

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



Aislamiento e Identificación de Hongos Secundarios al Ácaro
(*Acolups lycopersici*) en Tomate

Por:

MAXIMILIANO AGUSTÍN HUERTA CABRERA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Saltillo, Coahuila, México

Octubre de 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

Aislamiento e Identificación de Hongos Secundarios al Ácaro
(*Acolups lycopersici*) en Tomate

Por:

MAXIMILIANO AGUSTIN HUERTA CABRERA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Aprobada por el Comité de Asesoría:


Dr. Ernesto Cerna Chávez
Asesor Principal


Dra. Yisa Maria Ochoa Fuentes
Coasesor


Dra. Mariana Beltrán Beache
Coasesor


Dr. Gabriel Gallegos Morales
Coordinador de la División de Agronomía
Coordinación
División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México

Octubre de 2017

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Por concederme lo más maravilloso de la vida, la de **MIS PADRES Y MI FAMILIA**. Por tender tu mano a ayudar a levantarme, para seguir adelante y obtener un triunfo más, en esta vida; porque tu señor siempre has estado en los momentos más difíciles de mi vida y nunca me abandonas, gracias **DIOS MIO**, por tus bendiciones **SEÑOR**.

A MI “ALMA TERRA MATER”

Por abrigarme en su seno a partir desde el primer día que ingrese hasta el final de mi carrera; por permitir superarme, así como enseñarme a trabajar, lo más hermoso que alimenta a nuestro pueblo mexicano “el campo” , además de obtener la herramienta necesaria para aprovechar al máximo sus frutos.

MIS ASESORES

Mi más sincero agradecimiento **al Dr. Ernesto Cerna Chávez**. Por aceptarme como su tesista.

A la Dra. Mariana Beltrán Beache por su valioso apoyo como coasesora, y por sus consejos y dedicación que me brindo durante la realización del presente, y así culminar exitosamente mi tesis profesional.

Al Dr. Juan Carlos Delgado Ortiz por su valioso tiempo que me brindo apoyándome con el experimento.

A la Dra. Yisa María Ochoa Fuentes por su gran apoyo durante toda la carrera como mi tutora, por su gran apoyo y sus consejos.

DEDICATORIAS

A mis padres:

Agustín Huerta Marín e Isidora Cabrera Villa

Cuando se trata de agradecer el amor, los valores, el impulso, la motivación, el cuidado, la protección, los desvelos, y el sacrificio que han tenido para mí, las palabras no alcanzan para agradecerles por lo que han hecho de mí, nudo que me atraviesa la garganta me impide hablar, solo siento una gran emoción y un profundo agradecimiento de tenerlos a ustedes como padres, no hay manera... Ni una sola palabra que pueda expresar el infinito agradecimiento que tengo hacia ustedes por todo el apoyo que me han regalado.

En este momento los recuerdos invaden mi mente donde cada cavidad se encuentra llena de esos bonitos recuerdos que pasamos juntos desde mi niñez, quiero decirles que cada regaño, impulso, dedicación y una serie de valores que me inculcaron me han servido para lograr lo que una vez soñé y que a hora ese sueño se ha convertido en realidad, lo cual me enorgullece como hijo tener como padres a unos maravillosos seres humanos, no me canso de agradecerles por ayudarme a alcanzar mis metas y por la confianza, cariño y amor que me brindan día a día.....Con la preparación que he obtenido a lo largo de mi carrera profesional que hoy finaliza, el día de mañana les recompensaré el esfuerzo el amor y el sacrificio que me han brindado.

Su hijo que los quiere...

“DIOS LOS BENDIGA SIEMPRE”.

A mi Abuelita:

A Mamá Salud, te llamo así porque fue el único nombre que me enseñaste a decirte desde niño, muchas gracias por todo el amor que me has regalado, la quiero mucho...

A mis hermanas

Matilde Huerta Cabrera mi gran tesoro en la vida, un gran ejemplo a seguir, signo de gran humildad y el gran amor que tienes, te admiro mucho por eso, eres la mayor y la más hermosa en todos los aspectos mi chula, te amo demasiado y te agradezco los grandes momentos que me has brindado desde mi infancia hasta ahora, eres el corazón fuerte de la familia, le pido a Dios que te de muchos años de vida, te amo mucho hermana.

Mayda Huerta Cabrera mi gran soporte de vida, te agradezco todo en estos logros que he obtenido, porque este logro en la vida te lo debo a ti tanto como a mis padres, mucho más que como mi hermana has cumplido un segundo papel como madre para mí, por el hecho de todo tipo de apoyo que he necesitado, y los grandes consejos que me has dado, te admiro y te quiero demasiado.

Joaquina Huerta Cabrera querida hermana te amo mucho, gracias por todo, te admiro y respeto, gracias por tu apoyo y buenos consejos, siempre contarás conmigo tú, mi cuñado Misa y mis sobrinos queridos, es un privilegio decir que soy tu hermano menor.

Isela Huerta Cabrera mi hermana querida te admiro y te amo mucho, gracias por tus consejos y el apoyo que me has brindado y por quererme tanto, siempre estaré contigo en buenos y malos momentos, y no me queda más que decirte que es una dicha el ser uno de tus hermanos menores.

Juan Antonio Cabrera Villa mi primo hermano, te agradezco mucho hermano, lo digo así porque de esta manera te considero, te admiro y agradezco tanto, por el gran apoyo que me has ofrecido, moral y económicamente, en verdad muchas gracias por todo.

Mara Abigail Huerta Cabrera sin comparación alguna de todas mis hermanas te amo y admiro de la misma manera que a todas, pero tanto como hermana has sido mi mejor amiga, en la que he confiado muchas cosas y la que me presta atención, te doy gracias por el gran apoyo moral que me has dado, mi chula tienes un gran corazón y eso te hace muy especial, a pesar de las grandes indiferencias que hemos tenido aun te sigo teniendo en el mismo lugar, te amo mucho hermosa.

Isidora Huerta Cabrera mi hermana hermosa, la más pequeña de la familia y con un gran carácter que tienes te hace diferente a las demás, eres única mi niña y te amo mucho, porque me alimentaste desde que éramos chiquitos, doy gracias a Dios por tenerte en mi vida como mi herma pequeña.

A mis Amigos

Aquí serán pocos los mencionados, por el hecho de que no se le puede nombrar amigo a cualquier persona, sino a esos que brindan el valioso de su tiempo para todo tipo de dificultad que se tenga tanto como en esos momentos agradables que se disfrutan.

Primero menciono a mis queridas primas, amigas, hermanas, Mera y Chuy, por su valioso tiempo que me han brindado, consejos y buenos momentos que pase con ustedes, las quiero mucho.

Mis grandes y buenos amigos: Roció Huerta Valadez, Uriel Federico, Laura Castro, José paredes, Diana Molina, Manuel Rosales, José Molina, Edwin German, Mario Alberto, por todos esos momentos de convivencia, por su apoyo y amistad.

Rogelio Reyes (Alan), Jose Carlos (Mocha), Damar Padilla (Juako), Juan Luis (Pepa). Gracias por su amistad, y todos esos momento tan agradables que hemos tenido.

De la misma manera, hacer extensa mi gratitud a mis compañeros de generación por hacer más amena mi estancia en la UAAAN, especialmente para Molina, Mario, Cristian, Edwin, Nicolás, Juan Carlos, Jhony, Alonso, Isabel, Odelia, Liz, Diana, Claudia, Aby, Rubí, Kareli, Candy.

“No duermas para descansar, duerme para soñar. Porque los sueños están para cumplirse” Walt Disney

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIAS	iv
INDICE DE CUADROS	ix
RESUMEN.....	x
INTRODUCCION.....	xi
JUSTIFICACION	xii
OBJETIVO	xii
Objetivos Específicos	xii
HIPÓTESIS	xii
REVISIÓN DE LITERATURA	1
El Cultivo de tomate	1
Origen del tomate.....	1
Clasificación taxonómica.....	2
Importancia del cultivo del tomate.....	2
Producción nacional	3
Fruto del tomate	4
Principales plagas presentes en el tomate	5
<i>Acolups lycopersici</i>	6
<i>Cladosporium fulvum</i>	7
Categoría taxonómica:.....	7
Descripción morfológica.....	8
Mecanismos de patogenicidad y sintomatología	8
Estrategias de control fitosanitario.....	9
Control químico	10
Control biológico.....	10
<i>Alternaria spp</i>	11
Taxonomía.....	12
Ciclo biológico y epidemiología.....	12
Síntomas y daños	13
Estrategias de control fitosanitario.....	13
Control químico	13
Control biológico.....	14

MATERIALES Y METODOS	15
Obtención de muestras	15
Material biológico	15
Aislamiento de los hongos	15
Identificación de los hongos	15
Identificación Morfológica	15
Identificación Molecular	16
Pruebas de patogenicidad	17
Preparación del inoculo	18
Conteo de esporas de <i>A. alternata</i> y <i>C. oryzae</i>	18
Desinfección de tomates	19
Inoculación de los tomates	19
Recuperación de los hongos inoculados	20
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
Aislamiento de los microorganismos fitopatógenos.	21
Pruebas de patogenicidad.	22
CONCLUSIONES	26
LITERATURA CITADA	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura.	Pág.
1. Elaboración propia con datos de SAGARPA. Servicio de información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Boletín mensual de la producción de tomate rojo (jitomate), mayo 2017	3
2. Elaboración propia con datos de SAGARPA. Boletín de avance de la producción de tomate, mayo 2017.....	4
3. Frutos de tomate con pudrición negra afectados por <i>Alternaria alternata</i>	11
5. Estructuras en la superficie del medio de cultivo con objetivo de 10X y 40X (Figura A y B).....	21
6 Características macroscópicas (A) y microscópicas (B y C) del hongo ubicado en el género de <i>C. oryzae</i>	22
7. Frutos de tomate inoculados con <i>A. alternata</i> con heridas y sanos (A y B).	23
8. Lesiones de la mezcla de <i>A. alternata</i> y <i>C. oryzae</i> en frutos de tomate.....	24
9. Frutos de tomate inoculados con <i>C. oryzae</i> . (A, B y C).	24
10. Muestra Testigo	25

