



Instituto Nacional Autónomo de
Investigaciones Agropecuarias



Programa de Modernización
de Servicios Agropecuarios

Verificación de la etiología y la sintomatología de la enfermedad "mancha negra del tronco del tomate o árbol" y establecimiento de las diferencias y semejanzas en sintomatología con la enfermedad "tizón tardío" causada por *Phytophthora infestans*.¹

JORGE REVELO², MÓNICA REYES³, ELOY MORA¹

Verificación de la etiología y la sintomatología de la enfermedad “mancha negra del tronco del tomate de árbol” y establecimiento de las diferencias y semejanzas en sintomatología con la enfermedad “tizón tardío” causada por *Phytophthora infestans*.¹

JORGE REVELO²; MÓNICA REYES³; ELOY MORA³

RESUMEN

REVELO J, REYES M, MORA E. 2003. Verificación de la etiología y la sintomatología de la enfermedad “mancha negra del tronco del tomate de árbol” y establecimiento de las diferencias y semejanzas en sintomatología con la enfermedad “tizón tardío” causada por *Phytophthora infestans*. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, E.E. Santa Catalina. Quito, Ecuador.

Con el propósito de contribuir al desarrollo de una estrategia de control eficiente de la “mancha negra del tronco” (*Fusarium* sp) y del “tizón tardío”, se realizó el presente trabajo de investigación con los siguientes objetivos: 1) Verificar la etiología y la sintomatología de la enfermedad mancha negra del tronco y 2) Establecer las diferencias y semejanzas en sintomatología con la enfermedad tizón tardío.

Se recolectaron 45 muestras de tejido de plantas de tomate de árbol infectadas individualmente con las dos enfermedades, 18 en plantaciones jóvenes (3 a 5 meses) y 27 en plantas adultas (mayor a 10 meses) en las provincias de Imbabura, Pichincha, Tungurahua y Azuay. A cada planta se le realizó una disección, se describió la sintomatología, se fotografió, se tomó tejido del ápice en el caso de las plantas jóvenes, y de tres estratos en el caso de las plantas adultas (ápice, rama primaria, tallo y raíz). Las muestras de tejido fueron sembradas en medios de cultivo agar centeno específico para *Phytophthora*, Nash específico para *Fusarium* y B de King específico para *Pseudomonas*. Las pruebas patológicas realizadas a las muestras fueron: aislamiento de microorganismos, identificación, selección de cepas, purificación y conservación, cultivo monospórico, patogenicidad, selección de cepas patogénicas y postulados de Koch.

Se determinó a *Fusarium solani* como el agente causal de la enfermedad mancha negra del tronco de tomate de árbol. Entre las principales semejanzas y diferencias en sintomatología de las dos enfermedades, se determinaron las siguientes: en plantas jóvenes, *F. solani* ataca tejidos del floema de los estratos ápice y preferentemente del tallo y ramas primarias, mientras que *P. infestans* ataca tejidos del floema y xilema de los estratos ápice, ramas primarias y preferentemente tejidos de las hojas; En plantas adultas, *F. solani* tiene preferencia por tejidos del floema del tallo y de ramas primarias, por su parte, *P. infestans* tiene preferencia por tejidos de las hojas y ramas primarias.

Las dos enfermedades inicialmente causan una necrosis de color café claro con bordes hendidos en el tallo, para luego tomar una coloración negra brillante. En el caso de la mancha negra, bajo condiciones ambientales de menor humedad, el hongo esporula tornándose la necrosis de color beige para luego producir rajaduras de la corteza. En cambio tizón tardío no provoca rajaduras de la corteza, la necrosis se mantiene de color negro brillante y de consistencia ligeramente acuosa, pero ocasiona manchas redondeadas de color café negruzcas, en el haz y en el envés de las hojas, desde los bordes hacia adentro y presentan ondulaciones concéntricas a manera de oleaje formadas por un polvillo blanquecino. En el caso de la mancha negra, la rama o tallo de plantas jóvenes se dobla fácilmente en el sitio de la lesión, mientras que en el caso del tizón tardío, la rama o tallo de plantas jóvenes, se rompe al ejercer presión en el sitio de la lesión por acción del viento. Las plantas atacadas por *F. solani*, tienden a emitir brotes bajo el sitio de la lesión, dando lugar a la recuperación de la misma. Bajo condiciones de lluvias continuas, el ataque de *P. infestans* en el campo, ocasiona defoliación severa de la planta.

Palabras claves adicionales: mancha negra del tronco del tomate de árbol, *Fusarium solani*, tizón tardío o lancha del tomate de árbol, *Phytophthora infestans*, patogenicidad, postulados de Koch, sintomatología.

¹ Parte de este trabajo fue realizado como tesis de Ing. Agr. del segundo autor

² Ing. Agr. M. Sc., Ing. Agr. E. E. Santa Catalina, Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, A. A. 17-01-340, Quito, Ecuador.

³ Tesista de la Universidad Central del Ecuador

INTRODUCCIÓN

El tomate de árbol por ser un frutal muy cotizado y rentable en Ecuador (INIAP, 1982), ha experimentado un incremento significativo de la superficie cultivada; entre los años 1990 y 2000 la superficie cultivada se ha incrementado alrededor de 186.4%, sin embargo la producción no tiene una relación proporcional con el área sembrada; así, Lascano (2000) señala que mientras el área sembrada presentó un crecimiento promedio anual de 12.67%, la producción apenas aumentó en 6.10%. Es a partir de 1998 y como consecuencia del incremento de la superficie cultivada, que el rendimiento del cultivo comienza a decrecer de manera progresiva, debido a que las plantaciones presentan una serie de problemas de carácter fitosanitario que han ocasionado la disminución de la producción, la calidad de la fruta y de la vida útil de las plantaciones (Velastegui, 1988; Morales, 2001).

Al respecto, Morales (2001) reporta que los problemas fitosanitarios de las zonas tomateras de Ecuador, en orden de importancia, son: “nudo de la raíz” (*Meloidogyne incognita*), “tizón tardío” o “lancha” (*Phytophthora infestans*), “antracnosis” (*Colletotrichum gloesporoides*), “cenicilla” (*Oidium spp*) y virus del tamarillo. Destaca que, en el diagnóstico realizado, la presencia de la enfermedad “mancha negra del tronco del tomate de árbol”, fue muy evidente en las plantaciones visitadas.

