Phoma medicaginis var. *pinodella*, agente causal del "Carate" en el tomate (*Lycopersicum esculentum* Mil.)

LUIS ERNESTO ARISTIZABAL VELEZ

ANDRES EMILIO MEJIA ARANGO

Trabajo de Investigación presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniero Agrónomo

Asesores: Ligia Pérez Angel
Rafael Navarro Alzate

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SECCIONAL MEDELLIN
FACULTAD DE AGRONOMIA

1.983

"Los profesores consejeros y el jurado examinador del grado, no se hacen responsables de las ideas emitidas por los autores".

ARTICULO 217.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos:

A los directivos, personal científico y empleados del ICA en el C.R.I. "La Selva", Rionegro, por su colaboración durante la realización de la investigación.

A GLORIA LOFERA y demás personal de la Biblioteca y Hemeroteca de la Facultad de Agronomía, por su colaboración en la recopilación de las referencias bibliográficas.

A PATRICIA SOTO, bacterióloga, por su asesoría en la metodología de trabajo en el laboratorio.

A JOSE D. CARTAGENA, laboratorista de fitopatología, por su colaboración durante la investigación.

A FRANCISCO VARGAS y personal científico de la Secretaría Departamental de Agricultura, por su colaboración en el procesamiento del material fotográfico.

DEDICATORIA

A Ana Mercedes

A mi familia

A mis profesores

LUIS

A mi familia

A mis profesores

ANDRES

TABLA DE CONTENIDO

		Página
INTRODUCCION		xv
1.	REVISION DE LITERATURA	1
1.1	ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR Phoma spp. EN COLOMBIA...	2
1.2	IDENTIFICACION DEL PATOGENO.....	11
2.	MATERIALES Y METODOS	12
2.1	PREPARACION DE LOS MATERIALES...	12
2.1.1	Esterilización del equipo.....	12
2.1.2	Cámara de siembra	13
2.1.3	Medios de cultivo.....	14
2.2	AISLAMIENTO DEL PATOGENO.....	15
2.3	PRUEBAS DE PATOGENICIDAD.....	17
2.3.1	Obtención de plántulas sanas.....	17
2.3.2	Obtención de la suspensión de conidias.	18
2.3.3	Inoculación.....	19
2.4	METODOS DE INOCULACION.....	20

		Página
2.4.1	Aspersión	20
2.4.2	Punción-aspersión	21
2.4.3	Mota de algodón	21
2.4.4	Diseño experimental	21
2.5	IDENTIFICACION DEL PATOGENO...	25
2.6	LOCALIZACION Y FECHA DE REALI-CION	26
3.	RESULTADOS	27
3.1	AISLAMIENTO DEL PATOGENO.....	27
3.1.1	Obtención del material enfermo.....	27
3.1.2	Medios de cultivo	28
3.1.3	Morfología de la colonia	29
3.2	PRUEBAS DE PATOGENICIDAD	40
3.3	SINTOMATOLOGIA DE LA ENFERME-DAD.....	40
3.4	METODOS DE INOCULACION	44
3.5	IDENTIFICACION DEL PATOGENO...	45
4.	DISCUSION	47
4.1	AISLAMIENTO DEL PATOGENO	47
4.1.1	Obtención del material enfermo.....	47
4.1.2	Morfología del hongo	47
4.2	PRUEBAS DE PATOGENICIDAD.....	48
4.3	SINTOMATOLOGIA DE LA ENFERMEDAD	49

Página

4.4	METODOS DE INOCULACION	50
4.5	IDENTIFICACION DEL PATOGENO...	51
5.	CONCLUSIONES	54
REFERENCIA BIBLIOGRAFICAS		68

LISTA DE TABLAS

		Página
TABLA 1	Frecuencia de las dimensiones de los picnidios.....	31
TABLA 2	Distribución de dimensiones de conidias.....	36

LISTA DE FIGURAS

		Página
FIGURA 1	Colonia de Phoma medicaginis var. pinodella, vista superior.	30
FIGURA 2	Distribución de frecuencias para el largo y el ancho de los picnidios	32
FIGURA 3	Grupo de picnidios	33
FIGURA 4	Picnidios expulsando conidias...	33
FIGURA 5	Ostíolo de un picnidio	34
FIGURA 6	Picnidio expulsando conidias en mucílago	34
FIGURA 7	Distribución de frecuencias para el largo y el ancho de las conidias....	37
FIGURA 8	Pinodela vista con luz directa..	38
FIGURA 9	Pinodela vista con luz indirecta	38
FIGURA 10	Colonia de Phoma medicaginis var. pinodella, vista inferior	39
FIGURA 11	Pinodela formando abanico....	39
FIGURA 12	Tallo de tomate mostrando los síntomas de la enfermedad....	41

Página

FIGURA 13 Tallo de tomate mostrando los síntomas avanzados de la enfermedad..... 43

FIGURA 14 Tallos y frutos de tomate mostrando los síntomas de la enfermedad..... 43

LISTA DE APENDICES

		Página
APENDICE 1	Medios nutritivos de cultivo	56
APENDICE 2	Valores transformados: θ = arc sen $(0,01\ x\%)^{1/2}$ ..... LECTURA 1, Agosto 6 de 1982	58
APENDICE 3	Cálculos del ANAVA de Lectura 1 ..	59
APENDICE 4	ANAVA y Prueba de Duncan para Lectura 1	61
APENDICE 5	Valores transformados: θ = arc sen $(0,01\ x\%)^{1/2}$ ..... LECTURA 2, Agosto 8 de 1982	63
APENDICE 6	Cálculos del ANAVA de Lectura 2..	64
APENDICE 7	ANAVA y Prueba de Duncan para Lectura 2.	66

RESUMEN

Se desarrolló una metodología basada en los Postulados de Koch con el fin de aislar el hongo, efectuar las pruebas de patogenicidad, evaluar diferentes métodos de inoculación y realizar la correcta identificación del agente causal del "Carate", enfermedad reportada desde 1.981 en las plantaciones de tomate del Oriente Antioqueño. El trabajo se realizó en las instalaciones del ICA, C.R. I. - "La Selva", Rionegro y en el laboratorio de fitopatología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional, Medellín.

Se obtuvieron muestras de tallos, ramas, hojas, flores y frutos provenientes de plantas enfermas en el campo, para realizar los aislamientos sobre PDA modificado en platos de Petri.

Al PDA normal se le adicionó ácido láctico, cloranfenicol y tiamina, que permitieron el desarrollo vegetativo y fructificación del hongo.

A medida que las colonias se desarrollaron, se observaron sus características morfológicas, tipos de crecimiento, coloraciones. Para identificar el hongo se obtuvieron fotografías al microscopio de luz y se emplearon claves taxonómicas actualizadas.

A partir de cepas puras se obtuvo una suspensión de micelio y conidias, con el cual se inocularon tres variedades diferentes de tomate, ensayándose tres métodos de inoculación.

Se hicieron dos lecturas para calificar los síntomas en las vemas, hojas y tallos de cada una de las plántulas.

Se ordenaron los valores de las lecturas, y se efectuó el ANAVA aplicando el método estadístico de parcelas subdivididas.

Al analizar las características macroscópicas del hongo, se determinó como Phoma medicaginis var. pinodella, por presentar estructuras ramificadas en el substrato de PDA, muy similares a las acículas de pino.

INTRODUCCION

El tomate (Lycopersicum esculentum Mill) es una planta de importancia económica cultivada en el Oriente Antioqueño. Su área de cultivo comprende los municipios de El Peñol, Guatapé y Marinilla con una extensión aproximada de 300 Ha y una producción promedia de 24 ton/Ha/año, las cuales representan un valor cercano a $ 300.000.000 en el comercio (4,5).

Para las diversas labores culturales se emplea la mano de obra local y la tecnología aplicada es aún empírica, la variedad más cultivada es la "Chonto" y su principal uso es el consumo directo.

La comercialización del fruto se realiza principalmente a través de la Cooperativa de cultivadores de tomate con sede en El Peñol, la cual efectúa despachos hacia Medellín y otras ciudades fuera del Departamento de Antioquia.

A partir de 1.981 se determinó una enfermedad denominada "Carate" por los cultivadores y causando grandes pérdidas a la economía de la región. Las características de esta enfermedad no concuerdan con las de ninguna otra descrita hasta ahora para el tomate, por lo tanto se considera una nueva enfermedad para este cultivo y producida por un hongo del género Phoma (36).

Los objetivos de este trabajo fueron:

1. Realizar el aislamiento del patógeno en medio de cultivo
2. Efectuar pruebas de patogenicidad
3. Evaluar diferentes métodos de inoculación
4. Hacer la correcta identificación del patógeno

BIBLIOTECA AGROPECUARIA
DE COLOMBIA

1. REVISION DE LITERATURA

En 1.981 se detectó y registró en el Oriente Antioqueño una nueva enfermedad fungosa en el tomate (Lycopersicum esculentum), conocida por los agricultores como "Carate" y producida por el hongo Phoma sp.

Según Navarro y Puerta (36), las plantas enfermas presentan proliferación de pequeñas manchas necróticas de consistencia seca y color negro, que al unirse llegan a cubrir la superficie del órgano atacado. Las lesiones aparecen sobre tallos, ramas, hojas y pedúnculos florales. En los frutos las lesiones muestran agrietamientos profundos y momificación.

En la literatura no se encontró una descripción de los síntomas de la enfermedad denominada "Carate", exceptuando la hecha por Navarro y Puerta.

La aparición de síntomas causados por Phoma spp. en las plantas.

está muy asociada a las condiciones ambientales de alta humedad y temperatura variable (15, 20, 25, 29).

Las conidias se desprenden fácilmente de la superficie de las lesiones u diante el lavado con agua (rocío, lluvia o riego) y requieren buena humedad para germinar (29, 46).

Los síntomas iniciales del "Carate" pueden confundirse con los de Phytophthora sp. y Alternaria sp. comunes en el Oriente Antioqueño, en el caso de Phoma sp. el patógeno no penetra en el tejido medular, además, en las lesiones es posible hallar las estructuras reproductivas del hongo (*).

Hasta el momento no se ha encontrado un método adecuado para controlar esta enfermedad en el campo.

1.1 ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR Phoma spp. EN COLOMBIA

Phoma spp. se presenta en Colombia en otros cultivos, siendo de amplia dispersión. Por lo general, su ataque y mayor virulencia ocurren en épocas de lluvias con bajas temperaturas.

*) Rafael Navarro, comunicación personal. Programa de Fitopatología. ICA, C.R.I. "La Selva", Rionegro, mayo de 1982.

En el cultivo del café (Coffea arabiga), el hongo es el causante de la muerte descendente. Se encuentra distribuida en las diferentes zonas cafeteras, pero particularmente en las ubicadas a alturas superiores a 1.600 m.s.n.m. donde adquiere caracteres epifitóticos (19). Esta enfermedad afecta a todas las variedades sembradas en el país, se ha observado que su incidencia y severidad son mayores durante la época lluviosa, coincidiendo con días de poco brillo solar.

Cuando no se manejan los cultivos adecuadamente, teniendo en cuenta el medio ambiente, las pérdidas económicas llegan a ser importantes (24).

El patógeno ataca brotes, ramas y frutos (18). Para la germinación y penetración del hongo se requiere la presencia de agua libre (22). En estudios histopatológicos se ha observado que en ocasiones el hongo no necesita de las aperturas estomales para su penetración. El patógeno avanza por los espacios intercelulares de la epidermis hasta el mesófilo, allí las células se presentan plasmolizadas y los cloroplastos aglutinados, los tejidos de empalizada y esponjoso son colonizados por las hifas, las cuales se entrelazan posteriormente en la epidermis para formar el picnidio (47). Se han efectuado investigaciones sobre el desarrollo

y esporulación del hongo en condiciones de laboratorio (23), recomendándose el medio de cultivo agar-Jugo V-8 (40) y temperaturas de inoculación entre 18 y 22°C (22, 40), con períodos diarios de iluminación entre tres y seis horas (22).

La enfermedad se caracteriza por la presencia inicial de manchas pequeñas, redondeadas con bordes irregulares (18), de color negro opaco en el ápice de las hojas recién formadas (22), cuando las manchas se presentan en los bordes se produce un encrespamiento hacia el lado de la lesión (18, 22).

Los brotes y ramas tiernas se secan de la punta hacia abajo, hasta alcanzar el tallo principal (19), la planta emite ramificaciones laterales que proliferan hasta deformarla y que luego pueden ser atacadas. El avance de la enfermedad disminuye con el envejecimiento de los tejidos (18).

El patógeno también afecta los entrenudos del tallo principal y de las ramas, causando lesiones en forma de anillos concéntricos, de coloración gris-ceniza. La mancha puede abarcar parcial o totalmente los tallos afectados, los cuales se quiebran con facilidad. En las ramas fructíferas jóvenes, la enfermedad se localiza en el cojín floral causando su destrucción.

Los frutos son atacados cuando están verdes, pintones o maduros. Los frutos jóvenes se tornan de coloración negra y se momifican, los maduros presentan lesiones pequeñas y hundidas (18).