INDICE DE CUADROS

Cuadro	Pág.
1. Patologías, signos y síntomas de origen fúngico en tomate.	5
2. Condiciones utilizadas en la PCR	17
3. Porcentajes de daños.	25

RESUMEN

El tomate es atacado frecuentemente por insectos, ácaros, patógenos bacterianos, fúngicos y especies de nematodos, siendo los hongos los que causan las enfermedades más destructivas, estos entran a partir de aberturas naturales o heridas en el fruto, llegando a causar daños severos. *Aculops lycopersici*, es un ácaro, que al alimentarse de la planta, favorece la formación de heridas, que fungen como vía de entrada de hongos saprofitos y patógenos, que aminoran los daños en el cultivo. En este trabajo se aisló e identificó morfológica y molecularmente los hongos patógenos secundarios a la presencia de *Aculops lycopersici* en frutos de tomate, así como su capacidad patogénica *in vitro*. Se aislaron e identificaron morfológica y molecularmente los hongos *Alternaria alternata* y *Cladosporium oryzae*, en frutos de tomate con presencia de *Aculops lycopersici*, demostrando el potencial de estos hongos como patógenos secundarios aumentando los daños y pérdidas en el cultivo de tomate, resultados que deben ser tomados en cuenta dentro del manejo integrado de enfermedades en el cultivo de tomate.

Palabras claves:

Patogénicos, *Cladosporium oryzae*, *Alternaria alternata*, Secundarios.

INTRODUCCION

El tomate es la hortaliza más cultivada en todo el mundo y la de mayor importe económico (Escalona *et al.*, 2009). Debido a su elevada demanda, el cultivo, producción y comercio de este vegetal aumenta continuamente. Su amplia aceptación y preferencia, se debe a sus cualidades gustativas, a la posibilidad de su amplio uso tanto en estado fresco como conservado, además a su alto contenido de vitaminas y minerales (Olimpia *et al.*, 2000)

Hasta Mayo del 2012 en México se sembraron 55,888.04 ha de tomate, siendo los principales estados productores: Sinaloa (18,623.05 ha), Michoacán (5,062.00 ha), Zacatecas (3,014.16 ha), Baja California Norte (2,952.05 ha), Veracruz (2,920.25 ha), Morelos (2,256.50 ha), Nayarit (2,447.50 ha), Baja California Sur (2,232.74 ha), Jalisco (2,079.98 ha) y Tamaulipas (1,876.20 ha), (SIAP, 2012).

La producción global de este cultivo alcanza elevados valores en zonas de climas templados, preferentemente en países del hemisferio norte, donde se localizan los principales exportadores (Umeh *et al.*, 2002) En las regiones del trópico este cultivo se ve afectado por condiciones climáticas y por la incidencia de plagas y enfermedades (Bernal *et al.*, 2003).

Las plantas de tomate se reproducen sexualmente, por lo que su propagación es por semilla, siendo la más utilizada para la producción de plántulas, por lo cual es muy susceptible al ataque de plagas y enfermedades ya que provocan grandes pérdidas económicas al cultivo (Carrillo *et al.*, 2003).

No obstante, el tomate en estas condiciones es atacado por bacterias, nematodos, insectos y ácaros como *Aculops lycopersici*, causante del bronceado del tomate, que a su vez pueden permitir la entrada a patógenos secundarios como hongos, por ejemplo, *Cladosporium fulvum* (sin. *Passalora fulva* Cook.) y *Alternaria solani* Sor., causantes del moho foliar y el tizón temprano, respectivamente, los responsables de la pérdida de gran parte de su producción, debido a la gravedad de los síntomas foliares que provocan (Peteira *et al.*, 2002). Por lo que en este trabajo se aisló e

identifico morfológica y molecularmente los hongos patógenos secundarios a la presencia de *Aculops lycopersici* en frutos de tomate, así como su capacidad patogénica *in vitro*.

JUSTIFICACION

Existe la posibilidad de que la presencia del ácaro *Aculops licopecyci* favorezca la entrada de patógenos secundarios que aseveren los daños y aumenten las perdidas en la producción de tomate, aunque no se dispone de información que explique la relación entre los hongos secundarios a este ácaro.

OBJETIVO

Aislar e identificar los hongos secundarios a la presencia de *Aculops lycopersici* en frutos de tomate.

Objetivos Específicos

Aislar e identificar morfológica y molecularmente los hongos patógenos secundarios a la presencia de *Aculops lycopersici* en frutos de tomate.

Evaluar la capacidad patogénica de los hongos aislados *in vitro*.

HIPÓTESIS

La presencia de *Aculops lycopersici* favorece la entrada de patógenos que aseveran los daños y pérdidas en la producción de tomate, pudiendo encontrarse dos o más hongos presentes.

REVISIÓN DE LITERATURA

El Cultivo de tomate

El tomate cultivado *Lycopersicon esculentum Mill.* (Peralta *et al.*, 2005). Es un cultivo alimentario de adopción reciente que se ha popularizado fundamentalmente durante el siglo pasado. Su versatilidad para consumo en fresco o en conserva y su adaptabilidad han jugado un papel fundamental en su rápida y extensa utilización.

La producción y consumo de tomate en el mundo ha crecido dramáticamente en las dos décadas pasadas. A pesar de la significación nutricional del tomate como fuente de vitaminas A y C, su consumo per cápita es aproximadamente cuatro veces mayor en los países desarrollados comparados con los países en desarrollo. En muchas partes del mundo, el tomate sigue siendo un cultivo menos de consumo de lujo, y existen todavía importantes oportunidades para incrementar su contribución al bienestar en la nutrición de la humanidad (Argerich, 2002).

Origen del tomate

El tomate, y las plantas más relacionados con él, tienen su centro de origen en una región montañosa, estrecha y alargada de los Andes en Perú, Ecuador y Chile. Además, algunas plantas claramente emparentadas con el tomate cultivado son parte de la flora nativa de las islas Galápagos. Estos parientes primitivos del tomate ocupan muchos ambientes diversos y distintos, y representan una fuente de genes casi inagotable para la mejora genética de la especie. La domesticación y cultivo del tomate fuera de su centro de origen parece que tuvo lugar inicialmente en las primeras civilizaciones de México. El nombre tomate deriva aparentemente de la legua Náhuatl de México y variantes de este nombre han seguido al tomate en su distribución a través del mundo, de tal manera podemos encontrar entre los principales productores mundiales a E. U., China, Italia e India (Moreña *et al.*, 2006).

Clasificación taxonómica

La ubicación más aceptada del tomate es la siguiente (Cronquist, 1984, Esquinas y Nuez, 1995, Peralta *et al.*, 2005):

Reino: Methaphyta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Solanales

Familia: Solanaceae

Género: *Solanum*

Especie: *Lycopersicum* L.

Importancia del cultivo del tomate

La demanda del fruto del tomate tanto en fresco como para la industria aumenta continuamente y con ella su cultivo, producción y comercio. El incremento anual de la producción de los últimos años se debe, principalmente, al aumento en el rendimiento y, en menor proporción, al aumento de la superficie cultivada (FAO, 2016). México se encuentra en el décimo lugar a nivel mundial en la producción de tomate, sin embargo, ocupa el primer lugar en exportación del fruto según datos de la (SAGARPA 2016); su principal mercado es Norteamérica (Estados Unidos y Canadá) con 95%. Los estados con mayor aportación son Sinaloa, Sonora, Oaxaca, Michoacán, Zacatecas y Jalisco (SIAP, 2017).

Dada la importancia que tiene el cultivo de hortalizas en México el cual representa alrededor del 3 al 5% de la superficie agrícola, el 56.3% del valor total de la producción nacional así como el 50% del valor de las exportaciones (SIAP, 2016), El tomate es la segunda especie hortícola más importante por la superficie sembrada, que es de aproximadamente 121,688 ha ubicadas principalmente en los estados de Sinaloa, Baja

California, San Luís Potosí y Michoacán; registrando un volumen de producción de 2,134,839 ton/año.

Producción nacional

A mayo de 2017, el estado de Sinaloa fue el principal productor de jitomate con 56.3% de la producción nacional total, seguido por Sonora, Oaxaca y Michoacán (SAGARPA, 2017).

Participación porcentual por entidad federativa en la producción de jitomate con respecto al total, mayo 2017

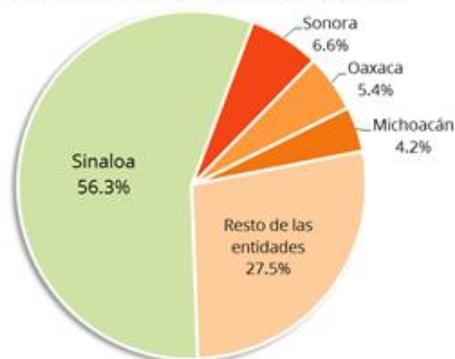


Figura 1. Elaboración propia con datos de SAGARPA. Servicio de información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Boletín mensual de la producción de tomate rojo (jitomate), mayo 2017

Mientras tanto, la producción de tomate alcanzó la cifra de 1 millón 152 mil 480 toneladas, 15.6% más que la obtenida en el mismo periodo del año anterior (Ver figura 2).