La enfermedad mancha negra del tronco, causada por el hongo *Fusarium solani*, se registra en 1988 en la provincia de Tungurahua (Velastegui, 1988), sin embargo, es en el año 2000 donde alcanza importancia económica. En este año, con la presencia del fenómeno del Niño, esta enfermedad alcanza niveles de severidad altos, que obligó a muchos productores a abandonar el cultivo en las provincias de Azuay y Tungurahua. El daño causado por esta enfermedad al cultivo, no pudo ser evitado debido a que se confundió con la enfermedad tizón tardío o lanchar por la similitud de los síntomas; es decir, el control errado se debió al desconocimiento de su agente causal, de los síntomas y de los métodos de control (Mora y Revelo, 2001).

En la actualidad esta enfermedad esta presente en zonas húmedas de las provincias de Imbabura, Pichincha, Tungurahua y Azuay (Morales, 2001) y constituye un factor limitante de la producción de este cultivo.

Lo anterior, aunado a la importancia del cultivo de tomate de árbol para el pueblo ecuatoriano y a que el país no cuenta con suficiente información básica para estructurar un manejo definido y eficiente para el combate de la enfermedad mancha negra del tronco, se realizó el presente trabajo de investigación, el cual persiguió los siguientes objetivos:

- Verificar la etiología y la sintomatología de la enfermedad mancha negra del tronco
- Establecer las diferencias y semejanzas en sintomatología con la enfermedad tizón tardío.

MATERIALES Y MÉTODOS

En las provincias de Imbabura, Pichincha, Tungurahua y Azuay, principales productoras de tomate de árbol, se realizó un muestreo de plantas afectadas por las enfermedades mancha negra del tronco y tizón tardío.

Las pruebas patológicas se realizaron en el laboratorio e invernadero del Área de Nematología del Departamento de Protección Vegetal de la Estación Experimental Santa Catalina del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), ubicado en la Provincia de Pichincha, Cantón Mejía, Parroquia Cutuglahua. Longitud 78°33 O, Latitud 0°22 S, Altitud 3050 m.s.n.m.

Factor en estudio:

- Muestras de tejido de tomate de árbol infectado con las enfermedades mancha negra del tronco y tizón tardío.

Muestreo.

En cada una de las provincias (Fig 1 y Cuadro 1), se seleccionaron los cantones más representativos para el cultivo y la enfermedad; es decir cantones con superficies grandes del cultivo y con condiciones de humedad relativa y precipitaciones altas y temperaturas promedio de 17 °C. A su vez, para cada cantón se seleccionaron varias parroquias en las cuales se muestreo dos plantaciones, una joven (3 a 9 meses de edad) y una adulta (mayor a 10 meses) y, en cada una de ellas, una planta que presentó síntomas iniciales o avanzados, típicos de la mancha negra del tronco y otra con síntomas característicos de tizón tardío, cuando fue posible.

En total se muestrearon 45 plantas de tomate de árbol de las cuales 18 plantas correspondieron a plantaciones jóvenes y 27 a plantaciones adultas. Esta diferencia resultó por la dificultad de encontrar en un mismo lugar los dos tipos de plantaciones establecidos y con las sintomatologías requeridas. En el caso de la provincia de Pichincha, el muestreo únicamente se realizó en una parroquia debido a condiciones de extrema sequía durante el muestreo.



Figura 1. Localización de las provincias de Imbabura, Pichincha, Tungurahua y Azuay donde se realizó el muestreo.

Cuadro 1. Provincias y Cantones seleccionados para muestrear tejido de tomate de árbol con síntomas de mancha negra del tronco y tizón tardío. Azuay, Tungurahua, Pichincha, Imbabura. 2003.

Provincias	Cantones	Plantas (no.)	Parroquias
Imbabura	Antonio Ante	6	Natabuela, Atuntaqui y Chaltura
	Cotacachi	7	Peñaherrera y Coellaje
	Ibarra	1	Ibarra
	Urcuqui	2	Urcuqui
	Otavalo	1	Ilumán
Pichincha	Quito	3	San José de Minas
Tungurahua	Patate	3	San Andrés y Tunga
	Pelileo	3	Valle Hermoso y Guadalupe
	Baños	2	Runtún
	Huambaló	2	Huambaló, Emilio Terán
Azuay	Gualacco	2	Chordeleg y Bulcay
	Paute	4	Bulán
	Zig-Zig	1	Zig Zig
	Sevilla de oro	2	Anejo y San Juan Bosco
	El Pan	4	Cedropamba, El Pan y San Francisco
	Guachapala	2	Guablid

De cada planta se tomó muestras de tejido de los estratos ápice, rama primaria, tallo y raíz, como se indica en las Fotos 1 y 2 y en el Cuadro 2. En total se realizaron 147 análisis fitopatológicos.

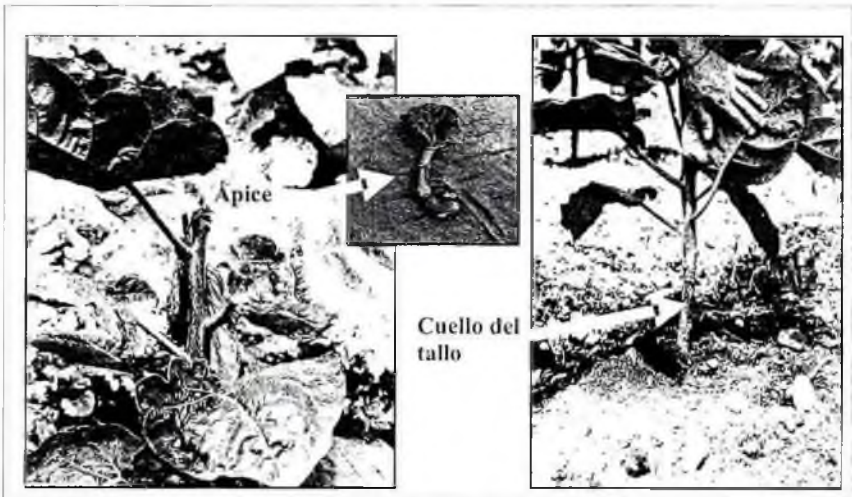


Foto 1. Estratos de plantas jóvenes de tomate de árbol donde se tomaron las muestras de tejido enfermo.

