

Guayaquil, 07 de ENERO del 2016

Doctor
Raúl Intriago López
DIRECTOR ESCUELA DE GRADUADOS
Facultad de Ciencias Médicas
Universidad de Guayaquil
Ciudad.
Presente.

Carmen Mosquera Revisora de Tesis
CM
enero 11 2016

De mis consideraciones;

Yo, **Dra. Carmen Mosquera**, Revisora de la tesis de la **QF Nelka Patricia Tandazo Falquez** con CI: 0902958164, egresada de la Maestría de Microbiología Avanzada Mención Industrial, **CERTIFICO** que he **REVISADO, MODIFICADO Y APROBADO EL BORRADOR DE TESIS** titulada:

"EFECTO DE *Hypocrea lixii* SOBRE EL TIZON TEMPRANO DEL TOMATE *Alternaria solani* EN CONDICIONES DE INVERNADERO. GUAYAS, 2014"

Al respecto debo señalar que el mismo cumple con los lineamientos de la Facultad de Ciencias Médicas, escuela de graduados para que pueda continuar con los trámites de la tesis.

ATENTAMENTE

~~Dra. Carmen Mosquera de Alvarado, M.Sc.~~
Dra. Carmen Mosquera.
REVISORA

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS ESCUELA DE GRADUADOS	
FECHA:	07 ENE 2016
NOMBRE:	11432
REVISOR POR:	rado



UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
ESCUELA DE GRADUADOS
TELEFAX: 042-288086
Guayaquil - Ecuador

Of. EG#141-Antep.

Diciembre 23 de 2015

Química y Farmacia
Nelka Patricia Tandazo Falquez
MAESTRIA EN MICROBIOLOGÍA MENCIÓN INDUSTRIAL
Ciudad

Por medio del presente oficio comunico a usted, que su ANTEPROYECTO de investigación titulado:

“EFECTO DE HYPOCREA LIXII SOBRE ALTERNATIVA SOLANI EN TOMATE *Slycopesicon esculentum* Mill)”.

Ha sido modificado de la siguiente manera:

“EFECTO DE *Hypocrea lixii* SOBRE EL TIZON TEMPRANO DEL TOMATE *Alternaria solani* EN CONDICIONES DE INVERNADERO GUAYAS 2014”.

Tutor de tesis: Msc. Ing. María Leticia Vivas Vivas

Ha sido aceptado en aras de favorecer el proceso del trabajo de investigación se deberá realizar con más de 100 casos o el periodo de estudio de un año.

Ha sido Revisado y aprobado por la Dirección de Escuela de Graduados el día 22 de diciembre del 2015, por lo tanto puede continuar con la ejecución del Borrador de tesis.

Revisor: Dra. Carmen Mosquera Herrera

Atentamente,

Dr. Raúl Intriago López
DIRECTOR

C. archivo

Revisado y Aprobado	Dr. Raúl Intriago L.
Elaborado	Nadia Guerrero V.

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL

DECANATO
Ciudadela Universitaria "DR. SALVADOR ALLENDE"
Teléfono: (04) 2-288040 APARTADO 8 8881
GUAYAQUIL - ECUADOR

CERTIFICACIÓN:

En mi calidad de Decano de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Guayaquil, CERTIFICO: Que la Q.F. NELKA PATRICIA TANDAZO FALQUEZ, Docente Principal de esta Unidad Académica, realizó desde Octubre hasta Mayo de 2014 su respectiva Tesis de Maestría de Microbiología mención Industrial, cuyo tema es: "EFECTO DE *Hypocrea lixilis* SOBRE EL TIZÓN TEMPRANO DEL TOMATE *Alternaria solani* EN CONDICIONES DE INVERNADERO. GUAYAS, 2014", en el Invernadero de esta Facultad, ubicado en la Cdma. "Salvador Allende" contiguo al Local del Campus Café.

Autorizo a la peticionaria hacer uso según estime conveniente del presente certificado.

Guayaquil, 13 de diciembre de 2015


ING. AGR. CARLOS BECILLA JUSTILLO, Mg. Ed.
DECANO



kabel

Elaborado por: Ing. Com. Carolina Castro Mendoza, Secretaria 1 del Decanato
Revisado y aprobado por: Ing. Agr. Carlos Becilla Justillo, Mg. Ed.



**UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
ESCUELA DE GRADUADOS**

TITULO:

**EFECTO DE *Hypocrea lixii* SOBRE EL TIZÓN TEMPRANO DEL
TOMATE *Alternaria solani* EN CONDICIONES DE INVERNADERO,
GUAYAS 2014.**

**TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OPTAR POR EL
TITULO DE MAGISTER EN MICROBIOLOGÍA MENCIÓN
INDUSTRIAL**

AUTORA

QF. NELKA TANDAZO FALQUEZ

TUTORA:

ING. AGR. MARÍA LETICIA VIVAS VIVAS MSc.

AÑO:

2015

GUAYAQUIL-ECUADOR

CERTIFICADO DEL TUTOR

EN MI CALIDAD DE TUTORA DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE MAGISTER EN MICROBIOLOGÍA, MENCIÓN INDUSTRIAL, DEL PROGRAMA DE POSTGRADO MICROBIOLOGÍA AVANZADA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS, DE LA UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL.

CERTIFICO QUE: HE DIRIGIDO Y REVISADO LA TESIS DE GRADO PRESENTADA POR LA SRA. QUÍMICA FARMACÉUTICA NELKA PATRICIA TANDAZO FALQUEZ CON C.I. 0902958164.

CUYO TEMA DE TESIS ES: EFECTO DE *Hypocrea lixii* SOBRE EL TIZÓN TEMPRANO DEL TOMATE *Alternaria solani* EN CONDICIONES DE INVERNADERO, GUAYAS 2014.

REVISADA Y CORREGIDA EN SU TOTALIDAD LA TESIS, SE APROBÓ LO CUAL LO CERTIFICO



ING. AGR. MARÍA LETICIA VIVAS VIVAS, M.Sc

TUTORA

CERTIFICADO GRAMÁTICO

Ing. María Leticia Vivas Vivas MSc, con domicilio ubicado en Urb Malaga II Mz 14 villa 6 por medio de la presente tengo a bien CERTIFICAR: Que he revisado el trabajo de titulación elaborado por la Sra. QF NELKA PATRICIA TANDAZO FALQUEZ previo a la obtención del título de magister en Microbiología mención Industrial.

TEMA DE TRABAJO DE TITULACIÓN ES: “EFECTO DE *Hypocrea lixii* SOBRE EL TIZÓN TEMPRANO DEL TOMATE *Alternaria solani* EN CONDICIONES DE INVERNADERO GUAYAS, 2014.”

El trabajo de titulación revisado ha sido escrito de acuerdo a las normas gramaticales y de sintaxis vigentes de la lengua española.

.....
Ing. María Leticia Vivas Vivas MSc
TUTORA

DEDICATORIA

A Dios ser supremo que me permitió la vida y observar las maravillas de su creación así como poder terminar esta investigación y escribir mis experiencias.

A mi madre (+) quien me trajo al mundo, madre inigualable llena de virtudes, quien siempre me apoyo y me alentó diciéndome que para estudiar no hay edad, límites, ni tiempo, que siempre lo haga, en su MEMORIA.

A mis hijas, Shibell Defaz Tandazo, Nelka Louisiana y Zahary Johanna Torres Tandazo, razón de mi vida y por quienes me esfuerzo día a día, para que comprendan que no hay nada más que estudiar para ser libres y que no importa la edad, siempre habrá tiempo para prepararse.

A mi esposo Juan Luis Torres compañero de mi vida, aunque no estabas a mi lado pero tus palabras de aliento desde muy lejos me motivaban a seguir adelante cubriendo todas mis necesidades para que termine mis estudios y la concluya con éxito.

A mis hermanos Ing. Agr Jofree Sixto, y Eglintón Sadoc Tandazo Falquez que ya partieron de este mundo terrenal, en su memoria y a mis otros hermanos(a) Dr. Godofredo, Jimmy y Enita, para que lo tomen como un ejemplo de superación.

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a la Facultad de Ciencias Agrarias con su representación el Ing. Carlos Becilla por haberme dado las facilidades en el invernadero de la Facultad para poder realizar mi investigación.

Al Laboratorio de suelos de la Facultad en donde desempeñé mis labores, al Dr. Miguel Macías quien me abrió las puertas para que realice la parte práctica necesaria.

A la Ing. María Leticia Vivas quien fue mi tutora y supo guiarme para el feliz término del presente trabajo, así como a la Ing. Segress García.

A mi querida amiga MSc Marta Mora Gutiérrez quien siempre estuvo a mi lado ayudándome y dándome las fuerzas necesarias cuando ya sentía que no las tenía.

A mi revisora Dra. Carmen Mosquera de la Facultad de Medicina, quien con su dedicación y paciencia supo guiarme con sus consejos para que este trabajo se ha presentado muy bien.

A mis amigos Roberto, Xavier, a mis amigas, Betty, Felicita, Andrea, Jessica, Gigi compañeras de esta hermosa aventura, la maestría que emprendimos juntos (as) y que siempre estuvieron a mi lado motivándome, aconsejándome, ayudándome para la culminación de la misma. Y a mis compañeras del colegio Rita Lecumberri quienes siempre vivieron mis experiencias alentándome para que persistas en mi meta.

A mis queridos alumnos quienes hicieron sus pasantías estando a mi lado ayudándome en lo necesario a ellos: Sr Sallo, Sr Calle, Sr Cantos y Sra. Montes, muy en especial a mi ex alumno Sr Daniel Merejildo que con su experiencia junto con los conocimientos del Ing. Aldo Loqui lograron mantener el cultivo el tiempo necesario hasta su culminación, a todos ellos GRACIAS MIL GRACIAS, QUE DIOS LE PAGUE.

RESUMEN

El tomate *Lycopersicon esculentum* Mill es una solanácea que es afectado por diversos microorganismos como hongos, bacterias, virus y nematodos; para prevenir estos problemas se utilizan pesticidas para su manejo, los mismos que aumentan los costos de producción y daños en la salud de las personas que laboran en la actividad agrícola y de consumidores. Dentro de las enfermedades comunes y de importancia económica se encuentra el tizón temprano del tomate o alternariosis, causada por *Alternaria solani*. El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto de *Hypocrea lixii* sobre el tizón temprano del tomate *Alternaria solani*, en condiciones de invernadero, la misma que se desarrolló entre el mes de octubre del 2014 a mayo del 2015.