Los almácigos deben colocarse a la semisombra. Se recomienda aplicar fungicidas a base de captafol o clorotalonil en forma preventiva. Los almácigos muy atacados no se deben emplear para el transplante.

En plantaciones desarrolladas se recomienda la aplicación preventiva de fungicidas en épocas lluviosas. En cultivos muy afectados, se aconseja la poda de ramas y brotes atacados y aplicación de fungicidas (18).

En yuca (Manihot esculenta) la mancha de anillos circulares o mancha anillada está limitada en Colombia a plantaciones que se encuentran por encima de los 1.200 m.s.n.m y en donde la temperatura es inferior a 20° C durante la época lluviosa. Causa severa defoliación en cultivos susceptibles y a veces muerte descendente o total de la planta, dando como resultado grandes pérdidas en el rendimiento. La enfermedad es endémica en las regiones yuqueras del país que cumplen con las condiciones citadas (10, 11, 14, 30, 32).

Leu (30), citando a Lozano y Booth escribe: "Ya que no se ha determinado por completo la definición y la validez taxonómica de las especies reportadas, la posibilidad es que sea un sinónimo perteneciente al género Phoma sp. Es urgente efectuar un completo estudio taxonómico en un amplio rango de aislamientos patogénicos para clarificar si efectivamente el patógeno pertenece a Phoma o a Phyllosticta".

El hongo produce numerosos picnidios sobre la epidermis de las hojas y tallos infectados. Estos picnidios son de color café oscuro, globosos, individuales o en pequeños grupos, ostiolados, con conidióforos hialinos y cortos (30).

La enfermedad presenta grandes manchas de color café con borde indefinido, las lesiones se encuentran comunmente en las puntas o en los bordes de los lóbulos, a lo largo de la vena principal y secundarias de las hojas. Las lesiones jóvenes sobre el haz muestran anillos concéntricos, en las lesiones viejas los anillos no se muestran bien definidos pues los picnidios son arrastrados por las gotas de lluvia. En el envés, las lesiones son de color café oscuro y se pueden formar picnidios en poca cantidad, a partir de la lesión inicial las nervaduras se necrosan radialmente. Cuando la humedad relativa es alta, las lesiones pueden cubrirse con una red

de hifas color café grisáceo. Al expandirse el hongo, la hoja sufre una quemazón tornándose de color café oscuro muriendo finalmente. La enfermedad se extiende sistemáticamente ocurriendo defoliación cuando es severa, el patógeno ataca el pecíolo, el tallo y los retoños, causando muerte descendente. Los tallos enfermos se tornan de color café oscuro y frecuentemente se recubren con los picnidios (10, 30, 32). Los tejidos verdes y jóvenes se encuentran severamente lesionados, las hojas inferiores y más viejas parecen tener mayor resistencia (30).

Se controla la mancha anillada sembrando cultivares resistentes o altamente tolerante, especialmente en zonas de clima frío (11, 32), sembrando material sano proveniente de plantas con bajo índice de área foliar, con el fin de disminuír las condiciones favorables para la formación de un microclima húmedo y de baja temperatura con poca circulación de aire, además se deben tener bajas densidades de siembra (33).

En los cultivares más productivos se incorpora resistencia genética a esta enfermedad (30).

En papa (Solanum tuberosum), Phoma solanicola y P. foveata causan pudriciones de tipo seco en tubérculos almacenados a cuatro grados centígrados y a 80 a 90% de humedad.

Los signos iniciales de infección se manifiestan por pequeñas manchas oscuras y brillantes que luego pueden alcanzar hasta 2,5 cm. de diámetro. A medida que las manchas aumentan de tamaño sus márgenes se van definiendo, el área de la lesión se hunde y la epidermis se arruga. En estados avanzados de infección se desarrollan picnidios alrededor del punto original de la misma, los cuales aparecen como puntos negros, visibles a simple vista. La infección puede avanzar externamente o penetrar hacia el centro del tubérculo. La pudrición progresa a medida que disminuye la temperatura de almacenamiento (3).

El control se logra mediante destrucción temprana de la parte aérea de la planta, cosecha de tubérculos bien maduros, manipulación y empaque cuidadoso de los mismos y almacenamiento inicial a 18° C durante diez días (12).

En remolacha (Beta vulgaris), la pudrición del corazón se debe a la presencia de Phoma betae, hongo que ataca todas las partes de la planta, en plántulas produce Damping - off. La base del

tallo jóven y raíces se tornan negras, se marchitan y mueren. El hongo causa una mancha foliar de color pardo y algunas veces con anillos concéntricos, en las manchas maduras se forman picnidios negros visibles a simple vista. Las hojas interiores jóvenes se infectan primero, siguiendo luego las más viejas, las que se tornan débiles y amarillentas.

El patógeno infecta los tallos portadores de semillas y se puede encontrar fructificando en la superficie de éstas. El hongo puede sobrevivir en el suelo hasta por tres años. Las esporas son diseminadas por la lluvia.

Los suelos bien fertilizados y con buen drenaje, el uso de semilla limpia y desinfectada con sulfato de cobre reducen la incidencia de la enfermedad, lo mismo que la adición de boro y sodio (41).

En repollo (Brassica oleracea), Phoma lingam es el agente causal de la "Pata negra". Esta enfermedad se presenta en Colombia en todas las zonas donde se siembren variedades susceptibles. El principal síntoma es una lesión oval con una depresión ligeramente parda, cerca a la base del tallo que puede llegar a circundarlo.

En las hojas aparecen manchas circulares pardo claras, bien definidas, hundidas, con centro cenizo, en el cual se pueden observar las fructificaciones del hongo. Cuando las plantas están muy afectadas se marchitan, los bordes de las hojas toman una coloración azul : jiza.

El hongo puede ser transportado dentro y sobre la semilla. La severidad de la enfermedad está en proporción directa con la cantidad de lluvia.

El control de la enfermedad se logra mediante rotaciones de cultivos a cuatro años, evitando la dispersión de material y destrucción de residuos infectados, utilización de semillas limpias y tratadas, siembra de plántulas sanas.

El suelo del semillero debe tratarse con desinfectantes y construírlos en terrenos donde no se haya sembrado repollo que se hubiese infectado. Realizar el cultivo en lotes con buen drenaje, y hacer el control de malezas en especial de la familia Cruciferae (42).

En Antioquia se encontró Phoma sp. causando pudriciones radiculares en plántulas de ciprés (Cupressus sp.) y pino (Pinus patula) (38).

1.1 IDENTIFICACION DEL PATOGENO

De los 17 grupos de Phoma spp. descritos por Dennis y reordenados por Boerema, tan sólo dos son reportados como patógenos del tomate:

Grupo III/cepa 11: Phoma lycopersici Cke., estado conidial de Didymella lycopersici Klebahn, siendo el tomate su principal hospedero y causándole pudrición del tallo (gangrena), pudrición del fruto y manchas foliares. Con frecuencia se confunde con P. destructiva Plowr., pero en cultivo se distinguen con facilidad uno del otro.

Grupo XVII, cepa 34: Phoma glomerata (Cda.) Wollenw. & Hochapf. hongo ubícuo, usualmente saprófito pero algunas veces actúa como parásito débil o fuerte. También se aisló de pintura, madera, mantequilla y varios productos químicos. El cultivo original se aisló de frutos podridos de tomate y fué denominado P. alternariaceum Brooks & Searle, se caracteriza por producir in vitro cadenas de dictioclamidosporas como las de Alternaria (9)

2. MATERIALES Y METODOS

Para cumplir los postulados de Koch se obtuvo un cultivo puro del hongo patógeno sobre un medio nutritivo, que permitió su crecimiento y fructificación en platos de Petri. Para lograrlo se efectuó el procedimiento siguiente:

2.1 PREPARACION DE LOS MATERIALES

2.1.1 Esterilización del equipo

Los implementos manuales (pinzas, agujas de disección, bisturís, etc) se esterilizaron en autoclave a 132° C y a una presión de 18 lb/pulg^2 durante 20 minutos. Los platos de Petri, se envolvieron en papel formando paquetes de ocho unidades, los otros artículos de cristalería (Beakers, Erlenmeyers, pipetas, etc) se envolvieron individualmente en papel, y todo este material se colocó dentro de una estufa de calor seco a 170° C durante dos horas.

2.1.2 Cámara de siembra

Se empleó una cámara de siembra marca MICROVOID, con flujo constante de aire filtrado y lámpara de luz de neón.

El interior de la cámara se desinfectó con hipoclorito de sodio al cinco por ciento y estabilizado con hidróxido de potasio, tal solución se aplicó a las paredes con un hisopo de algodón.

Para el trabajo rutinario en la cámara se requirió de una completa asepsia por parte del operador, lograda mediante el lavado de las manos con jabón y posterior enjuague con etanol al 95%. Durante el período de trabajo en la cámara se mantuvieron encendidos dos mecheros en su interior y en los cuales se flamearon los implementos metálicos previamente sumergidos en etanol al 95% (7).

2.1.3 Medios de cultivo

Se seleccionó inicialmente el medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) convencional propuesto por Echandi y al cual se le efectuaron modificaciones en su contenido nutritivo para permitir el completo desarrollo del hongo. Además, se ensayó el medio normal de Agar-Harina de Maíz (A.H.M.) al que también se le efectuaron modificaciones en los nutrientes (16, 21). Las formulaciones de estos medios se indican en el Apéndice 1.

Los medios de cultivo se esterilizaron a 132°C y a 18 lb/pulg^2 (39).

Todos los implementos y medios de cultivo se llevaron a la cámara de siembra. Con el medio de cultivo licuado se agregaron el ácido láctico y el antibiótico, se agitó la mezcla evitando formar burbujas, al dejar enfriar hasta una temperatura de 45°C aproximadamente (cuando el operador puede soportar el calor del recipiente al contacto con la mejilla) se vertió el medio a los platos de Petri, permitiendo la solidificación a la temperatura ambiente.

2.2 AISLAMIENTO DEL PATOGENO

El material enfermo se obtuvo en parcelas experimentales de tomate y provenientes del campo, en el CRI "La Selva". Se ensayaron trozos de tallos, ramas, hojas y frutos, con diferente grado de desarrollo de la enfermedad sobre la epidermis de los tejidos, desde lesiones iniciales hasta que las estructuras se encontraban completamente ennegrecidas. Estos trozos se lavaron con agua corriente, y se hicieron cortes en cuadrículas de cinco milímetros de lado que se llevaron a la cámara de siembra. El espesor de los cortes comprendió únicamente los tejidos corticales.

Método de desinfestación de los cortes de tejido (7, 21):

a. Inmersión de los tejidos en etanol al 70% durante 30 segundos, con el fin de romper la tensión superficial de la cutícula.

b. Lavado con agua bidestilada estéril

c. Inmersión en una solución desinfectante de hipoclorito de sodio al 0,5 por ciento durante un minuto.

d. Lavado con agua bidestilada estéril por tres veces.

Durante el proceso de siembra los trozos de tejido permanecieron sumergidos en agua bidestilada estéril.

Se sembraron cuatro trozos de tejido por plato de Petri, los cuales fueron sellados con cinta de enmascarar para evitar contaminaciones y conservar la humedad en su interior. Cada plato de Petri se marcó con una etiqueta en la cual se anotó: número del ensayo, número de la replicación, medio nutritivo, tipo de tejido y fecha de siembra.

Se realizaron revisiones semanales de los aislamientos, observándose su desarrollo y efectuándose reaislamientos de aquellos platos en los que el hongo tuvo un completo desarrollo.

Los reaislamientos se realizaron por extracción de discos de medio con micelio en su superficie, mediante la utilización de un sacabocados de cinco milímetros de diámetro con la punta de un bisturí se sacó el disco de PDA y se colocó invertido sobre la superficie del PDA contenido en otro plato de Petri.

2.3 PRUEBAS DE PATOGENICIDAD

2.3.1 Obtención de plántulas sanas

Para el cumplimiento de los postulados de Koch, se efectuaron las pruebas de patogenicidad requeridas para verificar si la sintomatología producida por el patógeno en el campo, era semejante a la causada en plántulas sanas inoculadas con cepas puras y colocadas en un umbráculo con semisombra y riego controlado.

Las plántulas se obtuvieron a partir de semillas sembradas en vasos plásticos, lavados previamente en una solución de hipoclorito de sodio al cinco por ciento y llenados con suelo preparado y tratado con bromuro de metilo, se previno el encharcamiento de los vasos perforando su fondo.

Con el suelo suficientemente húmedo se sembraron cuatro semillas en cada vaso, de una de las siguientes variedades:

V_1 : "Chonto LIGATO".

V_2: Variedad Holanda nueve (*)

V_3: Variedad Holanda once (*)

Cada vaso se identificó con un baja lenguas, donde se anotó la fecha de siembra y el número del tratamiento. Los v sos se llevaron a un invernadero con techo de vidrio y paredes de anjeo tupido; el invernadero fue previamente asperjado con una solución de benomil al dos por ciento. Se proporcionó riego durante el período de germinación y crecimiento de las plántulas. A los 15 días de germinadas se ralearon, dejándose dos por vaso.