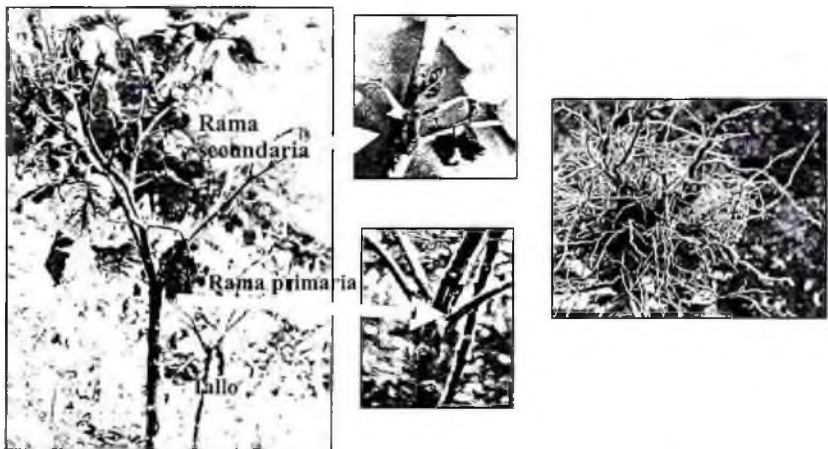


Foto 2. Estratos de plantas adultas o en producción de tomate de árbol donde se tomaron las muestras de tejido enfermo.

Cuadro 2. Estratos de las plantas de tomate de árbol donde se tomaron las muestras de tejido y medios de cultivo utilizados para el aislamiento del o los patógenos.

Estratos	Tejido	Descripción	Medio de cultivo
Apice	Floema	La muestra de tejido se tomó de parte baja de la zona de crecimiento apical	Nash, agar centeno y B de King.
	Xilema		
2. Rama primaria	Floema	La muestra de tejido se tomó de la zona donde el tallo se difurca dando dos o tres tallos principales. De manera general, esta zona presentó necrosis negra a café rojiza.	Nash y agar centeno.
3. Tallo	Xilema	La muestra de tejido se tomó de la parte media y baja del tallo, dependiendo del lugar donde se presentaron sintoma de manchas negras, cánceres o grietas en la corteza	Nash y agar centeno.
	Floema		
4. Raiz	Xilema	La muestra de tejido se tomó de raíces secundarias, tanto sanas como con síntomas de pudrición.	Nash, agar centeno y B de King.
	Floema		
	Xilema		

Pruebas patológicas.

A) Aislamiento de microorganismos

En el campo, a cada planta se le realizó una disección, se describió la sintomatología, se fotografió, se tomó tejido de varios estratos, se etiquetó y se transportaron al laboratorio en un recipiente térmico.

Las muestras de tejido se lavaron con agua potable, se desinfectaron con cloretol al 20% durante tres minutos, luego se lavaron por tres veces consecutivas con agua esterilizada y se colocaron en papel absorbente estéril para eliminar el exceso de agua. A continuación se sembraron tres trocitos de tejido en los medios de cultivo agar centeno (AC) específico para *Phytophthora*, Nash específico para *Fusarium*, B de King específico para *Pseudomonas*. Los platos petri fueron mantenidos en una estufa a temperatura constante de 20 °C

B.) Identificación

La identificación del género del patógeno aislado se efectuó después de ocho días de haber realizado la siembra de los tejidos en los medios de cultivo, para la cual se prepararon placas semi-permanentes para observar las estructuras morfológicas de los microorganismos, mediante un microscopio compuesto y se compararon con aquellas estructuras reportadas en las claves de Bryant, et. al. 1977; Barnett y Humer, 1987 y Booth, 1971.

Para identificar la especie de las cepas patogénicas se realizó una dilución 10⁻³ de cada una de las cepas y se sembró en medio agar agua para obtener la germinación de esporas individuales.

Al cabo de 24 horas estas esporas se trasladaron a los medios selectivos: PDA y agar hojas de clavel para determinar sus características macro y micromorfológicas. Se evaluó durante 21 días.

c. Selección de cepas

En esta primera etapa, las cepas se seleccionaron mediante un análisis cualitativo. Para el caso de *Fusarium* aislado del follaje o de la raíz, las colonias se agruparon tomando en cuenta las características de color de la colonia, la consistencia y crecimiento. Para el caso de *Pseudomonas*, se seleccionaron colonias del grupo fluorescentes. Para el caso de *Phytophthora* aislada del ápice, se seleccionaron las cepas que presentaron una mayor tasa de crecimiento.

d. Purificación y conservación.

Una vez identificados los microorganismos y seleccionadas las cepas, estos fueron purificados y conservados en los siguientes medios: tubos con arena estéril para cepas de *Fusarium*, tubos con agar ceneno para *Phytophthora* y tubos con PDA inclinado cubierto con aceite mineral estéril para bacterias.

e. Cultivo monospórico.

Para los estudios de patogenicidad, se procedió a realizar cultivos monospóricos, para garantizar la pureza de las cepas aisladas, siguiendo la siguiente metodología:

De las cepas seleccionadas, purificadas y crecidas en medio PDA, se cortaron secciones de 5 mm. Cada sección, conteniendo medio y micelio o colonias, se depositó en un tubo con 10 ml de agua estéril y se agitó por 5 segundos. A continuación, con un asa de platino estéril se tomó una alícuota de la solución para realizar un rayado en la superficie de un plato petri conteniendo medio agar-agua. El rayado se realizó primero en forma de triángulo y luego para toda la superficie del medio. Los platos petri se dejaron a medio ambiente por el lapso de 24 horas, para que germinen las esporas. Transcurrido este tiempo y con un bisturi, se cortó un segmento del medio que contenía una espora germinada. Finalmente el segmento se transfirió a un plato con PDA que fue colocado en una estufa de incubación a 20°C.

f. Prueba de patogenicidad

Las pruebas de patogenicidad se realizaron de acuerdo al patógeno seleccionado y según la siguiente metodología:

Para *Fusarium* aislado del ápice, de ramas gruesas y de tallo, la patogenicidad se midió in vitro, para lo cual en una cámara húmeda se colocaron segmentos de tallos de tomate de árbol con una hoja, previamente desinfectados con clorox al 10 % por 2 minutos. A continuación se roció la suspensión conidial a una concentración de 5×10^6 macroconidias. Los segmentos de tallo que presentaron síntomas de manchas negras, indicaron una reacción positiva y la cepa inocular se consideró patogénica.

Para *Phytophthora* aislada del ápice y rama gruesa, en una cámara húmeda se colocaron hojas pequeñas de tomate de árbol, previamente lavadas con agua estéril. La inoculación se realizó

colocando un microlitro de solución conidial en cuatro sitios de la hoja con una concentración de 20 esporangios por mililitro. La presencia de lesiones necróticas en los sitios de inoculación, indicó una reacción positiva y por tanto la patogenicidad de las cepas inoculadas.

Para *Pseudomonas* aisladas de raíces, se realizaron inoculaciones individuales al suelo en plantas de tomate de árbol ecotipo amarillo gigante, de dos meses de edad, realizando cuatro hoyos alrededor de la planta con ayuda de sorbetes, por donde se inoculó 10 ml de la solución en concentración de 5×10^6 bacterias por mililitro. La presencia de marchitez, decaimiento de las plántulas y necrosamiento de la raíz, se consideró reacción positiva.