Figura 2. Elaboración propia con datos de SAGARPA. Boletín de avance de la producción de tomate, mayo 2017.

De acuerdo con estadísticas de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), entre 2013 y el estimado 2016, la producción de tomate "Hecho en México" aumentó en 35 por ciento, al pasar de dos millones 52 mil toneladas a dos millones 769 mil toneladas.

Fruto del tomate

El fruto de tomate contiene de 94% a 95% de agua; siendo el 5 a 6% restante una mezcla compleja en la que predominan componentes orgánicos que dan al fruto su textura y sabor característicos. Los principales determinantes del sabor del tomate son los azúcares libres y ácidos orgánicos: sin embargo, también parecen contribuir al típico sabor del tomate la textura del fruto y otros componentes orgánicos complejos. El ambiente del cultivo puede influir marcadamente sobre la tasa de crecimiento, el cuajado de los frutos, el rendimiento y la calidad del fruto (Calleja, 2009).

Principales plagas presentes en el tomate

El tomate es atacado frecuentemente por insectos, ácaros, patógenos bacterianos, fúngicos y especies de nematodos, siendo los hongos los que causan las enfermedades más destructivas. Estos atacan hojas, raíces y frutos, al encontrar condiciones edafoclimáticas favorables para el desarrollo de su ciclo de vida (Damicone y Brandenberger, 1993) (Cuadro 1).

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (1993), el tomate también presenta problemas de post cosecha, ya que el fruto consta de períodos cortos de conservación y en esta etapa es afectado por microorganismos como hongos y bacterias, los cuales penetran por las heridas que se presentan a causa del proceso de maduración, desencadenado por el etileno (Gonzalez y Laguna, 2004).

Cuadro 1. Patologías, signos y síntomas de origen fúngico en tomate.

Patología	Agente causal	Síntomas distintivos
Marchitez 	<i>Fusarium oxysporum</i> Schlee	Clorosis en hojas inferiores y caída de peciolo en las superiores.
Tizón Temprano 	<i>Alternaria solani</i> Sor.	Círculos necróticos en hojas inferiores
Tizón tardío 	<i>Phytophthora infestans</i> Mont.	Doblamiento hacia abajo del peciolo de las hojas infectadas.
Moho foliar 	<i>Passalora fulva</i> Cook	Manchas pálidas o ligeramente amarillas en el lado adaxial de las hojas.

Antracnosis		<i>Colletotrichum phomoides</i> Sacc	Manchas circulares, acuosas y hundidas en frutos.
Putrefacción		<i>Rhizoctonia solani</i> Khün.	Podredumbre circular oscura o clara en frutos.
Bronceado del tomate		<i>Acolups lycopersici</i>	Los daños en frutos la piel la vuelve áspera y color marrón rojizo.

Acolups lycopersici

Esta especie se conoció por primera vez en América del Sur en 1962, citándose por Rossi en Argentina, luego Fletchman y Aranda la citan en 1970 en Brasil y Cermeli *et al.* (1982) la menciona en Venezuela. En 1963 este acaro era conocido en 28 países y el año de 1986 ocurría en total de 37 países (Perring y Farrar, 1986).

Se conoce que este acaro ataca el tomate en forma tan severa que provoca finalmente la muerte de la planta; pudiendo darse ataques de esta plaga bajo condiciones de invernadero (Berlinger *et al.*, 1986). El tipo de daño se da en las condiciones favorables para el desarrollo de este acaro, por el número de generaciones que se presentan, se alimentan de tallos y hojas iniciando daños de forma muy característica en la parte inferior de la planta, cercana al suelo; así las hojas se secan progresivamente de abajo hacia arriba. Las hojas toman un color amarillo por el haz y un aspecto acartonado, luego acaban por secarse y caer, la defoliación es el principal daño de esta plaga, dejando a los frutos expuestos al sol.

Cladosporium fulvum.

En la actualidad, un problema del cultivo de tomate en invernadero, son los daños provocados por *P. fulva* y *A. solani*, que en Cuba ocasionan graves pérdidas, al afectar el 30 y 20% de la producción respectivamente (Guerrero *et al.*, 2008). Estas patologías afectan gran parte de la superficie foliar, provocando una gran defoliación y atizonamiento del follaje, por lo cual la hoja queda inutilizada para realizar la fotosíntesis, lo que se traduce en un descenso en los rendimientos y la calidad del fruto.

Passalora fulva. El género *Passalora* fue descrito en el 2003 por (Braun *et al.*, 2003), desde su aparición fue clasificado por Cooke en 1883 como *Cladosporium fulvum*, por Cif en 1954 como *Fulvia fulva* (Cook) y como *Mycovellosiella fulva* (Cook) por Arx en 1983. Su reciente disposición taxonómica en el género anamorfo *Passalora*, se debe la filogenia de su ADN y las cicatrices distintivas de sus hifas conidiales, típicas de *Passalora*, características que lo diferencian con *Cladosporium spp.* que incluye telomorfos en *Davidiellaceae* (Thomma *et al.*, 2005). *P. fulva* es un microorganismo biotrófico que crece en los espacios intercelulares de las hojas (Beltrán *et al.*, 2006), produciendo la cladosporiosis, enfermedad conocida como moho foliar en el tomate y mancha filamentosa en berenjena cimarrona (*Solanum torvum* Sw.). Es un hongo asexual, muy heterogéneo, que se encuentra agrupado en las siguientes categorías taxonómicas (Thomma *et al.*, 2005).

Categoría taxonómica:

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Dothideomycetes

Orden: Capnodiales

Familia: *Mycosphaerellaceae*

Género: *Passalora*

Descripción morfológica

Las colonias de *P. fulva* sobre sustrato natural, son efusas, pilosas, velludas o flocosas, gris pardas oliváceas o negras. El micelio superficial está bien desarrollado, inmerso en el sustrato. Las hifas son septadas, ramificadas, oliváceas, pálidas, pardas o pardas oscuras, con pared celular compuesta principalmente por los polisacáridos glucano y quitina. Las células conidiogénicas son hologénicas, simpodiales o determinadas, multilocales o unilocales, integradas o discretas (<http://www.mycobank.org>).

Mecanismos de patogenicidad y sintomatología

El hongo infecta principalmente las hojas, donde se observan, por el lado adaxial, pequeñas manchas pálidas o ligeramente amarillas, las cuales, al crecer, se tornan de color café en el centro (Rivas y Thomas, 2005). Sin embargo, se pueden observar ocasionalmente afectaciones en el tallo, capullos, peciolo y frutos del cultivo (Jones *et al.*, 1997).

P. fulva posee un ciclo de vida que se caracteriza por la producción de conidióforos libres, oscuros y ramificados, con una o dos células de forma ovoide, cilíndricas o irregulares y en cadena. La enfermedad puede manifestarse en forma epifítica y después de la floración, el resto de la planta es muy susceptible al ataque de este hongo (Deacon, 2006).

Los conidios de *P. fulva* son diseminados por el aire o el agua. Al ser depositados en la parte abaxial de la hoja, germinan y forman hifas delgadas de penetración, que crecen aleatoriamente sobre la superficie. Después de tres días aproximadamente una de las ramificaciones laterales de la hifa, se introduce en la hoja del tomate hasta localizar una abertura estomática. En consecuencia, el diámetro de la hifa se puede duplicar, y crece de manera continua por la cavidad subestomática hacia el interior del espacio intercelular, entre las células del mesófilo, mediante la formación de estructuras largas y ramificadas de la hifa (Thomma *et al.*, 2005).

El crecimiento fúngico parece estar orientado hacia los tejidos vasculares, probablemente en respuesta a los gradientes de glucosa que se establecen alrededor del floema (van den Ackerveken *et al.*, 1994 y Wubben *et al.*, 1994). El taponamiento

del estoma afecta severamente la respiración de la planta, provocando la marchitez de las hojas, defoliación parcial y hasta la muerte del hospedante en casos severos de la enfermedad (Jones *et al.*, 1997).

Durante estas etapas de la infección es posible observar deposiciones de calosa en las paredes de las células del mesófilo. Sin embargo, se han descrito diversos cambios ultraestructurales, como la disposición paralela del retículo endoplasmático con respecto a la membrana plasmática, donde ocurre el contacto con el hongo y la aparición de cuerpos lipídicos en el citoplasma que contienen inclusiones cristalinas (Lazarovits y Higgins, 1976). En lesiones avanzadas, las células del mesófilo muestran señales degenerativas de sus organelos (mitocondrias y cloroplastos), y en ocasiones es posible observar la liberación del contenido citoplasmático, relacionado con el daño de la membrana citoplasmática o el tonoplasto (Thomma *et al.*, 2005).

Los síntomas iniciales de la cladosporosis se producen en la primera semana luego del inicio de la enfermedad, como manchas difusas de colores amarillentos o verde claro en la zona superior de la hoja, que posteriormente van aumentando de tamaño y tornándose distintivamente amarillas. Esta apariencia es la consecuencia de la muerte celular del parénquima de empalizada (Butler y Jones, 1949).

El mecanismo de infección de *P. fulva*, radica en la capacidad del hongo para secretar proteínas extracelulares o intracelulares que son reconocidas solo por algunas plantas (Laugé *et al.*, 1998). Se ha planteado que estas proteínas son muy importantes en el establecimiento de la enfermedad y todas han sido reconocidas por algunos genotipos de tomate a lo largo de su evolución (Thomma *et al.*, 2005).