2.3.2 Obtención de la suspensión de conidias

A partir de platos de Petri con cultivo puro del hongo y de 25 días de sembrados, se obtuvo una suspensión acuosa de micelio y conidias por el procedimiento siguiente:

Con un asa de vidrio se desprendió el micelio de la superficie del PDA en cinco diferentes platos de Petri, luego se lavó el micelio con agua bidestilada estéril. La suspensión obtenida se

(*) Emile Girard, Programa de Hortalizas, ICA, CRI "La Selva", Rionegro, Julio de 1.982.

agitó por diez minutos en una licuadora y se filtró por varias capas de gasa hasta que estuvo libre de residuos de agar; se realizó un segundo filtrado a través de un embudo cubierto con papel de filtro (SURGE 20.137 breaker cup), se terminó completando con agua bidestilada estéril hasta un volumen de 300 ml.

La concentración de conidias se determinó empleando un hemocitómetro NEUBAUER de 400 retículos/mm^2 y de 0,1 mm de profundidad.

2.3.3 Inoculación

Cuando las plántulas tuvieron 30 días de germinadas, se formaron dos lotes de 90 vasos cada uno. Al primero se le trató con agua bidestilada estéril, y al segundo se le trató con la suspensión de conidias a una concentración de $1,3 \times 10^6$ conidias/ml empleando un aspersor manual De VILVISS.

Luego de la inoculación se procedió a cubrir cada vaso con una bolsa de polietileno transparente de (20 x 25) cm ajustada con una banda elástica al vaso con el fin de lograr una cámara húmeda (100% H.R.). La bolsa se retiró a las 48 horas.

Los vasos se colocaron en un cobertizo con techo de plástico y paredes laterales de tela de yute, para proteger las plántulas del viento y la lluvia. El suelo y las paredes se mantuvieron húmedas. Este lugar presentó las condiciones climáticas siguientes: Temperatura máxima variando entre 22,4 a 23,6° C; temperatura mínima variando entre 10,2 a 11,2°C; humedad relativa variando entre 67 y 70%, para los días de las lecturas uno y dos. En el mes de agosto de 1.982 la temperatura máxima absoluta fué de 24,8°C y la temperatura mínima absoluta fué de 5,6°C.

Se llevó un registro del avance de la infección, efectuando lecturas en los dos lotes a los cuatro y seis días después de la inoculación.

Se realizaron reaislamientos del patógeno de las plantas con síntomas de la enfermedad.

2.4 METODOS DE INOCULACION

Para evaluar el sistema más adecuado de inoculación del patógeno se emplearon los siguientes métodos:

2.4.1 Aspersión

El inóculo se aplicó directamente al follaje con el aspersor, tratando de cubrir todos los tejidos.

2.4.2 Punción-aspersión

Las plántulas se punzaron con una aguja pequeña en cinco puntos diferentes del tallo, teniendo cuidado de no causar otros daños mecánicos, luego se realizó la aspersión de los tratamientos, tal como se describió anteriormente.

2.4.3 Mota de algodón

Se tomó una mota de algodón clínico estéril y se sumergió en la suspensión de conidias, luego se colocó alrededor del tallo a nivel de las hojas cotiledonares de cada plántula.

2.4.4 Diseño experimental.

El experimento se condujo en un diseño de Parcelas subdividas con un arreglo completamente al azar (*, 44).

(*) Carlos Escobar. Comunicación personal. Profesor de Diseño Experimental. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional. Julio de 1.982.

Factores de variabilidad:

Factor inoculación o factor I: dado por las aspersiones de agua bidestilada estéril o de suspensión de conidias a dos lotes de plántulas.

Se designó así:

i_1: Inoculación con la suspensión de conidias

i_2: Inoculación con agua bidestilada estéril

Factor método de inoculación o factor S: dado por los métodos de inoculación.

s_1: Aspersión

s_2: Punción-aspersión

s_3: Mota de algodón

Factor variedad o factor V: dado por las variedades de tomate

v_1: Variedad "Chonto LICATO"

v_2: Variedad Holanda nueve

v_3: Variedad Holanda once

Unidad experimental:

Para los cálculos se consideró como unidad experimental a cada vaso conteniendo dos plántulas, para un total de 180 unidades experimentales.

Tratamientos:

Su número se expresó por: tres variedades por tres métodos de inoculación por dos inóculos = 18 tratamientos diferentes.

Con el diseño experimental utilizado se dividió el ensayo en dos lotes, cada uno con nueve tratamientos y diez replicaciones.

L_1: Lote al que se le aplicó la solución de conidias
L_2: Lote testigo, en el cual se utilizó la aspersión de agua bidestilada estéril.

Cada lote se conformó con 90 unidades experimentales, colocadas por sorteo en las casillas de una cuadrícula nueve por diez y numeradas del uno al 90. Ambos lotes estuvieron sometidos a iguales condiciones ambientales y de manejo.

Registro de síntomas:

Las observaciones efectuadas en los diferentes órganos de la planta se registraron indicando: el valor de la unidad cuando aparecian síntomas de la enfermedad y el valor de cero para órgano asintomático.

Todos los registros de sintomatología se realizaron en el siguiente orden en las estructuras de las unidades experimentales: Yema (Y), hoja (H) y tallo (T), resultando un número de tres cifras con las siguientes variaciones:

Y H T

0 0 0..... Planta sana

0 0 1.....Planta con tallos infectados

I 0 0.....Planta con yemas infectadas

0 I 1.....Planta con hojas y tallos infectadas

1 0 1.....Planta con yemas y tallos infectados

1 1 1 ..... Plantas con infección generalizada

1 1 1 MARCHITA. Planta con infección generalizada y marchita

A partir de los anteriores registros de campo se asignó una calificación en porcentaje de la gravedad de la enfermedad para cada planta, y dada por:

CALIFICACION (x%)	
0.....	Planta sana
25.....	Planta con una estructura afectada
50..... ..	Planta con dos estructuras afectadas
75.....	Planta con tres estructuras afectadas
100.....	Planta con infección generalizada y marchita

Estas calificaciones son variables discretas, para realizar los cálculos estadísticos se requieren de variables continuas, por lo cual se realizó la transformación θ = arc. sen. $(0,01\ x\%)^{1/2}$ (31).

Para el análisis de varianza se tabularon los valores transformados para las lecturas a los cuatro y seis días, y se analizaron independientemente.

2.5 IDENTIFICACION DEL PATOGENO

Se describieron las características principales de las colonias, los picnidios y las conidias, indicando tamaño, tipo de crecimiento, coloraciones.

Se obtuvieron fotografías al microscopio de: colonias, picnidios, conidias, micelio y otras estructuras características.

La identificación del agente causal se basó en los estudios de Phoma spp. de Boerema (9) y Johnston (27).

2.6 LOCALIZACION Y FECHA DE REALIZACION

Los ensayos de laboratorio y campo se realizaron en:

INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO - ICA
C.R.I. "La Selva", Rionegro, Antioquia.

UNIVERSIDAD NACIONAL
Seccional de Medellín.
Laboratorio de Fitopatología.

La obtención de cepas puras del hongo se inició en el mes de marzo de 1982, la constatación de la similitud entre estas cepas y las obtenidas a partir de plántulas inoculadas se logró en el mes de noviembre del mismo año.

La cuenta, medición y fotografía de estructuras se llevó a término en el mes de agosto de 1983.

3. RESULTADOS

3.1 AISLAMIENTO DEL PATOGENO

3.1.1. Obtención del material enfermo

La capacidad de un tejido enfermo para desarrollar micelio sobre la superficie del medio nutritivo (in vitro) dependió de:

- Extensión de la lesión sobre la superficie del tejido afectado: aquellos tejidos cubiertos en su total extensión por lesiones no mostraron desarrollo in vitro, pero los tejidos que aún conservaban porciones verdes fueron capaces de desarrollar crecimiento micelial y posterior fructificación del hongo.

- Grosor del corte: los cortes compuestos únicamente de tejidos corticales desarrollaron micelio sobre la superficie del PDA, los cortes con porciones de médula adheridas no tuvieron capacidad de desarrllar micelio in vitro.

La variedad de tomate seleccionada en el campo para realizar el aislamiento no influyó en el desarrollo del hongo sobre el medio nutritivo contenido en los platos de Petri.

Aunque inicialmente se trabajó con tejidos enfermos provenientes de tallos, ramas, frutos y hojas, el ensayo se continuó luego con tejidos de tallos y ramas únicamente, dada la facilidad para su manejo (poder realizar cortes delgados, resistentes al manipuleo y abundancia del material en condiciones favorables para ser sembrado).

Los ensayos con tejidos provenientes de hojas enfermas no fueron consistentes, debido a la contaminación que mostraron las colonias en los platos de Petri.

3.1.2 Medios de cultivo

Con los medios nutritivos normales de PDA y AHM no se obtuvieron crecimientos satisfactorios del hongo, debido especialmente a la contaminación bacterial, no obstante, con PDA modificado se tuvo crecimiento vegetativo y reproductivo del hongo, lo cual no ocurrió con el AHM modificado (Apéndice 1).

3.1.3 Morfología de la colonia.

El crecimiento inicial del hongo es lento, pero a partir del octavo día de sembrado en el medio nutritivo se desarrolla rápidamente formando una colonia circular. El tamaño de la colonia es variable, desde 2,5 cm de diámetro a los ocho días de sembrada, hasta ocupar los dos tercios del área interior del plato de Petri a los 40 días.

Las colonias inicialmente desarrollaron micelio de color blanco, algodonosas, sobrelevantadas, con hifas largas y abundantes.

A medida que crecen, se observaron coloraciones variables en la superficie del micelio, desde rosa pálido a los pocos días de la siembra, luego verde y gris en diversos matices en la madurez de la colonia.

Durante el período de crecimiento, las colonias se oscurecieron a partir del centro, tanto en la superficie como en la parte inferior del micelio. Cuando las colonias llegaron a su máximo estado de desarrollo se observó en la parte inferior del micelio y sobre la superficie del PDA una coloración negra brillante, debida a la acumulación de residuos orgánicos derivados de pro-

cesos metabólicos del hongo.

Las colonias llegan a la madurez (25 días después de la siembra) cuando presentan áreas en forma de corona circular, compuestas de picnidios semi sumergidos o inmersos en el sustrato, inicialmente de apariencia cristalina, como gotas de agua, y luego lechosos hasta oscurecerse variando de pardo a negro brillante. En colonias con más de 50 días se tornan negros. (Figura 1)

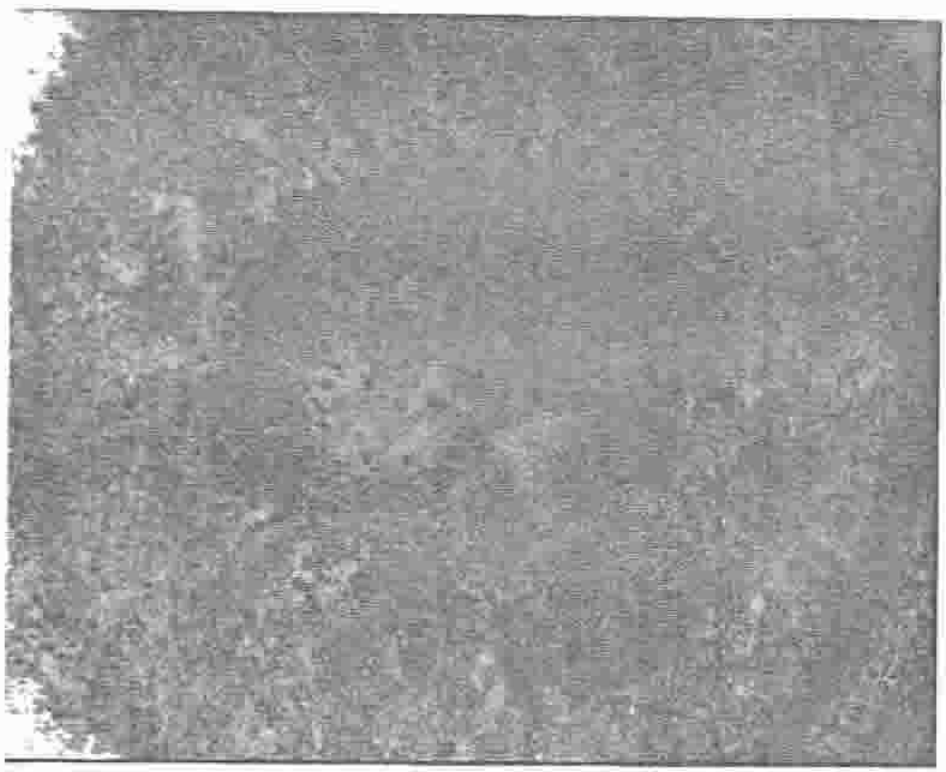

FIGURA 1. Colonia de Phoma medicaginis var. pinodella, vista superior.

Los picnidios son ampuliformes, glabros, separados, uniloculares, ostiolados, de tamaño variable, entre (7 a 24 x 10 a 30)µ (Tabla 1) (Figura 2), y expulsan las conidias envueltas en un mucílago blanquecino (figuras 3, 4, 5 y 6).