La investigación 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. 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 tomato *Lycopersicon esculentum* Mill is a solanum which is affected by various microorganisms such as fungi, bacteria, viruses and nematodes; to prevent these problems there are used pesticides for handling, the same that rise costs for production and damage the health of working people in agriculture and consumers. Among the common diseases in economical important of tomato we find early blight or *Alternariosis*, caused by *Alternaria solani*. The objective of this research was to determine the effect of *Hypocrea lixii* on tomato early blight *Alternaria solani*, under greenhouse conditions developed between October 2014 and May 2015.

Research had five treatments per experiment in dose and frequency, it was used a completely random design (CRD) with 10 experimental units. The dose study treatments were: 1×10^6 , 1×10^8 and 1×10^{10} conidia per ml. in five application frequencies. 10, 15, 20, 28 and 44 days after transplantation; two witnesses in both trials, an absolute one and one chemical is included. Data on the incidence and severity of the disease were recorded by the scale of 0-5 degrees, where 0 = no symptoms to 5 = more than 50% of the spotted leaf area.

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

Keywords: *Alternaria solani*, *Hypocrea lixii*, antagonism

CONTENIDO

	Página
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I EL PROBLEMA	3
1.1. Planteamiento del problema	3
1.2. Justificación	3
1.3. Determinación del problema	4
1.4. Preguntas de Investigación	4
1.5. Objetivos	4
1.5.1. Objetivo General	4
1.5.2. Objetivo Especifico	4
1.6. Hipótesis	5
CAPITULO II MARCO TEÓRICO	6
2.1. El cultivo del tomate (<i>Lycopersicum esculentum</i> Mill)	6
2.1.1. Generalidades	6
2.1.2. Composición y valor nutricional	7
2.2. Enfermedades que afectan al cultivo del tomate	8
2.2.1. Generalidades	8
2.2.2. Hongo patógeno: <i>Alternaria solani</i>	10
2.2.3. Control Fitosanitario	12
2.3. Organismos Antagónicos	13
2.3.1. Hongos	13
2.4. Características del Invernadero	14
2.4.1. Temperatura	14
2.4.2. Humedad	14
2.4.3. Luminosidad	15
2.4.4. Suelo	15
2.4.5. Potencial de Hidrogeniones	15
2.4.6. Riego	15
2.5. Variedades	16
CAPITULO III METODOLOGÍA	17
3.1. Área de Estudio	17

3.1.1.	Ubicación Geográfica	17
3.2.	Universo y muestra	17
3.3.	Viabilidad	17
3.4.	Variables	18
3.5.	Criterios	18
3.5. 1.	Criterio de inclusión	18
3.5.2.	Criterio de exclusión	18
3.6.	Operación de variables	19
3.7.	Tipo de investigación	20
3.8.	Tratamientos estudiados	20
3.9.	Diseño de la investigación	21
3.9.1.	Análisis de varianza	21
3.10.	Técnicas aplicada a la investigación	21
3.10.1.	En el laboratorio	21
3.10.2.	Identificar la presencia de <i>Alternaria solani</i>	21
3.10.3.	Reactivación de <i>Hypocrea lixii</i>	22
3.10.4.	Inoculación del fitopatógeno	22
3.10.5.	Contaje de conidios en cámara de Neubauer	22
3.10.6.	Inoculación del antagonista	23
3.11.	Incidencia y severidad	24
3.12.	Manejo del experimento en el campo	24
3.12.1.	Preparación del semillero y siembra	24
3.12.2.	Preparación de tierra y llenado de macetas	24
3.12.3.	Trasplante	25
3.13.	Labores Agrícolas	25
3.13.1	Preparación del suelo	25
3.13.2	Riego	25
3.13.3	Control de maleza	25
3.13.4.	Fertilización	25
3.13.5.	Poda	26
3.13.6.	Tutorado	26
3.13.7.	Aporque	26
3.13.8.	Control Fitosanitario	26

3.14.	Materiales y equipos utilizados	27
3.15.	Recursos utilizados	27
3.15.1.	Recursos humanos	27
3.15.2.	Recursos Físicos	27
CAPITULO IV	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
CAPITULO V	CONCLUSIONES	36
CAPITULO VI	RECOMENDACIONES	37
	BIBLIOGRAFÍA	38
	ANEXOS	42
Anexo 1.	Cultivo del tomate en invernadero.	42
Anexo 2.	Croquis de invernadero	43
Anexo 3.	Croquis de campo	44
Anexo 4.	<i>Alternaria solani</i> en medio de cultivo y conidios	45
Anexo 5.	Antagonista obtenido en el laboratorio	46
Anexo 6.	Tutoreo de las plantas de tomate	47
Anexo 7.	Preparación de diluciones en el laboratorio	48
Anexo 8.	Atomización manual a los tratamientos	49
Anexo 9.	Acción de la <i>Alternaria solani</i> en el fruto y sanos	50
Anexo 10.	Flujograma de la investigación	51
	Glosario	52

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Contenido	Página
Cuadro 1. Porcentaje de plantas afectadas por <i>Alternaria solani</i> en condiciones de invernadero, primera réplica. UG. 2015	30
Cuadro 2. Porcentajes plantas afectadas por <i>Alternaria solani</i> en condiciones de invernadero, segunda réplica. UG. 2015	31
Cuadro 3. Porcentaje de plantas con síntomas de <i>Alternaria solani</i> , primera réplica UG. 2015	32
Cuadro 4. Porcentaje de plantas con síntomas de <i>Alternaria solani</i> , segunda réplica UG. 2015	33
Figura 1. Cámara de Neubauer para conteo de esporas	23
Figura 2. Esquema del proceso de dilución del antagonista	23
Figura 3. Cultivo de <i>Alternaria solani</i> en agar Sabouraud	28
Figura 4. Observación de micelios de <i>Alternaria solani</i> a través de microscopía óptica	29
Figura 5. Porcentaje de plantas con presencia de <i>Alternaria solani</i> durante 44 días de evaluación. UG, 2015	31
Figura 6. Porcentaje de plantas con presencia de <i>Alternaria solani</i> durante 44 días de evaluación en el estudio de frecuencias de aplicación de <i>H. lixii</i> en la primera réplica. UG, 2015	33
Figura 7. Porcentaje de plantas con presencia de <i>Alternaria solani</i> durante 44 días de evaluación en el estudio de frecuencias de aplicación de <i>H. lixii</i> en la segunda réplica. UG, 2015.	34

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD.

Bajo juramento declaro que la responsabilidad de los resultados obtenidos, conclusiones y recomendaciones del presente trabajo de investigación son exclusivamente de la autora.

QF. Nelka Patricia Tandazo Falquez

C. I. 0902958164

Celular: 0991222262

e-mail: bellanelka_53@hotmail.com.

.....

INTRODUCCIÓN.

El tomate *Lycopersicum 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.

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 2.010 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 afectado por muchos hongos ascomicetes e imperfectos los cuales ocasionan enfermedades en el follaje, inflorescencias, tallos jóvenes, frutos e incluso las raíces. Algunos fitopatógenos pueden causar también ataques por crecer y multiplicarse en el xilema y en el floema de la planta y, por ende, por bloquear el 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.

El tizón temprano del tomate es producido por un hongo llamado *Alternaria solani* que afecta a hojas, produce lesiones en el tallo, peciolo y frutos.

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 *Thichoderma*, *Penicilium* y *Gliocladium*.

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 Gomez, 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 y mostró eficacia sobre la infección del tizón del tomate en invernadero

En este estudio los resultados a obtener serán: reducir el uso de fungicidas, obtener frutos de calidad, proteger la salud de las personas y del ambiente, evitar costos de producción.

CAPITULO I

EL PROBLEMA

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

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.

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 (FAO).

1.2. JUSTIFICACIÓN

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.

Por lo antes expuesto la importancia de este tema es disponer de una alternativa biológica para obtener productos sin residuos químicos e impulsará a una agricultura sustentable y sostenible mediante un cultivo ecológico; proteger el medio ambiente y generar información sobre la acción que ejerce *Hypocrea lixii* sobre el tizón temprano del tomate.

1.3 DETERMINACIÓN DEL PROBLEMA

Campo: Agricultura

Área: Microbiología

Aspecto: biocontrol de la enfermedad del tizón temprano del tomate por medio de un antagonista como es *Hypocrea lixii*.

1.4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿Qué apariencia tiene *Alternaria solani* causante del tizón temprano en el cultivo del tomate al microscopio?

¿Cómo se manifiesta el control de *Alternaria solani* ante diferentes dosis de *Hypocrea lixii*?

¿Influye la frecuencia de aplicación de *Hypocrea lixii* en el control de la *Alternaria solani*?

1.5. OBJETIVOS

1.5.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de *Hypocrea lixii* sobre el tizón temprano del tomate *Alternaria solani*, en condiciones de invernadero.

1.5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar la presencia de *Alternaria solani* causante del tizón temprano en el cultivo del tomate mediante microscopía óptica.

2. Evaluar el efecto de la mejor dosis de aplicación de *Hypocrea lixii* sobre *Alternaria solani* en condiciones de invernadero.
3. Establecer la frecuencia de aplicación de *H. lixii* para el manejo de *Alternaria solani* en condiciones de invernadero.

1.6. HIPÓTESIS

El uso del antagonista *Hypocrea lixii* tiene efecto positivo sobre el hongo de *Alternaria solani*.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. EL CULTIVO DE TOMATE (*Lycopersicum esculentum* Mill)

2.1.1. GENERALIDADES

El tomate es una planta originaria de América y cultivada en todo el mundo por su fruto comestible. Este cultivo pertenece a la familia de las solanáceas y necesita de climas templados para crecer sin problemas. La palabra tomate procede del náhuatl *tomātl*, ‘tomate’. En el centro y sur de México se llama «tomate» al tomatillo o tomate verde (*Physalis ixocarpa*), mientras que el tomate común es conocido como «jitomate» (que proviene del nahuatl *jictli*: ‘ombligo’ y *tomātl*: ‘tomate’, que significaba ‘tomate de ombligo’ (Crisanto C, 2010).

Este fruto se produce y consume en todo el mundo tanto fresco como procesado de diferentes modos, ya sea como salsa, puré, jugo/zumo, deshidratado o enlatado. La planta del tomate, es una hierba delicada que crece naturalmente de manera rastrera, sin embargo, puede cultivarse de forma erecta o semi erecta, con ayuda de estructuras de madera y puede llegar a sobrepasar al metro de altura. Las hojas, pubescentes-tomentosas (como toda la planta), son alternas, de hasta 25 cm de largo, divididas en varias hojillas de diferentes tamaños principalmente en la base (Crisanto C, 2010).