Este patógeno se conserva viable 10 meses sobre los vegetales, le favorecen temperaturas del orden de 25 °C y humedades relativas superiores al 80% (Torres, 2008).

Estrategias de control fitosanitario

El control de esta enfermedad, se practica a través de diversos métodos como mejoras en las prácticas de cultivos, que incluyen la siembra de semillas libres del patógeno, airear al máximo los invernaderos para reducir la humedad relativa del aire y el

deshojado de la base de las plantas (Castellanos *et al.*, 2005). También, se ha trabajado en la creación de variedades genéticamente resistentes y el uso de fungicidas químicos de forma preventiva y curativa, además de saneamientos. De modo similar, se ponen en práctica estrategias de control biológico basadas en procesos de micoparasitismo (Santamarina *et al.*, 2002).

Control químico

El control químico se realiza mediante la aplicación eficiente y oportuna de fungicidas, entre los que sobresalen: Clorotalonil (HELM en Argentina) cuyo principio activo es MetilN-fenilacetil; SCORE® 250 (Syngenta S.A, Usine de Monthey, Suiza) con principio activo Difeconazol; el Capatafol (Grupo Pujol San José, Costa Rica) derivado de las Ftalimidas, Captan (FMC Corporation, Estados Unidos) con principio activo de N triclorometilo ciclohex-4 en 1,2-dicarboximida, Triadimefon (Renewable Chemicals Bangkok ,Thailand), pulverizaciones con Oxicloruro de Cobre y Mancozeb (Dow AgroSciences Colombia S.A) cuyo principio activo es zinc con etileno bis ditiocarbamato de manganeso (Álvarez y Delgadillo, 2004).

Control biológico

El control biológico se basa en el empleo de hongos antagonistas, a partir del estudio de su efectividad y de su mecanismo de acción, así como de factores esenciales para su utilización como biocontroladores y el desarrollo de una estrategia en la implantación de una agricultura sostenible. Es así como se utilizan hongos antagonistas y micoparásitos, tales como cepas fúngicas del género *Trichoderma*, lo cual constituye una alternativa que podría sustituir el control químico sintético, que además de su elevado costo económico, trae como consecuencias el desarrollo de resistencia por parte del fitopatógeno, problemas de contaminación y toxicidad (Torres, 2008).

En contraste, no existen investigaciones publicadas que demuestren el empleo por parte de los agricultores de un producto de origen vegetal en el tratamiento de esta

enfermedad, alternativa que resultaría conveniente para lograr un control más específico.

***Alternaria* spp**

El género *Alternaria* ataca un amplio número de plantas de importancia agrícola, se encuentra causando daños significativos en frutos en pre y postcosecha. La presencia de hongos pertenecientes a este género en distintas variedades de frutos y vegetales bajo diversas condiciones de cultivo, manejo y almacenamiento sugiere que las pérdidas causadas por *Alternaria* son comparables con otros géneros como *Apergillus* P. Minch ex Link, *Penicillium* Link (Stinson *et al*, 1980). *Alternaria* produce un gran número de toxinas que actúan como factores de patogenicidad, entre las más importantes esta alternariol (AL) y alternariol monometil éter (AME), que son producidos en grandes cantidades (Heisler *et al.*, 1980). Las toxinas de *Alternaria* han sido detectadas como contaminantes naturales del tomate y productos derivados. Adicionalmente estos hongos también producen enzimas de maceración celular y ácidos orgánicos (El-Shareb y Malibari, 1995; Hirsh *et al.*, 1995). *Alternaria* es un organismos cosmopolita y muchas de las especies son saprofitas, las cuales se pueden encontrar en materia orgánica en descomposición en el suelo. *A. alternata*, es una de las especies que provocan grandes daños en el cultivar de tomate en condiciones de almacenaje (Rodney, 2004; Snowdon, 1991). Las enfermedades causadas por diferentes especies de *Alternaria* se caracterizan por producir manchas foliares y pudriciones en raíces o frutos.



Figura 3. Frutos de tomate con pudrición negra afectados por *Alternaria alternata*.

Taxonomía

Reino: Fungi

Filo: Ascomycota

Clase: Dothideomycetes

Subclase: Pleosporomycetidae

Familia: *Pleosporaceae*

Género: *Alternaria*

(Bayer Crop Science, 2008)

Ciclo biológico y epidemiología

El patógeno inverna en otras solanáceas o puede sobrevivir como conidios por más de un año en los residuos de las plantas atacadas. Es más probable que la infección primaria sea causada por el hongo que está en el suelo, contribuyendo a ella los días lluviosos o húmedos y la temperatura ambiental de 24°C. Los conidios germinan a un óptimo de entre los 28 y 30°Cy con humedad relativa alta (Mendoza, 1996).

Se transmite por conidios dispersados por salpicaduras o viento, las condiciones secas favorecen su liberación; el máximo de concentración de esporas en el aire tiene lugar cuando la velocidad del viento es máxima y la humedad relativa mínima.

Cuando las condiciones son favorables germinan sobre la planta y penetran directamente, o por aberturas invade a los tejidos de las hojas, tallos y frutos formando un micelio intercelular, el cual origina los conidios sobre los tejidos infectados, estos son liberados y acarreados por el viento pudiendo caer sobre plántulas, atacándolas a nivel del cuello, sobre tallos, hojas y tubérculos. Si las condiciones le son favorables a este hongo se reproduce abundantemente re infectando continuamente a las plantas (Mendoza y Pinto, 1985).

Síntomas y daños

En las hojas se presentan pequeñas manchas circulares de color café frecuentemente rodeadas de un halo amarillo. Las manchas tienen la característica de tener anillos concéntricos de color oscuro. Usualmente las manchas aparecen en las hojas más viejas y de éstas suben al resto de la planta. A medida que la enfermedad progresa, el hongo puede atacar los tallos y las frutas. Las manchas en las frutas son similares a las de las hojas con color café y anillos concéntricos oscuros. En los anillos concéntricos se producen esporas polvorientas y oscuras. Las esporas se pueden observar si a la lesión se le acerca un objeto de coloración clara (Mendoza, 1996).

En las hojas atacadas aparecen inicialmente con manchas circulares o angulosas de color café oscuro a negro, las cuales aumentan de tamaño y forman anillos concéntricos, dándole a la lesión una apariencia característica, las manchas pueden coalescer y dañar toda la hoja. Las hojas fuertemente atacadas se tornan amarillas y se caen. Si el ataque es severo se defolia toda la planta, lo que además de debilitarla, deja los frutos expuestos a quemaduras de sol; por lo general el ataque empieza en las hojas viejas (Mendoza, 1996; Sánchez, 1980).

Estrategias de control fitosanitario

El control de esta enfermedad, se practica a través de diversos métodos culturales cuyo fundamento radica en eliminar o quemar todos los residuos de plantas infectadas, el empleo de semillas sanas y el uso de fungicidas sintéticos que está siendo sustituido por el control biológico, basado en el uso de extractos vegetales.

Control químico

La alternariosis es controlada a través de aspersiones con fungicidas en forma preventiva, tal es el caso de Maneb (Dow AgroSciences Colombia S.A) cuyo principio activo es Sales de Zn + formaldehído, Zineb (SYNGENTA AGRO, S.A) con principio activo Zinebzetilenbis-dico-carbamato de Zn, Captafol (Grupo Pujol San José, Costa Rica), y Daconil (SYNGENTA CROP PROTECTION S.A) con principio activo clortalonil + carbendazepina. Las aplicaciones deben iniciarse antes de la fructificación con un intervalo de siete a diez días. Otra alternativa es la rotación de cultivos por un período

de tres años, lo cual reduciría la cantidad de inóculo. Resulta conveniente también eliminar los residuos de cosecha (Sarita, 1993; Álvarez y Delgadillo, 2004).

Control biológico

Como estrategia de control biológico frente a este patógeno, existen investigaciones que estudian extractos vegetales que se oponen al desarrollo de *A. solani*. Entre ellos se destacan extractos metanólicos de corteza de *Careya arborea* Roxb. (Sambath *et al.*, 2006) y aceites esenciales de *Satureja montana* L. De modo similar, se han probado extractos ricos en saponinas obtenidos a partir de mesocarpos del fruto de *Balanites aegyptiaca* L., corteza de *Quillja saponaria* L. y *Yucca schidigera* Ortgies. (Chapagain, 2007), además de extracto de corteza de *Cinnamomum zeylanicum* Nees. en acetona, éter de petróleo y etanol (Mishra *et al.*, 2009) y ácidos fenólicos obtenidos a partir de *Acorus calamus* L. y *Tinospora cordifolia* Willd. Pupo *et al.*, (2011) evaluó el potencial antifúngico de extractos de once plantas naturalizadas en Cuba frente a *A. solani*, a partir de flores de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray y *Tagetes erecta* L. hojas y flores de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, *Lippia dulcis* Trev. y *Lantana camara* L. planta completa de *Cleome gynandra* L. y *Cleome viscosa* L. y hojas de *Coleus amboinicus* Lour, *Polyscias guilfoylei* (L.) Bailey, *Lepianthes peltata* (L.) Raf., *Tradescantia pallida* (Rose) D.R. Hunt y *Tradescantia spathacea* Sw. Sin embargo, no existe un producto de origen natural que se produzca comercialmente, para tratar las afectaciones producidas por la alternariosis.

MATERIALES Y METODOS

Obtención de muestras

El presente trabajo se realizó en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, en el departamento de Parasitología en el Laboratorio de Toxicología.