TABLA 1. Frecuencia de las dimensiones de los Picnidios

Largo (µ)	Frecuencia	Ancho (µ)	Frecuencia
		10	2
7	1	11	2
9	1	12	2
10	4	13	1
11	3	14	1
12	1	15	1
13	1	16	1
15	1	18	2
17	1	20	3
18	1	21	3
19	2	22	1
20	3	23	1
21	2	24	1
22	2	25	1
23	1	26	1
24	1	30	2
Total	25		25

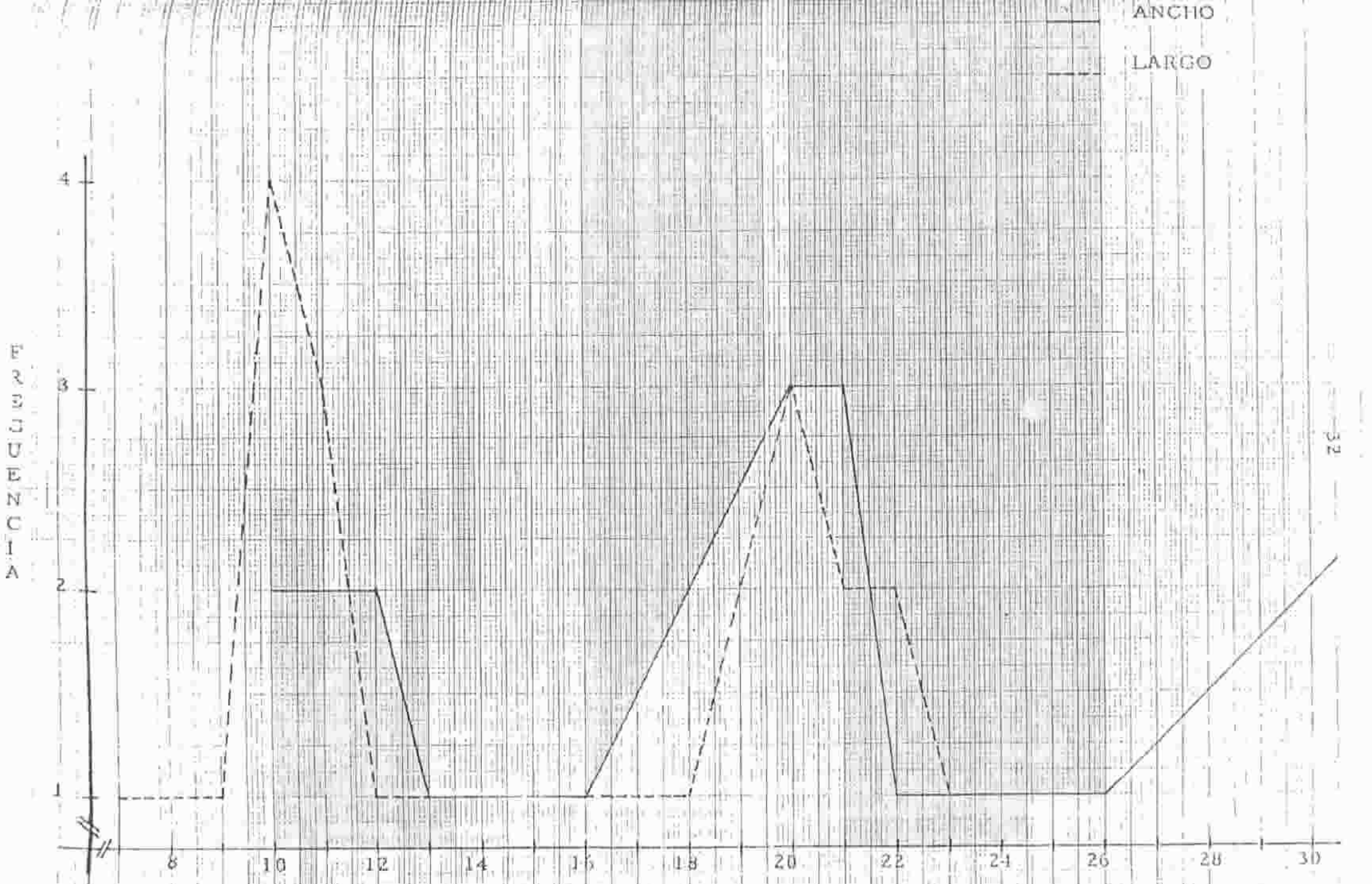

FIGURA 2. Distribución de frecuencias para el largo y el ancho de los picnidios

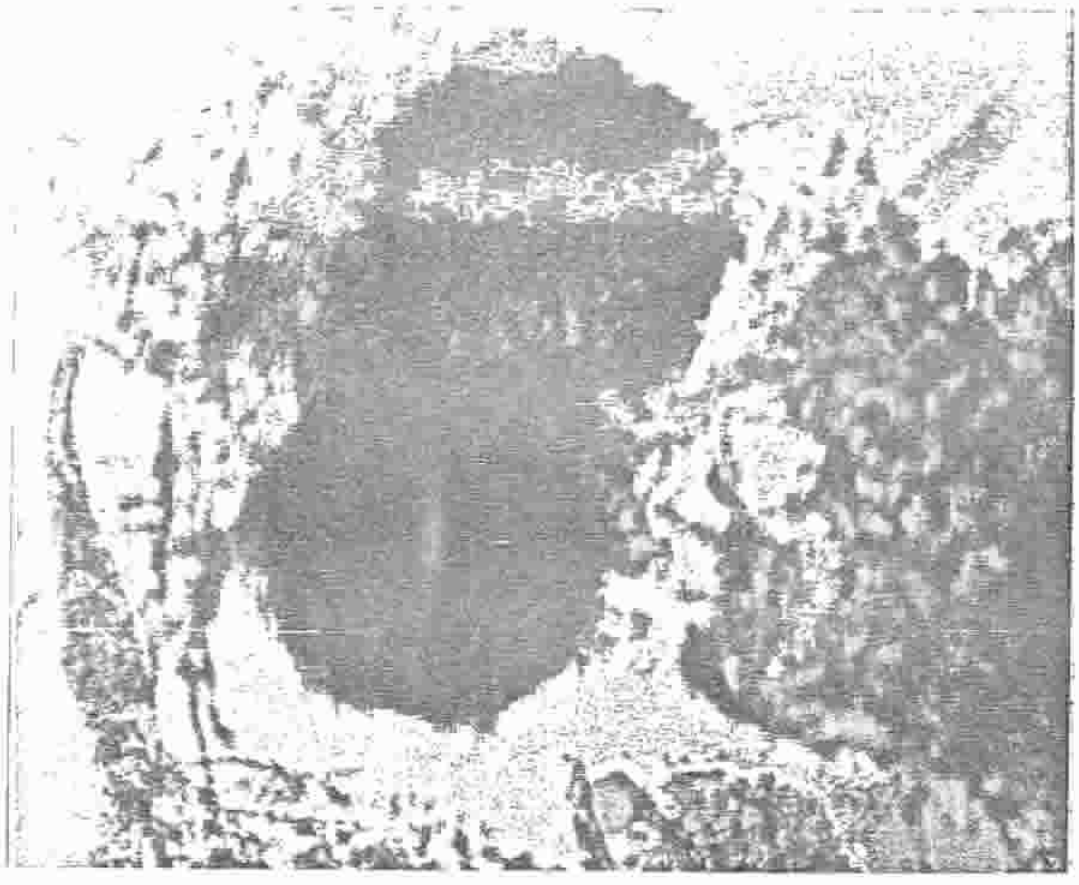

FIGURA 3. Grupo de picnidios

FIGURA 4. Picnidios expulsando conidias

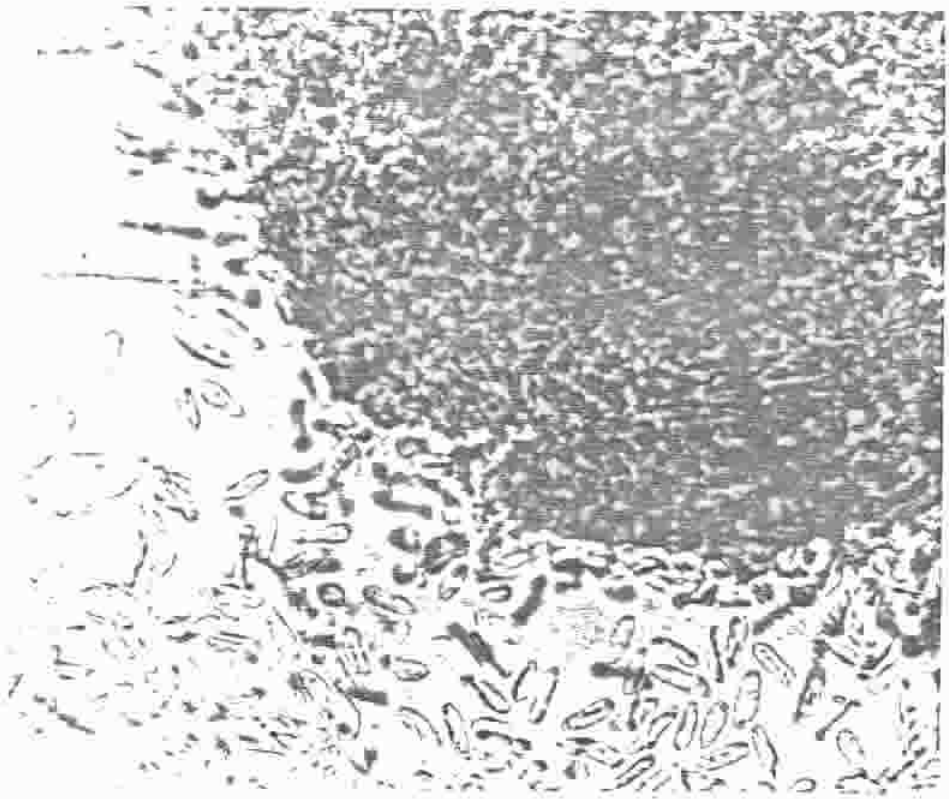

FIGURA 5. Ostíolo de un picnidio

FIGURA 6. Picnidio expulsando conidias en mucílago

Las conidias son hialinas, uniceldadas, uninucleadas, y elongadas ó cilíndricas o elípticas (oblongas), con ápices redondeados (obtusas) (1), (Figura 5), variando las dimensiones entre (10 a 20 x 2,5 a 7,5)µ, hallándose el 80% de ellas entre (12,5 a 16,25 x 2,5 a 6,25)µ (Tabla 2) (Figura 7).

Cuando las colonias fructifican (15 a 20 días después de la siembra), se forman unas estructuras de apariencia cristalina, blanquecinas cuando incide sobre ellas la luz directa (Figuras 8 y 9)

Los cristales crecen hacia abajo en la matriz de agar, originándose en la superficie inferior del micelio; los cristales se alargan transversalmente hacia el borde del plato de Petri y se agrupan en coronas circulares que aparecen en forma de anillos concéntricos (vistos a través del fondo del plato) a medida que crece la colonia (Figura 10).

Estas estructuras cristalinas se denominaron rizomorfos o "pinodelas" por su semejanza a las acículas del ciprés, pues algunas crecen con ramificaciones alargadas y otras forman abanicos de cristales cilíndricos (Figura 11).