Los tallos no son delgados (superan los 20 centímetros de grosor) y, debido a esto, son frágiles. Externamente están cubiertos de abundantes pelos, por lo que es áspero al tacto. La flor tiene un cáliz de 5 sépalos angostamente triangulares, puntiagudos; la corola es de color amarillo, también en forma de estrella de 5 puntas (raramente más, y hasta 9). Hay 5 estambre, a veces más hasta 9, con sus filamentos unidos entre sí en la parte inferior, libres en la parte distal y rodeando al estilo. Las flores juntas forman inflorescencias dispuestas en racimos cortos o alargados, a veces ramificados, ubicados generalmente en los nudos (Corpeño B, 2004).

El fruto, el tomate es una baya jugosa, de forma generalmente sub-esférica, globosa o alargada y, habitualmente, de unos 8 centímetros de diámetro. Inmaduro es del todo verde y cuando madura, toma generalmente un color rojo intenso, pero también se encuentra en tonos anaranjados, debido a la presencia de los pigmentos licopeno y carotenos, posee un sabor ligeramente ácido, mide de 1 a 2 cm de diámetro en las especies silvestres, y es mucho más grande en las variedades cultivadas (Nuez F, 2009).

Los frutos del tomate de pasta son de distintos modos, pudiendo encontrarse de forma alargada, de pera o redondos, siendo estos últimos preferidos por el mercado ya que en muchas ocasiones los utilizan para sustituir el tomate de ensalada. El color predominante es el rojo, tienen alta viscosidad, son biloculares, con pH menor a 4.5 y de pericarpio más grueso que los destinados al consumo en ensaladas. Su peso varía entre los 50 – 100 gr/fruto. Sus semillas son numerosas, más o menos circulares, aplanadas, parduscas/amarillentas (El Agro, 2005).

2.1.2. COMPOSICIÓN Y VALOR NUTRICIONAL

El tomate es un alimento con escasa cantidad de calorías. De hecho, 5.000 gramos de tomate se aportan solamente 18 Kcal. La mayor parte de su peso es agua y el segundo constituyente en importancia son los hidratos de carbono. Contiene azúcares simples que le confieren un ligero sabor dulce y algunos ácidos orgánicos que le otorgan el sabor ácido característico. Los contenidos nutricionales por cada 100 gramos de tomate son: Carbohidrato 4 g, azúcares 2.6 g, Grasas 0.02, Proteínas 1 g, agua 95 g, vitamina C 13 mg y una energía de 20 Kcal 80 Kj, según el departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, 2007).

El tomate maduro contiene mayoritariamente el licopeno en aproximadamente un 83%, también se encuentra el β -caroteno, entre un 3-7%, y otros componentes como el γ -caroteno, el β -caroteno que presentan actividad provitáminica A, fitoeno, fitoflueno, etc. El contenido en licopeno aumenta con la maduración de los tomates y puede presentar grandes variaciones según la variedad, condiciones del cultivo como el tipo de suelo y clima (Duran A *et al*, 2005).

El tomate es una fuente importante de minerales, como potasio y magnesio. De su contenido en vitaminas destacan la B1, B2, B5, y la C. Posee también carotenoides como licopeno, (pigmento que da el color rojo característico al tomate), estos dos últimos son antioxidantes con una función protectora del organismo humano (CIDH, 2004).

Además, actúa modulando las moléculas responsables de la regulación del ciclo celular y produciendo una regresión de ciertas lesiones cancerosas. No se conoce exactamente las bases biológicas ni fisicoquímicas de estas propiedades, pero parecen directamente relacionadas con el elevado poder antioxidante del licopeno, mucho más que otros antioxidantes como la vitamina E o el β -caroteno. Un gran número de procesos cancerígenos y degenerativos están asociados a daños oxidativos sobre los tejidos. El licopeno actuaría como un poderoso neutralizador de radicales libres (óxido y peróxido) (Vítale A *et al*, 2010).

Este fruto contiene vitamina A en un 20%, vitamina C en 10%, potasio en 10% e hierro en 2%, la vitamina C combate la presencia de radicales libres que dañan nuestra salud ya que están ligados con muchas enfermedades cardiovasculares y al cáncer, así como también aceleran el proceso de envejecimiento. Al ser rico en potasio interviene en la regulación del equilibrio ácido-base del cuerpo y funcionamiento de los nervios, corazón y los músculos (El Agro, 2005).

2.2. ENFERMEDADES QUE AFECTAN AL CULTIVO DEL TOMATE

2.2.1. GENERALIDADES.

Los organismos fitopatógeno pueden ser nematodos, bacterias, virus, protozoarios, moluscos, y hongos, pero la mayoría de los patógenos de las plantas son hongos de las división ascomicetes, basidiomicetes y oomycota.

Las principales enfermedades causadas por hongos en tomate son mildius, oidios, royas, carbonos, que se manifiestan como agallas, deformaciones, necrosis, chancros, marchiteces foliares, vasculares, podredumbres radicales, de flores, de

frutos y micosis post-recolección. Generalmente el patógeno inverna en residuos de cosecha que permanecen en el suelo, o en otras solanáceas; los conidios germina a temperaturas entre 24-29°C, en ambientes húmedos o lluviosos, diseminándose fácilmente a través del aire y la lluvia (Sánchez, 2012).

Entre las provincias de Guayas, Santa Elena y Manabí, entre los causales de enfermedades foliares en el cultivo del tomate se mencionan a *Alternaría solani* entre otros. Daña las hojas produciendo manchas pequeñas circulares o angulares, con marcados anillos concéntricos en las hojas, en tallo y peciolo produce lesiones negras alargadas, en las que se pueden observar a veces anillos concéntricos (Morán, 2008).

Este hongo puede sobrevivir en el suelo, en residuos de cultivos infestados, en la maleza, en semillas o dispersado con la ayuda del viento, agua insectos, trabajadores y maquinarias agrícolas. Las esporas que aterrizan en las plantas de tomate germinan e infectan las hojas cuando estas están húmedas. Las esporas pueden penetrar las hojas, tallos o frutos. El tizón temprano es más severo cuando las plantas están estresadas por muchos fructificaciones, ataque de nematodos o deficiencias de nitrógeno, *Alternaría solani* persiste dependiendo de la localidad en residuos de cosecha, suelo, tubérculos infectados u otros hospedantes del grupo de las solanáceas (Infante D *et al*, 2009).

El hongo penetra directamente a través de la epidermis. La infección primaria puede realizarse al follaje más viejo durante la etapa temprana del cultivo, la mayor diseminación secundaria se realiza especialmente después de la floración, cuando el nivel de inculo es mucho más alto, la enfermedad se desarrolla con mayor rapidez durante los periodos en que se alternan condiciones húmedas y secas de ambiente (Nuez, 2009).

La sintomatología del tizón temprano *A. solani*, afecta principalmente a las hojas, tallos, flores y frutos, generalmente, la afección foliar aparece en forma de manchas irregulares constituidas por anillos concéntricos (Okumoto, 2004; CIDH, 2004).

Este hongo también ataca al fruto, formando una depresión cerca al pedúnculo, a partir de las cicatrices del cáliz, provocando lesiones pardo-oscuras ligeramente deprimidas y recubiertas de numerosas esporas del hongo. (Info Jardín, 2011). La infección se presenta durante periodos lluviosos y de alta humedad, aunque también se ha observado que en periodos secos y cálidos que se favorece su rápida expansión, preferentemente si existen periodos frecuentes de rocío o riego por aspersión (Agrios, 2004).

Los hongos 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, actividad antibiótica, microparasitismo y habilidad de incrementar el desarrollo y crecimiento de las plantas. Otra de las propiedades antagónicas se basa en el biocontrol por competencias como fungistaxis, que es la competencia por nutrientes, biofertilización y activación de los mecanismos de defensa de las plantas. (Benítez et al, 2004).

2.2.2. HONGO PATÓGENO: *Alternaria solani*

TAXONOMIA

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

El tizón temprano o alternariosis es una de las enfermedades más importantes del cultivo del tomate, debido a que puede afectarlo en cualquier etapa de su desarrollo. La enfermedad se encuentra bien establecida, su presencia y peligro potencial se puede manifestar prácticamente durante casi todo el ciclo de

desarrollo en muchas regiones del país. Su control es difícil y la opción del empleo de variedades resistentes es uno de los objetivos a lograr en breve plazo, para lo cual se requiere del conocimiento de los mecanismos básicos que rigen la interacción de esta investigación (Torres E, *et al*, 2008).

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).

Dañadas las hojas con 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).

En tallo y peciolo produce lesiones negras alargadas, en las que se pueden observar a veces anillos concéntricos. Los frutos son atacados a partir de las cicatrices del cáliz, provocando lesiones pardo-oscuras ligeramente deprimidas y recubiertas de numerosas esporas del hongo. 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).

La colonia del hongo va 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. El pico de la conidia tiene al inicio el cuerpo y se adelgaza en el extremo, algunas veces es ramificado y tiene el largo del cuerpo de la conidia o ligeramente más grande (Benítez T *et al*, 2004).

Entre las alternativas para el manejo de las enfermedades causadas por hongos está el uso de químico a través de fungicidas, que en el caso de la Alternariosis en el cultivo de tomate constituye una medida obligatoria para asegurar una alta productividad (Arauz, 2002). Entre los fungicidas comúnmente utilizados por los agricultores para eliminar patógenos o retardar su crecimiento se encuentran fungicidas protectantes como los carbamatos, clorotalonil, cúpricos, entre otros (Arreaga, Hernández 2004).

También se usan extractos vegetales elaborados con ruda, neen, en dosis de 200 y 100 g de hoja por litro de agua. Las labores fitosanitarias, se realizan de acuerdo al tipo de plaga presente en el cultivo. Las constantes investigaciones en la búsqueda de respuestas al control fitosanitario en el cultivo del tomate, es la tarea principal de muchos científicos ya que son necesarios estos estudios por diversas razones como: agroecológicas, salud, alimentación, entre otras (Vivas, 2011).

2.2.3. Control fitosanitarias.

Se realizaron monitoreo y evaluaciones semanales de los principales insectos plagas y enfermedades que se presentaren en el cultivo y de acuerdo al umbral se aplicaron los insecticidas adecuados para el control de los mismos.

