

UNIVERSIDAD DE SONORA
DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA Y GANADERÍA

**MECANISMO DE ACCION DE *Trichoderma harzianum* RIFAI
SOBRE *Meloidogyne incognita* (KOFOID y WHITE) CHITWOOD,
EN EL CULTIVO DE TOMATE**

TESIS
MAESTRIA EN CIENCIAS

IRMA GLORIA ROMO LOPEZ

ABRIL 2008

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



“El saber de mis hijos
hará mi grandeza”



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

Mecanismo de acción de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood, en el cultivo de tomate.

TESIS

**Sometida a la consideración del
Departamento de Agricultura y Ganadería**

de la

Universidad de Sonora

por

Irma Gloria Romo López

**Como requisito parcial para obtener
El grado de Maestro en Ciencias en Horticultura**

Abril de 2008

Esta tesis fue realizada bajo la Dirección del Consejo Particular, aprobada y aceptada como requisito parcial para la obtención del grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

CONSEJO PARTICULAR

DIRECTOR:


DR. JOSE COSME GUERRERO RUIZ

ASESOR:


M.S. ALFREDO SERRANO ESQUER

ASESOR:


DR. FRANCISCO JOSE RIVAS SANTOYO

CONTENIDO

	Pág.
ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS	<i>iv</i>
RESUMEN	<i>ix</i>
ABSTRACT	<i>x</i>
INTRODUCCIÓN	1
LITERATURA REVISADA	3
MATERIALES Y MÉTODOS	12
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
CONCLUSIONES	40
LITERATURA CITADA	41
APÉNDICE	46

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

		Pág.
Cuadro 1.	Peso en gramos del sistema radicular de cada una de las plantas de tomate de los diferentes tratamientos, diez semanas después de la inoculación.	22
Cuadro 2.	Medias del peso en gramos del sistema radicular de plantas de tomate de cada tratamiento, diez semanas después de la inoculación y significancia estadística en base a la prueba de Tukey.	22
Cuadro 3	Número de agallas presentes en el sistema radicular de cada una de las plantas de los diferentes tratamientos, diez semanas después de la inoculación.	24
Cuadro 4.	Medias del número de agallas presentes en la raíz de tomate de cada tratamiento, diez semanas después de la inoculación y significancia estadística en base a la prueba de Tukey.	25
Cuadro 5.	Análisis de varianza para el numero de agallas presentes en las raíces de plantas de tomate tratadas, 10 semanas después de la inoculación.	47
Cuadro 6.	Análisis de varianza para peso fresco de raíz de plantas de tomate tratadas, 10 semanas después de la inoculación.	47
Figura 1.	Material y equipo utilizado para la extracción de huevecillos de <i>Meloidogyne</i> .	13
Figura 2.	Suspensión de huevecillos obtenida mediante la técnica de McClure (1973).	14
Figura 3.	Perforaciones en las que se vertió la suspensión de huevecillos de <i>M. incognita</i> , en cada maceta.	14
Figura 4.	<i>Trichoderma harzianum</i> en placa petri, después de 7 días de incubación.	14
Figura 5.	Obtención del filtrado de <i>Trichoderma</i> mediante la técnica de Siddiqui, <i>et. al.</i> , (2001).	15
Figura 6.	Plantas de tomate inoculadas, en cámara de crecimiento.	16
Figura 7.	Poda de plantas de tomate de los diferentes tratamientos.	16
Figura 8.	Secuencia fotográfica que ilustra la técnica utilizada para recolectar huevecillos y juveniles de <i>Meloidogyne</i> a partir del suelo de cada una de las macetas de los diferentes tratamientos, 10 semanas después de la inoculación.	17

Figura 9.	Portaobjetos con cámara doble (Two-well chamber slides, Nunc Inc., Naperville, IL.) donde se realizaron los experimentos <i>in vitro</i> .	18
Figura 10.	Cámara con medio de cultivo Phytigel donde se inoculó raíz de vid con hembra y masa de huevecillos de <i>M. incognita</i> (a) y disco de agar con <i>T. harzianum</i> (b).	19
Figura 11.	Raíces de vid con hembras de <i>M. incognita</i> (a) sin masa de huevecillos, que se inocularon con Trichoderma en cámara con medio de cultivo Phytigel.	19
Figura 12.	Raíz de planta del tratamiento cuatro (Meloidogyne) con agallas, hembras y masas de huevecillos (a), 35 días después de la inoculación.	21
Figura 13.	Raíces de plantas de tomate de los diferentes tratamientos, 10 semanas después de la inoculación, con el número de tratamiento en recuadro.	23
Figura 14.	Acercamiento de raíces de plantas de los tratamientos 3, 4 y 7.	24
Figura 15.	Huevecillos y juveniles recuperados del suelo de plantas de tomate inoculadas con Meloidogyne (Tratamiento 4), 10 semanas después de la inoculación.	25
Figura 16.	Raíz de tomate del tratamiento 1 (Meloidogyne + Trichoderma) con hembras en su interior.	26
Figura 17.	Raíz de tomate del tratamiento 2 (Meloidogyne + filtrado) con hembra en su interior.	27
Figura 18.	Raíz de tomate del tratamiento 3 (Meloidogyne + Trichoderma + Filtrado) con agalla y hembra en su interior..	27
Figura 19.	Raíz de tomate del tratamiento 4 (Meloidogyne) con agalla y hembra en su interior.	28
Figura 20.	Raíces de tomate del tratamiento 4 (Meloidogyne) con agallas y hembras en su interior.	28
Figura 21.	Corte perineal de hembra de <i>M. incognita</i> obtenida de raíces de tomate y utilizada para los experimentos en cámara de crecimiento.	29
Figura 22.	Hifas de Trichoderma enroscadas (a) y en el interior de huevecillos de Meloidogyne (b), con 10 y 14 días de incubación respectivamente.	30

Figura 23.	Juvenil (J1) donde se aprecian lumen (a) y metacorpus (b) característicos de <i>M. incognita</i> , con hifas (c) de <i>T. harzianum</i> en su interior.	30
Figura 24.	Desarrollo de hifas de <i>T. harzianum</i> en matriz gelatinosa (a) de <i>M. incognita</i> .	30
Figura 25.	Hembra de <i>M. incognita</i> parasitada por <i>T. harzianum</i> , con hifas (a) en su interior. Se aprecian claramente estilete (b), lumen (c) y válvula del metacorpus (d).	31
Figura 26.	Parte posterior de una hembra de <i>M. incognita</i> parasitada por <i>T. harzianum</i> , con hifas en su interior (a), observándose su patrón perineal (b).	31
Figura 27.	Desarrollo de micelio de <i>T. harzianum</i> sobre hembra de <i>M. incognita</i> (a) sin masa de huevecillos, 48 horas después de la incubación en cámara dual.	32
Figura 28.	Huevecillo de <i>M. incognita</i> después de 5 días de incubación sin Trichoderma (Testigo).	32
Figura 29.	Huevecillos de <i>M. incognita</i> con diferentes tipos de alteraciones después de 5 (a y b) y 7 (c y d) días de incubación con filtrado de <i>T. harzianum</i> .	33
Figura 30.	Corte perineal de hembra utilizada en los experimentos <i>in vitro</i> .	33
Figura 31.	Conidias de Trichoderma (a) en el interior del estoma (b) de <i>Rhabditis sp.</i>	34
Figura 32.	Nematodos del genero <i>Rhabditis sp</i> parasitados por <i>Trichoderma harzianum</i> .	34
Figura 33.	Acercamiento de la parte anterior (a) y media (b) del cuerpo de <i>Rhabditis</i> , parasitado por Trychoderma.	35
Figura 34.	Plantas de tomate mostrando síntomas de daño por frío.	48
Figura 35.	Síntomas del minador en plantas de tomate en cámara de crecimiento.	48
Figura 36.	Palomilla del gusano bellotero en planta de tomate en cámara de crecimiento.	48

AGRADECIMIENTOS

Al Ing. Jesús Manuel Avila Salazar por alentarme a continuar superándome y apoyarme generosamente con sus vastos conocimientos y experiencia en la realización de esta tesis y durante toda mi vida profesional.