Material biológico

Se utilizaron dos cepas de hongos aisladas a partir de frutos de tomate afectados por la presencia del ácaro *Aculops lycopersici*, (*Alternaria spp*), (*Cladosporium spp*), provenientes de invernadero, proporcionadas por el Laboratorio de Toxicología del departamento de Parasitología.

Aislamiento de los hongos

Se utilizaron las dos cepas de los patógenos que fueron proporcionados, realizando un aislamiento de cada patógeno en placas Petri con PDA (papa-dextrosa-agar), en función de los diferentes tipos de coloraciones de micelio desarrollado fue el número de explantes que se tomaron con la finalidad de obtener cultivos puros. Este aislamiento se realizó con ayuda de un sacabocados, con el que se extrajo del borde de la colonia, sembrándolo en otra caja Petri con medio PDA. Después se incubaron por 8 días a 24°C y 28°C con 65% de HR. A partir de estas placas se tomaron, para realizar la siembra y la multiplicación de los patógenos.

Identificación de los hongos

Identificación Morfológica

A partir de los aislamientos realizados de *Alternaria* y *Cladosporium*, se determinó el género observando las características macroscópicas y microscópicas sobre el medio de cultivo (PDA). Los hongos se caracterizaron por la forma, tamaño y color en la superficie de la colonia y en el anverso de la caja Petri; igualmente la textura, aspecto y consistencia del micelio. Por otro lado, se realizaron tinciones con azul lactofenol y

se observaron las características microscópicas de cada hongo con base en las claves de Barnett y Hunter (1998).

La identificación de *Cladosporium* y *Alternaria* se basó en la morfología en cultivo, en las características de las conidias y del micelio, y en la sintomatología del patógeno en el cultivo de tomate.

Identificación Molecular

Para la extracción del ADN, se utilizó el micelio de un cultivo de *Alternaria* y *Cladosporium* crecida durante cinco días en medio de cultivo PDA. El ADN se extrajo siguiendo la técnica de Doyle y Doyle (1990) modificado por Vázquez.

Del crecimiento se tomó 0.2 g de micelio en crecimiento en el medio de cultivo. El micelio fue depositado en un tubo eppendorf de 1.5 mL, se homogenizó con 1 mL de buffer de extracción (Tris HCl , pH =8; Na Cl 50 mM; EDTA pH =8.5, 50mM; SDS 2%); posteriormente, se agitó el macerado con un Vortex por 30 segundos, se colocó en hielo por 15 minutos, se agregó cloroformo-alcohol-isoamilico 24:1, nuevamente se agitó con Vortex por 30 segundos, se centrifugo a 12,000 revoluciones / minuto / 15 minutos.

Posteriormente, se extrajo el sobrenadante y se pasó a un tubo eppendorf de 1.5 mL y se anotó la cantidad extraída, en seguida se agregó Isopropanol (Alcohol-Isopropilico) el mismo volumen que se recuperó del sobrenadante, se volvió a colocar el hielo por 15 minutos, centrifugando a 12,000 rpm/10 minutos, decantando el sobrenadante, se dejó el precipitado “pastilla”.

Con lo anterior se llegó a la formación de una pastilla de ADN; el alcohol fue retirado y se procedió al lavado de la pastilla con etanol, posteriormente fue retirado el etanol y puesta a secar en papel secante. Cuando la pastilla estaba completamente seca se diluyo en 50 µL agua inyectable, con ayuda de un vortex, se almaceno a 4°C.

La visualización del ADN se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con Buffer de carga Gelred (GenScript®) y con luz ultravioleta con ayuda del fotodocumentador (MultiDoc-T Digital Imagin System).

Para llevar a cabo el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se efectuó una mezcla de acuerdo a las recomendaciones del fabricante de la Taq Master Mix 2x (GenScript®), se utilizaron 1µl de los indicadores de secuencia ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG)/ ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC), 2µl de ADN para aforar con agua a un volumen total de 30µl por muestra; Posteriormente, se efectuó la PCR en un termociclador (Axygen Maxygene), de acuerdo a las condiciones presentadas en el cuadro 2.

Cuadro 2. Condiciones utilizadas en la PCR

	1 ciclo		30 ciclos			1 ciclo	
Temperatura	94.0°C	95.0°C	56-60 °C	72°C	72°C	4°C	
Tiempo	5:00 Min	10 Seg	30 Seg	2 Min	5 Min	∞	

Los productos de la PCR, fueron visualizados mediante electroforesis, como anteriormente se menciona. El producto de la PCR se secuenció en una dirección del 5'- 3' y 3'-5' en el UA-LAB Laboratorio de Diagnostico Fitosanitario. Los pares de bases obtenidas por la PCR (ANEXO 1) se compararon con las secuencias reportadas en la base de datos del NCBI (National Center of Biotechnology Information, www.ncbi.nih.gov) mediante el programa BLAST; arrojando un 100% de similitud con *Alternaria alternata* y *Cladosporium oryzae*.

Pruebas de patogenicidad

Este experimento se realizó con la finalidad de demostrar el potencial de inoculación de los patógenos. Se trabajó con 21 unidades experimentales las cuales fueron 3 frutos libres de *A. alternata*, 3 frutos inoculados con *A. alternata*, 3 frutos libres de *C. oryzae*, 3 frutos inoculados con *C. oryzae*, frutos sanos con mezcla de *A. alternata* y *C. oryzae*, 3 frutos con heridas con mezcla de *A. alaternata* y *C. oryzae*, y 3 frutos como Testigos.

Asperjando la solución madre de esporas del cultivo de *C. orizae* y *A. alternata*, sobre los frutos sanos y con heridas de tomate, las cuales fueron incubadas a temperatura ambiente (24 °C a 28 °C) y 70% a 85% de humedad relativa (HR) hasta la aparición de los primeros síntomas ocasionados por el patógeno (a los 8 a 15 días). Seguidamente se tomaron los frutos con el mayor daño y se tomaron muestras para identificar el patógeno.

Preparación del inóculo

Se emplearon las cepas de *A. alternata* y *C. orizae*, se tomó crecimiento de cada patógeno de la caja Petri, con ayuda de una navaja de bisturí y se depositó en una licuadora para obtener una solución de esporas. Se aforó con agua destilada estéril, para ajustar a una concentración de 1×10^6 esporas por mililitro. De la misma manera se preparó una mezcla con los dos patógenos de *A. alternata* y *C. orizae* juntos para su inoculación en frutos de tomate.

Conteo de esporas de *A. alternata* y *C. orizae*

Se colocaron 100 ml de agua destilada estéril en un vaso de precipitación, se tomó una muestra de cada hongo que fue extraída con el sacabocados y se colocó esta. Se agitó con una varilla durante 5 minutos para que las esporas quedaran en suspensión en el agua.

El conteo se realizó en una cámara de Neubauer, se colocó el cubre objetos tapando parcialmente la caja y con una micropipeta se cogió una muestra de 100µL de la solución de esporas, donde por efecto de capilaridad el fondo de la cámara se llenó antes de que la solución pueda desbordarse.

Se llevó la caja Neubauer a observar en el microscopio, donde primeramente se ubicó la caja con el lente de aumento de 5x, luego con el de 10x observamos el cuadro central, y con el lente de 40x se procedió a hacer el conteo de 5 cuadrantes.

Se tomarón cinco lecturas de las esporas que se encontraban en cinco cuadros grandes de la cámara de Neubauer, se promediaron y se calculó la densidad de las esporas por volumen usando la siguiente formula:

$$\text{No. de esporas / mL} = \frac{\text{Esporas Totales} \times \text{Factor de cámara (10,000)}}{\text{Numero de cuadros} \times \text{dilución}}$$

Resultado / Superficie Total = esporas/mm³

Siguiendo el procedimiento de Everett y Timudo-Torrevilla, 2007, se ajustó a la concentración a 10 esporas/ml. (ANEXO 6)

Desinfección de tomates

Se utilizaron frutos de tomate obtenidos de un supermercado, los cuales fueron lavados con agua corriente, desinfectados con cloro al 10% y enjuagados con agua destilada estéril, para eliminar la presencia de polvo y hongos saprofitos presentes en la superficie. Posteriormente los frutos se colocaron en sanitas estériles dentro de una campana de flujo laminar, para su secado.

Inoculación de los tomates

Se hicieron cortes en el fruto de 1cm² del epitelio, con una navaja de bisturí la cual se desinfecto con alcohol cada uno de los cortes.

De la solución de esporas 1x 10⁶ se asperjaron con ayuda de un atomizador a cada uno de los frutos que se colocaron en recipientes de plástico adecuados para su tamaño, estos se mantuvieron en incubación a una temperatura (+20°C) alrededor de un mes, a lo largo que se tomaban datos. Después de todo este procedimiento se tomaron datos de la infección cada 24 hrs.

Recuperación de los hongos inoculados

De los tomates que presentaron crecimiento de hongos, se tomaron los que presentaron un daño mayor para tomar muestras e identificar el patógeno presente. Se realizaron montas de micelio procedente de los patógenos teñidas con azul de lactofenol y observadas al microscopio para su identificación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de los microorganismos fitopatógenos.

De las muestras de los frutos de tomate inoculados que presentaron síntomas de pudrición, se lograron aislar microorganismo de tipo fúngico. Las colonias del hongo en medio PDA mostraron un color verde azulado y café.