2.3. ORGANISMO ANTAGÓNICOS

2.3.1. HONGO ANTAGONISTA: *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>

Los hongos 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, actividad antibiótica, microparasitismo y habilidad de incrementar el desarrollo y crecimiento de las plantas. 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 uso de microorganismos antagonistas para el control biológico de fitopatógenos de suelo es una de las herramientas del manejo integrado de plagas. El control biológico es la utilización de organismos vivos para reducir la población de determinados organismos nocivos. Los organismos utilizados pueden ser enemigos naturales de los dañinos o individuos de la misma especie manipulados de modo que perjudiquen a sus propios congéneres (Jacas *et al*, 2005, Nicholls, 2008).

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 hospedante 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).

2.4. CARACTERISTICAS DEL INVERNADERO

2.4.1. Temperatura

La temperatura óptima, de desarrollo del cultivo de tomate oscila entre los 20 y 30 °C durante el día y entre 10 y 17 °C durante la noche. Las temperaturas superiores a los 35 °C impactan negativamente sobre el desarrollo de los óvulos fecundados y, por ende, afectan el crecimiento de los frutos. Por otro lado, las temperaturas inferiores a 12 °C afectan adversamente el crecimiento de la planta. Las temperaturas son especialmente críticas durante el período de floración, ya que por encima de los 25 °C o por debajo de los 12 °C la fecundación no se produce (Duran A, *et al*, 2005).

2.4.2. Humedad

La humedad relativa óptima oscila entre 60% y 80%. Con humedades superiores al 80% incrementa la incidencia de enfermedades en la parte aérea de la planta y puede determinar, además, el agrietamiento de los frutos o dificultades en la polinización ya que el polen se apelmaza. En el otro extremo, una humedad relativa menor al 60% dificulta la fijación de los granos de polen al estigma, lo que dificulta la polinización (Corpeño, 2004).

2.4.3. Luminosidad

La luz solar es un pre-requisito para el crecimiento de la planta. El tomate necesita de condiciones de muy buena luminosidad, de lo contrario los procesos de crecimiento, desarrollo, floración, polinización y maduración de los frutos pueden verse negativamente afectados.

El tomate es un cultivo que no lo afecta el fotoperiodo o largo del día, sus necesidades de luz oscilan entre las 8 y 16 horas; aunque requiere buena iluminación. Los días soleados y sin interferencia de nubes, estimulan el crecimiento y desarrollo normal del cultivo (Corpeño B, 2004).

2.4.4. Suelo

La planta de tomate no es muy exigente en cuanto a suelos, excepto en lo que se refiere al drenaje, el cual tiene que ser excelente ya que no soporta el anegamiento. No obstante, prefiere suelos sueltos de textura silíceo-arcillosa y ricos en materia orgánica como los suelos franco, y franco arcilloso, con buen drenaje y pH entre 6,5 a 7,5(Nuez F, 2009).

2.4.5. Potencial de hidrogeniones pH

En cuanto al pH, los suelos pueden ser desde ligeramente ácidos hasta ligeramente alcalinos cuando están en-arenados. En invernadero el tomate tolera diferentes condiciones de salinidad tanto del suelo, como del agua de riego (Nuez F, 2009).

2.4.6. Riego

El consumo diario de agua por planta adulta de tomate es de aproximadamente 1.5 a 2 litros por día, la cual varía dependiendo de la zona, las condiciones climáticas del lugar, la época del año y el tipo de suelo que se tenga.

Existen diversos sistemas de riego (gravedad, aspersión y goteo) y su uso depende de la disponibilidad de recursos, pendiente del terreno, textura de suelo, abastecimiento y calidad de agua. Con cualquiera de los sistemas seleccionados, se debe evitar someter el cultivo a deficiencias o excesos de agua. Es importante la buena distribución del riego durante todo el ciclo del cultivo, principalmente antes de la formación de frutos.

De los tres sistemas de riego mencionados, el más eficiente es el de goteo, ya que es el que menos pérdidas de agua tiene. Este tipo de riego es el que se recomienda para trabajar el tomate, en general, en riego por goteo se aplican entre 30 a 40 m³ de agua/ha. /día, dependiendo del tamaño de la planta, población y época del año. La evapotranspiración de la zona y el coeficiente del cultivo es quizá lo

más importante que debe considerarse en el rendimiento del riego. (MAGAP, 2012).

2.5. Variedades

Los cultivares sembrados en el país y que se encuentran en los mercados y supermercados están: Daniella, Francesca, Alboran, Jenna, Heart Máster, Big Beff, y otros. El cultivar usado en esta investigación será Floradade por ser uno de los cultivares más frecuentes y más fungosos.

CAPÍTULO III METODOLOGÍA

3.1. ÁREA 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.

3.1.1. Ubicación geográfica

Sus coordenadas Geográficas son: latitud sur 2° a 12', longitud occidental 79° 53' y 6 msnm, con una temperatura media anual de 26.79 °C, una precipitación media anual de 85.59 mm, una humedad relativa media anual de 72.94%, una precipitación media anual de 118.65 y una heliofonía de 1303.9 horas de sol anual (Datos tomados de la estación meteorológica de la Universidad de Guayaquil).

3.2. 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 como ya se describió.

3.3. VIABILIDAD

Se dispone de información sobre el efecto del antagonista, existe además el laboratorio para la multiplicación e identificación del hongo patógeno y una infraestructura para la evaluación de *H. lixii* en condiciones de invernadero en forma artesanal; así como el personal capacitado para lograr el objetivo de esta investigación.

3.4. VARIABLES

Dependiente: Incidencia y severidad de *A. solani*.

Independiente: Efecto de antibiosis de *Hypocrea lixii* sobre *A. solani*.

3.5. CRITERIOS

3.5.1. Criterio de inclusión

- 1.- Producción de tomate con uso de fungicidas.
- 2.- Manejo de microorganismos (*A. solani* e *H. lixii*).

3.5.2. Criterios de exclusión

- 1.- Tomates cultivados sin uso de fungicidas.
- 2.- Manejo de otros microorganismos que no fueran: *A. solani* e *Hypocrea lixii*.

3.6. OPERACIÓN DE VARIABLES

VARIABLE	DEFINICIÓN	DIMENSIÓN	INDICADOR	NIV. MEDIC.	INS. MEDIC.	ESTADÍSTICO
<i>Alternaria solani</i>	Hongo fitopatógeno causante de Alternariosis en tomate	Cantidad de manchas o daños en la planta	Presencia de Síntomas	Ordinal	Libreta de campo, escala de evaluación	Diseño completamente al azar, análisis de varianza.
<i>Hypocrea lixii</i>	Hongo antagonista de <i>Alternaria solani</i>	Inhibición de daños causados por <i>Alternaria solani</i>	Ausencia de Síntomas	Ordinal	Libreta de campo, escala de evaluación	Diseño completamente al azar, análisis de varianza.

3.7. 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.

3.8. TRATAMIENTOS ESTUDIADOS

Desarrollo del segundo objetivo:

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)

Desarrollo del tercer Objetivo:

El estudio de frecuencias de aplicación de *H. lixii* se describe a continuación:

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)

3.9. 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.

3.9.1. 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 ($p=0.05$).

3.10. TÉCNICAS APLICADAS EN LA INVESTIGACIÓN

3.10.1. En el laboratorio

- a) Identificar la presencia de *Alternaria solani*
- b) Reactivación de la *Hypocrea lixii*
- c) Inoculación del fitopatógeno
- d) Contaje de conidios en cámara de newbauer
- e) Inoculación del Antagonista

3.10.2. 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*.

3.10.3. 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.

3.10.4. 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.

3.10.5. Contaje de conidios en cámara de Neubauer

Para preparar la solución madre de *Hypocrea lixii*, se midió en una 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 colocó en la cámara de Neubauer, con la ayuda de un contador se procede 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 conteaje de esporas

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.

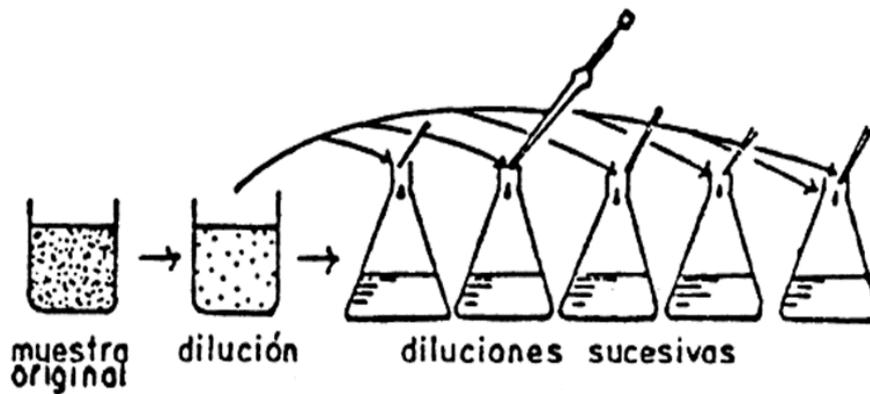


Figura 2. Esquema del proceso de dilución del antagonista.

3.10.6. 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.

3.11. 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.

3.12. MANEJO DEL EXPERIMENTO EN EL CAMPO

3.12.1. 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.

3.12.2. 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 agregó 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.

3.12.3. 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.

3.13. LABORES AGRICOLAS

3.13.1. 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.

3.13.2. 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.

3.13.3. Control de malezas

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

3.13.4. 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.

3.13.5. 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.

3.13.6. 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 tutoreo 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.

3.13.7. 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.

3.13.8. 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.

3.14. 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 (Memmert), 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).

3.15. RECURSOS UTILIZADOS

3.15.1. Recursos Humanos

En la presente investigación participaron: la maestrante y la tutora.

3.15.2. Recursos físicos

Se contó con:

- ✓ computadoras,
- ✓ cámara digital,
- ✓ papeles
- ✓ semillas de tomate
- ✓ bandejas germinadoras
- ✓ caña guadua, plástico y piola
- ✓ bombas de fumigación capacidad 5 L
- ✓ mangueras para riegos

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

5.1. IDENTIFICAR LA PRESENCIA DE *Alternaria solani* CAUSANTE DEL TIZÓN TEMPRANO EN EL CULTIVO DEL TOMATE MEDIANTE MICROSCOPIA 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.



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

El hongo se lo observó como un micelio filamentoso 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.

5.2. 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) fue 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. UG. 2015.

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).