DEDICATORIA

A mi hijo Rafael, mi madre Aurelia y mis hermanas María Aglae, Albi, Norma y Gilda, las personas que más amo.

RESUMEN

Para determinar los mecanismos de acción involucrados en la relación *Trichoderma harzianum*-*Meloidogyne incognita*, se efectuaron dos tipos de trabajos: 1) En cámara de crecimiento que consistió en inocular plantas de tomate con huevecillos del nematodo, *Trichoderma* vivo, filtrado de *Trichoderma* y sus diferentes combinaciones; 2) *in vitro* que consistió en colocar en portaobjetos con cámara dual diferentes estadios de *Meloidogyne* con *Trichoderma* vivo y filtrado de *Trichoderma*. Los resultados en cámara de crecimiento mostraron un efecto significativo en la reducción del número de agallas en las plantas tratadas con el hongo; *in vitro*, *Trichoderma* fue capaz de parasitar huevecillos, juveniles de primer estadio y hembras sin masa de huevecillos. No se observó parasitismo en hembras con masa de huevecillos ni en juveniles de segundo estadio.

ABSTRACT

Two bioassay trials were realized for mechanism determination in *Trichoderma harzianum*-*Meloidogyne incongnita* interaction.

- 1) In a growth chamber were inoculated tomato plants with *Meloidogyne* eggs, *Trichoderma* fungi, *Trichoderma* filtrate and also their combinations.
- 2) *In vitro*, were used dual chamber slides with different *Meloidogyne* stages (eggs, juvenils, females with and no egg masses) and *Trichoderma* filtrate and *Trichoderma* fungus.

In growth chamber *Trichoderma* reduced significately *Meloidogyne* galls number in tomato plants, *in vitro*, *Trichoderma* parasited: eggs, first stage (J1) and female without egg masses. However, *Trichoderma* did not parasited females with egg masses, or second juvenile stages.

INTRODUCCIÓN

El tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) es el segundo producto hortícola en el consumo mundial, esto indica la importancia que para la seguridad alimentaria de cualquier país tiene este cultivo. México ocupa el décimo lugar a nivel mundial como productor de tomate, pero es el tercer comercializador del producto. Es una de las especies hortícolas más importantes de nuestro país debido al valor de su producción y a la demanda de mano de obra que genera. Por su alto valor comercial, el tomate ha representado tradicionalmente un ingreso de divisas muy importante para México. Por ello se debe continuar exportando este producto, e incluso incrementar los volúmenes ya que es altamente competitivo en los mercados internacionales.

El nematodo de los nódulos, *Meloidogyne spp*, ocasiona severas pérdidas económicas a la agricultura en todo el mundo atacando a un gran número de especies, en las que se incluyen hortalizas, frutales, cultivos básicos y ornamentales. El cultivo de tomate es hospedero de numerosas especies de nemátodos, destacando entre ellos el género *Meloidogyne* por provocar considerable daño en la producción. Durante muchos años el combate contra estos organismos ha consistido en la utilización de materiales resistentes, realización de prácticas culturales y uso de nematicidas; sin embargo, la reducida disponibilidad de éstos últimos, las restricciones de uso y falta de registro de algunos de ellos en tomate, además de sus elevados costos y el impacto en los ecosistemas y la salud, han propiciado la búsqueda de alternativas al control químico. En los últimos años, los métodos biológicos de control, han recibido una gran atención y se están convirtiendo en una posibilidad real para reducir los daños ocasionados por nemátodos y disminuir los problemas que generan los productos químicos.

El hongo *Trichoderma* es uno de los agentes de control biológico más ampliamente utilizado para el control de patógenos de plantas, ya que numerosos estudios indican que posee muchos y muy variados mecanismos de acción, entre los que

destacan: micoparasitismo, producción de antibióticos (toxinas), competencia, producción de enzimas, inducción de respuestas de defensa en la planta y uno descubierto recientemente que consiste en la capacidad de *Trichoderma* para metabolizar los estimulantes producidos por las plantas y requeridos para la germinación de propágulos de los patógenos (Wells, 1988; Elad, 1995; Yedidia, *et. al.*, 1999; Harman, 2000; Howell, 2002; Howell, 2003).

Uno o varios de los mecanismos mencionados contra hongos pueden potencialmente estar involucrados en el proceso de biocontrol de nemátodos, pero la información acerca de los posibles mecanismos de acción es muy limitada; sin embargo, para hacer más eficaz el uso de agentes biológicos para el control de nematodos fitoparásitos es necesario entender como trabajan estos mecanismos y cuales son sus limitaciones (Howell, 2003).

Numerosos autores coinciden en que la utilización de microorganismos para el control de nematodos fitoparásitos sólo puede ser efectuada mediante el análisis de las interacciones naturales entre "planta huésped-nematodo fitoparásito-agente de control biológico-medio ambiente", y que en la medida que se comprendan mejor estas complejas interacciones, el control biológico de los nematodos será más acertado.

El objetivo principal de este trabajo fue determinar el o los mecanismos de acción involucrados en la relación *Trichoderma harzianum*-*Meloidogyne incognita*, mediante la evaluación de la capacidad del hongo vivo y su filtrado para afectar las poblaciones de *M. incognita* tanto en condiciones *in vitro* como en condiciones *in vivo* en plantas de tomate.

LITERATURA REVISADA

Se estima que el 50% de la producción mundial de hortalizas la constituyen la papa y el tomate, lo cual indica el enorme valor que este último cultivo representa no solo en el comercio, sino también en el sistema alimentario mundial. Según datos de la FAO de la ONU, los principales productores de tomate a nivel mundial son China, Estados Unidos, Turquía, Italia, Egipto e India, quienes han concentrado durante la última década el 70% de la producción mundial. Cifras del Servicio de Información Estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) de la SAGARPA, mencionan que México ocupa el décimo lugar a nivel mundial como productor de tomate y el tercero como exportador, la mayoría con destino a los Estados Unidos de América, siendo el principal producto hortícola de exportación, ya que representa el 37% del valor total de las exportaciones de hortalizas y el 16% del valor total de las exportaciones agropecuarias (SAGARPA, 2002)

La superficie cosechada de este cultivo, en México durante el 2005 fue de 71 086 ha con un valor de la producción de \$9 914 273 000.00 pesos; concentrándose casi el 70 % de la producción en los estados de Sinaloa (35.5%), San Luis Potosí (8.3%) Baja California (8.0%), Michoacán (6.7%), Baja California Sur (4.7%) y Morelos (4.0%). Sonora ocupa el décimo lugar con 1882 ha cosechadas (2.7%), con un valor total de \$286 647 500.00 pesos. Pocas son las hortalizas que a nivel mundial presentan una demanda tan alta, por ello el tomate ha representado tradicionalmente un ingreso de divisas muy importante para nuestro país (INEGI, 2006a y b)

Este cultivo es hospedero de muchas especies de nemátodos, destacando entre ellas *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood, el cual provoca daños severos en condiciones de invernadero y campo (Álvarez y Armenta, 2000, Cid del Prado, *et. al.* 2001).

Meloidogyne spp

Se han reportado mas de 60 especies de este género, destacando *M. incognita*, *M. javanica* (Treub) Chitwood, *M. arenaria* (Neal) Chitwood y *M. hapla* Chitwood por que atacan un amplio rango de hospederas, causan daños severos a muchos cultivos y están distribuidas mundialmente (Eisenback, *et. al.*, 1981).

Ciclo de vida.

