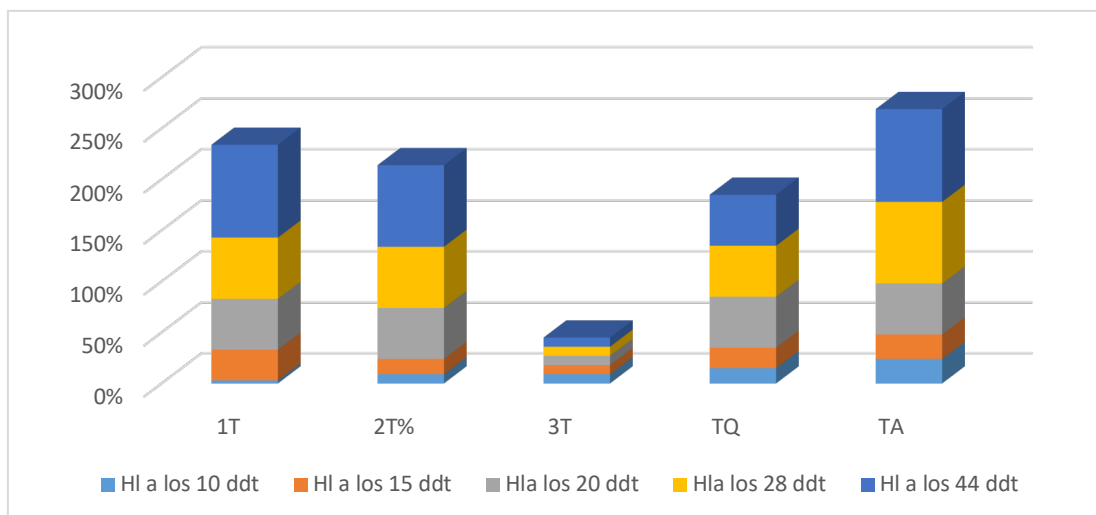


Figura 7. Porcentaje de plantas con presencia de *Alternaria solani* durante 44 días de evaluación en el estudio de frecuencias de aplicación de *H. lixii* en la segunda réplica.

IV. DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos en la investigación las tres dosis de *Hypocrea lixii*, 1×10^6 , 1×10^8 , 1×10^{10} , y con dos réplicas, se determinó que la dosis de 1×10^{10} fue la de mejor efecto, debido a que es el tratamiento que presenta a las plantas de tomate con poco ataque y se obtuvo el mayor número de plantas sanas.

Las plantas que tuvieron mayor infestación fue la dosis de 1×10^6 ya que fueron igual al testigo absoluto. Las plantas con la dosis de 1×10^8 resistieron más, pero el análisis estadístico indicó que fueron iguales a los testigos.

El efecto que produce el antagonista frente a *Alternaria solani* en el cultivar Florada de muestran un comportamiento variable, la dosis más alta fue la de menor efecto, datos que concuerdan a los reportados por Molina M (2011), pues, efectivamente así aconteció.

Respecto a la frecuencia hubo respuesta positiva con las aplicaciones cada 20 días, fue significativo y con el menor porcentaje de plantas afectadas, por otra parte, se puede mencionar que este resultado estaría relacionado con el fenómeno de la hormesis, el mismo que es una respuesta de ciertos microorganismos frente dosis altas o bajas. (Felix, et al. 2015)

Existe escasa información nacional e internacional sobre el estudio de dosis de *H. lixii* como antagonista sobre el tizón temprano del tomate causada por *Alternaria solani*, en condiciones de invernadero.

Los siguientes microorganismos como: *Bacillus subtilis* JF419701 y *Trichoderma harzianum* JF419706 (teleomorfo: *Hypocrea lixii*) inhibieron el crecimiento de *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Exserohilum*

rostratum, *Macrophomina phaseolina*, *Pythium ultimum* y *Rhizoctonia solani*, además, el examen microscópico demostró la capacidad de *T. harzianum* JF419706 a parasitar las hifas de todos los patógenos y les ocasionaba la muerte a través de enzimas degradantes producidas en su pared celular.