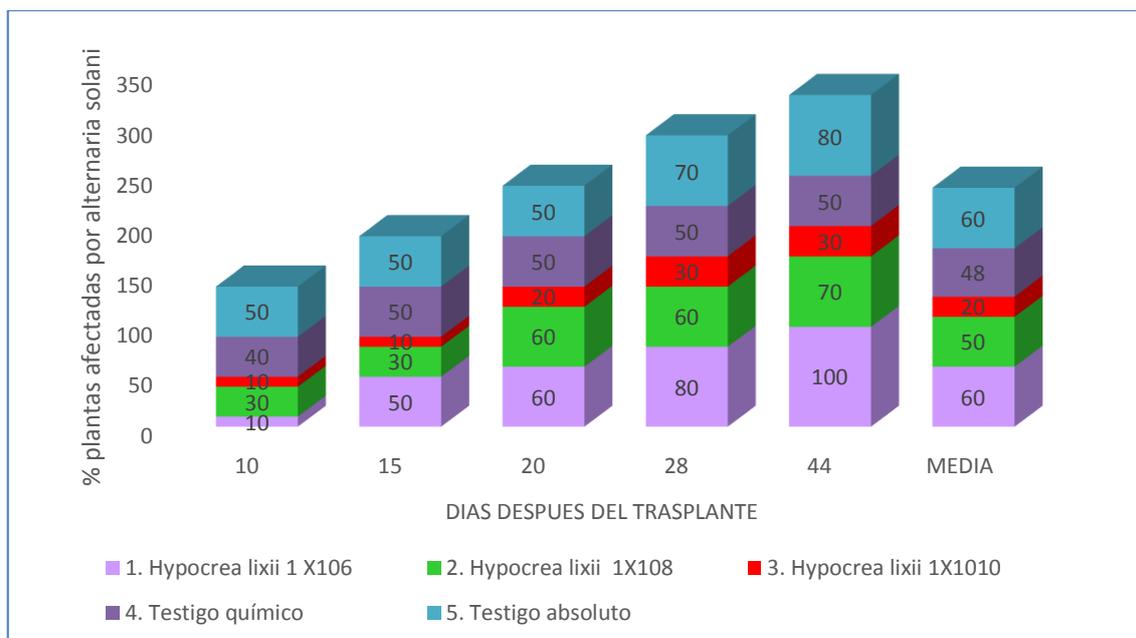


Figura 5. Porcentaje de plantas con presencia de *Alternaria solani* durante 44 días de evaluación. UG, 2015.

La segunda réplica muestra que la dosis 1×10^{10} 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 31.30% (Cuadro 2).

Cuadro 2. Porcentajes plantas afectadas por *Alternaria solani* en condiciones de invernadero, segunda réplica. UG. 2015.

Concentración conidios /ml	Días después del trasplante					Media
	10	15	20	28	44	
1. <i>Hypocrea lixii</i> 1×10^6	1	3	1	90	99	38,8 a ^{1/}
2. <i>Hypocrea lixii</i> 1×10^8	25	4	1	60	80	34,0 a
3. <i>Hypocrea lixii</i> 1×10^{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).

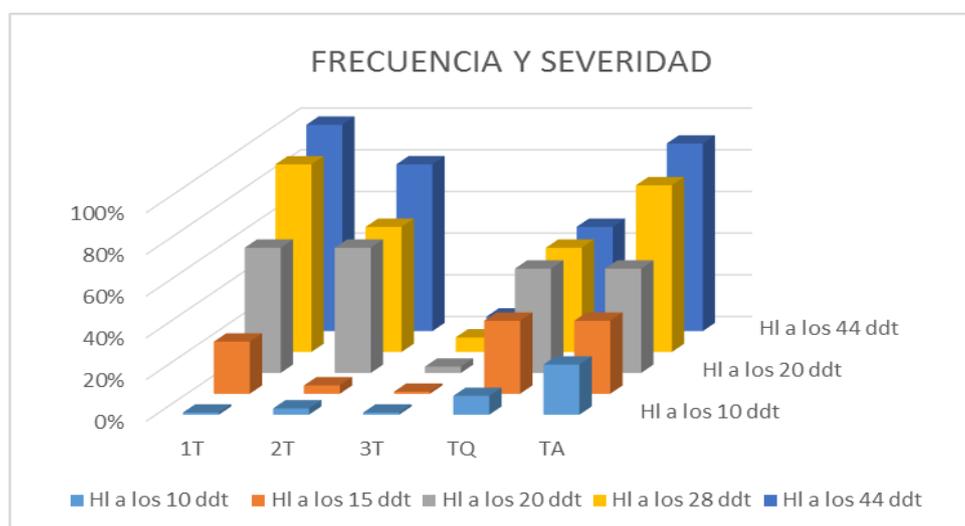


Figura 6. Porcentaje de plantas con presencia de *Alternaria solani* durante 44 días de evaluación en el estudio de frecuencias de aplicación de *H. lixii* en la primera réplica. UG, 2015.

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).

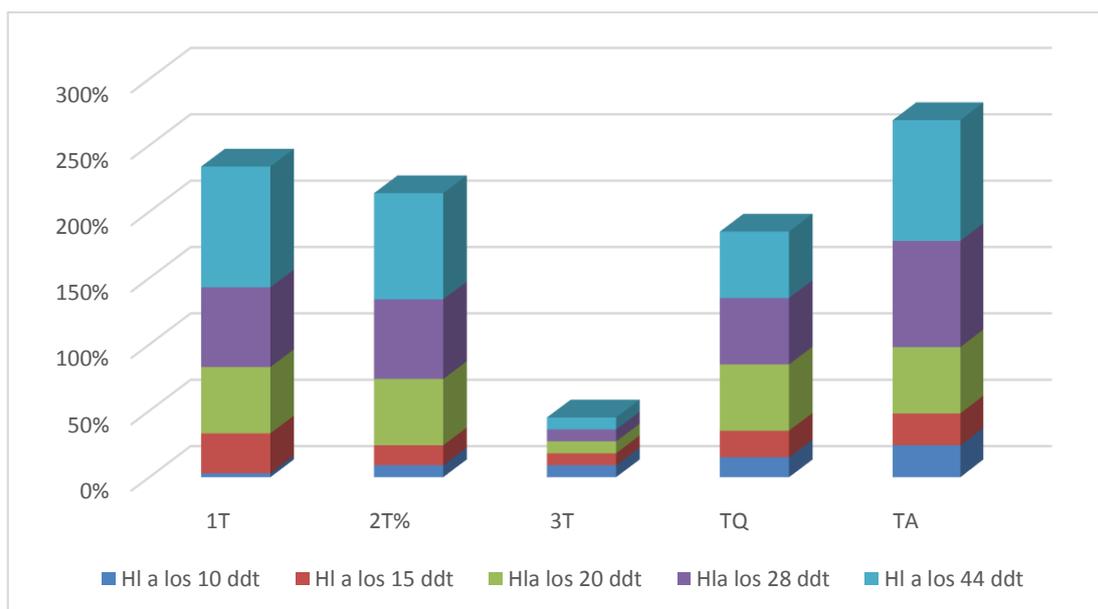


Figura 7. Porcentaje de plantas con presencia de *Alternaria solani* durante 44 días de evaluación en el estudio de frecuencias de aplicación de *H. lixii* en la segunda réplica. UG, 2015.

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 Floradade muestran un comportamiento variable, la dosis más alta fue la de menor efecto, datos que concuerdan a los reportados por Molina M (2010), 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.

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.

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.

CAPÍTULO 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 la 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 eco sistema

6.-La sociedad se verá beneficiada al disponer de productos de consumo masivo limpio, sano saludable; 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.

CAPÍTULO VI

RECOMENDACIONES

1. Realizar otros estudios sobre las dosis determinadas con otros cepas de hongos antagonista que ataquen al tizón temprano del tomate
2. Efectuar otras investigaciones sobre el control de alternariosis en otros cultivos como: pimiento, sandía, melón, que son ampliamente cultivados en la costa y de gran consumo masivo.
3. Investigar los metabolitos toxico volátiles y no volátiles que impiden ser colonizados por microorganismos antagonistas, como *H. lixii* sobre *A. solani*.
4. Realizar combinaciones de bacterias con hongos antagonistas como alternativa eficaz en el control biológico de patógenos que producen enfermedades en el tomate.

BIBLIOGRAFÍA

ACEVES M., et al. 2010. In vitro biological control of tomato *Lycopersicum esculentum* Mill fungous diseases. 12 (3); p. 55-68 ISSN: 780188789-0. Disponible en: <http://www.ucol.mx/revaia/portal/pdf/2008/sept/1.pdf>.

AGRIOS G. 2.004. Fitopatología del cultivo del tomate. México. Editorial Limusa S.A. Página 358.

ALAMRI S. 2012. In vitro and in vivo biocontrol of soil-borne phytopathogenic fungi by certain bio agents and their possible mode of action. *Biocontrol Sci.* 2012; 17(4):155-67.

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.

ARREAGA J., HERNÁNDEZ M. 2.004. Evaluación de Asoxystrobin en el control de la candelilla temprana (*alternaria solani*) p. 107. Disponible en: http://www_revfacagronluz.org.re/PDF/abril_junio2001/ra2012/.pdf.

BAYER CROPS SCIENCE .2009. For a Better Life. Problemas Biológicos alternariosis o Tizón Temprano. Centroamérica y Caribe. Disponible en: <http://www.bayercropscience-ca.com/contenido.php>

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

BLANCARD D. 2.015. Enfermedades del tomate. Madrid. Observar, identificar, luchar. 1ra Ed. Madrid: Mundi prensa. Página 47-181.

CARBAJAL T. editor. 2007. Manual de Cultivos Hortícolas. Estación Experimental Portoviejo. INIAP; Página 5.

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.

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.

CIDH. 2014. El Cultivo del Tomate. [Internet] [Citado 20 de Agosto del 2 012][aprox. 50 p.] Disponible en: [www. Cidh. Org. Mx/monografias/tomate.html](http://www.Cidh.Org.Mx/monografias/tomate.html).

CORPEÑO B. 2004. Manual del Cultivo del Tomate. Idea. Alemania Centro de inversión desarrollo y Exportación de agro negocios. 2 004. Rossdorf 13 (6); página 25.

CRISANTO C.2010. Agrícola de los principales cultivos del Ecuador. [Citado 05 de jun. 2012]. [aprox. 3 páginas].