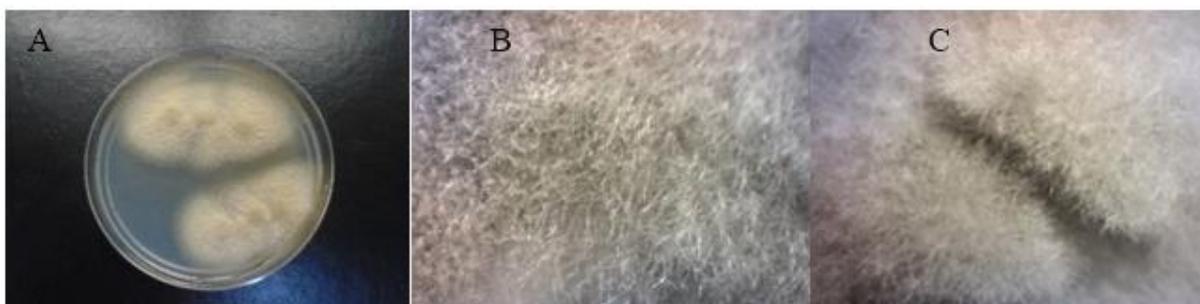


Figura 4. Crecimiento de *A. alternata* en medio PDA. A) Fotografía tomada con cámara SONY. B) Micelio con crecimiento en forma de escoba. C) Formación de estructuras tipo esclerocio.

Se realizaron montas de micelio procedentes de *A. alternata*, que fueron teñidas con azul lactofenol y observadas al microscopio, donde se observaron las estructuras con el objetivo de 10X y 40X. Se observó al microscopio conidios septados de forma transversal, con terminaciones puntiagudas y de tonalidades marrones.

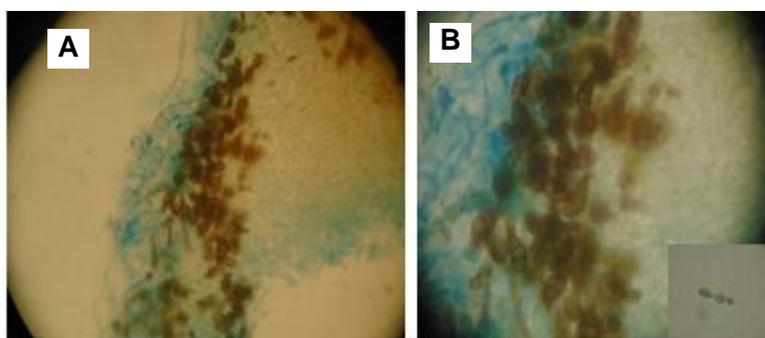


Figura 5. Estructuras en la superficie del medio de cultivo con objetivo de 10X y 40X (Figura A y B)

El segundo hongo aislado fue *C. oryzae*, se analizó de las mismas condiciones microscópicas que *A. alternata*, como su nombre derivados del griego que quiere decir “esporas encadenadas formando ramas” (Payam y Ramanathan, 2004). Sus colonias son características porque tienen una apariencia algodonosa y un color que va desde olivo grisáceo hasta el verde olivo, micelio superficial e inmerso en el medio de cultivo. En la figura 5 (A) se pueden apreciar loa conidióforos color blanco, por el uso del estereoscopio de luz dirigida.

Definiendo las características morfológicas donde se observa el crecimiento de las esporas en forma de rama, en un microscopio electrónico de barrido, que lo colocan dentro del género de *C. oryzae* (Imagen B, Figura 5). La imagen C de la figura 5 ilustra los conidióforos y conidios observados a 40X en microscopio de campo claro.

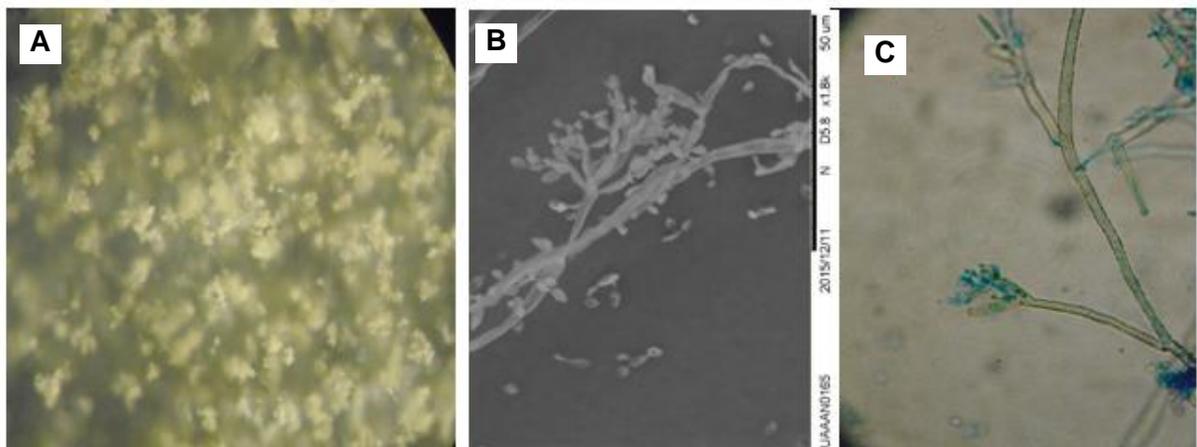


Figura 6 Características macroscópicas (A) y microscópicas (B y C) del hongo ubicado en el género de *C. oryzae*.

Pruebas de patogenicidad.

Los frutos de tomate sanos que se inocularon con las cepas de los hongos y que se mantuvieron en condiciones de alta humedad relativa mostraron síntomas similares a los del hongo inoculado, obteniendo y confirmando las colonias y estructuras similares. A los frutos que se inocularon con heridas, estos fueron los que mayores síntomas presentaron (Cuadro 3). La inoculación en los frutos mostro que los hongos

potencialmente pueden infectar a frutos en los que haya ocurrido una herida, ya que, en todos los frutos inoculados, a los 22 días se observó una pudrición y posteriormente se observó el micelio y esporulación del hongo (ANEXO 2).

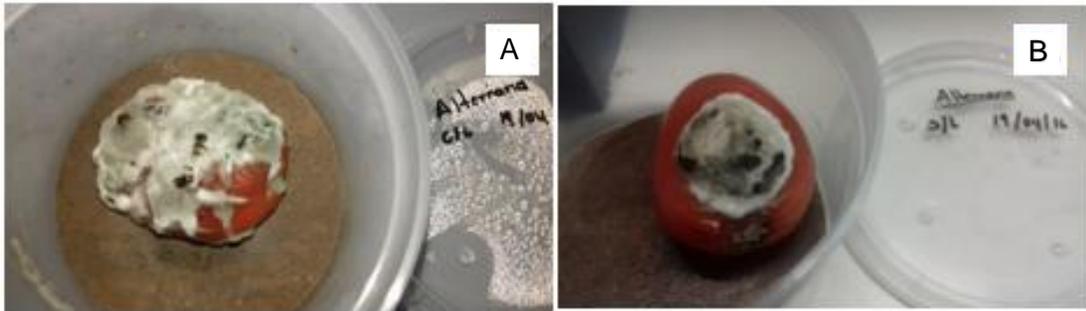


Figura 7. Frutos de tomate inoculados con *A. alternata* con heridas y sanos (A y B).

Se puede observar los resultados de la inoculación del género de *A. alternata* sobre los frutos de tomate sanos y con heridas, se puede determinar que sobre el fruto con heridas fue más agresivo, presentando una colonización casi total sobre el fruto, en la (Fig. 8 B) se presentaron lesiones profundas en el mesocarpio, de aspecto redondo con borde definido de color café oscuro y heridas en el centro con presencia de micelio.

Las infecciones en los frutos pueden afectar tanto a frutos verdes como maduros; los síntomas son manchas circulares de colores café oscuro, acuosas y que también presentan anillos concéntricos; sin embargo, existen otras especies de éste patógeno que pueden afectar frutos tanto en pre como en poscosecha (Nitzsche y Wyenandt, 2005; Wyenandt *et al.*, 2006).

El periodo de incubación fue de 51 días, en la (Fig. 8 A) se presentó una mancha circular pequeña con borde definido de color café oscuro y centro pálido, aspectos que según Agrios (2006), Quintero (2008) y Galindo (2010), es característico del microorganismo. Sin embargo, las lesiones sobre los frutos B y C los cuales se inocularon en frutos con lesiones fueron diferentes, ya que mostraron una pudrición casi total.

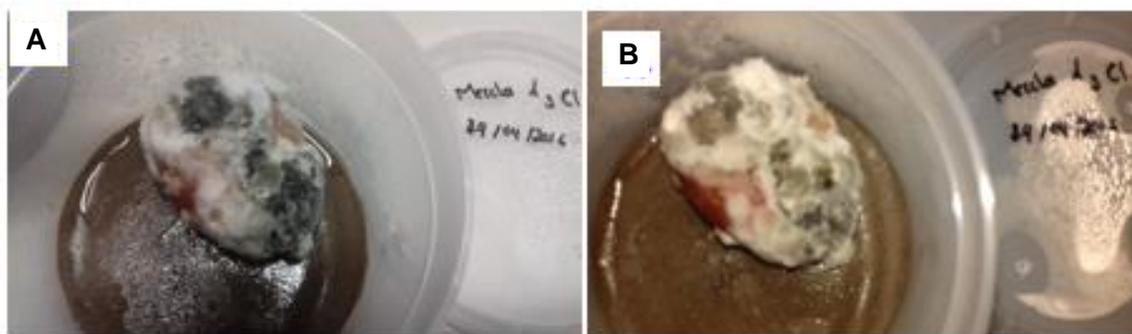


Figura 8. Lesiones de la mezcla de *A. alternata* y *C. oryzae* en frutos de tomate.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos de la mezcla de *A. alternata* y *C. oryzae* de la inoculación sobre los frutos de tomate con y sin heridas, se puede determinar que se obtuvo mayor actividad patogénica (Cuadro 3). Tomando en cuenta que el periodo de incubación fue el mismo de 51 días, obteniendo una colonización total en los frutos inoculados (ANEXO 3).