Para las cepas de *Fusarium* aisladas de raíces e inoculadas al suelo, se consideró infección positiva, cuando el tallo presentó manchas negras o canchales a nivel del cuello de la planta y necrosamientos en la raíz.

g. Selección de cepas patogénicas

Una vez realizadas las pruebas de patogenicidad se seleccionaron las cepas que presentaron una infección positiva.

En total se seleccionaron 33 cepas de *Fusarium* con características diferentes entre sí, cinco cepas de *Phytophthora* aisladas del ápice y una del estrato rama gruesa y ninguna cepa de *Pseudomonas*.

h. Postulados de Koch

Una vez aislados los posibles agentes causales y determinada su patogenicidad, se procedió a realizar los postulados de Koch, es decir, a reproducir los síntomas en invernadero mediante inoculaciones a plantitas de tomate de árbol ecotipo amarillo gigante. Con este propósito, cada cepa fue inoculada en forma individual en 10 plantas de dos meses de edad. Los métodos de inoculación variaron de acuerdo al patógeno y al sitio de la planta de donde fueron aislados.

Para patógenos aislados de la parte aérea como *Phytophthora*, se asperjó el ápice de las plantas con una suspensión de esporangios en una concentración de 20 esporangios/ml.

Para el caso de *Fusarium*, en la parte media del tallo de las plántulas, se realizó una herida mecánica con una aguja hipodérmica y luego se asperjó el inóculo del hongo en la concentración antes indicada.

Para *Fusarium* aislado de la raíz, se sumergió las raíces en el inóculo a una concentración de 5×10^6 durante 5 minutos, y luego se transplantaron a las macetas conteniendo el sustrato.

Las plantas inoculadas fueron colocadas en una cámara húmeda dentro del invernadero. En esta etapa se registraron las siguientes variables:

Síntomas

A intervalos de siete días, se registraron y describieron los síntomas que presentaron las plantas

inoculadas, hasta 28 días después de la inoculación. Estos síntomas se compararon con los síntomas registrados en el campo y con aquellos reportados por Velasteguí, 1988 y Mosquera, 1992.

Incidencia

La incidencia (tallos o plántulas con síntomas de la enfermedad) se midió 30 días después de la inoculación aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ incidencia} = \frac{\text{Número de troncos afectados}}{\text{Número total de troncos analizados}} \times 100$$

Los datos de esta variable permitieron cuantificar la confiabilidad de la prueba.

i. Re -aislamiento

Cuando los síntomas de las enfermedades mancha negra del tronco y tizón tardío se reprodujeron en las plantas inoculadas, se tomaron muestras de tejido afectado para re aislar e identificar el patógeno y comprobar si corresponde al patógeno que fue inoculado. De esta forma se cumplió con los postulados de Koch y se verificó el agente causal de cada enfermedad.

j. Caracterización y diferenciación de la sintomatología de la mancha negra y tizón tardío.

Se seleccionó la sintomatología registrada en el campo, únicamente de las plantas de tomate de árbol de donde se aislaron las cepas patogénicas de *Fusarium* y de *P. infestans*. El resto se descartó. Esta sintomatología se comparó con aquella que se registró en el estudio de postulados de Koch. En base a estos resultados se establecieron las diferencias entre las dos enfermedades, especialmente de la sintomatología observada en el ápice de plantas jóvenes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento, identificación y selección de cepas

De las muestras de tejido enfermo de los estratos tallo y raíces de las plantas jóvenes, se aisló el hongo *Fusarium* sp con una frecuencia de 50 y 100%, respectivamente. Las cepas de *Fusarium* sp aisladas del tallo, el 42 % se aislaron de tejido del floema y 8% de tejido del xilema (Cuadro 3), resultado que indica que el hongo aislado no presenta un tipo de ataque sistémico o vascular. Además, las muestras de las que se aisló a *Fusarium* sp del xilema, corresponden a plantas cuyos tallos a más de presentar los síntomas típicos de la mancha negra, presentaron daño por insectos masticadores, lo cual según Velastegui (1988) influye en la incidencia de esta enfermedad especialmente cuando el daño se produce en la base del tallo a nivel del suelo.

De muestras de tejido tomadas de los estratos ápice y rama primaria de plantas jóvenes de tomate de árbol, con síntomas de la enfermedad tizón tardío, se aisló al hongo *Phytophthora infestans* con una frecuencia de 50 y 33%, respectivamente (Cuadro 3). A pesar de que todas las muestras provenientes de estos estratos presentaron la sintomatología típica de la enfermedad, la baja

frecuencia de aislamiento del agente causal se considera aceptable, al considerar la dificultad que usualmente presenta este hongo para su aislamiento de tejidos de tallos enfermos de tomate de árbol, siendo más fácil aislarlo de tejidos de hojas enfermas.

Según los resultados obtenidos, se puede decir que en plantas jóvenes *P. infestans* tiene preferencia también por los tejidos del ápice y ocasionalmente por los de las ramas, a más de su principal preferencia los tejidos de las hojas como reporta Velastegui (1988). Por su parte *Fusarium sp* prefiere los tejidos del tallo, especialmente del floema.

En relación a la alta frecuencia de *Fusarium sp* determinada en el estrato raíces, no se considera como la posible causa de la sintomatología registrada en las plantas en el campo, ya que muchas de estas cepas, como se verá más adelante, no fueron patogénicas.

En plantas adultas, en el estrato rama primaria, el principal patógeno aislado fue *Fusarium sp* con 70% de frecuencia, de cuyo porcentaje el 60% correspondió a aislamientos de muestras de tejido del floema y 10% a tejido del xilema. Similares resultados se obtuvieron en el estrato tallo, donde el 53% de cepas de *Fusarium sp* se aislaron del floema y 13% del xilema. En el estrato raíz se aisló a *Fusarium sp* y a la bacteria *Pseudomonas sp* con 88 y 12 % de frecuencia, respectivamente (Cuadro 4).

En el estrato ápice, se aisló a *Fusarium sp* con una frecuencia de 30%, seguido por *P. infestans* y *Pseudomonas sp* con 10% y también *Cladosporium sp* y *Colletotrichum sp* con 20% de frecuencia (Cuadro 4), patógenos causantes de necrosamientos de tejidos de este estrato en plantas adultas.

Cuadro 3. Patógenos aislados, distribución y frecuencia por estratos en plantas jóvenes de tomate de árbol. Cutuglagua, Pichincha. 2003.