DELGADO G. 2010. Evaluación de Extracto Vegetales y aplicación de Silicio para el manejo integrado de enfermedades foliares e insectos-plagas en tomate. *Lycopersicum esculentum* Mill. [Tesis de Grado.]. Ecuador. Universidad de Guayaquil. Facultad de Ciencias Agrarias.

DURÁN A., MORA D., RAMÍREZ L. 2005. Compendio de Información para la producción vegetal. Ecuador. El libro verde. Página44.

EL AGRO.2.005. Revista edición No. 107. Editorial Uminusa S.A. Guayaquil Ecuador. Página 17.

EL AGRO. 2005. En tomate con el uso de enmiendas orgánicas. Manejo integrado de Plagas. Costa Rica Federal Register, Revista Editorial Uminusa S.A. Guayaquil Ecuador. Rules and Regulations. 47065. August 13, 2 008; 111 (73): p. 157. Disponible en: <http://www.epa.gov/fedrgstr/>

ELEIN TERRY ALFONSO. 2010. Revista Colombiana de biotecnología. [http://www. Revista.und.edu.cos/lindex.php/biotenlogia/artede/viero/](http://www.Revista.und.edu.cos/lindex.php/biotenlogia/artede/viero/) documento 20, vol 12, N°1 (año 2010). Editorial Universidad Nacional de Colombia.

FAO. 2010. Efecto de Trichodermas sobre Alternaria solani en el cultivo del tomate. 2 010. Disponible en: <http://www.fao.org/home/en/>

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.

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).

INFO JARDÍN. 2011. Cultivo del Tomate, plagas y enfermedades. [Internet] 2 011. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. INIAP, departamento de fitopatología. Disponible en: www.infojardin.com/Ecuador.

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA). 2011. Contrôle d' *Alternaria solani* dans les cultures de tomate. Disponible en : http://www7.international.inra.fr/es/el_instituto.

INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS (INIAP). 2012. Estación experimental del litoral sur “Dr. Enrique Ampuero Pareja”. Boliche.

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 Jaume I de Castelló. ISBN 84-8021 -514-3. Disponible en: www.e-buc.com/portade

MAGAP. Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) Solanácea. 2 012. Disponible en: http://www.mag.go.cr/biblioteca_virtual_ciencia/tec.

MAGAP-SIGAGRO. Censo Nacional Agropecuario. [Internet] 2 011 [citado 05 de jun. 2 012]. [aprox. 3 p.] Disponible en: www.magap.gov.ec.

MELGAREJO P, ANTONIETA DEL CAL, INMACULADA LARREA, PILAR SABUQUILLO Y BELÉN GUIJARRO. 2005. Estrategia para el control Biológico de Hongos Fitopatógenos. Madrid. Página 117.

MOLINA M. 2011. Identificación y evaluación de antagonistas del tizón temprano (*Alternaria solani*) en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Ecuador. [Tesis de Grado]. Previa la obtención del título de Ingeniero Agrónomo. Milagro. Universidad de Guayaquil. Facultad de Ciencias Agrarias.

MORÁN M. 2008. Aislamiento, caracterización y análisis del gen *thpg1* de *Trichoderma harzianum*. Universidad de Salamanca [Memoria grado doctoral]. En ciencias biológica Salamanca página 5-9.

NICHOLLS C. 2008. Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico. Antioquía .62 (1): páginas 18-28.

NUEZ F.2009. El cultivo del Tomate. [Internet][Citado 25 de Jun. 2 012]. [aprox. 3 p.]Disponible en: www.slideshare.net/stanwlad/articulo-trichoderma-ssmp.

OKUMOTO S. Y BUSTAMANTE, E. 2004. Selección in vitro de bacterias antagonistas a *Alternaria solani*. En Manejo Integrado de Plagas. Costa Rica. 28 (1): página 7-10.

PAULUS A. Y CORNELJ. OÍDIO.2010. En Plagas y enfermedades del tomate. The American Phytopathology Society. 4ta ed. Madrid-España: Mundi-Prensa; página 19.

PERDOMO M. PEÑA J., GUEDEZ C., CASTILLO C., CASALES L. 2007 [Internet] *Trichoderma harzianum* para el control de la enfermedad en semilleros de tomate (*Lycopersicon esculentum*). Universidad de los Andes. Academia. [Citado 23 de agosto del 2012].12 (6) p.52-61. Disponible en: www:saber.ula.ve/bitstream/123456789/27300/1/articulo5.pdf.

PORTALANZA D. 2011. Eficacia de Cepas Antagonistas y Endopatógeno para el manejo del Complejo Marchitez y Mosca Blanca en el cultivo del pimiento. *Capsicum annum*. Ecuador. [Tesis de Grado] Universidad de Guayaquil. Facultad de Ciencias Agrarias.

REYES H.2009. Identificación y Evaluación de hongos entomopatògenos en insectos plagas de tomate y permanentes en las provincias de Guayas, Santa Elena y Manabí. Ecuador. [Tesis de Grado]. Facultad de Ciencias Agrarias: Universidad de Guayaquil.

REYES R., BARRACO B., GARCÍA G. Y JIMÉNEZ G.2012. Actividad in vitro de *Trichoderma harzianum* sobre *Sclerotium rolfsii* en plántulas de tomate. Manejo integrado de plagas. No. 66. Página. 45-48.

SÁNCHEZ. M. 2012. Manejo de Enfermedades del Tomate. Curso del INCAPA “Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades en Tomate, Chile y Papa”. México D.F. página 29 – 30. [Citado 25 de jun. 2 012]. Disponible en: <http://www.funprover.org/formatos/manualTomate/Manejo%20de%20Enfermedades%20del%20Tomate.pdf>.

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.

VITALE A., BERNATENE E., POMILIO A.2010. Carotenoids in chemoprevention: Lycopene. Rev. Bioquímica. Clínica. Latinoamericana. 44 (2). Disponible en: <http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S0325->

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.

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.

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.

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. 2011, 3(3). Página 8-21.