Figura 9. Frutos de tomate inoculados con *C. oryzae*. (A, B y C).

En la inoculación de *C. oryzae*, se presentaron los síntomas característicos a los 24 ddi (días después de inoculación) mostrando lesiones escasas, de tamaño pequeño (ANEXO 4). Lo cual indica que es posible que bajo ciertas condiciones *C. oryzae* no posea la capacidad necesaria para iniciar la enfermedad, o de comportarse como saprofito, cuando emplea como mecanismo de penetración las aberturas naturales o la forma directa, necesitando de heridas para inducir la sintomatología, lo cual coincide con lo citado por Torres (1999), que menciona que la afección por *C. oryzae*., se inicia

con la presencia de un vector, el cual al introducir el estilete en el mesocarpio, causa heridas que estimulan la reacción en los tejidos de la planta produciendo zonas corchosas.

Según los resultados obtenidos en el presente trabajo se sabe que el mecanismo de penetración de *C. oryzae* en los frutos de tomate es más exitoso mediante heridas previamente ocasionadas (ANEXO 4), lo cual se confirma con el trabajo de Rojas (2010).

Con respecto a los testigos no presentaron ningún tipo de crecimiento de hongos manteniéndose sin daños (Figura 10).



Figura 10. Muestra Testigo

Cuadro 3. Porcentajes de daños.

Patógeno	% de daño
<i>A. alternata</i> sano	75%
<i>A. alternata</i> con heridas	80%
<i>C. oryzae</i> sano	10%
<i>C. oryzae</i> con heridas	30%
Mezcla de <i>A. alternata</i> y <i>C. oryzae</i>	97%
Testigo	0%

CONCLUSIONES

Se aislaron e identificaron morfológica y molecularmente los hongos: *Alternaria alternata* y *Cladosporium oryzae*, en frutos de tomate con presencia de *Aculops lycopersici*, demostrando el potencial de estos hongos como patógenos secundarios aumentando los daños y pérdidas en el cultivo de tomate.

LITERATURA CITADA

- Álvarez, R y Delgadillo, F (2004): Enfermedades del tomate y chile Bell. Memorias del IV Simposio Nacional de Horticultura. Invernaderos: Diseño, Manejo y Producción. Torreón: México.
- Agrios. 2006. Fitopatología. Editorial Limusa S.A de C.V. México D.F.
- Argerich C. y Gaviola J.C., 2002. Manual de producción de semillas hortícolas. Tomate. Pág. 4.
- Beltrán, M.J, T. Ogura, G. Manzo y C. Ariasl (2006): Catalasas de hongos fitopatógenos: ¿Factores de virulencia y resistencia a los fungicidas?. Revista mexicana de fitopatología. 24: 50-58.
- Bernal, J; Cipriano, A; Diaz, D. 2003. Tecnología para el cultivo del Tomate de Árbol. Manual Técnico 3. Corpoica. Centro de Investigación "La Selva". Antioquia Colombia.
- BERLINGER, M.J.; DAHAN. R.; and COHEN, S. 1986. Greenhouse tomato pests and their control in Israel. Proc. Working Group Integrated Control in Glasshouses. Darmstadt. June 26-29. 1982. Bull IOBCI/WPRS/1983/V/13; 7-11.
- Butler, E.J. y Jones, S.G. (1949): Tomato Leaf Mould, *Cladosporium fulvum* Cooke. London: Macmillan.
- www.bayercropscience.com/ec/productdesc.aspx?prodid=43 Consulta 2 de Julio 2008
- <http://www.amycobank.org>
- Castellanos, L, M. Stefanova, P. Villa, I. Irimia, M. González y M.E. Lorenzo (2005): Ensayos con el producto biológico Gluticid para el control de *Alternaria solani* y *Cladosporium fulvum* en el tomate en casas de cultivo protegidos. Fitosanidad. 2: 3941.
- Calleja R., P. 2009. El Tomate Terapéutico. En: www.infoagro.com/noticias/2009/3/5562 . Consultado en: marzo de 2009.

- Carrillo F., Montoya R. T. J., García E. J., 2003. Razas de *F. oxysporum f. sp. Lycopersici* en tomate. Pág. 125- 130. Revista Mexicana de Fitopatología.
- Cronquist A., 1984. Introducción a la botánica. 2ad. Ed. CECSA. México. 848 p.
- Chapagain, B.P, Z. Wiesman y T. Srór: (2007). In vitro study of the antifungal activity of saponin-rich extracts against prevalent phytopathogenic fungi. I. Crops and Products. 26:109-115.
- Damicone, J y Brandenberger, L (1993): Common Diseases of Tomatoes. Part I. Diseases Caused by Fungi. Division of Agricultural Sciences and Natural Resources. Oklahoma State University.
- Deacon, J (2006): Fungal Biology. Blackwell Publishing Ltd. 4th edition.
- Esquinas J. T. y Nuez V. F., 1995. El cultivo del tomate. Ediciones Mundi-Prensa, España, 793 p.
- Escalona, V; P. Alvarado, V. Hernán, C. Urbina y A. Martín (2009): Manual de cultivo del tomate *Lycopersicon esculentum*. Facultad de CS. Agronómicas. Universidad de Chile.
- Everett K.R. y Timudo-Torrevilla O.E., 2007. In vitro fungicide testing for control of Avocado fruit rots. New Zealand Plant Protection 60:99-103.
- El-Shareb, M. K. Z y Malibari, A. A. 1995. Enzimatic activities of soft rot causal organisms affecting vegetables and fruits in Saudi Arabia. Alexandria Journal of Agricultural. Research 40: 293-304.
- FAO, 2011. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- Galindo, G. 2010. Avances del grupo de investigación en Gulupa. Universidad Nacional de Colombia.
- Gonzalez, O.E y Laguna, J.L (2004): Evaluación del comportamiento agroeconómico de once cultivares de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) bajo el manejo del productor en el Valle de Sébaco. Matagalpa: Universidad Nacional Agraria.

- Guerrero, D; E. Tamayo y D. Vuelta, (2008): Efecto de *Trichoderma harzianum* frente al patógeno *Cladosporium fulvum* (Cooke) en condiciones de laboratorio. Laboratorio Provincial Sanidad Vegetal. Santiago de Cuba. Universidad de Oriente.
- Heisler, E. G., Siciliano, J., Stinson, E. E. y Osman, S. F. 1980. High performance liquid chromatographic determination of major mycotoxinas by *Alternaria* molds. *Journal of Chromatography* 194: 89-94.
- Hirsh, P., Eckhardt, F. F. W y Palmer Jr. R. I. 1995. Fungi active in weathering of rock and stone monuments. *Canadian Journal of Botany* 73:1384-1390.
- Jones, J.B, J. Jones, R. Stall y T. Zitter (1997): *Compendium of Tomato Diseases*. St. Paul, MN: APS Press. 1: 1-5.
- Jones, J.B., R. E. Stall, T. A. Zitter. 2001. *Plagas y enfermedades del tomate*. Ediciones MundiPrensa. 74 p.
- Lazarovits, G y Higgins, V.J (1976): Ultrastructure of susceptible, resistant, and immune -reactions of tomato to races of *Cladosporium fulvum*. *Can. J. Bot.* 54: 235249.
- Laugé, R, M.H.A.J. Joosten, J.P.W. Haanstra, P.H. Goodwin, P. Lindhout y P.J.G.M. De Wit (1998): Successful search for a resistance gene in tomato targeted against a virulence factor of a fungal pathogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 9014-9018.
- Mendoza, Z. C. 1996. *Enfermedades fungosas de las hortalizas*. Universidad Autónoma Chapingo. Depto. de Parasitología Agrícola. Chapingo, México. 83 p.
- Mendoza Z. C., Pinto D. E., 1983-1985. *Sintomas y daños ocasionados por enfermedades fungosas*.
- Moreña J. J., Rodríguez V. P., Guzmán A. M. y Zapata M. A., 2006. El cultivo del tomate bajo invernadero. *Boletín técnico* 21. Centro de investigación la selva Rionegro, Antioquia, Colombia.

- Mishra, A, M. Amita, HK. Kehri, B. Sharma y AK. Pandey (2009): Inhibitory activity of Indian spice plant *Cinnamomum zeylanicum* extracts against *Alternaria solani* and *Curvularia lunata*, the pathogenic dematiaceous moulds. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 8: 1-7.
- Momol, T. and K. Pernezny. 2006. 2006 Florida Plant Disease Management Guide: Tomato. Publication PDMG-V3-53. Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.
- Momol, T., J. Pingsheng, K. Pernezny, R. McGovern, and S. Olson. 2008. Three soilborne tomato diseases caused by *Ralstonia* and *Fusarium* species and their field diagnostics. Publication PP 52. Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.
- Nitzsche, P. and Wyenandt, A. 2005. Diagnosing and controlling fungal diseases of tomato in the home garden. Publication Number FS547. Rutgers NJAES Cooperative Extension, The State University of New Jersey.
- Olimpia G; A. Casanova; H. Laterrot y G. Anaís (2000): Mejora genética y manejo del Cultivo del Tomate para la producción en el Caribe. Instituto de Investigaciones Hortícolas "Liliana Dimitrova". La Habana. 159pp.
- Peralta I., S. Knapp, y D.M. Spooner, 2005. New species of wild tomatoes (*Solanum* section *Lycopersicon*: *Solanaceae*) from northern Peru. *Syst. Bot.* 30:424-434.
- PERRING.T.M.; FARRAR. Ch. A. 1986. Historical perspective and current world status of the Tomato Russet Mite (*Acari*: *Eriophyidae*). *Ent. Soc. of Am. Misc. publ.* No. 63 19 p,
- Peteira, B, D.F. Díaz, M. González-Chavez, B. Martínez e I. Miranda (2002): Búsqueda de un marcador RAPD asociado a la resistencia a *Alternaria solani* Sor. en tomate. *Rev. Protección. Veg.* 17: 6-13.
- Pernezny, K., P. D. Roberts, J. F. Murphy, and N. P. Goldberg. 2003. Compendium of pepper diseases. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, U.S.A. 63 p.
- Pupo Y.G, D.B. Kalombo, L. Herrera, D.I. Malheiros, B. Vargas (2011): Effect of plant extracts on growth and spore germination of *Alternaria solani* (E. & M.) J. & G. under in vitro conditions. *Rev. Iberoam. Micol.* 28: 60.