Muestra no.	Ápice	Rama primaria	Tallo		Raíz
			Floema	Xilema	
2	<i>P. infestans</i>				
3	<i>P. infestans</i>				
4	<i>P. infestans</i>				
7			<i>Fusarium sp</i>	<i>Fusarium sp</i>	<i>Fusarium sp</i>
9					<i>Fusarium sp</i>
17		<i>P. infestans</i>			<i>Fusarium sp</i>
22					<i>Fusarium sp</i>
28	<i>P. infestans</i>				
33			<i>Fusarium sp</i>		
35			<i>Fusarium sp</i>		<i>Fusarium sp</i>
41					<i>Fusarium sp</i>
43			<i>Fusarium sp</i>		<i>Fusarium sp</i>
44			<i>Fusarium sp</i>		<i>Fusarium sp</i>
Frecuencia (%)	50	33	42	8	100

Cuadro 4. Patógenos aislados, distribución y frecuencia por estratos en plantas adultas de tomate de árbol. Cutuglagua, Pichincha. 2003.

Pátogenos	Ápice (%)	Estratos				Raíz (%)
		Rama primaria		Tallo		
		Floema (%)	Xilema (%)	Floema (%)	Xilema (%)	
<i>Fusarium sp</i>	30	60	10	53	13	88
<i>Phytophthora infestans</i>	10	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas sp</i>	10	-	-	-	-	12
Otros ¹	20	20	-	-	-	-

¹ *Cladosporium* sp, *Colletotrichum* sp.

Estos resultados muestran que en plantas adultas *Fusarium* sp tiene preferencia por los tejidos del floema del tallo y de la rama primaria.

Patogenicidad

En las pruebas de patogenicidad se evaluaron 33 cepas de *Fusarium* seleccionadas por características diferentes de color de colonia, consistencia y crecimiento (Foto 3), dos cepas de *Pseudomonas* del grupo fluorescentes (Foto 4) y cinco cepas de *Phytophthora* aisladas del ápice y una del estrato rama primaria que mostraron mejor crecimiento (Foto 5).

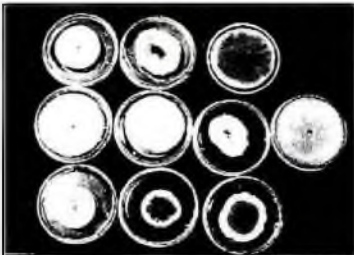


Foto 3. Cepas de *Fusarium* sp



Foto 4. Cepas de *Pseudomonas*



Foto 5. Cepas de *Phytophthora infestans*

De las 33 cepas de *Fusarium* evaluadas, 16 mostraron patogenicidad (Foto 6 y 7), de las cuales dos corresponden al estrato ápice, dos al estrato rama primaria, seis al estrato tallo y seis al estrato raíces (Cuadro 5). De estas, ocho cepas que presentaron un grado de severidad mayor a 80%, fueron seleccionadas para realizar la prueba de Postulados de Koch y correspondieron, dos al estrato ápice, una al estrato rama primaria, tres al estrato tallo y dos al estrato raíz.

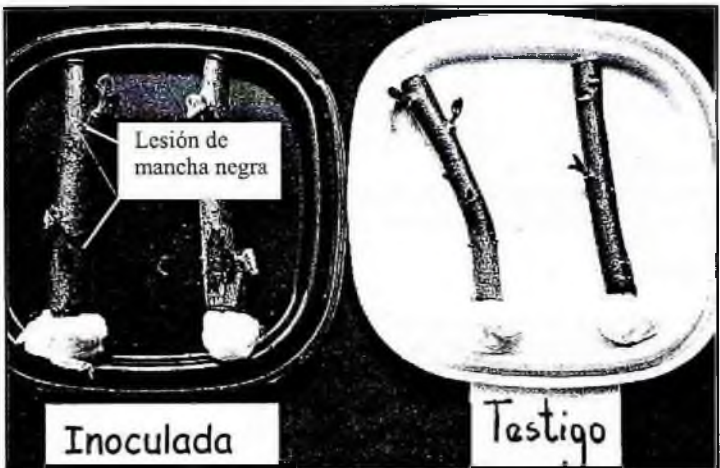


Foto 6. Prueba de patogenicidad de cepas de *Fusarium* sp en ramillas de tomate De árbol, ecotipo amarillo gigante. Cutuglagua, Pichincha. 2003.

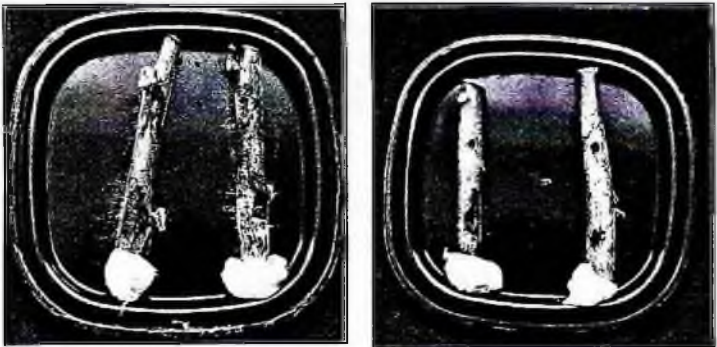


Foto 7. Diversos grados de severidad de *Fusarium* sp registrados en ramillas de tomate de árbol ecotipo amarillo gigante en las pruebas de patogenicidad. Cutuglagua, Pichincha. 2003.

Cuadro 5. Cepas patogénicas de *Fusarium* aisladas de varios estratos de plantas de tomate de árbol. Cutuglagua, Pichincha. 2003.

Muestra No.	Estrato	Reacción de patogenicidad
7	Tallo	+
7	Raíces	+
8	Tallo	+
8	Tallo	+
9	Raíces	+
12	Raíces	+
13	Rama gruesa	+
19	Raíces	+
21	Ápice	+
25	Rama gruesa	+
25	Tallo	+
29	Ramillas	+
35	Raíces	+
35	Tallo	+
41	Raíces	+
45	Cuello	+

Para el caso de *Phytophthora*, las seis cepas evaluadas presentaron similar grado de patogenicidad (Foto 8). De estas, únicamente se seleccionaron dos cepas, la 16,1 aislada del estrato rama gruesa y la 17,1 aislada del ápice, al considerar que en estos estratos se requiere conocer la sintomatología de la enfermedad tizón tardío que ocasiona el hongo para determinar sus semejanzas y diferencias con la enfermedad mancha negra del tronco. Además, estas cepas fueron seleccionadas por presentar un mejor crecimiento en el medio de cultivo (Cuadro 6).