El ciclo de vida de las especies de *Meloidogyne*, como en la mayoría de los nemátodos fitoparásitos consiste de 6 estadios: huevo, cuatro estadios juveniles (J₁, J₂, J₃ y J₄) y adulto. Las hembras adultas, que están completa o parcialmente incrustadas en la raíz del hospedero depositan los huevecillos en una sustancia gelatinosa que los mantiene juntos en masas o sacos de huevos. El contenido del huevo se transforma en un juvenil de primer estadio con estilete. La primera muda tiene lugar dentro del huevo; poco después emerge como juvenil de segundo estadio y se mueve a través del suelo en busca de una raíz para alimentarse. Generalmente penetran cerca de la punta de la raíz y colocan sus cabezas en el cilindro central y sus cuerpos en la corteza. Con sus estiletes perforan las paredes de las células e inyectan secreciones que dan lugar a la formación de las células gigantes debido al agrandamiento de las células (hipertrofia) o a la posible disolución de paredes celulares, a un agrandamiento del núcleo y a cambios en la composición de los contenidos celulares. Al mismo tiempo, hay una intensa multiplicación de células (hiperplasia) alrededor de la cabeza de nematodo. Generalmente estos cambios son acompañados por el engrosamiento de la raíz formándose agallas o nódulos; mientras esto ocurre, aumenta el ancho del nematodo y a medida que continúa alimentándose, el cuerpo adquiere forma distinta a la de gusano y las gónadas se alargan (Taylor y Sasser, 1983).

Cuando se completan la segunda y tercera muda en la hembra, dan origen a los juveniles de tercero y cuarto estadio respectivamente. Poco después ocurre la cuarta muda, se forman el útero y la vagina y el patrón perineal se hace visible, dando lugar a la hembra adulta que tiene cuerpo piriforme; éstas, mediante un proceso de reproducción

conocido como partenogénesis producen huevecillos durante dos o tres meses y viven algún tiempo mas después de que cesa la producción de huevos (Triantaphyllou, 1973).

En el macho después de la segunda y tercera muda, el estilete no es visible y la gónada se alarga. Luego ocurre una rápida metamorfosis: el cuerpo cilíndrico y de gusano se desarrolla completo dentro de la cutícula, con estilete, espículas y esperma en los testículos. Enseguida abandona la raíz, se dirige al suelo y aquí muere, sin procurar a las hembras para realizar la copulación. La duración del ciclo se ve severamente afectada por la temperatura, la óptima para *M. incognita* es entre 25 y 30 °C (Taylor y Sasser, 1983).

Sintomatología.

Los síntomas aéreos en las plantas atacadas por este nematodo son similares a aquellos causados por otros patógenos radiculares y por condiciones ambientales que restringen la translocación de agua y nutrientes, observándose plantas con poco crecimiento, clorosis del follaje, marchitez y baja producción. El síntoma más característico ocurre en las raíces presentándose agallas o tumores, hiperplasia celular, reducción y deformación del sistema radicular y obstrucción mecánica de las raíces, En casos de ataques severos, la muerte es el final de los síntomas mencionados. (Taylor y Sasser, 1983; Tello y Del Moral, 2001).

Trichoderma spp

Este género pertenece a la Clase Deuteromicetos, Orden Moniliales, Familia Moniliaceae. Se reporta que algunas especies de Ascomycetos del género *Hypocrea* tienen a *Trichoderma* como estado imperfecto. Es un hongo del suelo que cuando desarrolla en medio de cultivo, produce colonias blancas, ligeramente amarillas o verdes que crecen rápidamente. El micelio es hialino, septado y origina grupos de conidióforos repetidamente ramificados con fialides simples o en grupos y conidios verdes que nacen en cabezas delgadas (Alexopoulos y Mims, 1979; Bissett, 1984).

Sus conidióforos son aterciopelados, irregulares y cortos, ramificados, no verticilados y sus ramas tienen una longitud de 150 μ ; en el segmento terminal produce conidias unicelulares, ovoides o esféricas que forman racimos globosos que se disocian con facilidad; también produce clamidosporas aunque no se ha estudiado su desarrollo e importancia, ni ha sido determinado su papel en la sobrevivencia del hongo (Alexopoulos y Mims, 1979; Lewis y Papavizas, 1988; Gams y Bisset, 1998)

Se han reportado 32 especies de *Trichoderma*, destacando entre ellas *T. harzianum* Rifai, *T. hamatum* (Bon.) Bain, *T. koningii* Oudem, *T. lignorum*, *T. piluliferum* Webster y Rifai, *T. polysporum* (Link Fr.) Rifai y *T. viridae* Pers. Ex. S. F. Gray, por su capacidad para actuar como antagonistas de patógenos de plantas (Samuels, *et al.*, 2002).

Trichoderma como agente de control biológico

El potencial de *Trichoderma* como agente de biocontrol fue reconocido por primera vez por Weindling en 1932; a partir de esa fecha numerosos investigadores han realizado estudios con este hongo tratando de entender los mecanismos y principios del control biológico de enfermedades de plantas y su potencial aplicación para incrementar la producción de cultivos (Mukerji y Garg, 1988).

Trichoderma es un modelo excepcional para el estudio del biocontrol porque es fácil de aislar en medio de cultivo, crece rápidamente en muchos sustratos, afecta un amplio rango de hongos fitopatógenos y no es patógeno de plantas. Se ha sugerido que varios mecanismos están involucrados en la actividad de biocontrol de *Trichoderma* y se cree que estos mecanismos nunca actúan de manera independiente. Enzimas como quitinasas, glucanasas y proteasas parecen ser muy importantes en el proceso de parasitismo; mientras que compuestos como trichodermina, dermadina, suzukacilina, alameticina y acetaldehído son antibióticos liberados por el hongo que dañan a los patógenos (Rodríguez-Kabana, *et al.*, 1978; Mukerji y Garg, 1988; Elad, 1995; Haran, *et al.*, 1996; Howell, 2003).

Trichoderma harzianum se ha reportado en la Costa de Hermosillo como parásito de hifas y esclerocios de hongos fitopatógenos como *Phymatotrichum omnivorum* (Shear) Duggar, *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid, *Fusarium solani* (Mart.) Sacc, *Monosporascus cannonballus* y *Alternaria cucumerina* (Ellis y Everth) (Esquer, F. F. 2004; López, 1996; Romo *et. al.*, 1997).

Uno de los aspectos más interesantes del control biológico es el estudio de los mecanismos utilizados por los agentes de biocontrol para llevar a cabo el control de la enfermedad. Investigaciones realizadas en el pasado indican que los mecanismos son muchos y muy variados, incluso dentro del mismo género *Trichoderma*. Con el fin de hacer mas efectivo el uso de agentes de control biológico, debe entenderse como trabajan y cuales son sus limitaciones (Howell, 2003).

Mecanismos de Acción

Debido a que el control biológico es el resultado de diferentes tipos de interacciones entre organismos, los investigadores se han enfocado en caracterizar los mecanismos que operan en diferentes situaciones. Howell (2003), menciona los siguientes:

Micoparasitismo y Producción de antibióticos (Toxinas). Se sabe que una de las características mas sobresalientes del genero *Trichoderma* es su habilidad para parasitar otros hongos. Weindling (1932) reportó el biocontrol que ejerció *T. lignorum* en *Rhizoctonia solani* como micoparasitismo, describiendo detalladamente como las hifas del agente de biocontrol se enrollaban alrededor de las hifas de *R. solani*, las penetraban y subsecuentemente disolvían el citoplasma. Este fenómeno ocurre a pesar del aporte de nutrientes externos al hospedero o al micoparásito. Aunque este autor menciona la posibilidad de que bajo ciertas circunstancias *T. lignorum* pudiera actuar como competidor por nutrientes contra *R. solani*, considera que el micoparasitismo es el principal mecanismo de biocontrol involucrado en esa relación.

El mismo Weindling (1934 y 1941)) encontró que una raza de *T. lignorum* producía un principio letal que era excretado en el medio que lo rodeaba permitiendo la actividad parasítica. Lo caracterizó, lo nombró como gliotoxina y demostró que era tóxico tanto para *R. solani* como para *Sclerotinia americana* Norton y Ezequiel. Después se demostró que el hongo que producía esta sustancia no era *T. lignorum*, sino *T. virens*. En los siguientes años muchos ejemplos de control biológico exitoso con especies de *Trichoderma* se han atribuido a los mecanismos de micoparasitismo y/o antibiosis.