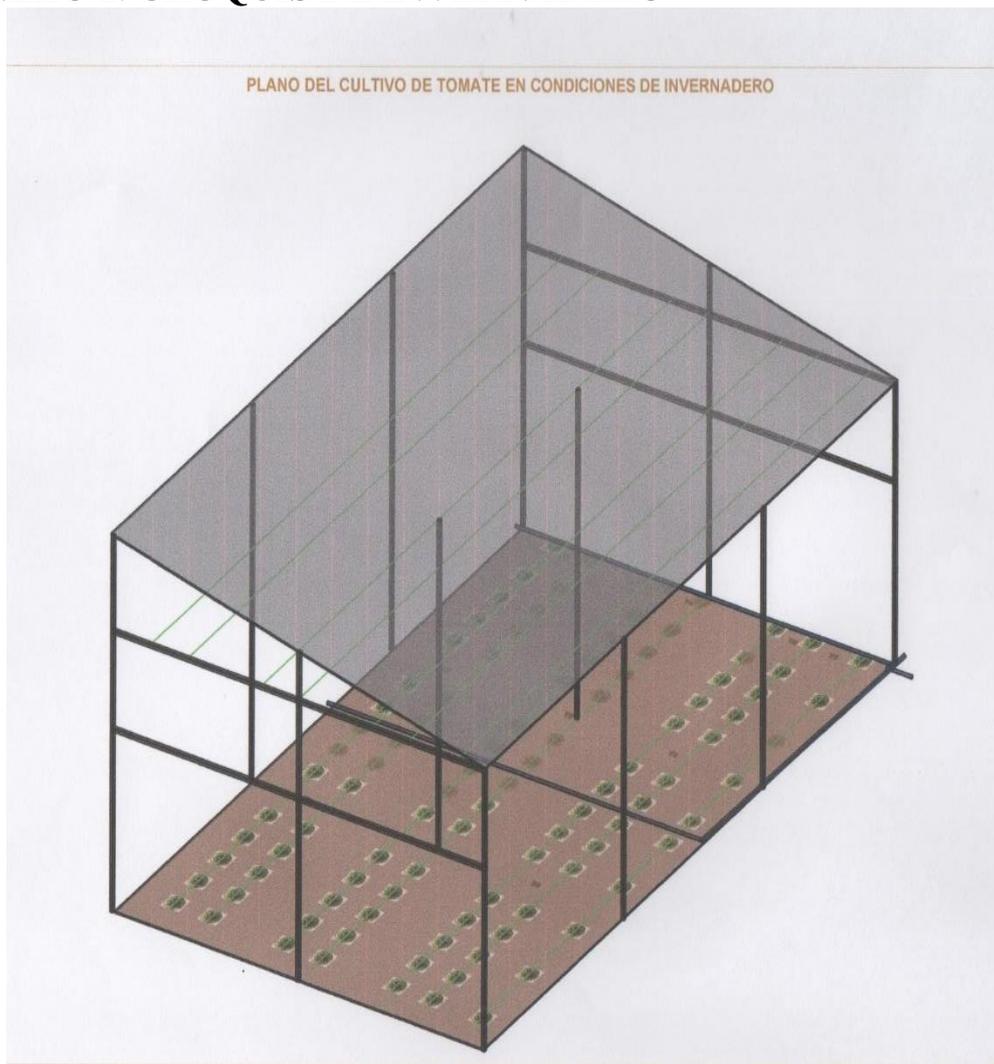
ANEXOS

ANEXO 1. CULTIVO DE TOMATE EN INVERNADERO

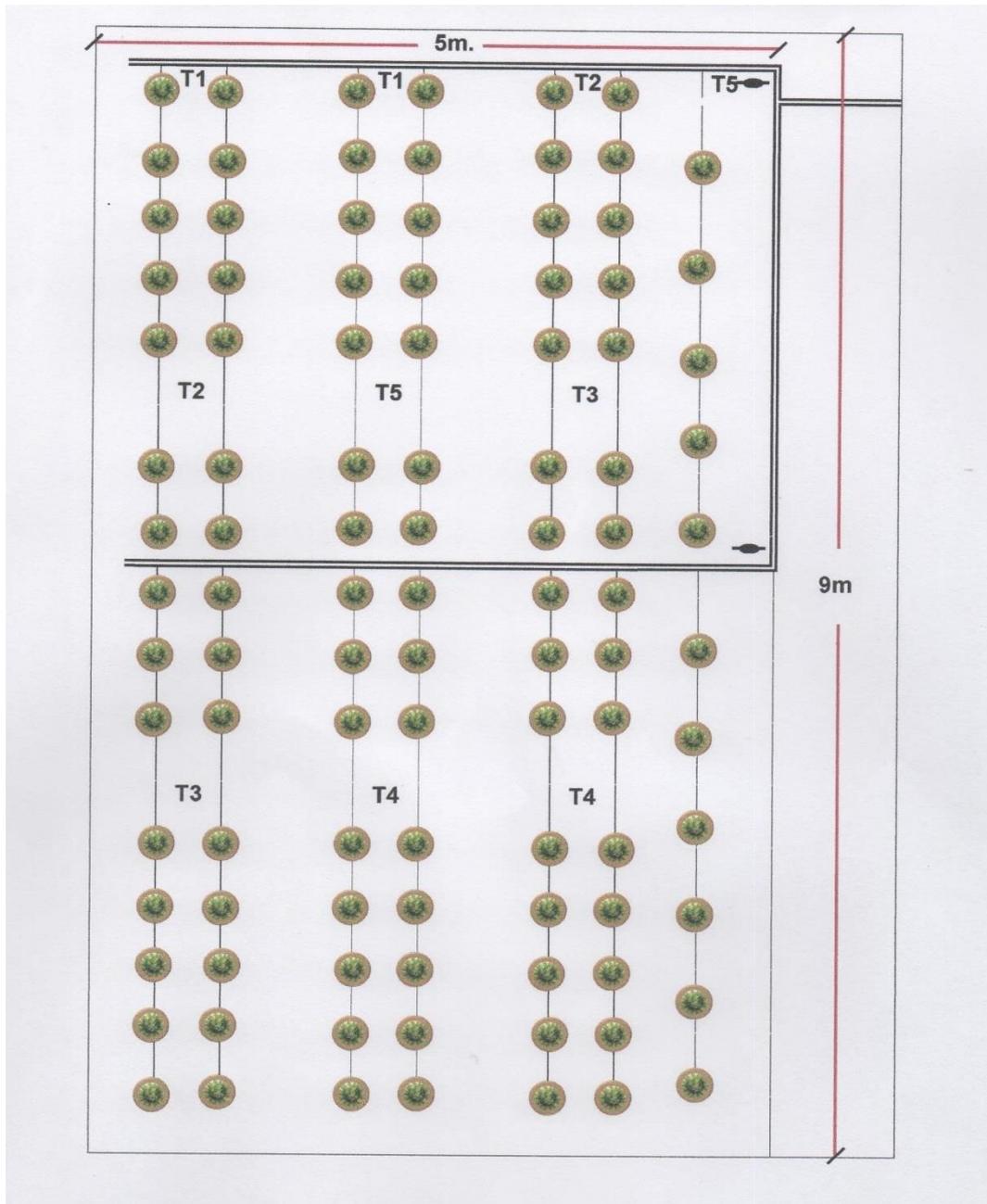


Se observa un invernadero elaborado artesanalmente, cuyo interior hay siembras de tomates tutoradas con piola para mantenerlas erguidas.

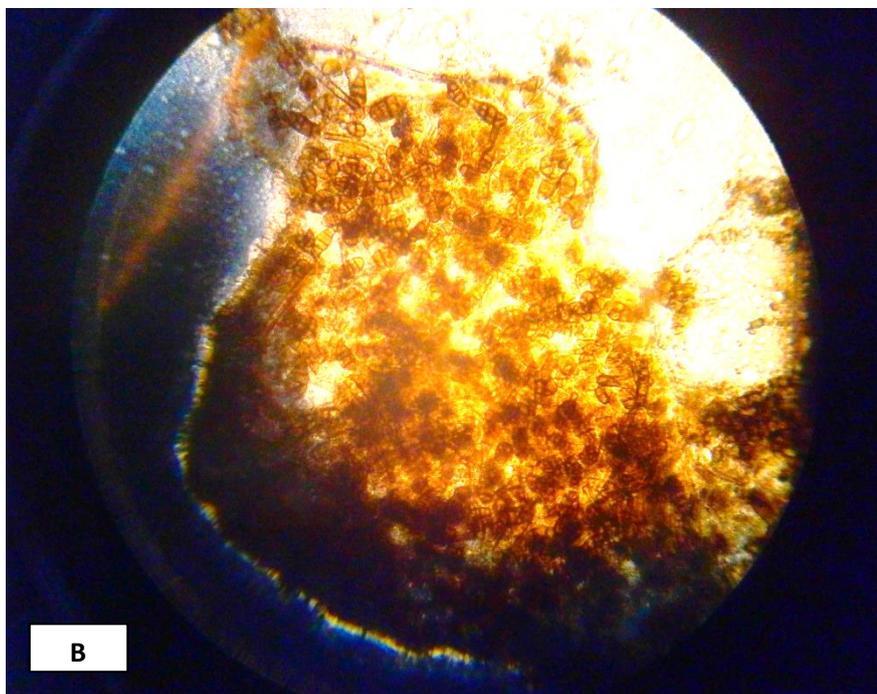
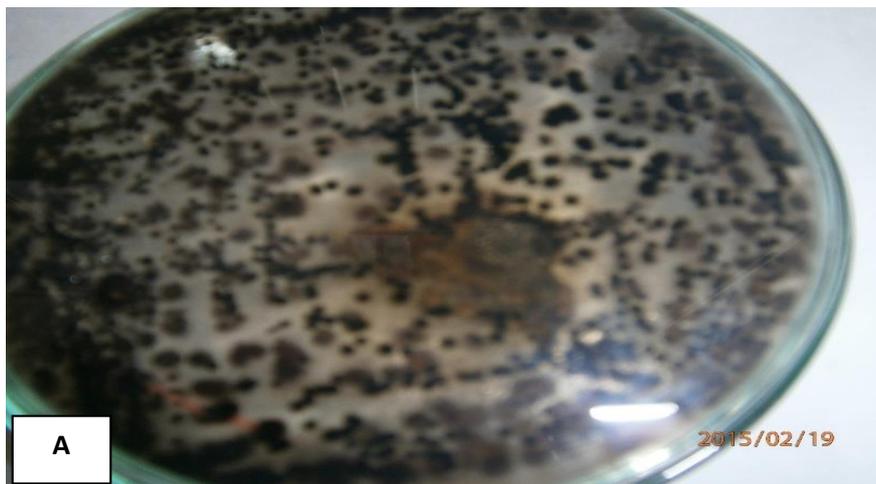
ANEXO 2. CROQUIS DE INVERNADERO



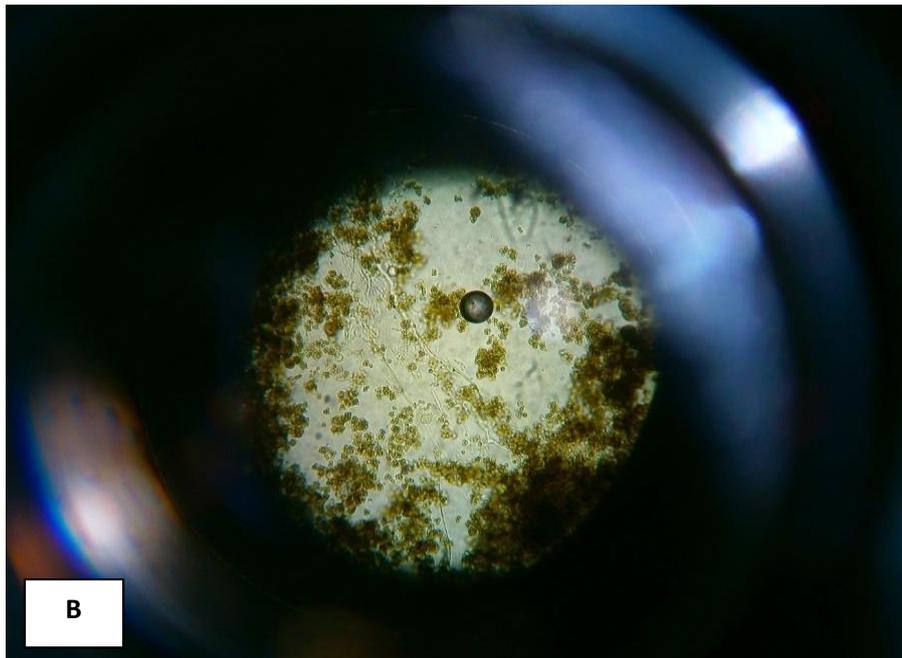
Invernadero construido en forma artesanal

ANEXO 3. CROQUIS DE CAMPO**Croquis de campo. Cultivo del tomate en condiciones de invernadero.**

ANEXO 4. *Alternaria solani* en medio de cultivo agar saboraund. UG. 2015



ANEXO 5. ANTAGONISTA OBTENIDO EN EL LABORATORIO: *Hypocrea lixii*
se observa el crecimiento miceliar del antagonista *Hypocrea lixii*
después de 5 días de haber permanecido en la estufa a 25°C



Se observa la forma alargada transparente y sifonada de *Hypocrea lixii* sembrado en agar PDA (A) y vista al microscopio (B).

ANEXO 6. TUTOREO DE LAS PLANTAS DE TOMATE



Se hace el tutoreo de la planta de tomate para mantener la planta erguida y darles las facilidades para su desarrollo, procedimiento que se lo realiza cuando la planta tenga 21 días del trasplante

ACCIÓN EN LAS HOJAS DE *Alternaria solani*.



Se observa la infección de tizón temprano del tomate ocasionada por *Alternaria Solani* que consiste en manchas en las hojas constituidas por anillos concéntricos que le confiere la apariencia de una diana dando el aspecto del tiro al blanco produciendo un marchitamiento en sus hojas

ANEXO 7. PREPARACION DE DILUCIONES EN EL LABORATORIO. Y ATOMIZADORES



Se observa la caja de petri en el que se encuentra *Hypocrea lixii* y el matraz. Se procede a preparar el agua madre que fue llevada a la cámara de Neubauer realizando el conteo micelial.



Una vez hechos los cálculos respectivos y preparados sus diluciones se procedió aplicarlas de forma manual a los tratamientos de acuerdo a sus dosis.

ANEXO 8. ATOMIZACION MANUAL A LOS DIVERSOS TRATAMIENTOS.

Se observa cuando se hace la atomización a las plantas de tomate con las diluciones mencionadas y de acuerdo a los tratamientos.