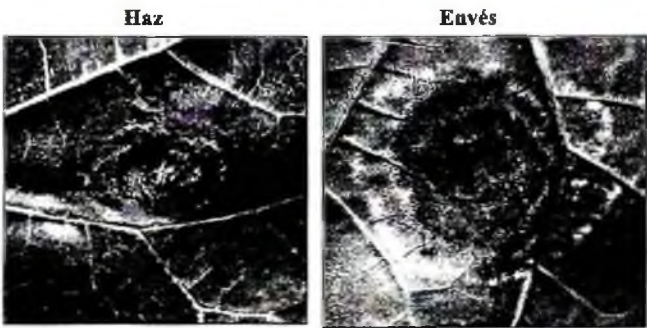


Foto 8. Prueba de patogenicidad de cepas de *Phytophthora infestans* en hojas de tomate de árbol. Cutuglagua, Pichincha. 2003

Cuadro 6. Cepas patogénicas de *Phytophthora infestans* provenientes de varios estratos de plantas de tomate de árbol. Cutuglagua, Pichincha. 2003.

Código	Estrato	Reacción de patogenicidad
2,1	Rama gruesa	+
3,1		+
4,1		+
16,1		+
17,1		+
28.1		+

En cuanto a las cepas de *Pseudomonas* del grupo fluorescentes, en la Foto 9 y en el Cuadro 7, se observa que no fueron patogénicas, por cuya razón se descartaron.

Foto 9. Prueba de patogenicidad de cepas de *Pseudomonas sp* del grupo fluorescentes en plántulas de tomate de árbol. Cutuglagua, Pichincha. 2003.



Cuadro 7. Reacción de patogenicidad de cepas de *Pseudomonas sp* del Grupo fluorescentes provenientes de varios estratos de plantas de tomate de árbol. Cutuglagua, Pichincha. 2003.

Código	Estrato	Reacción de patogenicidad
1,1	Raíces	
8,1	Apice	

Identificación de las especies de *Fusarium* y de *Phytophthora*

Fusarium

Las cepas 21 y 29 aisladas del sustrato ápice, la 21 del sustrato rama primaria y las cepas 10 y 45 del sustrato tallo, presentaron desarrollo de micelio blanco ligeramente algodonoso al inicio, tornándose amarillo o crema a los 15 días. En el envés de la caja se registró un color blanco, el mismo que no varió. A los cinco días se registró un rango de crecimiento de 3.5 a 5.0 cm. Durante los primeros días de esporulación, se observaron abundantes microconidios unicelulares, ovoides. A los 21 días, únicamente se observaron macroconidios cilíndricos con dos a tres septas,

producidas en monofialides relativamente largas. Se observó producción escasa a moderada de clamidosporas simples de paredes gruesas y en pares (Foto 10).

A su vez, la cepa 35 aislada del sustrato tallo y la 19 y 35, aisladas del sustrato raíz, presentaron crecimiento de micelio algodonoso denso de color blanco, el cual después de cinco días se tornó rosado. En el envés de la caja se observó un color salmón – púrpura. A los cinco días se registró un rango de crecimiento de 7.5 a 8.5 cm. Durante los primeros días de esporulación, se observaron abundantes microconidios ovoides y ligeramente más pequeños que los observados en las cepas anteriores. Se observó la formación de los conidios en monofialides con conidioforos cortos. Se registró la presencia de macroconidios y se observó escasa a moderada producción de clamidosporas redondas, en su mayoría simples y de paredes gruesas (Foto 11).



Foto 10. Características macromorfológicas (microconidias en monofialides alargadas) de cepas patógenicas de *Fusarium solani* aisladas de varios estratos de plantas de tomate de árbol. Cutuglagua, Pichincha. 2003.



Foto 11. Características macromorfológicas (macroconidias) de cepas patógenicas de *Fusarium oxysporum* aisladas de varios estratos de plantas de tomate de árbol. Cutuglagua, Pichincha. 2003.

Las características antes descritas se compararon con la clave de identificación de especies de *Fusarium* de Nelson, et. al. (1981, 1983), coincidiendo el primer grupo de cepas (aisladas del tallo, rama primaria y el ápice) con la especie *Fusarium solani* y el segundo grupo (aisladas de raíces) con *Fusarium oxysporum* (Fotos 10 y 11 y Cuadro 8).

Cuadro 8. Especies de *Fusarium* identificadas según sus características macromorfológicas. Cutaglagua, Pichincha. 2003.

Cepas código	Estrato	Especie de <i>Fusarium</i>
21	Apice	<i>Fusarium solani</i>
29	Apice	
21	Rama primaria	
10	Tallo	
45	Tallo	
35	Tallo (cuello)	<i>Fusarium oxysporum</i>
19	Raíz	
35	Raíz	

Phytophthora

En el medio de cultivo, el hongo presentó crecimiento de micelio blanco, rastrero, poco denso, que a lo largo del tiempo no cambió de color. Presentó una tasa de crecimiento bajo, registrándose a los 15 días un crecimiento que osciló entre 3.5 a 4.5 cm. Del micelio hialino no tabicado, se observó la proyección de esporangioforos largos con bifurcaciones en la parte apical donde se forman esporangios grandes en forma de limón. En el sitio de formación del esporangio, se observó un engrosamiento dando la forma de articulaciones, característica que permite claramente identificar a la especie (Foto 12). Estas características, coinciden con aquellas reportadas por Agrios (1995) para la especie *Phytophthora infestans*, lo cual fue corroborado por científicos del Centro Internacional de la Papa, quienes manifestaron que las cepas de *Phytophthora* aisladas del follaje o estratos aéreos del tomate de árbol, corresponden a la especie antes señalada.

Las cepas patogénicas de *Phytophthora infestans* seleccionadas para las pruebas de postulados de Koch, fue posible reproducirlas y conservarlas únicamente en medio agar – centeno, específico para esta especie.

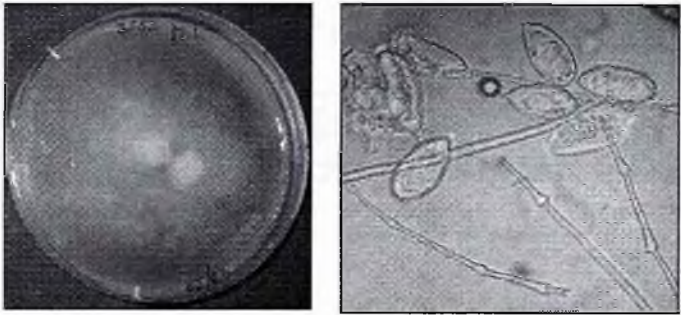


Foto 12. Características macromorfológicas de cepas patogénicas de *Phytophthora infestans* aisladas de varios estratos de plantas de tomate de árbol. Cutaglagua, Pichincha. 2003.