TABLA 2. Distribución de dimensiones de [illegible]nidias

Largo x Ancho (µ)	Frecuencia	Frecuencia acumulada	Frecuencia acumulada en porcentaje
10,00 x 2,50	3	3	1,00
x 3,75	2	5	1,67
x 5,00	10	15	5,00
x 7,50	1	16	5,33
11,25 x 3,75	2	18	6,00
x 5,00	1	19	6,33
12,50 x 2,50	11	30	10,00
x 3,75	13	43	14,33
x 5,00	80	123	41,00
x 6,25	4	127	42,33
x 7,50	6	133	44,33
13,75 x 2,50	1	134	44,67
x 3,75	2	136	45,33
x 5,00	11	147	49,00
x 6,25	1	148	49,33
15,00 x 2,50	4	152	50,67
x 3,75	7	159	53,00
x 5,00	90	249	83,00
x 6,25	10	259	86,33
x 7,50	7	266	88,67
16,25 x 3,75	1	267	89,00
x 5,00	2	269	89,67
x 6,25	1	270	90,00
x 7,50	1	271	90,33
17,50 x 3,75	1	272	90,67
x 5,00	18	290	96,67
x 6,25	3	293	97,67
x 7,50	6	299	99,67
20,00 x 5,00	1	300	100,00
Total	300		

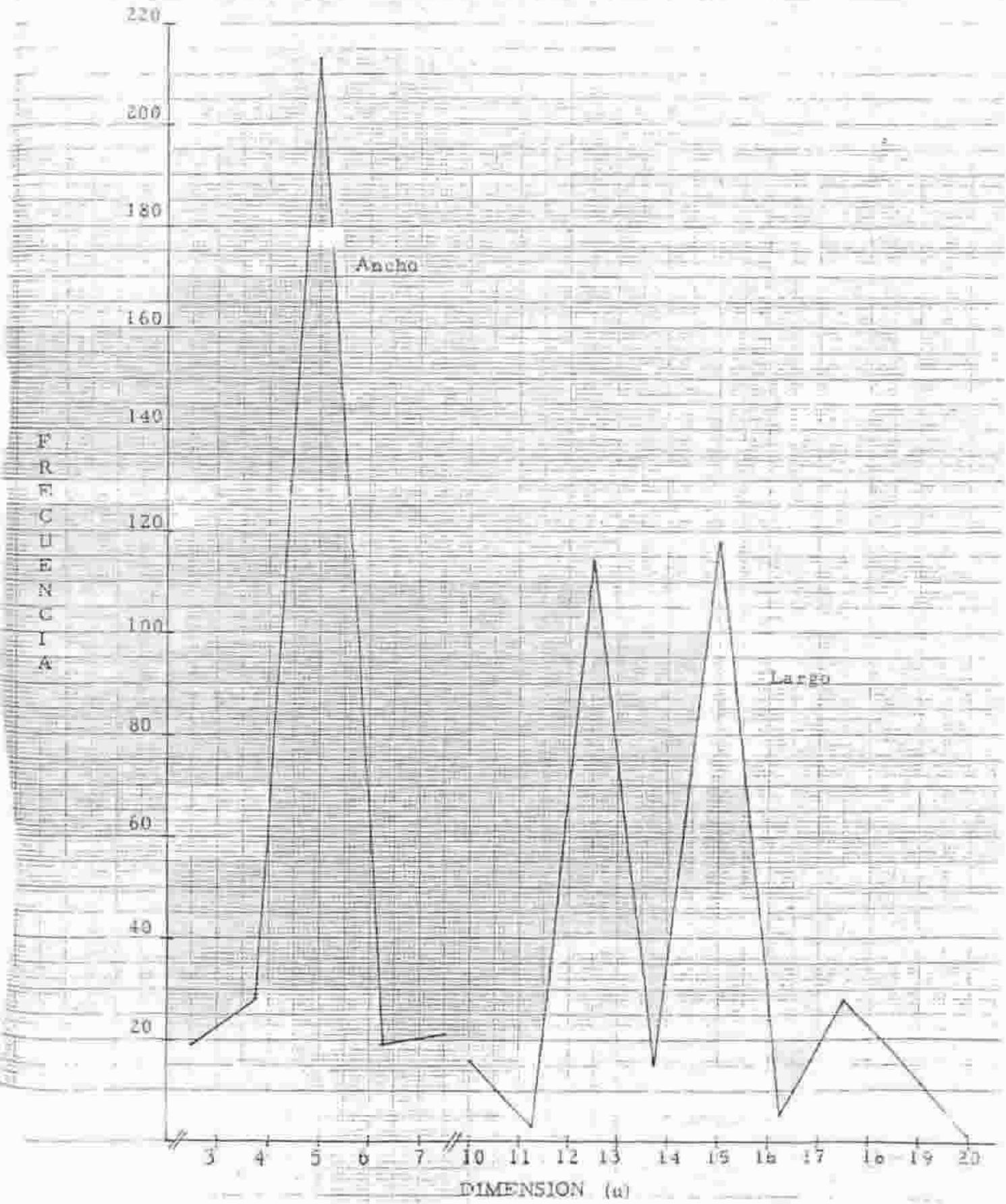

FIGURA 7. Distribución de frecuencias para el largo y el ancho de las conidias

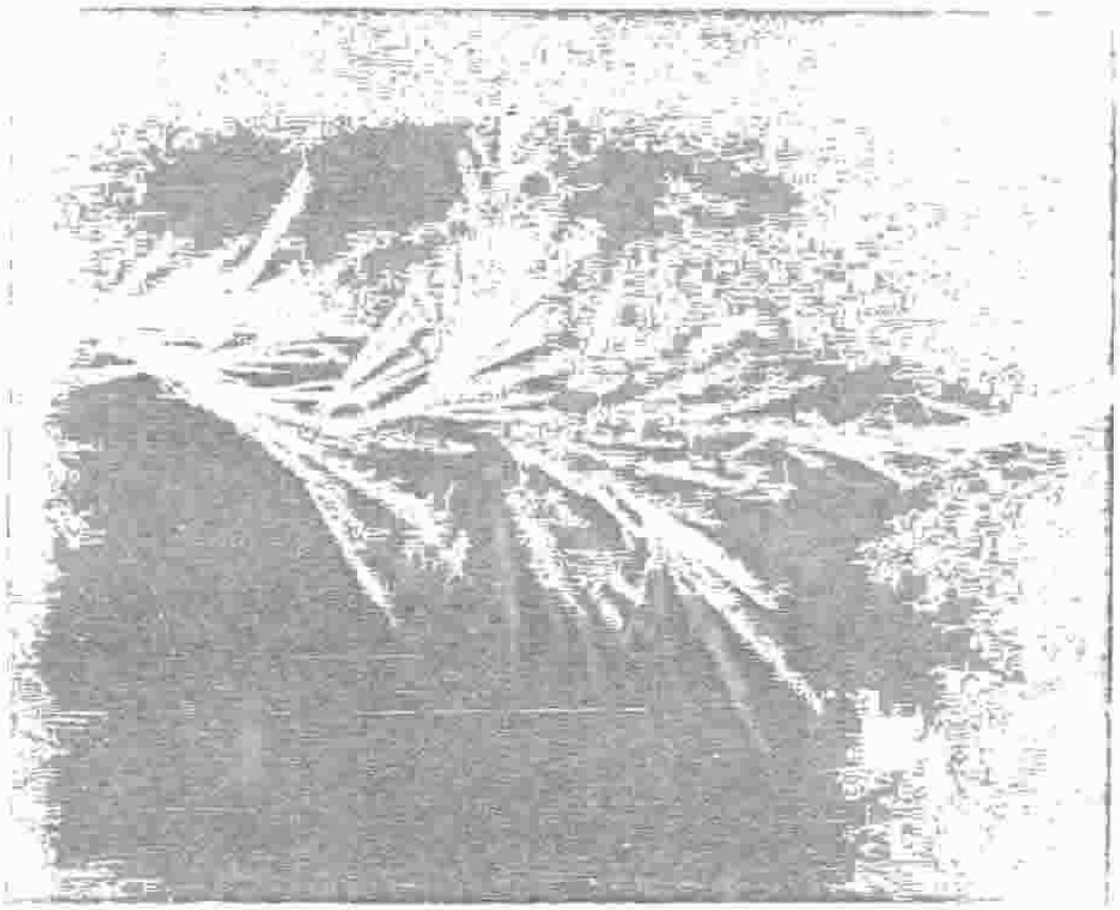

FIGURA 8. Pinodela vista con luz directa

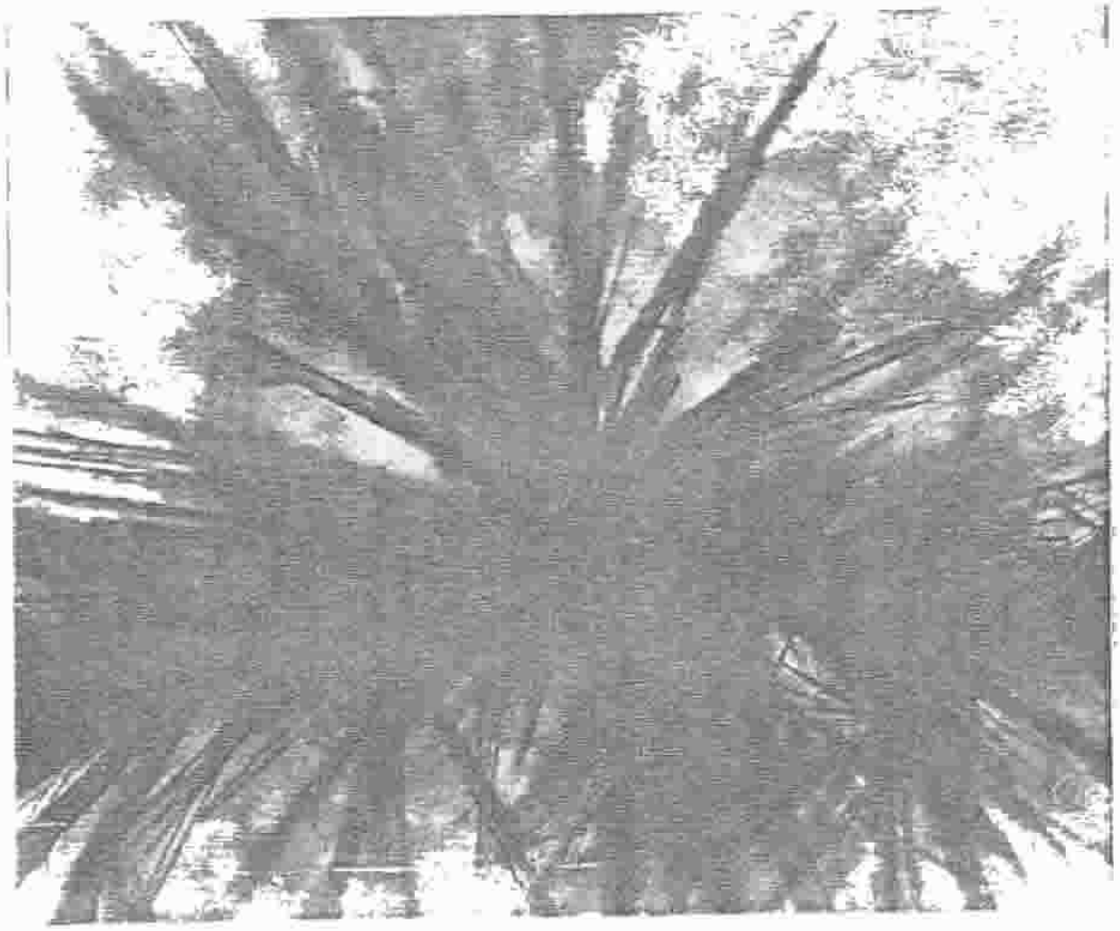

FIGURA 9. Pinodela vista con luz indirecta

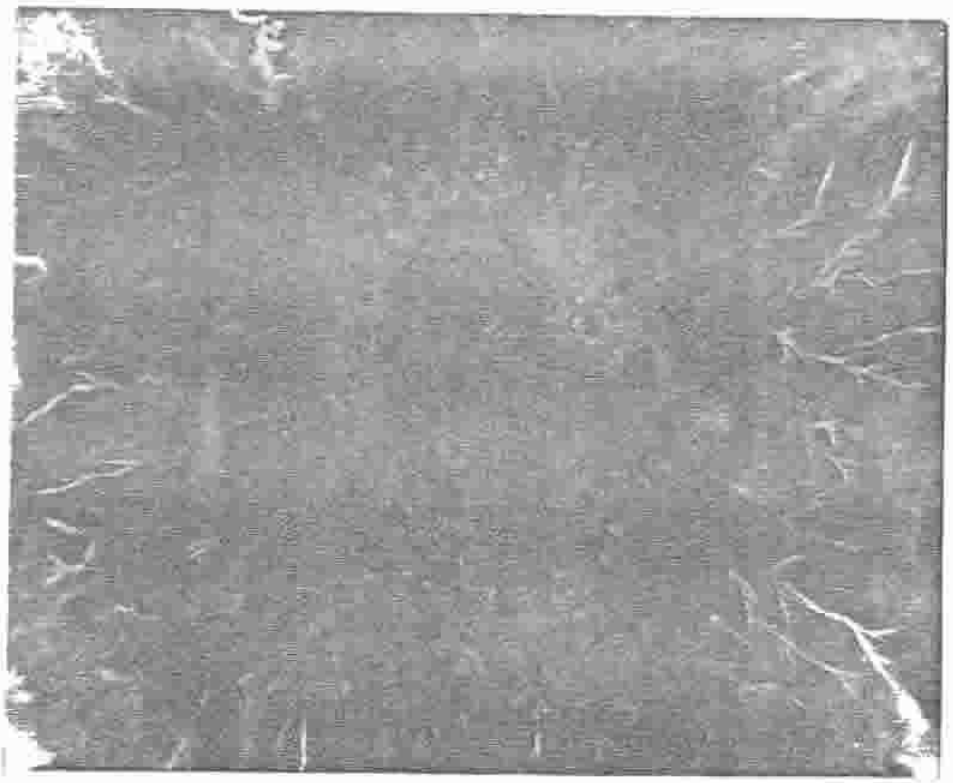

FIGURA 10. Colonia de Phoma medicaginis var. pinodella, vista inferior.