Howell y Stipanovic (1983), aislaron y describieron un nuevo antibiótico, la gliovirina, a partir de *Gliocladium (Trichoderma) virens* que inhibió fuertemente a *Pythium ultimum* y a especies de *Phytophthora*, pero no a *R. solani*, *Phymatotrichum omnivorum* ni *Verticillium dahliae* Kleb.

Otro estudio demostró que *T. harzianum* y *T. koningii* controlaron varias especies de *Pythium* en chícharo mediante la producción de un factor tóxico que inhibió el crecimiento del patógeno y no debido a micoparasitismo o competencia (Lifshitz, *et. al.*, 1986).

Competencia. Este mecanismo es la habilidad para crecer y ocupar espacio rápidamente, estableciéndose en los diferentes nichos ecológicos; es importante porque un agente de control biológico que no compite por espacio y nutrientes, es incapaz de crecer en la rizosfera. Las especies de *Trichoderma*, ya sea aplicada al suelo o como tratamiento a las semillas, desarrollan junto con el sistema radicular de la planta tratada. A pesar de que este mecanismo no se considera entre los más importantes, definitivamente es un valor agregado para aquellos que lo ejercen (Harman, 2000)

Enzimas. Investigaciones acerca de posibles mecanismos involucrados en el control biológico que ejercen especies de *Trichoderma* han conducido a varias explicaciones alternativas para el control biológico exitoso. Una de las ideas que más ha progresado es que las enzimas como las quitinasas y/o glucanasas producidas por los

agentes de biocontrol son las responsables de la supresión del patógeno, ya que desdoblán los polisacáridos, la quitina y los β -glucanos responsables de la rigidez de la pared celular de los hongos, destruyendo la integridad de la misma.

Otros Mecanismos. *Trichoderma* posee otras características durante la interacción con plantas hospederas, que aunque no son de primera importancia como mecanismos en el control biológico, pueden contribuir a la tolerancia o resistencia a la enfermedad por parte de la planta. Estas características se manifiestan mediante un aumento del sistema radicular y del crecimiento vegetativo, en la resistencia a condiciones de estrés biótico y abiótico y en cambios en el nivel nutricional de la planta (Harman, 2000). Una característica peculiar de este hongo es que puede promover el crecimiento de las plantas y tiene la habilidad de colonizar la superficie radicular (Wells, 1988; Invar, *et. al.*, 1994 y Yedidia, *et. al.*, 1999).

Pal y McSpadden (2006) en su trabajo "Control Biológico de Patógenos de Plantas" clasifican los tipos de antagonismo de la siguiente forma:

- 1) Antagonismo directo, que incluye el mecanismo de hiperparasitismo/ predación.
- 2) Antagonismo combinado que incluye los siguientes mecanismos: Producción de antibióticos como 2,4-diacetilphloroglucino, fenazinas y lipopéptidos cíclicos; Enzimas líticas como quitinasas, glucanasas y proteasas; Productos de desecho no regulados como amonía, dióxido de carbono y ácido cianhídrico; Interferencia física o química como obstrucción de los poros del suelo, desvanecimiento de las señales de germinación y alteración de los mecanismos de reconocimiento molecular.
- 3) Antagonismo indirecto que incluye mecanismos como: Competencia que consiste en la ocupación de nichos físicos, consumo de exudados radiculares y eliminación de sideroforos

Mientras que muchos investigadores han intentado establecer la importancia de mecanismos específicos de control biológico en patosistemas particulares, es probable

que todos los mecanismos descritos operen, en cierta medida, en todos los ecosistemas, tanto naturales como manipulados. Además, los agentes de biocontrol más efectivos estudiados hasta la fecha son los que actúan sobre los patógenos usando múltiples mecanismos.

Trichoderma es reconocido principalmente por su antagonismo contra hongos fitopatógenos, aunque también se ha reportado como antagonista de algunas bacterias patógenas y más recientemente y en pocos estudios, como antagonista de nemátodos fitoparásitos (Mukerji y Garg, 1988; Spiegel y Chet, 1998; Sharon, *et. al.*, 2001).

Numerosos organismos son antagonistas de nemátodos fitoparásitos, sin embargo ciertos hongos parecen ser los más apropiados para ejercer un control biológico eficiente sobre ellos (Meyer y Roberts, 2002) Estos organismos pueden actuar como nematófagos, depredadores, endoparásitos, parásitos de huevecillos, parásitos de quistes, o produciendo metabolitos tóxicos para los nemátodos. (Saxena y Mukerji, 1988). Uno o varios mecanismos pueden potencialmente estar involucrados en el biocontrol de nemátodos, sin embargo, la información acerca del posible mecanismo es muy limitada; entender este proceso permitirá mejorar y eficientar este método de biocontrol (Windham *et. al.*, 1989).

En trabajos realizados por Sharon *et. al.* (2001), donde evaluaron el efecto de tres aislamientos: *Trichoderma harzianum* T-203, un aislamiento nativo de Israel llamado WT y una línea transformada IMI 206040 previamente manipulada genéticamente para la sobreexpresión de la actividad del gen PrbI proteinasa, sobre *Meloidogyne javanica* en tomate, reportan que todas ellas disminuyeron drásticamente la formación de agallas en las raíces, presentándose además una significativa mejoría en el peso fresco radicular en comparación con el testigo no tratado. También encontraron que las tres cepas fueron capaces de penetrar los huevos y los juveniles (J2) del nematodo, concluyendo que el mecanismo de acción involucrado es el parasitismo directo y que incrementando la actividad proteolítica de las cepas de Trichoderma, aumenta la capacidad de antagonismo.

Khan, *et. al.*, (1997), aplicó los hongos *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samsom y *Trichoderma harzianum* contra *Meloidogyne incognita* y *Fusarium solani* en plantas de papaya que crecieron en macetas con suelo esterilizado, encontrando que cada agente de biocontrol aplicado solo, aumentó el vigor de las plantas, redujo el número de nemátodos y disminuyó la incidencia de pudrición de raíz; sin embargo la aplicación combinada de ambos fue mucho mas efectiva.

Esquer, F. R. (2004), al evaluar el efecto de *Trichoderma harzianum*, extractos del hongo *Myrothecium verrucaria* Alb. Y Shwein (Ditera DF), un nematicida orgánico a base de quitina (Nematrol) y un producto cuyo ingrediente activo es un extracto del árbol *Quillaja saponaria* Mol. (QL.Agri), sobre *Meloidogyne incognita* en tomate, encontró que *Trichoderma harzianum* fue el mejor tratamiento ya que las plantas presentaron menor porcentaje de agallas, la población de juveniles en el suelo disminuyó y la altura de las plantas fue mayor que en el resto de los tratamientos.

MATERIALES Y METODOS

Este experimento se realizó en el Departamento de Agricultura y Ganadería de la Universidad de Sonora y consistió de dos etapas:

- 1) Trabajos *in vivo* utilizando plantas de tomate en cámara de crecimiento
- 2) Trabajos *in vitro* utilizando portaobjetos de doble cámara en condiciones de laboratorio

Trabajos *in vivo*.

Se utilizaron plántulas de tomate de 45 días de edad de la variedad Brigade (tipo saladette, crecimiento determinado) de Seminis Vegetable Seeds Co., que crecieron en macetas con 1.3 Kg de arena (análisis de suelo en Apéndice). Las macetas se desinfectaron con una solución de agua, alcohol, cloro en proporción 6:2:2. La arena se esterilizó mediante autoclave a 30 libras por pulgada cuadrada durante 30 minutos.

Los tratamientos fueron los siguientes:

- 1.- *M. incognita* + *T. harzianum* vivo
- 2.- *M. incognita* + Filtrado de *T. harzianum*
- 3.- *M. incognita* + *T. harzianum* vivo + Filtrado de *T. harzianum*
- 4.- *M. incognita*
- 5.- *T. harzianum* vivo
- 6.- Filtrado de *T. harzianum*
- 7.- Testigo con suelo esterilizado
- 8.- Testigo con suelo no esterilizado

El diseño experimental fue completamente al azar con 8 tratamientos y 5 repeticiones.