Por otro lado, Viterbo A (2009), describe el antagonismo de *Hypocrea lixii* sobre algunas cepas de *Trichoderma*.

Estudios realizados en Ecuador con seis cepas de hongos antagonistas que actúan sobre la alternariosis, del tomate se determinó que *Hypocrea lixii* tiene algún efecto antagonista contra *Alternaria solani* (Molina M, 2011). En el estudio se logró un mayor efecto antagonista.

Las bondades que presentan las cepas del antagonista *Trichoderma*, han logrado que se lo considere como un excelente biocontrolador tanto desde el punto de vista fisiológico y por ser un producto muy amigable con el ambiente.

Los frutos que se obtuvieron en la cosecha fueron frutos sanos, limpios, libre de contaminantes químicos, lo que determina la contribución que tienen estos hongos del genero *Trichoderma* en colaborar con el medio ambiente, y bajar el costo de insumos en la producción de tomate de calidad para que llegue a los hogares de muchos ecuatorianos y a muy bajo precio.

Es trascendental mencionar que este estudio sirve para evitar el uso indiscriminado de productos químicos para el control de plagas, con repercusión a la salud humana.

Finalmente, es importante destacar que esta investigación es una alternativa biológica para obtener productos sin residuos químicos e impulsará a una agricultura sustentable y sostenible mediante un cultivo ecológico para proteger el medio ambiente.

V. CONCLUSIONES

1.- Ante los resultados obtenidos se afirma que existen diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes dosis de aplicaciones de *Hypocrea lixii* y los testigos químicos y absolutos.

2.-La dosis 1×10^{10} de *Hypocrea lixii*, ejerció un mejor efecto sobre *A. solani*.

3.- En cuanto a la frecuencia de aplicación cada 20 días fue el mejor efecto sobre el porcentaje de plantas afectadas por *A. solani*.

4.- El tratamiento de *Hypocrea lixii* con concentraciones de 1×10^{10} contribuye de manera significativa a disminuir el uso de plaguicidas y

fungicidas de origen químico que son sustancias altamente tóxicas y ocasionan daños en la salud y al ambiente

5.- De los resultados de este estudio, se beneficiarán los agricultores, las personas que trabajan en el campo, los consumidores finales y el ecosistema

6.- La sociedad se verá beneficiada al disponer de productos de consumo masivo limpio, sano saludable; además, el ecosistema tendrá menos contaminación y mejorará la calidad de vida de los agricultores y consumidores

7.- Con el uso de este producto orgánico en la concentración determinada como apropiada, se obtiene un fruto orgánico de excelente calidad, cuyo uso reducirá de modo significativo los costos de producción, debido al no uso de los agroquímicos tradicionales para el control fitosanitario.

VI. FINANCIAMIENTO

Financiado por la autora Nelka Tandazo-Falquez.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARIAS M. (2004). Hongos Antagonistas o Micopatógenos en: Guías de insumos Biológicos para el manejo integrado de plagas. Corporación para Desarrollo de Insumos y Servicios Agroecológicos. Barcelona. Harmonia página 59 –68.
2. ARREAGA J., HERNÁNDEZ M. (2004). Evaluación de Asoxystrobin en el control de la candelilla temprana (*alternariasolani*) p. 107. Disponible en: http://www_revfacagronluz.org.re/PDF/abril_junio2001/ra2012/.pdf.
3. BENITEZ T. RINCON A. LIMON M. CODÓN A. (2004). Mecanismos de Biocontrol de cepas de *Trichoderma*. Rev. International Microbiology.7 (4). Madrid. Disponible en: www.scielo.isciii.es/scielo.php
4. CAPUZ R. (2009). Identificación de microorganismos antagonistas de fitopatógenos de suelo y su efecto in vitro e invernadero en especies hortícolas. Tesis de Grado. [Título de Ingeniero Agrónomo]. Guayaquil. Universidad de Guayaquil. Facultad de Ciencias Agrarias.