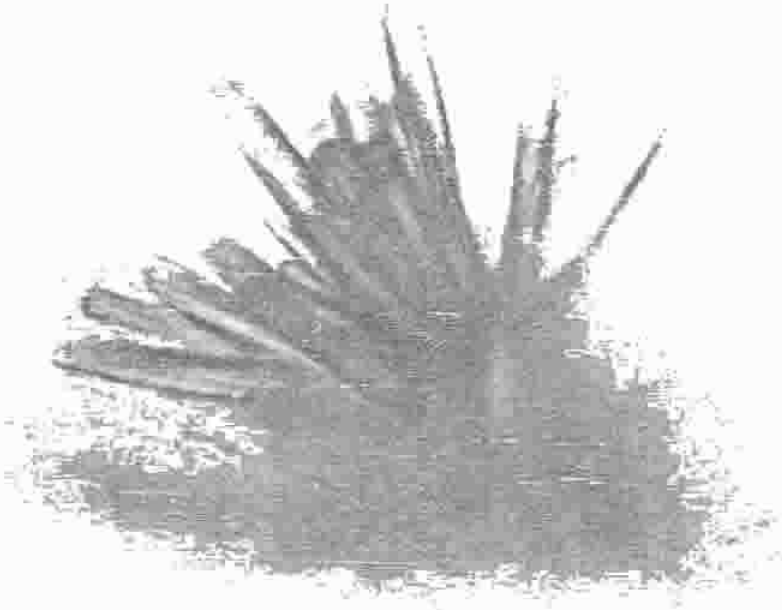

FIGURA 11. Pinodella formando abanico

3.2 PRUEBAS DE PATOGENICIDAD

Las 90 plántulas inoculadas con la suspensión de micelio y conidias mostraron síntomas de enfermedad y ninguna de las 90 plántulas tratadas con agua bidestilada estéril presentó síntomas de enfermedad.

Las colonias en platos de Petri, obtenidas de muestras provenientes del campo y de tejidos de las plántulas inoculadas y enfermas, presentaron características morfológicas similares, tal como las descritas en el numeral 3.1.3.

3.3 SINTOMATOLOGIA DE LA ENFERMEDAD

A los dos días de inoculadas, las plántulas mostraron los síntomas iniciales de la enfermedad, pequeños puntos de color café, de apariencia aceitosa sobre la superficie de los tallos, ramas y hojas. A los cuatro días de inoculadas, las plántulas presentaron un índice de incidencia del 100%.

Las lesiones aisladas en tallos y ramas se presentan hendidas, de forma irregular, predominantemente alargada, bordes negruzcos y consistencia correosa en el centro, con coloración variable, de café claro a pardo-oscuro (Figura 12).

BIBLIOTECA AGROPECUARIA DE COLOMBIA

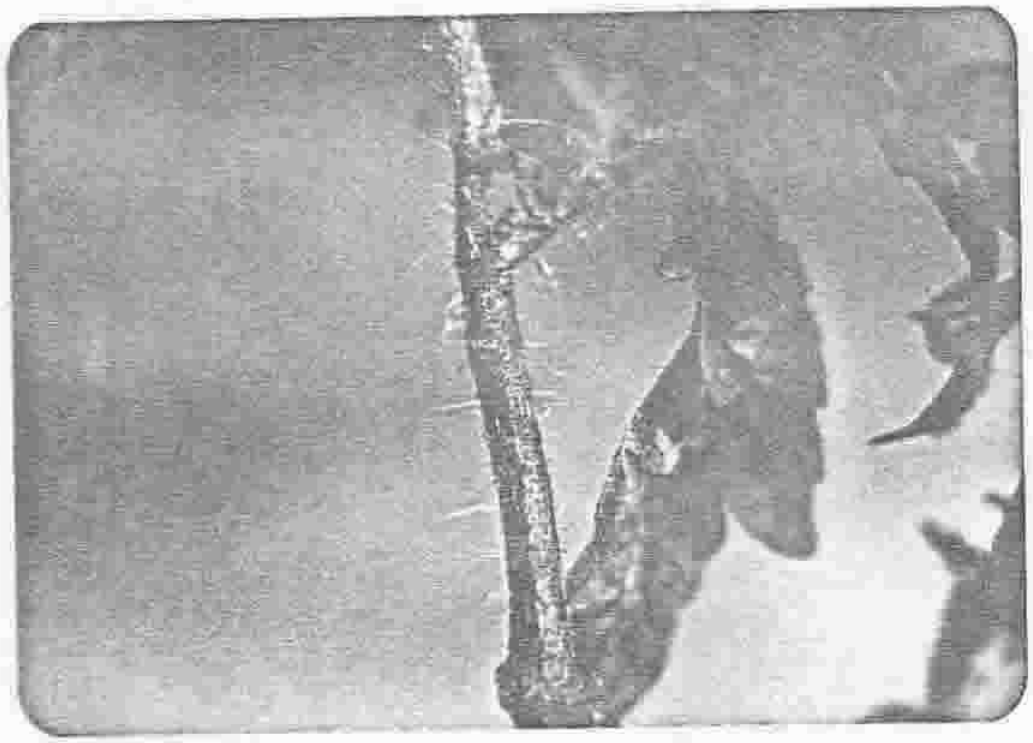

FIGURA 12. Tallo de tomate mostrando los síntomas de la enfermedad.

En las hojas aparecen pequeñas manchas alargadas en las nervaduras y puntos en los tejidos intervenales, que con el tiempo coalescen. En yemas y flores, las lesiones comienzan a manifestarse como puntos oscuros, con el avance de la enfermedad secan la estructura.

En general, todas las manchas se unen, hasta cubrir la superficie de los órganos afectados. En los estados finales de la enfermedad, las plantas se tornan flácidas, resecas, se presenta defoliación parcial y las estructuras se tornan completamente negras (Figura 13), dando la impresión de una quemazón por fuego, los frutos se momifican y agrietan permitiendo la entrada de patógenos secundarios (Figura 14).

En los diferentes campos con material experimental, y en diferentes épocas, se observaron desde pérdidas totales de las plantaciones hasta cosechas de frutos maduros, pero con una punteadura marrón endurecida sobre la superficie, dependiendo del momento en que se presentasen condiciones ambientales de alta humedad, que favorecieran el desarrollo de patógeno.

Se observó que el patógeno sólo afecta los tejidos corticales de las estructuras de la planta, aparentemente los tejidos medulares están libres del hongo.

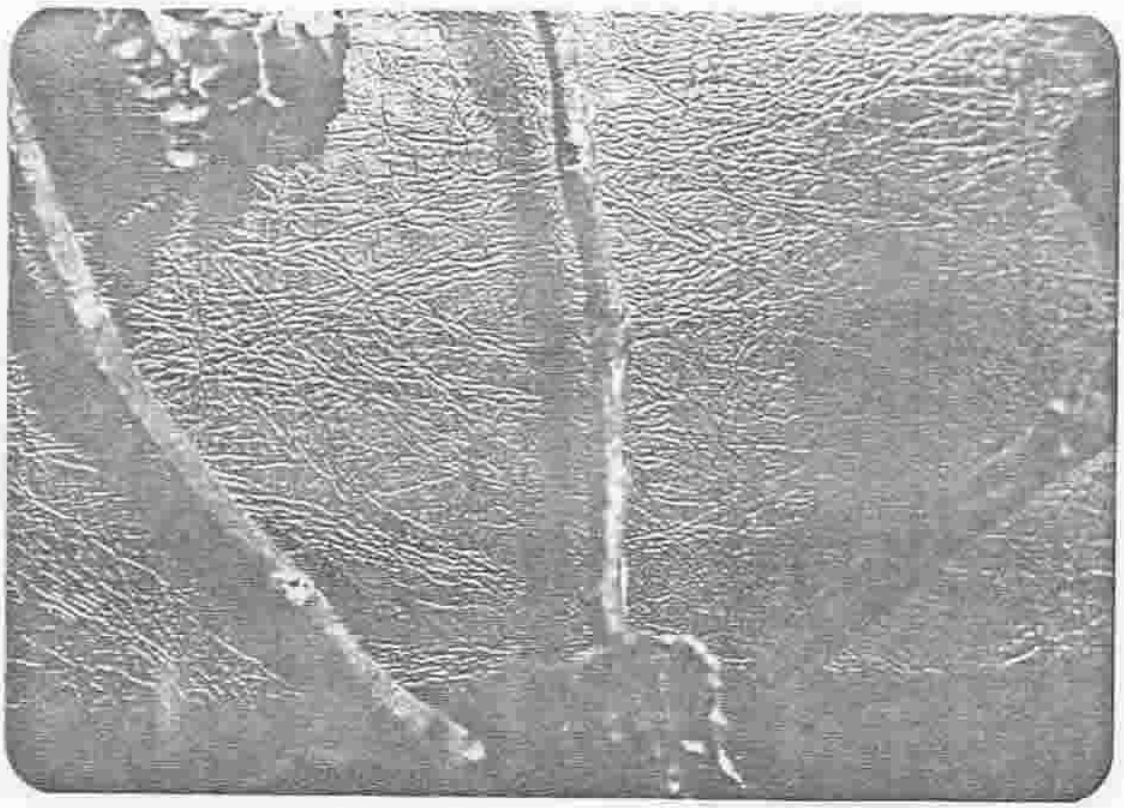

FIGURA 13. Tallo de tomate mostrando los síntomas avanzados de la enfermedad.

FIGURA 14. Tallos y frutos de tomate mostrando los síntomas de la enfermedad.

Se encontró significancia en los métodos de inoculación (subparcelas), indicando ésto, que las diferencias entre los efectos de estos sistemas son los responsables de una porción considerable de la variación observada, o sea, existen diferencias entre los métodos de inoculación empleados (Apéndices 4 y 7).

Al probar la significancia en los métodos de inoculación por la Prueba de Duncan, se encontró que los métodos, aspersión (s1) y punción - aspersión (s2) fueron los mejores e igualmente efectivos (Apéndices 4 y 7).

3.5 IDENTIFICACION DEL PATOGENO

Para la identificación del patógeno se utilizaron los rasgos morfológicos de las colonias, los picnidios, las conidias y, la formación de cristales blanquecinos inmersos en la matriz de PDA.

De acuerdo con Boerema (9) y Johnston (27), el hongo agente causal del "Carate" en el tomate es Phoma medicaginis var. pinodella (L.K. Jones) Boerema, con la sinonimia siguiente: Ascochyta pinodella L.K. Jones, y Phoma trifolii E.M. Johnson & Valleau.

3.4 METODOS DE INOCULACION

Al momento de realizar el Análisis de varianza, se encontró que en el factor de variabilidad inoculación (factor I), las diferencias estadísticas fueron evidentes entres sus componentes, inoculación con la suspensión de micelio y conidias (i1) e inoculación con agua bidestilada estéril (i2), tal como se expresó en el numeral 3.2. Por este motivo, al eliminarse uno de los factores de variabilidad, el ANAVA se calculó como un diseño de Parcelas Divididas (17).

El ANAVA (Apéndices 4 y 7) indicó que no existieron diferencias estadísticas entre las variedades (parcelas principales), lo cual sugirió que todas ellas se comportaron de igual manera ante los distintos métodos de inoculación, o sea que todas son igualmente susceptibles al patógeno.

Tampoco se encontró significancia para la interacción entre las variedades (parcelas principales) y los métodos de inoculación (subparcelas), lo que indicó que no existe relación de dependencia entre los dos factores estudiados (Apéndices 4 y 7).

Se encontró significancia en los métodos de inoculación (subparcelas), indicando ésto, que las diferencias entre los efectos de estos sistemas son los responsables de una porción considerable de la variación observada, o sea, existen diferencias entre los métodos de inoculación empleados (Apéndices 4 y 7).

Al probar la significancia en los métodos de inoculación por la Prueba de Duncan, se encontró que los métodos, aspersión (s1) y punción - aspersión (s2) fueron los mejores e igualmente efectivos (Apéndices 4 y 7).

3.5 IDENTIFICACION DEL PATOGENO

Para la identificación del patógeno se utilizaron los rasgos morfológicos de las colonias, los picnidios, las conidias y, la formación de cristales blanquecinos inmersos en la matriz de PDA.

De acuerdo con Boerema (9) y Johnston (27), el hongo agente causal del "Carate" en el tomate es Phoma medicaginis var. pinodella (L.K. Jones) Boerema, con la sinonimia siguiente: Ascochyta pinodella L.K. Jones, y Phoma trifolii E.M. Johnson & Valleau.

En las claves para los Taxa Superiores de Ainsworth (2), la ordenación taxonómica del hongo es:

Reino	Fungi
División	Eumycota
Subdivisión	Deuteromycotina
Clase	Coelomycetes
Orden	Sphaeropsidales
Familia	Sphaeropsidaceae
Género	Phoma
Especie	medicaginis
Variedad	pinodella

4. DISCUSION

4.1 AISLAMIENTO DEL PATOGENO

4.1.1 Obtención del material enfermo

En los aislamientos realizados a partir de trozos de tejido cortical con médula adherida, no se observó crecimiento del hongo *in vitro* debido a la posible presencia de una sustancia inhibidora contenida en los tejidos medulares; los cortes compuestos únicamente de tejidos corticales fueron capaces de desarrollar colonias sobre PDA.

4.1.2 Morfología del hongo

La forma y el tamaño de las diferentes estructuras del hongo varían de acuerdo al sustrato en el cual se cultiven. según Sutton (45), el tamaño y la forma de las conidias pueden ser alterados significativamente al cambiar la naturaleza del medio artificial, sobre el cual crece el aislamiento. Se encontraron dimensiones

variables, el 80% de las conidias estaban en el rango (2,5 a 6,25 x 12,5 a 16,25)µ, Boerema (9) reporta (2,0 a 3,5 x 5,0 a 8,5)µ y Johnston (27) señala una variación entre (5,5 a 8,0 x 2,5 a 3,5)µ; ambos trabajando con agar harina de avena.