Postulados de Koch

Para cumplir con los postulados de Koch y verificar el agente causal de la enfermedad mancha negra del tronco del tomate de árbol, se inocularon plántulas de tomate de árbol con las cepas patogénicas de las dos especies de *Fusarium* que fueron aisladas con mayor frecuencia, con el fin de reproducir la sintomatología de la enfermedad en estudio.

En el Cuadro 9 se observa que las cepas de *Fusarium solani*, provenientes de los estratos ápice, rama primaria y tallo, todas reprodujeron los síntomas típicos de la enfermedad mancha negra del tronco, en mayor o menor grado, siendo la cepa 21 aislada de rama primaria y la 45 aislada del tallo, las que propiciaron 70% de incidencia de la enfermedad (Fotos 13 a, 13 b, 13 c y 13 d).

El análisis por características macromorfológicas de las cepas de *Fusarium* reaisladas, determinó que las dos correspondían a la especie *Fusarium solani* que fue inoculada, dando lugar al cumplimiento de los postulados de Koch. Cabe indicar que la cepa 21 aislada del estrato rama primaria, mostró mayor agresividad que el resto y fue la que al final de la prueba presentó mayor esporulación, sintoma característico de la etapa final de la enfermedad, por lo cual fue seleccionada para realizar el estudio de interacción (Foto 13 b).

Cuadro 9. Porcentaje de incidencia y sintomatología causada por las cepas patogénicas de *Fusarium sp* en plántulas de tomate de árbol en el estudio de Postulados de Koch. Cutuglagua, Pichincha 2003.

Código	Especie	Incidencia (%)	Sintomatología
21 Ápice	<i>F. solani</i>	40	Necrosis café oscura brillante en el tallo con ligera rajadura de la corteza. Planta vigorosa
29 Ápice	<i>F. solani</i>	20	El tallo no presentó síntomas, pero se observó la muerte del biote cercano al sitio de inoculación
21 Rama primaria	<i>F. solani</i>	70	Necrosis café rojiza con bordes regulares de color café intenso. Rajadura profunda de la corteza en el sitio de inoculación. Esporulación. Follaje verde clorótico, marchito y raíces sanas
10 Tallo	<i>F. solani</i>	40	Necrosis negra con rajadura de la corteza, que no progresa. Follaje verde abundante.
35 Tallo	<i>F. oxysporum</i>	20	Pequeñas manchas negras con ligeras rajaduras que pierden coloración y cicatrizan.
45 Tallo	<i>F. solani</i>	70	Necrosis café oscura con rajadura de la corteza, no progresan. Plantas muy vigorosas.
19 Raíz	<i>F. oxysporum</i>	70	Plantas cloróticas pequeñas, ligeras manchas café claro en el tallo, estrangulamiento del cuello en el 20% de plantas. Raíces con el floema necrosado, sin daño vascular
35 Raíz	<i>F. oxysporum</i>	30	Ligero enanismo, las raíces no presentan síntomas aparentes de ataque



13 a. Plántula de tomate de árbol mostrando lesiones de mancha negra en la prueba de postulados de Koch.



13 b. Plántula de tomate de árbol mostrando síntomas de la enfermedad en la fase de esporulación en la prueba de postulados de Koch.



13 c. Diversos grados de severidad de *Fusarium* sp registrados en plántulas de tomate de árbol en la prueba de postulados de Koch. Cutuglagua, Pichincha. 2003.



13 d. Planta adulta de tomate de árbol en campo mostrando síntomas de la enfermedad en la fase de esporulación.

En cuanto a las cepas de *Fusarium oxysporum* aisladas del sustrato raíz y una del cuello del tallo, en el Cuadro 9 se observa que la cepa 19 proveniente de una planta adulta de la provincia de Azuay, el 70% de plantas inoculadas fueron pequeñas y cloróticas, y de estas, el 20% presentaron necrosamiento de la base del tallo y de las raíces, síntomas característicos del ataque de *F. oxysporum* (Foto 14), resultado que avala la eficacia de la prueba realizada. Los reaislamientos del hongo de las plantas enfermas, correspondieron al patógeno inoculado, es decir a *Fusarium oxysporum*.



Foto 14. Planta de tomate de árbol mostrando síntomas de la enfermedad mancha negra del tronco en la prueba de postulados de Koch con la cepa 19-raíz. Cutuglagua, Pichincha. 2003.

En cuanto a la prueba de postulados de Koch realizada con las cepas de *P. infestans*, las plantitas de los tres ecotipos de tomate de árbol inoculadas, presentaron los síntomas típicos de la enfermedad tizón tardío (Foto 15). Los reaislamientos del hongo de las plantas enfermas, correspondieron al patógeno inoculado, es decir a *P. infestans*.



Foto 15. Plántulas de tomate de árbol inoculadas con *Phytophthora infestans* mostrando síntomas característicos de la enfermedad tizón tardío, en las pruebas de postulados de Koch. Cutuglagua, Pichincha. 2003.

Caracterización y diferenciación de la sintomatología de las enfermedades mancha negra del tronco y tizón tardío.

Las dos enfermedades se caracterizan por provocar inicialmente una necrosis de color café claro amorfa con bordes hendidos en el tallo (Fotos 16 a, 16 b), para luego tomar una coloración negra brillante (Fotos 17 a y 17 b).

En el caso de la mancha negra, dependiendo de las condiciones ambientales, la necrosis evoluciona; así, bajo condiciones ambientales de menor humedad, el hongo esporula tornándose la necrosis de color beige (Foto 18) para luego producir rajaduras de la corteza (Foto 20). En cambio tizón tardío no provoca rajaduras de la corteza, la necrosis se mantiene de color negro brillante y de consistencia ligeramente acuosa (Foto 19), pero ocasiona manchas redondeadas de color café – negruzcas, en el haz y en el envés de las hojas, desde los bordes hacia adentro y presentan ondulaciones concéntricas a manera de oleaje formadas por un polvillo blanquecino (Foto 21). Es importante destacar que para el caso de la mancha negra, la rama o tallo de plantas jóvenes se dobla fácilmente en el sitio de la lesión (Foto 22), mientras que en el caso del tizón tardío, la rama o tallo de plantas jóvenes, se rompe al ejercer presión en el sitio de la necrosis o por acción del viento (Foto 23).