El inóculo de *Meloidogyne incognita* se obtuvo de raíces de plantas de vid que crecieron en suelo naturalmente infestado en el “Campo Vanessa” de la Costa de Hermosillo. Las raíces con agallas se llevaron al Laboratorio de Fitopatología y se procesaron mediante la técnica de Extracción de huevecillos de McClure (1973) modificada por Jiménez *et. al.*, (1985) que consiste en lavarlas con agua de la llave quitando suavemente los restos de suelo, cortarlas en trozos de aproximadamente 1 cm de largo, mezclarlas, pesar 20 gramos de este material y colocarlo en batidora eléctrica, agregarle 180 ml de agua destilada y después 20 ml de cloro comercial (Fig. 1), batir durante 3 minutos e inmediatamente después verter el material en una cubeta que contenga abundante agua (10 a 12 litros), pasarla a través de los tamices de 40, 200 y 400 mallas recogiendo el líquido en otra cubeta limpia, lavar los trozos de raíz que quedaron en los tamices para arrastrar la mayor cantidad de huevecillos a la segunda cubeta, pasar el líquido colectado por un tamiz de 500 mallas donde quedan retenidos los huevecillos, lavarlos con agua destilada usando una piseta. Se recogen en un vaso de precipitado, se afora a un volumen determinado y se realiza el conteo utilizando el microscopio de disección.

Cada maceta se inóculó con 50 c.c. de suspensión con una concentración de 800 huevecillos/c.c. (Fig. 2), vertiéndola en 4 perforaciones de 4 cm de profundidad (Fig. 3).



Fig. 1.- Material y equipo utilizado para la extracción de huevecillos de *Meloidogyne*.

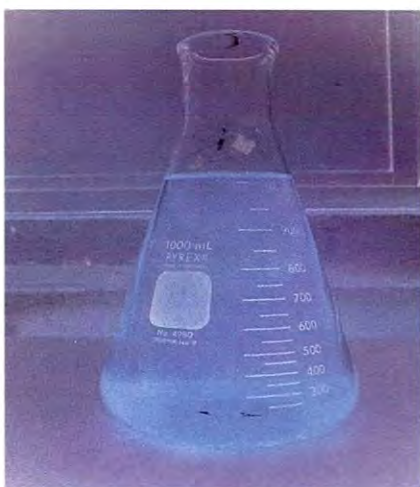


Fig. 2.- Suspensión de huevecillos obtenida mediante la técnica de McClure (1973).



Fig. 3.- Perforaciones en las que se vertió la suspensión de huevecillos de *M. incognita*, en cada maceta.

Para preparar el inóculo del hongo, se utilizó un cultivo monospórico de la cepa B II de *Trichoderma harzianum* (Fig. 4), posteriormente se multiplicó en placas petri con medio Papa-Dextrosa-Agar (PDA) y se incubó a 27 °C durante 7-10 días. Se preparó una suspensión licuando en agua destilada el contenido de varias placas petri con el hongo, se vació en un vaso de precipitado y se aforó hasta obtener una concentración de 1.4×10^7 esporas por c. c. Cada maceta se inoculó con 50 c.c. de esta suspensión, vertiéndola en las perforaciones antes mencionadas.



Fig. 4.- *Trichoderma harzianum* en placa Petri, después de 7 días de incubación.

El filtrado del hongo se obtuvo en el Laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario de este Departamento mediante la técnica utilizada por Siddiqui, *et. al.* (2001). Consistió en hacer crecer el hongo en medio de cultivo PDA durante 7 días, licuarlo obteniendo una suspensión con concentración de 5.3×10^7 esporas/ml y mediante bomba de vacío filtrarla cuatro veces utilizando papel Whatman No. 40 (Fig.5). Después se colocó en baño maría durante 10 minutos a 60°C , con el fin de matar cualquier estructura viva de *Trichoderma*. Se utilizaron 20 c.c. de este líquido por maceta, vertiéndolos en las perforaciones antes mencionadas, en los tratamientos correspondientes.



Fig. 5.- Obtención del filtrado de *Trichoderma* mediante la técnica de Siddiqui, *et. al.* (2001):

Después de inocular nematodo y hongo, las plantas se colocaron en una cámara de crecimiento a temperatura ambiente con luz fluorescente durante 12 horas diarias (Fig. 6). Se fertilizaron con solución nutritiva de O'Leary (N, 144; P, 62; K 156; Mg, 48; Ca, 165; S, 64; Fe, 5; B, 1; Mn, 0.40; Cu, 0.02; Zn, 0.09; Cl, 0.50 y Mo, 0.30 ppm) cada tercer día y con agua destilada cuando fue necesario. Con el fin de controlar el crecimiento vegetativo se realizaron 4 podas (Fig. 7), la primera 10 días después del trasplante y el resto con intervalos de 15 días. Durante el desarrollo del experimento se aplicaron al follaje los siguientes productos:

- a) Agrimec (Abamectina), 1 c.c./l, el día del trasplante y 15 y 30 días después, para control de minador.
- b) Lepinox (*Bacillus thuringiensis*), 30 y 45 días después del trasplante, para control de gusano bellotero.



Fig.6.- Plantas de tomate inoculadas, en cámara de crecimiento.



Fig. 7.- Poda de plantas de tomate de los diferentes tratamientos.

A los 35 días de la inoculación se tomó una raíz pequeña de una de las plantas del tratamiento 4 (inoculadas con *Meloidogyne*) con la finalidad de verificar la infección por parte del nematodo, mediante la presencia de agallas.

Diez semanas después de la inoculación se sacaron las plantas de la cámara de crecimiento, se llevaron al Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Agricultura y Ganadería, se extrajeron de las macetas y los tratamientos se evaluaron tomando como base las siguientes variables: a) Peso fresco de raíz y b) Número de agallas presentes en la totalidad de las raíces de cada una de las plantas de los diferentes tratamientos.

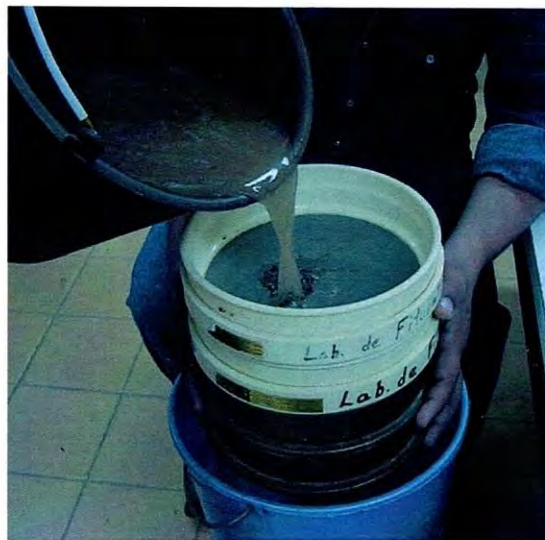
ANÁLISIS ESTADÍSTICO. Se utilizó el programa JMP versión 6.0 para el análisis de varianza y la prueba de Tukey, con nivel de significancia del 0.05.

EXTRACCION DE HUEVECILLOS Y JUVENILES.- Después de sacar las raíces de las macetas, se procesó el suelo contenido en cada una de ellas, mediante la técnica de los tamices con el fin de recolectar los huevecillos y juveniles de *Meloidogyne* de cada tratamiento, en caso de existir. La técnica utilizada consistió en colocar el suelo de cada maceta en una cubeta con agua (8 litros aproximadamente) (Fig.

8a), revolverla, pasarla a través de los tamices de 40, 60, 100, 200 y 325 mallas y recogerla en una segunda cubeta (Fig. 8b), lavar los tamices con una piseta (Fig. 8c), el agua de la segunda cubeta pasarla a través de los tamices de 400 y 500 mallas (Fig. 8d), recoger el contenido de estos últimos en una caja de syracuse y observar al microscopio.



a



b



c



d

Fig. 8.- Secuencia fotográfica que ilustra la técnica utilizada para recolectar huevecillos y juveniles de *Meloidogyne* a partir del suelo de cada una de las macetas de los diferentes tratamientos, 10 semanas después de la inoculación.