**ANEXO 9. ACCIÓN DE ALTERNARIA SOLANI EN EL FRUTO DEL TOMATE.
Y SANOS**

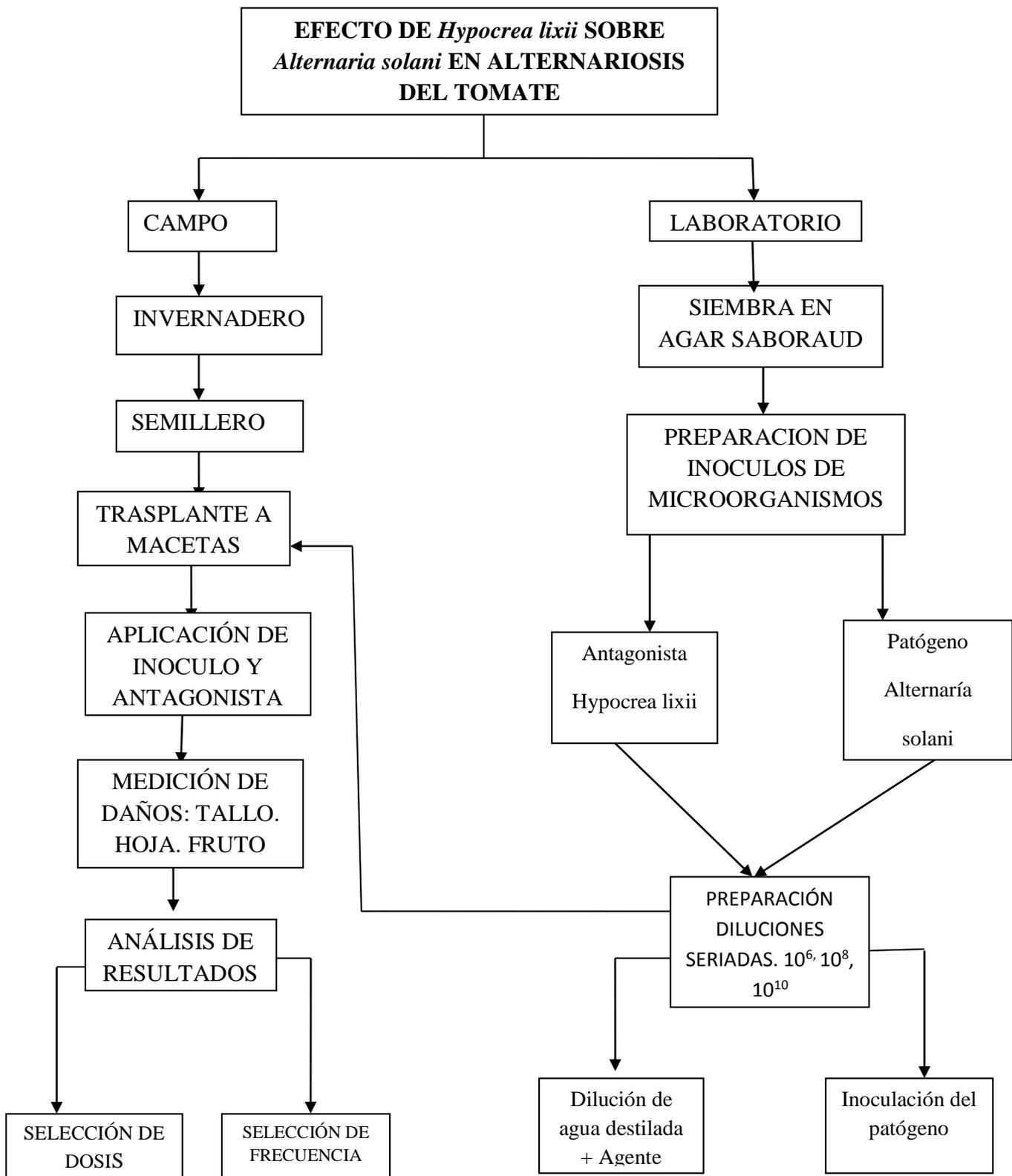


Se observa el ataque de la *Alternaria solani* al fruto en forma de manchas cóncavas deprimidas.



Se observa frutos sanos de buen color, limpios libres de sustancias químicas tóxicas.

ANEXO 10. FLUJOGRAMA DE LA INVESTIGACIÓN



GLOSARIO

Agonista: Sustancia que es capaz de unirse a un receptor celular receptor y provocar una respuesta en la célula con el fin de estimular una función.

Antagonista: Sustancia, natural o sintética, que se une a los receptores del organismo en cuestión, bloqueándolos contra la acción de los agonistas.

Antibiosis: Asociación de dos o más organismos que resulta perjudicial para uno de ellos.

Alternaria solani: Hongo fitopatógeno causante de alternariosis o tizón temprano en cultivos de tomate.

Alternariosis: Es una infección por *Alternaria solani*, la presentación por vía cutánea como centros de coordinación, ulceradas pápulas y placas.

Bio-control: Utilización de organismos vivos para comprobar la pureza de ciertas sustancias.

Biocontroladores o Control Biológico: Es un método de control de plagas, enfermedades y malezas que consiste en utilizar organismos vivos con el objeto de controlar las poblaciones de otro organismo

Bioflenoides: Son moléculas hidrosolubles y están compuestas por un grupo de pigmentos brillantes que frecuentemente se encuentran en frutas y vegetales en compañía de la vitamina C.

Biotrófica: Microorganismos que colonizan las raíces de las plantas para aportarles los nutrientes que necesita para la fase vegetativa.

Carotenoides: Son pigmentos orgánicos del grupo de los isoprenoides que se encuentran de forma natural en plantas y otros organismos fotosintéticos como algas, algunas clases de hongos y bacterias.

Conidióforo: Es una estructura microscópica especializada en la producción asexual de miles de esporas llamadas conidias y se localizan al extremo de hifas.

Cuajado: Unir y trabar las partes de un líquido para convertirlo en sólido.

Esporulación: Reproducción a través de esporas.

Fitoreguladores: Son productores reguladores del crecimiento de las plantas. crecimiento; normalmente se trata de hormonas vegetales (fitohormonas), y sus principales funciones son estimular o paralizar el desarrollo de las raíces y de las partes aéreas.

Flexuoso: Torcido o doblado.

Floema: El tejido conductor encargado del transporte de nutrientes orgánicos, especialmente azúcares, producidos por la parte aérea fotosintética y autótrofa, hacia las partes basales subterráneas, no fotosintéticas, heterótrofas de las plantas vasculares.

Floración: Período en que las flores se mantienen abiertas.

Glucanasas: Son enzimas que degradan b-glucanos.

Gluticid: Antifúngico foliar obtenido a partir de metabolitos activo de *Pseudomonas aeruginosa*.

Haustorio: extremo de la hifa de un hongo parásito o de la raíz modificada de una planta parásita.

Hypocrea lixii: Hongo antagonista de la *Alternaria solani* en alternariosis del tomate.

Lectinas: Son proteínas que se unen a azúcares con una elevada especificidad para cada tipo distinto. Su principal papel está en los fenómenos de reconocimiento, tanto a nivel molecular como celular.

Licopeno: Es un pigmento vegetal, soluble en grasas, que aporta el color rojo característico a los tomates, sandía, y a otras frutas y verduras.

Metamidofos: Es un plaguicida prohibido en muchos países bajo todas las formulaciones y usos pues es nocivo para la salud humana y el medio ambiente.

Parasitismo: Es una interacción biológica entre organismos de diferentes especies.

Pesticidas: Son sustancias químicas o mezclas de sustancias, destinadas a matar, repeler, atraer, regular o interrumpir el crecimiento de microorganismos considerados plagas

Proteinasas: Enzimas que degradan proteínas.

Quimiotaxis: Es un tipo de fenómeno en el cual las bacterias y otras células de organismos uni o multicelulares dirigen sus movimientos de acuerdo a la concentración de ciertas sustancias químicas en su medio ambiente.

Quimiotrópico: Movimiento o crecimiento inducido cuyo estímulo direccional es la química.

Quitinasas: Enzimas que degradan la quitina

Sostenibilidad: Mantenimiento de diversos sistemas biológicos y productivos con el transcurso del tiempo.

Sustentabilidad: Es el equilibrio existente entre una especie con los recursos del entorno.

Tutores: Cuerdas que permiten mantener los tallos de las plantas de tomates en posición vertical.

Xilema: Es el tejido vegetal leñoso de conducción que transporta la savia desde la raíz hasta las hojas de las plantas. Transporta agua, sales minerales y otros nutrientes.



Presidencia
de la República
del Ecuador



Plan Nacional
de Ciencia, Tecnología,
Innovación y Saberes



REPOSITARIO NACIONAL EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA

FICHA DE REGISTRO de tesis

TÍTULO Y SUBTÍTULO: EFECTO DE *Hypocrea lixii* SOBRE EL TIZÓN TEMPRANO DEL TOMATE *Alternaria solani* EN CONDICIONES DE INVERNADERO. GUAYAS, 2014

AUTOR/ES: Q.F. NELKA PATRICIA
TANDAZO FALQUEZ.

REVISORES:

INSTITUCIÓN:
UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL

FACULTAD:
FACULTAD DE MEDICINA

CARRERA: MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA, MENCIÓN INDUSTRIAL.

FECHA DE PUBLICACIÓN:

N. DE PAGS:

ÁREAS TEMÁTICAS: Agronomía, Salud Pública.

PALABRAS CLAVE: *Alternaria solani*, *Hypocrea lixii*, antagonismo.

RESUMEN:El tomate *Lycopersicon esculentum* Mill es una solanácea que es afectado por diversos microorganismos como hongos, bacterias, virus y nematodos; para prevenir estos problemas se utilizan pesticidas para su manejo, los mismos que aumentan los costos de producción y daños en la salud de las personas que laboran en la actividad agrícola y de consumidores. Dentro de las enfermedades comunes y de importancia económica se encuentra el tizón temprano del tomate o Alternariosis, causada por *Alternaria solani*. El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto de *Hypocrea lixii* sobre el tizón temprano del tomate *Alternaria solani*, en condiciones de invernadero, la misma que se desarrollo entre el mes de octubre del 2014 a mayo del 2015.

La investigación 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. 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.

N. DE REGISTRO (en base de datos):

N. DE CLASIFICACIÓN:

DIRECCIÓN URL (tesis en la web):

ADJUNTO URL (tesis en la web):

ADJUNTO PDF:

SI NO

CONTACTO CON AUTORES/ES:

Teléfono:
0991222262

E-mail:
bellanelka_53@hotmail.com

CONTACTO EN LA INSTITUCIÓN:

Nombre: Secretaría de la Escuela de graduados

Teléfono: 2288086

E-mail: egraduadosug@hotmail.com