Cuando las condiciones ambientales son favorables y constantes para el desarrollo de las dos enfermedades, provocan la pérdida completa del ápice de plantas jóvenes (Fotos 24 y 25). Para ambas enfermedades el período de incubación bajo condiciones de invernadero es de 4 a 5 días.

Fusarium solani ataca de manera preferente tejidos del floema de los estratos tallo y rama primaria (Foto 26), mientras que *Phytophthora* prefiere atacar tejidos del floema y xilema de los estratos ápice y ramas primarias de plantas jóvenes (Foto 27).

Cuando las plantas son atacadas por *F. solani*, estas tienden a emitir brotes bajo el sitio de la lesión, dando lugar a la recuperación de la misma (Fotos 24 y 28).

Bajo condiciones de extrema humedad (lluvias continuas), el ataque de *P. infestans* en el campo, ocasiona defoliación severa de la planta (Foto 29) y la muerte del cultivo, si no se toman medidas oportunas de control, afectando significativamente el rendimiento



Foto 16 a. Síntoma inicial.

Lesión



Foto 16 b. Síntoma inicial



Foto 17 a. Lesión negra brillante

Lesión



Foto 17 b. Lesión negra brillante

Mancha negra del tronco



Foto 18. Lesión necrótica con el hongo esporulando.

Tizón tardío



Foto 19. Lesión negra brillante

Lesión



Foto 20 Rajadura o cancro en el tallo.



Foto 21. Lesiones en el haz y envés de las hojas.



Foto 22. Doblamiento de la rama en el sitio de la lesión.



Foto 23. Rotura de la rama en el sitio de la lesión mediante presión.



Foto 24. Daño en el ápice en planta joven.



Foto 25. Daño en el ápice en planta joven.

Mancha negra del tronco



Foto 26. Tejidos del floema afectados en plantas jóvenes de tomate de árbol.

Tizón tardío

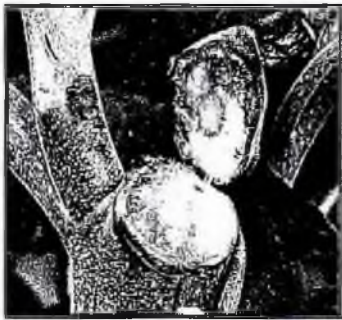


Foto 27. Tejidos del floema y xilema afectados en plantas jóvenes de tomate de árbol



Foto 28. Emisión de brotes bajo el sitio de la lesión.



Foto 29. Defoliación severa de la planta.

CONCLUSIONES

- Se verificó que *Fusarium solani* es el agente causal de la enfermedad mancha negra del tronco del tomate de árbol.
- Entre las principales semejanzas y diferencias en sintomatología de las enfermedades mancha negra del tronco y tizón tardío, se determinaron las siguientes:

En plantas jóvenes, *Fusarium solani* ataca tejidos del floema de los estratos ápice y preferentemente del tallo y ramas primarias, y *Phytophthora infestans* ataca tejidos del floema y xilema de los estratos ápice, ramas primarias y preferentemente tejidos de las hojas.

En plantas adultas, *F. solani* tiene preferencia por tejidos del floema del tallo y de ramas primarias, y *P. infestans* tiene preferencia por tejidos de las hojas y ramas primarias.

Las dos enfermedades se caracterizan por provocar inicialmente una necrosis de color café claro amorfa con bordes hendidos en el tallo, para luego tomar una coloración negra brillante. En el caso de la mancha negra, dependiendo de las condiciones ambientales, la necrosis evoluciona; así, bajo condiciones ambientales de menor humedad, el hongo esporula tornándose la necrosis de color beige para luego producir rajaduras de la corteza. En cambio tizón tardío no provoca rajaduras de la corteza, la necrosis se mantiene de color negro brillante y de consistencia ligeramente acuosa, pero ocasiona manchas redondeadas de color café negruzcas, en el haz y en el envés de las hojas, desde los bordes hacia adentro y presentan ondulaciones concéntricas a manera de oleaje formadas por un polvillo blanquecino. Es importante destacar que para el caso de la mancha negra, la rama o tallo de plantas jóvenes se dobla fácilmente en el sitio de la lesión, mientras que en el caso del tizón tardío, la rama o tallo de plantas jóvenes, se rompe al ejercer presión en el sitio de la necrosis o por acción del viento. Para ambas enfermedades el período de incubación bajo condiciones de invernadero es de 4 a 5 días. Las plantas atacadas por *F. solani*, tienden a emitir brotes bajo el sitio de la lesión, dando lugar a la recuperación de la misma. Bajo condiciones de lluvias continuas, el ataque de *P. infestans* en el campo, ocasiona defoliación severa de la planta.

El conocimiento de la sintomatología de las dos enfermedades, permitirá realizar un control más eficiente de las mismas.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen al Programa de Modernización de los Servicios Agropecuarios (PROMSA), por el apoyo financiero y técnico que permitió realizar el presente estudio. A la Sra. Myriam Jácome por su colaboración en la edición de este documento.

REFERENCIAS

- BARNETT, H.L. HUNTER, B. 1987. Illustrated genera of imperfect fungi. New York: Macmillan Publishing Company. 218p.
- BOOTH, C. 1971. Fusarium laboratory guide to the identification of the major species. England: Commonwealth Micology Institute. 237p.
- BRYANT, M; KRIEG, N; LAPAGE, S.; LAUTROP, H. 1977. The shorted bergey's manual of Determinative Bacteriology Eighth edition. Baltimore. 356p.
- INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS. 1982. Informe anual de Actividades de Fitopatología Quito: Estación Experimental Santa Catalina. p 26-29.
- LASCANO, V. 2002. Análisis de la competitividad de la cadena agroalimentaria del tomate de árbol en Ecuador. Tesis economista. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito. 90 p.
- MORA, E; REVELO, J. 2000. Identificación del organismo causal de la enfermedad conocida como "mancha negra", "pata de puerco" o fusariosis en Tomate de árbol. Informe Final s.p.
- MORALES, J. 2001. Diagnóstico Agro-socio-económico del cultivo de Tomate de Árbol en cuatro provincias del Ecuador. Tesis de Ing. Agr. Quito: Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrícolas. 120p.
- NELSON, P; TOUSSOUN, T; COOK, R. 1981. Fusarium. Diseases, Biology, and Taxonomy.
- NELSON, P; TOUSSOUN, T y MARASAS, F. 1983. Fusarium species, an ilustrated manual for identification. Pensylvania (U.S.A): State University, 193p.
- VELASTEGUI, J. 1988. Principales enfermedades del Tomate de árbol. Ambato, Publicación Técnica 59 p.