TINCIÓN DE RAÍCES Y NEMATODOS. Porciones de raíces de plantas de cada tratamiento se tiñeron sumergiéndolas durante 2 minutos en una mezcla hirviendo

de cristales de fenol (20 g), ácido láctico (20 g), glicerina (40 g), Fucsina acida al 1% (5 ml) y agua (20 ml); después se colocaron en una solución decolorante que se preparó de la misma forma que la mezcla anterior pero sin colorante. A las 24 horas se hicieron observaciones al microscopio de disección y al compuesto.

CORTES PERINEALES. Con el objetivo de confirmar la especie de *Meloidogyne* se realizaron 12 cortes perineales de hembras obtenidas de raíces de plantas de tomate inoculadas de los tratamientos 1, 2, 3 y 4.

Trabajos *in Vitro*.

Los experimentos *in vitro* se llevaron a cabo utilizando portaobjetos con cámara doble (Two-well chamber slides, Nunc Inc., Naperville, IL.) (fig. 9) con medio de cultivo Phytigel (Sigma Chemical) al 1% donde se colocaron los siguientes estadios de *M. incognita*:

- a.- Masas de huevecillos (2)
- b.- Huevecillos separados de las masas (30 a 40)
- c.- Juveniles de 2º estadio (15 a 20)
- d.- Raíces con hembras con masa de huevecillos (2) (Fig. 10)
- e.- Raíces con hembras sin masa de huevecillos (2) (Fig. 11)



Fig 9.- Portaobjetos con cámara doble (Two-well chamber slides, Nunc Inc., Naperville, IL.) donde se realizaron los experimentos *in vitro*.

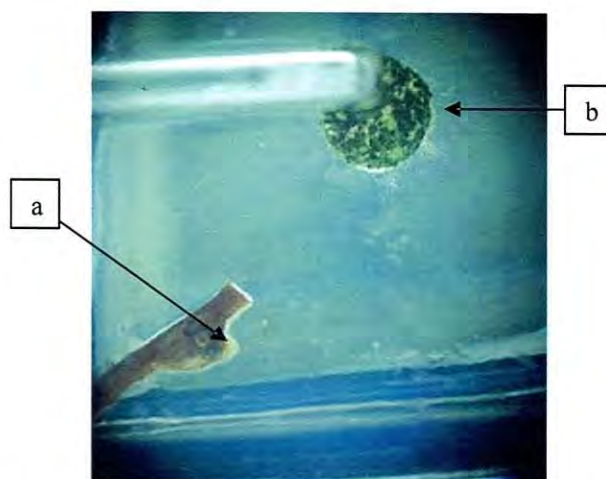


Fig. 10.- Cámara con medio de cultivo Phytigel donde se inocularon raíz con hembra y masa de huevecillos de *M. incognita* (a) y disco de agar con *T. harzianum* (b).

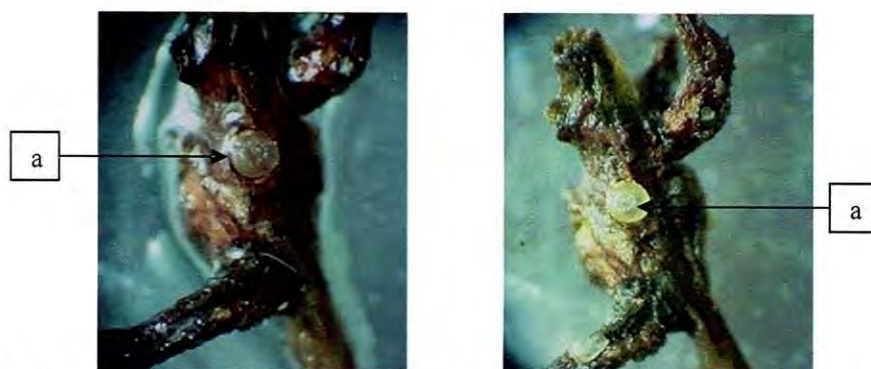


Fig. 11.- Raíces de vid con hembras de *M. incognita* (a) sin masa de huevecillos, que se inocularon con *Trichoderma* en cámara con medio de cultivo Phytigel.

Los diferentes estadios de *Meloidogyne incognita* se obtuvieron de la siguiente manera: los huevecillos separados de las masas se extrajeron de las raíces mediante la técnica de McClure (1973) modificada por Jiménez *et. al.* (1985), mencionada anteriormente; las masas de huevecillos se obtuvieron directamente de las raíces; los juveniles (J_2) se obtuvieron a partir de suelo infestado naturalmente mediante la técnica del embudo de Baermann y para las pruebas con hembras se utilizaron trozos de raíces que contenían una o varias de ellas; dejando la masa de huevecillos para una prueba y retirándola para otra.

El inóculo de *Trichoderma* y el extracto se obtuvieron mediante los mismos procedimientos que las pruebas *in vivo*.

Masas de huevecillos, huevecillos solos y juveniles de 2º estadio se desinfectaron colocándolos en una solución de cloruro mercuríco 10 ppm durante 1 minuto; las raíces con hembras con y sin masa de huevecillos se desinfectaron en solución de cloralex al 10 % durante 2 minutos.

En cada cámara se colocaron 1 o 2 discos de agar de 5 mm de diámetro con el hongo *Trichoderma* que previamente se desarrolló en PDA. Las cámaras se incubaron en oscuridad a 27 °C.

Cada uno de los experimentos (masas de huevecillos, huevecillos separados, juveniles, hembras con masa de huevecillos y hembras solas) consistió de 3 tratamientos y 4 repeticiones. Los tratamientos fueron los siguientes:

- a) Etapa de desarrollo del nematodo + Disco de agar con *Trichoderma*
- b) Etapa de desarrollo del nematodo + 50 Microlitros de filtrado de *Trichoderma*
- c) Etapa de desarrollo del nematodo sin *Trichoderma* (testigo)

La interacción hongo-nematodo se observó al microscopio de disección y al compuesto cada 24 horas durante 8 días y después cada 3 días durante un mes.

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar.

Para confirmar la especie de *Meloidogyne* se realizaron 10 cortes perineales de hembras obtenidas de las raíces utilizadas para los experimentos *in vitro*.

RESULTADOS Y DISCUSION

Trabajos en “cámara de crecimiento”

Después de 35 días de la inoculación se confirmó la infección por parte del nematodo en las plantas de tomate, al observarse la presencia de agallas, hembras y masas de huevecillos en raíces de una de las plantas del tratamiento 4 (inoculadas con *Meloidogyne*) (Fig. 12).

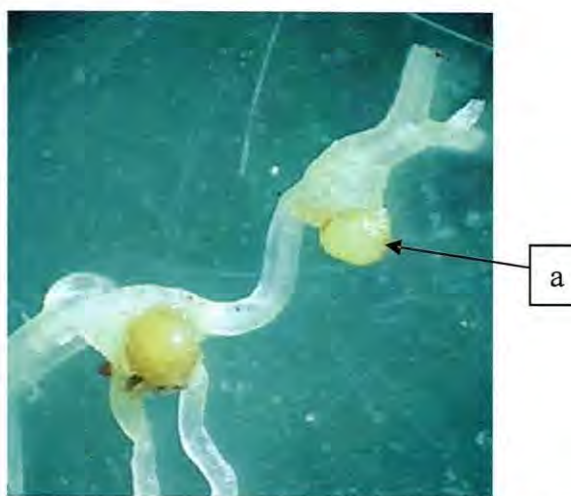


Fig- 12.- Raíz de planta del tratamiento cuatro (*Meloidogyne*) con agallas, hembras y masas de huevecillos (a), 35 días después de la inoculación.