La variabilidad encontrada en las "características de crecimiento en cultivo" por Boerema (8) y Malcolmson (34) concuerdan con los resultados que Shenk y Gerdemann (23) obtuvieron con P. trifolii creciendo en PDA y lo citado por ellos de Johnson y Valleau.

P. Trifolii, presentó conidias aceptadas creciendo en PDA (43), lo cual concuerda con las observaciones realizadas en el presente trabajo.

4.2 PRUEBAS DE PATOGENICIDAD

Las pruebas de patogenicidad evidenciaron la presencia del hongo causal del "Carate" en las plántulas inoculadas con la suspensión de micelio y conidias, comprobándose que la sintomatología producida en éstas plantas era similar a la aparecida en plantas en el campo.

Los aislamientos efectuados a partir de tejidos corticales de plántulas inoculadas, tuvieron idéntico crecimiento y desarrollo, a los aislamientos efectuados de tejidos provenientes de plantas enfermas en el campo.

4.3 SINTOMATOLOGIA DE LA ENFERMEDAD

Navarro (*) dice que el patógeno del "Carate", en los estados iniciales de la enfermedad, no penetra la médula del tallo de la planta de tomate, Schenck y Gerdemann (43) al describir la enfermedad del tallo negro en alfalfa (Medicago sativa) y trébol rojo (Trifolium pratense), causada por Phoma trifolii, sinónimo de P. medicaginis var. pinodella, aseveran que el crecimiento del hongo generalmente está confinado al tejido cortical del tallo, y sólo penetra el tejido vascular y la médula cuando ocurre un anillado en la corteza; el crecimiento micelial es detenido por un grupo de células fibrosas con paredes secundarias densas, las que forman una banda casi continua en el exterior del floema. Estas observaciones concuerdan con las realizadas en el presente trabajo.

*) Rafael Navarro, comunicación personal. Programa de Fitopatología. ICA. C.R.I. "La Selva", Rionegro, mayor de 1.982.

En tomate, la corteza del tallo se ennegrece por completo al presentarse la enfermedad en sus estados finales; en alfalfa y trébol rojo el crecimiento micelial es predominantemente longitudinal y resultando en un ennegrecimiento total del tallo (43).

Otros investigadores reportaron que el hongo Phoma spp. en tomate produce lesiones como puntos pequeños, negros y acuosos al inicio de la enfermedad, luego se tornan café oscuros de forma variable y de consistencia correosa en la superficie de la hoja (25, 29, 37, 46), las hojas toman coloración amarillenta y pueden caer prematuramente (25). Las lesiones del tallo son similares a las de las hojas pero hendidas y alargadas, las del fruto son circulares, acuosas y hundidas, desarrolladas a partir de heridas causadas durante las labores de cosecha y transporte (25, 29, 37, 46).

4.4 METODOS DE INOCULACION

El ambiente producido al embolsar las plántulas durante 48 horas, fué adecuado para producir la germinación de las conidias, notándose los primeros síntomas de enfermedad luego de retirar la cámara húmeda. Schenck (43), luego de la inoculación, mantuvo las plantas en cámara húmeda y asperjándolas con agua destilada

dos veces por día durante cuatro a seis días. Johnston (27), Johnston y Boeréma (28) mantuvieron las plántulas en cámara húmeda durante dos días, con una humedad relativa entre 80 y 100 por ciento y una temperatura entre 20 y 25°C.

Se encontró que una concentración de $1,3 \times 10^6$ conidias/ml fue suficiente para causar lesiones generalizadas en las plántulas. Johnston (27), Johnston y Boerema (28), utilizaron una concentración variable entre 5×10^6 y 10×10^6 conidias/ml.

Estadísticamente no se encontró diferencia significativa entre el método de aspersión y aspersión-punción, por lo tanto la punción del tallo puede ser eliminada. Schenck (43) inoculó las hojas de las plantas con sólo asperjarlas, los tallos fueron inoculados localizadamente mediante un pincel humedecido en la solución inoculadora.

4.5 IDENTIFICACION DEL PATOGENO

La forma, coloración y ubicación de los picnidios en el sustrato, y la forma, coloración y septación de las conidias, concuerdan con las características morfológicas de éstas estructuras incluídas en la clave taxonómica de los Coelomycetes (45), para el

género Phoma.

En la literatura sobre enfermedades del tomate, P. medicaginis no aparece como patógeno del tomate, ya que sólo se menciona causando daños económicos graves en frutos almacenados a P. destructiva Plowr.

La formación de estructuras cristalinas en cultivos puros del hongo, permitió su identificación, basados en la clasificación de Boerema para el género Phoma (9) . La separación de P. medicaginis var. pinodella de P. medicaginis var. medicaginis se realizó por comparación de la apariencia general de las colonias tal como aparecen en el citado estudio de Boerema.

P. Medicaginis var pinodella se ha reportado comunmente como parásito débil de la familia Leguminosae, y causando pudriciones radiculares, ennegrecimiento del tallo y manchas foliares. Ocasionalmente es aislado de otras plantas. Como saprófito, sus clamidosporas pueden permanecer en el suelo por varios años, donde colonizan tejidos muertos de un gran rango de plantas (9). Pueden causar pudriciones del tallo en alverja (Pisum sativum) y trébol rojo (Trifolium pratense), puede ser encontrado o inoculado existosamente en alfalfa (Medicago sativa) (27).

P. medicaginis var pinodella es de reciente aparición en nuestro medio y hasta ahora no se había registrado este hongo atacando tomate ni ninguna otra planta en Colombia (6), por lo cual se puede considerar como una nueva enfermedad del tomate a la vulgarmente conocida como "Carate".

5. CONCLUSIONES

La enfermedad del tomate, conocida en el Oriente Antioqueño como "Carate" es producida por el hongo Phoma medicaginis var. pinodella.

El hongo aislado, crece y fructifica bien en medio de cultivo de papa-dextrosa-agar modificado, conteniendo ácido láctico, cloranfenicol y tiamina.

Las colonias se desarrollaron bien a condiciones de temperatura ambiental (20°C) en el laboratorio.

Para efectuar los aislamientos deben emplearse trozos de tejido cortical del órgano afectado.

La suspensión de micelio y conidias utilizada a una concentración de $1,3 \times 10^6$ conidias/ml fué suficiente para producir los síntomas de la enfermedad en plantas sanas.

El método de inoculación más eficiente fué el de aspersión.

Conocido el agente causal del "Carate" pueden orientarse mejor las investigaciones sobre los diversos métodos de control de la enfermedad.

Es necesario efectuar un reconocimiento del género Phoma en Colombia, para diferenciar las especies que atacan los diversos cultivos.

APENDICE I

MEDIOS NUTRITIVOS DE CULTIVO

1. Formulación del PDA convencional, según Echandi (16)

Papa	350 gr.
Agar.....	18 gr.
Glucosa.....	20 gr.
Agua destilada.....	hasta completar 1000 ml.

Formulación del PDA modificado.

Papa.....	350 gr.
Agar.....	18 gr.
Glucosa.....	20 gr.
Tiamina.....	0,025 gr.
Agua destilada.....	hasta completar 1000 ml
Cloranfenicol.....	625 mg/lt de medio
Acido léctico.....	2 gotas/25 ml de medio

2. Formulación de AHM convencional, según Echandi (16)

Harina de maíz	20 gr
Dextrosa.....	20 gr.
Agar.....	20 gr.
Agua destilada.....	hasta completar 1000 ml

Formulación de AHM modificado

Harina de maíz.....	20 gr.
Dextrosa.....	20 gr.
Agar.....	20 gr.
Agua destilada.....	hasta completar 1000 ml
Jugo tomate-zanahoria.....	100 ml/lt CMA

El jugo de tomate-zanahoria se prepara 2:1 p/p.

APENDICE 2

VALORES TRANSFORMADOS : θ = arc sen $(0,01\ x\%)^{1/2}$

LECTURA 1, Agosto 6 de 1.982

	V1			parc.	V2			parc.	V3			Parc.	
BL	S1	S2	S3	V1	S1	S2	S3	V2	S1	S2	S3	V3	ΣBl
1	60	45	30	135	30	45	30	105	60	30	30	120	360
2	60	60	30	150	45	60	30	135	60	45	30	135	420
3	60	60	30	150	60	45	30	135	30	45	30	105	390
4	45	45	30	120	45	60	30	135	30	45	30	105	360
5	60	45	45	150	30	45	30	105	30	60	30	120	375
6	30	45	30	105	60	60	30	150	60	45	30	135	390
7	45	30	30	105	60	45	30	135	60	60	30	150	390
8	60	60	30	150	60	60	30	150	45	60	30	135	435
9	45	45	30	120	60	60	30	150	45	30	30	105	375
10	60	45	30	135	60	45	30	135	45	60	30	135	405
comb. VxS	525	480	315	1320	510	525	300	1335	465	480	300	1245	
V	V1 = 1.320				V2 = 1.335				V3=1.245				3.900
S	S1 = 1.500				S2 = 1.485				S3= 915				

APENDICE 3

CALCULOS DEL ANAVA DE LECTURA 1

$$T.C. = \frac{(3.900)^2}{90} = 169.000$$

$$S.C._{BL} = \frac{(360)^2 + \ldots + (405)^2}{9} - T.C. = \frac{1'526.400}{9} - T.C. = 600$$

$S.C._T$ Parc. pples =

$$\frac{135^2 + 150^2 + \ldots + 105^2 + 135^2}{3} - T.C. =$$

$$\frac{515.250}{3} - T.C. = 2.750$$

$$S.C.\ Var\ (V) = \frac{1.320^2 + 1.335^2 + 1.245^2}{30} - T.C. = 155$$

$S.C._{Error\ V} = S.C._T$ Parc. pples $- S.C._{BL} - S.C._V$

$= 2.750 - 600 - 156$

$= 1.995$

$S.C._T$ sub. parc. $= 38\ (30)^2 + 24\ (45)^2 + 28\ (60)^2 - T.C.$

$= 14.600$

$$S.C.\ met.\ (S) = \frac{1.500^2 + 1.485^2 + 915^2}{30} - T.C. = 7.145$$

$$S.C.\ comb.\ (V_vS) = \frac{525^2 + 480^2 + \ldots + 300^2}{10} - T.C. = 7.760$$

S. C. int (VxS) = 7.760 - 155 - 7.415 = 190

S. C. error S = 14.600 - 2.750 - 155 - 7.415

= 4.280

APENDICE 4

ANAVA Y PRUEBA DE DUNCAN PARA LECTURA 1.

Fuente de variación	G.L.	S.C.	C.M.	F. Calc.	Ft (0.05)
Bloques (r-1)	9	600	66,67		
Parcelas V (a-1)	2	155	77,50	0,7N.S.	3,55
Error V (r-1)(a-1)	18	1.995	110,83		
Total parc. PPl. (ar-1)	29	2.750			
Sub-parc.S (b-1)	2	7.415	3.707,5	46,78*	3,17
Interacc. VxS (a-1)(b-1)	4	190	47,5	0,6N.S.	2,54
Error S a(r-1)(b-1)	54	4.280	79,26		
Total sub-parc.	89	14.600			

PRUEBA DE DUNCAN

$$\Delta_7 = \sqrt{\frac{Errb}{ra}} = \sqrt{\frac{79,26}{30}} = 1,63$$

S.C.S.	S1 = 1.500	S1 = 50,0
	S2 = 1.485	S2 = 49,5
	S3 = 915	S3 = 30,5

Aplicando tabla Duncan para $\alpha = 0,05$ con 54 G.L. (31)

(Estas tablas no contienen exactamente este valor por lo tanto se aplicó para 40 G.L. sin interpolación dando relievancia a $\alpha = 0,05$)

		2	3
40 G.L.	ALS	2,86	3,01
	AES	4,66	4,91

S1-S2 = 150,0-49,5 = 0.5 $<$ 4,66
Se acepta Ho. $\therefore$ S1=S2

S1-S3 = 50,0-30,5 = 19,5 $>$ 4,91
Se rechaza Ho. $\therefore$ S1$\neq$S3

S2-S3 = 49,5-30,5 = 19,0 $>$ 4,66
Se rechaza Ho. $\therefore$ S2$\neq$S3

Representación gráfica

S3	S2	S1
30,5	49,5	50,0

APENDICE 5

VALORES TRANSFORMADOS: θ = arc sen $(0,01\ x\%)^{1/2}$

LECTURA 2, Agosto 8 de 1982

BL	V1 S1	V1 S2	V1 S3	parc. V1	V2 S1	V2 S2	V2 S3	parc. V2	V3 S1	V3 S2	V3 S3	parc. V3	Σbl
1	90	60	30	180	60	60	30	150	60	60	60	180	510
2	60	60	30	150	60	60	30	150	90	60	30	180	480
3	90	60	30	180	90	60	45	195	60	60	30	150	525
4	60	45	30	135	90	60	30	180	60	60	45	165	480
5	60	60	45	165	60	60	30	150	60	90	60	210	525
6	60	60	30	150	60	60	30	150	60	60	30	150	450
7	60	90	60	210	60	90	30	180	60	60	30	150	540
8	60	45	30	135	60	60	30	150	60	90	30	180	465
9	45	45	30	120	60	60	30	150	60	60	30	150	420
10	90	45	30	165	90	45	30	165	45	60	30	135	465
Comb. VxS	675	570	345	1.590	690	615	315	1.620	615	660	375	1650	