5. CEVALLOS S. (2010). Estudio de Eficacia de Trichoderma Cepa G008 sobre el complejo Marchitez Del Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Ecuador. [Tesis de Grado] Universidad de Guayaquil, EC, Facultad de Ciencias Agrarias.; página. 43.
6. FELIX L., GOMES S., SILVA T., ARBEX P., DOMINGUES E. (2015). Hormesis method for increasing oat Straw with a view to viability of direct-seeding systems. Rev. Cient. Agron; 46 (1). DOI. 10.1590.
7. HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A. (2014). Chet, I. and Lorito, M. Trichoderma Species-Opportunistic, a virulent plant symbionts. Nat. Rev. Microbiol. 2(1); página 43-56.
8. INFANTE D., MARTÍNEZ B., GONZÁLEZ N., REYES Y. (2009). Mecanismos de acción antagonista de Trichoderma Frente a hongos fitopatógenos. Rev. Protección Veg. Página 24 (1).
9. JACAS JOSEP. CABALLERO PRIMITIVO, ÁVILA JESÚS, CASTELLO DE LA PLANA. (2005). El control biológico de plagas y enfermedades. La Sostenibilidad de la Agricultura Mediterránea. Publicaciones de la Universidad Pública de Jaime I de Castelló. ISBN 84-8021 -514-3. Disponible en: www.e-buc.com/portade
10. MAGAP. (2012). Tomate (*Lycopersicom esculentum* Mill) Solanácea. Disponible en: http://www.mag.go.cr/biblioteca_virtual_ciencia/tec.
11. MAGAP-SIGAGRO. (2011). Censo Nacional Agropecuario. [Internet] 2 011 [citado 05 de jun. 2 012]. [aprox. 3 p.] Disponible en: www.magap.gov.ec.
12. MOLINA M. (2011). Identificación y evaluación de antagonistas del tizón temprano (*Alternaria solani*) en tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill). Ecuador. [Tesis de Grado]. Previa la obtención del título de Ingeniero Agrónomo. Milagro. Universidad de Guayaquil. Facultad de Ciencias Agrarias.
13. MORÁN M. (2008). Aislamiento, caracterización y análisis del gen thpg1 de *Trichoderma harziamun*. Universidad de Salamanca [Memoria grado doctoral]. En ciencias biológica Salamanca página 5-9.
14. TORRES E., IANNAcone J. Y GÓMEZ H. (2008). Biocontrol del Moho foliar del tomate *Cladosporium fulvum* empleando cuatro hongos antagonistas. Revista de ciencias agronómicas Bragantia. Brasil. 67 (1): página 169-178.

15. VITERBO A., et al. (2009). Expression regulation of the endochitinase chit36 from *Trichoderma asperellum* (T. harzianum T-203). CurrGenet. 2002 Nov; 42(2):114-22. Epub.
16. VIVAS L. (2011). Informe Final Proyecto "Búsqueda de microorganismos antagonistas de fitopatógenos foliares en el cultivo de tomate en las provincias de Guayas y Santa Elena". Dirección de Investigación y proyectos Académicos.página.45.
17. VIVAS L. (2011). Informe Final Proyecto "Alternativas biológicas para el combate de insectos plagas y de fitopatógenos de suelo en cultivos hortícolas en las provincias de Guayas y Manabí". INIAP. EELS página 108.
18. VIVAS L. Y MOLINA M. (2011). Comportamiento de seis cepas de hongos antagonistas de *Alternaria solani* en condiciones controladas de inoculación. En Revista de Investigación Tecnología e Innovación. Dirección de Investigaciones y Proyecto Académicos, Ecuador. Universidad de Guayaquil, 3(3). Página 8-21.