Peso fresco de raíz

En relación al peso fresco de raíces de las plantas de tomate, al realizarse la prueba de Tukey, se observó que hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, encontrándose dos grupos. El primero integrado por los tratamientos 2 (*Meloidogyne* + Extracto), 5 (*Trichoderma*), 6 (Extracto), 4 (*Meloidogyne*) y 1 (*Meloidogyne* + *Trichoderma*); que tuvieron el mayor peso de raíces; el segundo grupo formado por los tratamientos 7 (Testigo en suelo esterilizado), 8 (Testigo en suelo no esterilizado), 3 (*Meloidogyne* + *Trichoderma* + Extracto), 6 (Extracto), 4 (*Meloidogyne*) y 1 (*Meloidogyne* + *Trichoderma*) que mostraron el menor peso. Los resultados del peso fresco de raíz de cada una de las plantas de los diferentes tratamientos y sus medias con la significancia estadística, diez semanas después de la inoculación, se muestran en los

Cuadros 1 y 2 respectivamente. En las Fig. 13 y 14 se observa el sistema radicular de todas las plantas inoculadas.

Cuadro 1.- Peso en gramos del sistema radicular de cada una de las plantas de tomate de los diferentes tratamientos, diez semanas después de la inoculación.

NO. DE PLANTA	TRATAMIENTOS							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	4.1*	7.0	2.9	4.6	7.9	5.1	3.6	3.2
2	4.6	3.3	2.5	4.3	4.8	4.8	3.4	2.5
3	3.4	5.2	2.5	7.1	5.0	4.6	4.4	3.5
4	3.6	10.3	3.3	4.4	7.4	4.2	1.5	2.8
5	3.8	6.5	3.6	2.9	6.2	7.1	2.0	2.8
SUMA	19.5	32.3	14.8	23.3	31.3	25.8	14.9	14.8
MEDIA	3.90	6.46	2.96	4.66	6.26	5.16	2.98	2.96

*Peso en gramos

Cuadro 2.- Medias del peso en gramos del sistema radicular de las plantas de tomate de cada tratamiento diez semanas después de la inoculación y significancia estadística en base a la prueba de Tukey.

TRATAMIENTO	Peso Media *	Grupo**
2 Meloidogyne + Extracto	6.46	a
5 Trichoderma	6.26	a
6 Extracto	5.16	ab
4 Meloidogyne	4.66	ab
1 Meloidogyne + Trichoderma	3.90	ab
7 Testigo suelo esterilizado	2.98	b
8 Testigo suelo no esterilizado	2.96	b
3 Meloidogyne + Trichoderma + Extracto	2.96	b

*Peso en gramos

**Tukey 0.05: Medias con igual letra, en la misma columna, no son estadísticamente diferentes



Fig. 13.- Raíces de plantas de tomate de los diferentes tratamientos, 10 semanas después de la inoculación, con el número de tratamiento en recuadro.



Fig. 14.- Acercamiento de raíces de plantas de los tratamientos 3, 4 y 7.

Numero de agallas en las raíces

Cuadro 3.- Número de agallas presentes en el sistema radicular de cada una de las plantas de los diferentes tratamientos, diez semanas después de la inoculación.

NO. DE PLANTA	TRATAMIENTOS			
	1 Meloidogyne + Trichoderma	2 Meloidogyne + Filtrado	3 Meloidogyne + Trichoderma + Filtrado	4 Meloidogyne (Testigo)
1	30*	15	8	40
2	31	21	12	67
3	13	11	12	65
4	9	13	5	34
5	23	15	14	45
SUMA	106	75	51	251
MEDIA	21.2	15.0	10.2	50.2

*Numero de agallas

Respecto al número total de agallas presentes en las raíces de tomate inoculadas, al efectuar la prueba de Tukey, los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, observándose dos grupos estadísticos; uno en el que los tratamientos 1 (Meloidogyne + Trichoderma), 2 (Meloidogyne + Extracto) y 3 (Meloidogyne + Trichoderma + Extracto) se mostraron iguales entre si, pero diferentes al testigo; el segundo grupo estuvo formado por el tratamiento 4 (Testigo-Meloidogyne), el cual presentó el mayor número de agallas (Cuadros 3 y 4).

Cuadro 4.- Medias del número de agallas presentes en la raíz de tomate de cada tratamiento diez semanas después de la inoculación y significancia estadística en base a la prueba de Tukey.

TRATAMIENTO	Numero Agallas Media *	Grupo**
Meloidogyne (Testigo) Tratamiento 4	50.2	a
Meloidogyne + Trichoderma Tratamiento 1	21.2	b
Meloidogyne + Filtrado Tratamiento 2	15.0	b
Meloidogyne + Trichoderma + Filtrado Tratamiento 3	10.2	b

*Numero de agallas presentes en el sistema radicular

**Tukey 0.05: Medias con igual letra, en la misma columna, no son estadísticamente diferentes

EXTRACCION DE HUEVECILLOS Y JUVENILES.- En los tratamientos 1, 2, 3, 5, 6, 7 y 8 no se recuperaron del suelo huevecillos ni juveniles del nematodo; únicamente en el suelo inoculado con Meloidogyne (Tratamiento 4) se extrajeron gran cantidad de huevecillos; pudiéndose observar diferentes grados de desarrollo de ellos (Fig. 15a) y juveniles de primer y segundo estadios (Fig. 15b)

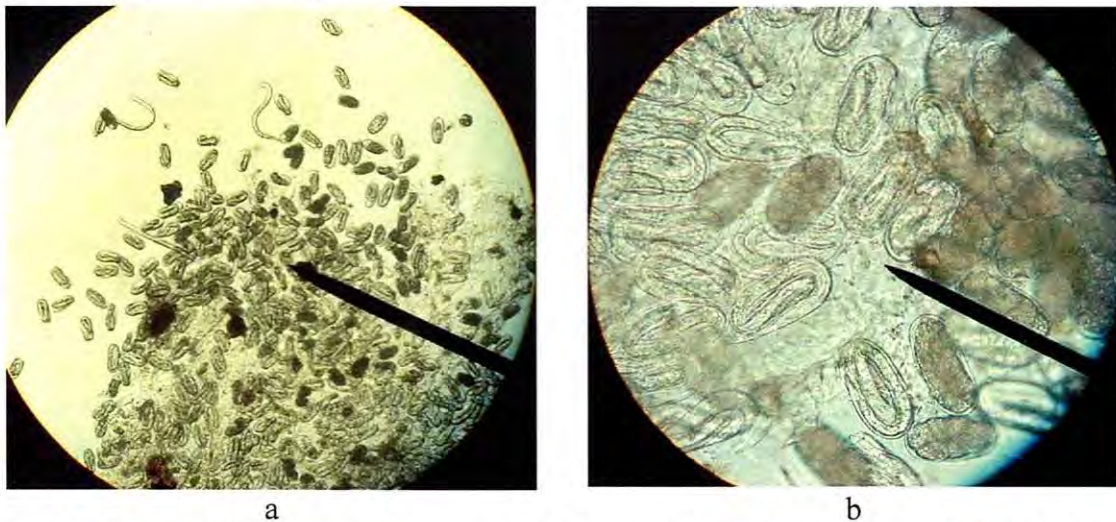


Fig. 15.- Huevecillos y juveniles recuperados del suelo de plantas de tomate inoculadas con Meloidogyne (Tratamiento 4), 10 semanas después de la inoculación.

TINCIÓN DE NEMATODOS.-Las raíces de tomate que crecieron durante 10 semanas en suelo inoculado con nematodo y sin Trichoderma vivo o su filtrado (Testigo- Tratamiento 4) mostraron que gran cantidad de huevecillos produjeron juveniles, penetraron las raíces y se convirtieron en hembras adultas (T4) (Figuras 19 y 20),

mientras que en aquellas en las que se aplicó el hongo, su filtrado o ambos (Tratamientos 1, 2 y 3) se observaron pocas hembras (Figuras 16, 17 y 18) y consecuentemente una drástica reducción en el agallamiento de las raíces, comparadas con las del Testigo. Los tratamientos 5, 6, 7 y 8 no se ilustran con fotografías en razón de que no fueron inoculados con *Meloidogyne* y en consecuencia no mostraron agallas ni nematodos.