V	V1=1.590	V2=1.620	V3=1.650	4860
S	S1=1.980	S2=1.845	S3=1.035	ΣT

BIBLIOTECA AGROPECUARIA DE COLOMBIA

APENDICE 6

CALCULOS DEL ANAVA DE LECTURA 2

$$T.C. = \frac{(4.860)^2}{90} = 262.440$$

$$S.C._{BL} = \frac{(510)^2 + \ldots\ldots + (465)^2}{9} - T.C. =$$

$$\frac{2'375.100}{9} = T.C. = 1.460$$

$$S.C._T \text{ Parc. pples} =$$

$$\frac{180^2 + 150^2 + \ldots\ldots + 150^2 + 135^2}{3} - T.C. =$$

$$\frac{801.000}{3} = T.C. = 4.560$$

$$S.C. \text{ Var (v)} = \frac{1.590^2 + 1.620^2 + 1.650^2}{30} - T.C. = 60$$

$$S.C.\text{error V} = S.C._T \text{ Parc. pples} - S.C._{BL} - S.C._V$$

$$= 4.560 - 1.460 - 60$$

$$= 3.040$$

$$S.C._T \text{ sub. Parc.} =$$

$$24\,(30)^2 + 10\,(45)^2 + 45\,(60)^2 + 11\,(90)^2 - T.C.$$

$$= 30.510$$

$$\text{S. C. met. (S)} = \frac{1.980^2 + 1.845^2 + 1.035^2}{30} - \text{T. C.} = 17.415$$

$$\text{S. C. Comb. (VxS)} = \frac{675^2 + 570^2 + \ldots\ldots + 375^2}{10} - \text{T. C.} = 18.315$$

S. C. int (VxS) = 18.315 - 60 - 17.415 = 840

S. C. error S = 30.510 - 4.560 - 60 - 17.415 = 8.475

APENDICE 7

ANAVA Y PRUEBA DE DUNCAN PARA LECTURA 2

Fuente de variación	G.L.	S.C.	C.M.	F. Calc.	Ft (0,05)
Bloques (r-1)	9	1.400	162,22		
Parcelas V (a-1)	2	60	30,0	0,18 N.S.	3,55
Error V (r-1)(a-1)	18	3.040	168,89		
Total para PPL. (ar-1)	29	4.560			
Sub-parc. S (b-1)	2	17.415	8.707.5	55,48*	3,17
Interacc. VxS(a-1)(b-1)	4	840	210	1,34 NS	2,54
Error S a(r-1)(b-1)	54	8.745	156,94		
Total sub-parc.	89	30.510			

$$\Delta 7 = \sqrt{\frac{ES}{ra}} = \sqrt{\frac{156,94}{30}} = 2,29$$

S.C.S S1 = 1.980 S1 = 66,0

S2 = 1.845 S2 = 61,5

S3 = 1.035 S3 = 34,5

Se aplicó Tabla Duncan con α = 0.05 similar a Lectura 1

		2	3
	AIS	2,86	3,01
40 G.L.			
	AES	6,55	6,89

S1=S2 = 66,0-61,5 = 4,5 $<$ 6,55
Se acepta Ho. $\therefore$ S1=S2

S1-S3 = 66,0-34,5 = 31,5 $>$ 6,89
Se rechaza Ho. $\therefore$ S1=S3

S2-S3 61,5-34,5 = 27,0 $>$ 6,55
Se rechaza Ho. $\therefore$ S2=S3

Representación gráfica

S3	S2	S1
34,5	61,5	66,0

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. AINSWORTH, G. C. Ainsworth and Bisby'x: Dictionary of the fungi. London, Comm. Mycol. Inst., 1.963. 547 p.

2. _____. Introduction and keys to higher taxa. In: Ainsworth G. C. et al. The fungi, an advanced treatise: A taxonomic review with keys: Ascomycetes and Fungi Imperfecti. New York, Academic Press, 1.973. V. 4A:1-7.

3. ALVARADO, L. F. y GUZMAN, J. Pudriciones de papa en almacenamiento. Rev. ICA (Bogotá), 3(1): 47-61, marzo 1.968.

4. ANTIOQUIA. Departamento Administrativo de Planeación. Dirección de Desarrollo Regional. Comercialización de productos agrícolas perecederos. Medellín, 189 p. 1.981.

5. _____. Secretaría de Agricultura y Fomento. Movimiento de productos agropecuarios en el Departamento de Antioquia durante 1.980. (Serie Estadística SMDPA 0-9-80). Medellín, 71p, 1.981.

6. ARISTIZABAL VELEZ, Luis y MEJIA ARANGO Andrés. Phoma y géneros asociados en Colombia. Seminario. Agronomía. Medellín, Universidad Nacional de Colombia, 1.963. 38 p.

7. BIONDI, S. and THORPE, T.A. Requeriments for a tissue culture facility. In : THORPE, T.A. Plant tissue culture. New York, Academic Press. pp 1-20, 1.981

8. BOEREMA, G.H. The use of the term Forma Specialis for Phoma-like fungi. Trans. Br. mycol. Soc. (London), 52(3):509, 1.969

9. _____. The Phoma species studied in culture by Dr. R.W.G. Dennis. Trans. Br. mycol. Soc. (London), 67(2): 289-319, 1.976.

10. CALDERON, H., LOZANO, J.C. y VICTORIA, J. Evaluación de la resistencia de la colección mundial de yuca. Not. Fitopat. (Cali), 4(1): 129, agosto 1.975.

11. _____. Resistencia de cultivares de yuca (Manihot esculenta Grantz) a la mancha de anillo (Phoma sp.). Not. Fitopat. (Cali), 5(2):104, diciembre 1.976

12. CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA. La papa: principales enfermedades y nemátodos. Lima, 1.978. pp. 52-53.

13. DALY, P. IRAT L3 une nouvelle variete de tomate, combinant plusieur résistances aux maladies. Agronomie Tropicale, 31(4):398-401.

14. DIAZ, R. y LOZANO, J.C. Enfermedades presentes en el cultivo de la yuca en Colombia. In: DIAZ, R. y PINSTRUP-ANDERSEN, P. Descripción agroeconómica del proceso de producción de yuca en Colombia. Cali, CIAT, 1.977. 14 p.

15. EBBEN, M. and CRITCHLEY, P. Phoma destructiva causin leafblight of tomato in Ascension Island. Pl. dis. Report. (Beltsville), 56(10):869, 1.972.

16. ECHANDI, E. Manual de laboratorio para fitopatología general. Lima, IICA, p. 40, 1.967.

17. ESCOBAR, CARLOS. Notas de clase, curso de Diseño Experimental. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía, Medellín. 1.981.

18. FEDERACION NACIONAL DE CAFETEROS. Manual del cafetero colombiano 4 ed. Bogotá, Andes, 1.979. p. 136.

19. FERNANDEZ, B.O. Muerte descendente de los brotes del cafeto causada por especies de Phoma y Colletotrichum. Cenicafé (Chinchiná), 12(3): 127-140, 1.961.

20. FOURNET, J. Etudes sur les conditions d'infection des feulles de tomate par le Phoma destructiva Plowr. Ann de Phytopath. (Paris), 3(2):215-236, 1.971.

21. FRENCH, E.R. y HEBERT, T.T. Métodos de investigación fitopatológica. San José, IICA, 1.980, 289 p.

22. GOMEZ Q., R. Influencia de algunos factores ambientales sobre el agente causal de la muerte descendente del cafeto y sobre la interacción patógeno-susceptivo. Tesis Programa para estudios para graduados en Ciencias Agrarias. Bogotá, U. Nal. - ICA, 1.976. 69 p.

23. _____, y BUSTAMANTE, E. Efecto de la temperatura en el crecimiento de aislamiento de Phoma sp. Not. Fitopat. (Cali), 5(2): 102, diciembre 1.976.

24. _____. Influencia de la luz y la temperatura en el desarrollo de la muerte descendente del cafeto, causada por Phoma sp. Fitopat. Col. (Cali), 6(1):73-80, marzo 1.977.

25. GROVER, R.K. Phoma rot of tomato. Indian Phytopath., 18(4):388-389, 1.965.

26. JAMIESON, C. Phoma destructiva, the cause of a fruit rot of the tomato. J. of Agr. Res. 4(1):1-20, 1.915.

27. JOHNSTON, P.R. Phoma on New Zeland grasses and pasture legumes. New Zeland Journal of Botany, 19:173-186, 1.981.

28. _____, and BOEREMA, G.H. Phoma nigricans sp. nov. and P. protorum sp. nov., two common saprophytes from New Zeland. New Zeland Journal of Botany, 19:393-396, 1.981

29. JONES, J.P., WEBER, G.F. and KELBERT, D.G. Tomato diseases in Florida, University of Florida, Fl. Agr. Expo. St. (Gainsville), p. 18-21, s.f.

30. LEU, L.S. Concentric-ring leaf spot (Phoma sp.) of cassava. In: BREKELBAUM, T. et al. eds. Cassava protection workshop. Cali, 1.978. pp. 117-120. (CIAT: Proceedings, Series CE-14).

31. LITTLE, T.M. y JACKSON, F. Métodos estadísticos para la investigación en la agricultura. Centro Reg. de Ayuda Técnica - AID, México, Trillas, 1.976, 270 p.

32. LOZANO, J.C. et al. Problemas en cultivos de la yuca. Cali, Karinn, 1.976. pp. 30-31. (CIAT: Series GS-16).

33. _____. y TERRY, E.R. Enfermedades de la yuca y su control. Not. Fitopat. (Cali), 5(1):38-44, noviembre 1.976.

34. MALCOLMSON, JEAN F. A consideration of the species of Phoma which parasitize potatoes. Trans. Brit. mycol. Soc. (London), 41(4):413-418, 1.958.

35. Mc. COLLOCH, L.P., COOK, H.T. y WRIGHT, W.R. Enfermedades de tomates, pimientos y berenjenas para el mercado. Centro regional de ayuda técnica, AID. Manual de agricultura No. 28. 1.972. pp. 26-28.

36. NAVARRO, A. y PUERTA, O. Presencia de Phoma sp. en tomate (Lycopersicum esculentum). ASCOLFI Informa (Cali), 7(4):32, Julio-agosto 1.981.

37. OBRERO, F.P., TRUJILLO, E.E. and ARAGAKI, M. Phoma leaf spot of tomato and potato in Hawaii. Plant. Disease Rep. (Beltsville), 52(12):946-947, 1968.

38. OROZCO, C. y BURITICA, P. Enfermedades fungosas prevalentes en los viveros forestales de Antioquia. Not. Fitopat. (Cali), 5(2):97, diciembre 1.976.

39. PELCZAR, M.J., REID, R. y CHAN, E.C. Microbiología. 4 ed. Méjico, Mc Graw Hill, 1.982. 703 p.

40. PEREZ, R.D. y SALAZAR, H. Determinación de las medidas de cultivo para el desarrollo de Phoma sp., agente causal de la muerte descendente del cafeto. Fitopat. Col. (Cali), 7(2):124, diciembre 1.978.

41. PUERTA, O. Enfermedades de la remolacha y su control. In: ICA. Curso sobre hortalizas: Programa de hortalizas. Medellín, 1.977. pp.147-148.

42. _____. Enfermedades del repollo y su control. In: ICA. Curso sobre hortalizas; Programa de hortalizas. Medellín, 1.977. pp. 205-206.

43. SCHENCK, N.C. y GERDEMANN, J.W. Taxonomy, pathogenicity, and host-parasite relations of Phoma trifolii and Phoma herbarum var. medicaginis. Phytopathology, 46:194-200, April 1.956.

44. SNEDECOR, G.W. y COCHRAN, W.G. Métodos estadísticos. 6 ed. Méjico, C.E.C.S.A. 703 p.

45. SUTTON, B.C. Coelomycetes. In: Ainsworth, G.C. et. al The fungi; an advanced treatise; A taxonomic review with keys: Ascomycetes and Fungi Imperfecti. New York, Academic Press, 1.973. V 4A:513-582

46. UNITED STATES OF AMERICA. Tomato diseases and their control. Agriculture Handbook No.203. USDA, S.f., s.p.

47. VIDAL, G.M. Estudio sobre el agente causal de la "muerte descendente" del cafeto (Coffea arabica L.) y su comportamiento en cuatro variedades comerciales. Rev. ICA. (Bogotá), 12(4):570, Diciembre 1.977.

ANEXO 1. AUTORIDADES QUE DEBEN DAR LA APROBACION

_____

Asesor

_____

Asesor

_____

Director de Carrera

_____

Coordinador CID

Acta No._____del_____de_____ de 1.984

_____

Coordinador CIFA

Acta No._____ del_____de_____de 1.984

Fecha de presentación día_____ mes_____año_____