- Quintero, A. 2008. Factibilidad de la producción comercial de gulupa (*Passiflora edulis* Sims var. *edulis*) de exportación en el municipio Granada (Cundinamarca). Trabajo de grado. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Rodney, G. R. 2004. *Alternaria yallinficiens* sp. nov. On Ya Li Pear fruit: From interception to identification. *Plant Diseases* 89: 134-145.
- Rojas, N. 2010. Etiología y penetración de los hongos que ocasionan enfermedades en flores y frutos de gulupa (*Passiflora edulis* Sims). Trabajo de grado. Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.
- Rivas, S y Thomas C.M (2005): Molecular interactions between tomato and the leaf mold pathogen: *Cladosporium fulvum*. *Annu Rev Phytopathol.* 43: 395-436.
- Sambath. K.R, S. Thangavel, S.S. Rajagopal, S. Palanavel, N. Ramalingam, G. Malaya y K.M. Upal (2006): Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Careya arborea* Roxb. Stem Bark. *Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics.* 5: 35-41.
- Sarita, V (1993): Cultivo de tomate de mesa. Boletín Técnico No.19. Fundación de Desarrollo Agropecuario. Santo Domingo, República Dominicana.
- Sánchez C. M., 1980. Manejo de enfermedades del tomate. Curso del INCAPA “Manejo integrado de enfermedades en Tomate, Chile y Papa”.
- Santamarina, M.P, J. Rosello, R. Yacer y V. Sanchos (2002): Antagonistic activity of *Penicillium oxalicum* Corrie and Thom, *Penicillium decumbens* Thom and *Trichoderma harzianum*.
- Snowdon, A. L. 1991. A colour atlas of postharvest diseases and disorders of fruits and vegetables. Vol 1 Fruits CRC Press London. 302 p..
- Stinson, E. E., Bills, D. D., Osman, S. F., Siciliano, J., Ceponis, M. J. y Heisler, E. G. 1980. Mycotoxin production by *Alternaria* species grown on apples, tomatoes and blueberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 26: 960-963.
- SIAP, 2012.Elaborado por el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), con información de las Delegaciones de la SAGARPA.

- SIAP, 2017. Elaborado por el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), con información de las Delegaciones de la SAGARPA.
- Thomma, B.P.H.J, H. Van Esse, P. Crous y P. De Wit (2005): *Cladosporium fulvum* (syn *Passalora fulva*), a highly specialized plant pathogen as a model for functional studies on plant pathogenic *Mycosphaerellaceae*. *Mol. Plant Pathol.* 6:379-393.
- Torres, E, J. Iannacone, H. Gomez (2008): Biocontrol del moho foliar del tomate *Cladosporium fulvum* empleando cuatro hongos antagonistas. *Bragantia*, Campinas. 67: 169 -178.
- Torres, C., M. Sánchez, N. Bravo, F. Marmolejo. 1999., Enfermedades fungosas y bacterianas en el cultivo de maracuyá *Passiflora edulis* Sims. Ministerio de Agricultura. Universidad Nacional de Colombia sede Palmira.
- Umeh VC, Kuku FO, Nnanguma EI, Adebayo OS, Manga AA (2002). A survey of the insect pests and farmers' practices in the cropping of tomato in Nigeria. *Tropicalicultura*, 20: 181-186.
- Valenzuela, J. G. 2004. Manejo de enfermedades en hortalizas bajo invernadero. In: Manual de producción hortícola en invernadero. 2a Ed. INTAGRI. Celaya, Gto. México. pp 318-344.
- van den Ackerveken, G.F.J.M. Dunn, R.M. Cozijnsen, A.J. Vossen, J.P.M.J. van den Broek y P.J.G.M de Wit (1994): Nitrogen limitation induces expression of the avirulence gene A vr9 in the tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. *Mol. Gen. Genet.* 243: 277-285.
- Wubben, J.P, M.H.A.J. Joosten y P.J.G.M de Wit (1994). Expression and localization of two in planta induced extracellular proteins of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. *Mol. Plant-Microbe. Interact.* 7:516-524.
- Wuthi.

- Wyenandt, C. A., S. L. Rideout, K. L. Everts, R. P. Mulrooney, and N. L. Maxwell. 2009. Development of a fungicide resistance management guide for vegetable growers in the Mid-Atlantic states. Online. Crop Management doi:10.1094/CM-2009-0316-01-MG.
- Wyenandt, C. A., S. L. Rideout, B. K. Gugino, M. T. McGrath, K. L. Everts, and R. P. Mulrooney. 2010. Fungicide resistance management guidelines for the control of tomato diseases in the mid-Atlantic and northeast regions of the United States. Online. Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-2010-0827-01-MG.
- Wyenandt, A., W. Kline, and A. J. Both. 2006. Important diseases of tomatoes grown in high tunnels and greenhouses in New Jersey. Publication Number FS358. Rutgers NJAES Cooperative Extension, The State University of New Jersey.
- Zitter, T. A. 2011. Bacterial diseases of tomato. Disponible en http://vegetablemdonline.ppath.cornell.edu/factsheets/Tomato_Bacterial.htm (revisado 22 de julio. 2011). Cooperative Extension, New York State, Cornell University.
- Zitter, T. A. and J. L. Drennan. 2007. Fungicides for controlling early and late blight in tomato. Plant Disease Management Reports 1:V001. Online publication. doi:10.1094/PDMR02.

ANEXOS

ANEXOS

Anexo 1., Secuencias de ADN para cada una de las muestras.

Secuencia Identificada como *Alternaria alternata*

>160510-15_A01_1_ITS1. 525pb.

```
CTGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAATTATTCACCCTTGTCTTTTGCCT  
ACTTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTTCGCCCACTAGGACAAACATAAACCTTTTG  
TAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTTTCAACAACGGATCT  
CTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATT  
GCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTC  
CAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTT  
GGGCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCG  
GCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTA  
GCATCCATTAAGCCTTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG  
CTGAACTTAAGCATATCAAAGCCCGGAGGAAGA
```

Secuencia identificada como *Cladosporium oryzae*

>160510-15_C01_4_ITS1. 496pb.

```
TACCACCGGGATGTTTCATAACCCTTTGTTGTCCGACTCTGTTGCCTCCGGGGCG  
ACCCTGCCTTCGGGCGGGGGCTCCGGGTGGACACTTCAAACCTTTCGCGTAACTT  
TGCAGTCTGAGTAACTTAATTAATAAATTAACAACTTTTAACAACGGATCTCTTGG  
TTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGA  
ATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGG  
GGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGC  
AACGCGGTCCGCCGCGTGCCTCAAATCGACCGGCTGGGTCTTCTGTCCCCTAA  
GCGTTGTGGAACTATTCGCTAAAGGGTGTTCGGGAGGCTACGCCGTAAAACAA  
CCCCATTTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGC  
ATATCATAA
```

Anexo 2-. Síntomas de los frutos inoculados con *Alternaria alternata*.



28 de abril del 2016



18 de Abril del 2016



01 de Mayo del 2016



02 de Abril del 2016



28 de Abril del 2016



04 de Mayo del 2016

Anexo 3-. Síntomas de los frutos inoculados con *Cladosporium oryzae*.



28 de Marzo del 2016



25 de Abril del 2016



04 de Mayo del 2016



01 de Abril del 2016



25 de Abril del 2016

Anexo 4-. Síntomas de los frutos inoculados con la mezcla de *A. alternata* y *C. oryzae*.



29 de Marzo del 2016



27 de Abril del 2016



04 de Mayo del 2016



05 de Abril del 2016



25 de Abril del 2016



04 de Mayo del 2016

Anexo 5-. Cálculos del conteo de esporas *Cladosporium oryzae*.

$$\text{No. de esporas / mL} = \frac{\text{Esporas Totales} \times \text{Factor de cámara (10,000)}}{\text{Numero de cuadros} \times \text{dilución}}$$

Total de esporas = 34

$$34/5 = 6.8 / 25 = 0.272 \times 4 \text{ millones} = \underline{1.088 \text{ ml de esporas por Agua}}$$

$$\frac{(1.088 \times 10^6) (250)}{1,000,000} = 272 - 250 = \underline{22} \text{ ml} \times 1 \times 10^6$$

Cálculos del conteo de esporas de *Alternaria alternata*.

Total de esporas = 49

$$49/5 = 9.8 / 25 = 0.392 \times 4 \text{ millones} = \underline{1.568 \text{ ml de esporas por Agua}}$$

$$\frac{(1.568 \times 10^6) (250)}{1,000,000} = 392 - 250 = \underline{142 \text{ Agua ml}} \times 1 \times 10^6$$