Fig. 16.- Raíz de tomate del tratamiento 1 (*Meloidogyne* + *Trichoderma*) con agallas y hembras en su interior.



Fig. 17.- Raíz de tomate del tratamiento 2 (Meloidogyne + filtrado) con agalla y hembra en su interior.

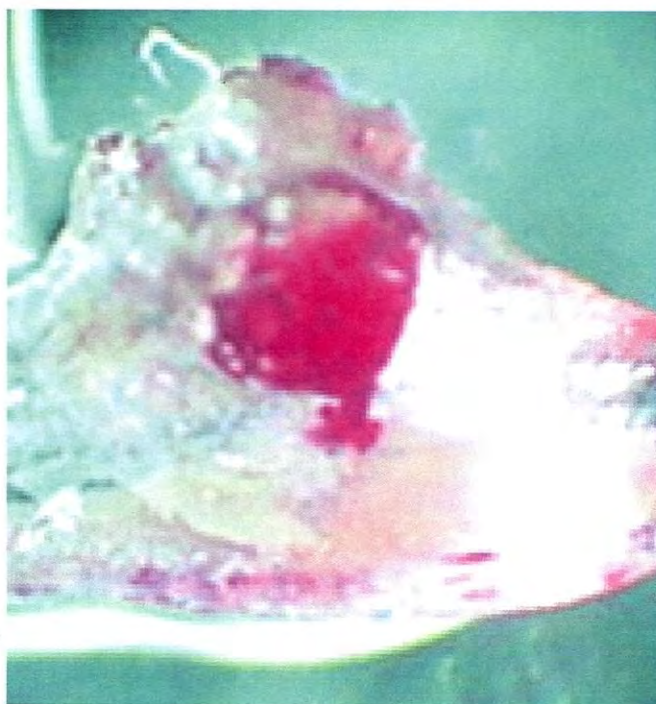


Fig. 18- Raíz de tomate del tratamiento 3 (Meloidogyne + Trichoderma + Filtrado) con agalla y hembra en su interior.



Fig. 19.- Raíz de tomate del tratamiento 4 (Meloidogyne) con agalla y hembra en su interior.



Fig. 20.- Raíces de tomate del tratamiento 4 (Meloidogyne) con agallas y hembras en su interior.

CORTES PERINEALES.- En base a 12 cortes perineales de hembras obtenidas de tomate de los tratamientos 3 (Meloidogyne + Trichoderma + Filtrado) y 4 (Meloidogyne), se determinó que la especie fue *Meloidogyne incognita* (Fig. 21).

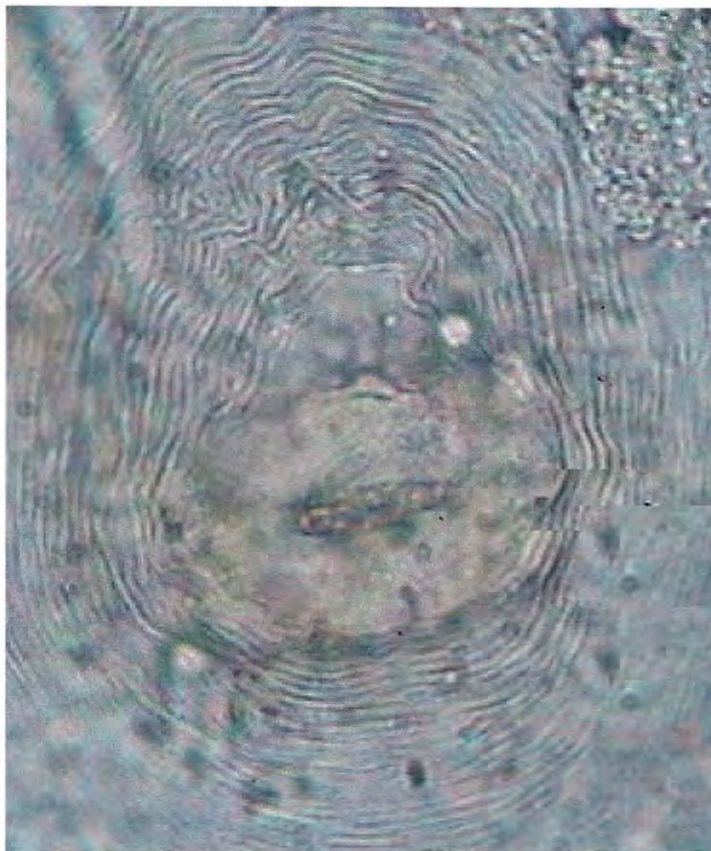


Fig. 21.- Corte perineal de hembra de *M. incognita* obtenida de raíces de tomate y utilizada para los experimentos en cámara de crecimiento.

Trabajos *in vitro*

En relación a los diferentes estadios de *Meloidogyne* incubados con el hongo vivo los resultados fueron los siguientes: *Trichoderma* fue capaz de desarrollar sobre los huevecillos separados de las masas, enroscarlos (Fig. 22a), así como penetrar y crecer dentro de ellos (Fig. 22b), también se observó desarrollo de hifas en juveniles de primer estadio (J1) (Fig. 23), en la matriz gelatinosa de las masas de huevecillos (Fig. 24) y en hembras sin masas de huevecillos las cuales fueron colonizadas completamente por el hongo (Figuras 25, 26 y 27). Los juveniles de segundo estadio (J2) y las hembras con masas de huevecillos no fueron parasitados por el hongo.



Fig.22.- Hifas de *Trichoderma* enroscadas (a) y en el interior de huevecillos de *Meloidogyne* (b), con 10 y 14 días de incubación respectivamente.

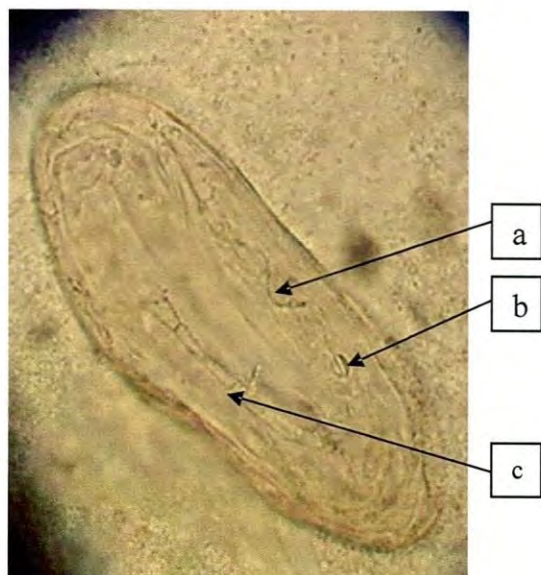


Fig. 23.- Juvenil (J1) donde se aprecian lumen (a) y metacarpus (b) característicos de *M. incognita*, con hifas (c) de *T. harzianum* en su interior.

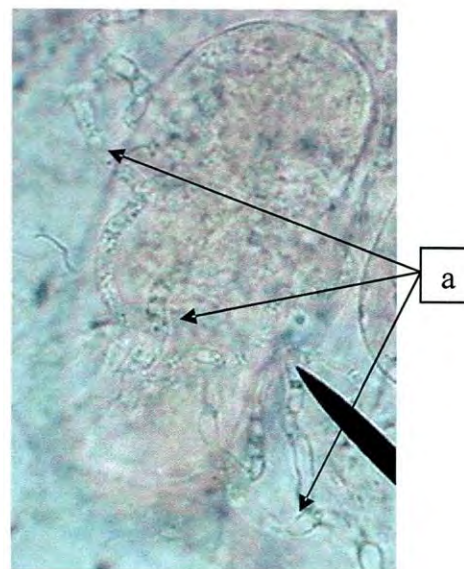


Fig. 24.- Desarrollo de hifas de *T. harzianum* en matriz gelatinosa (a) de *M. incognita*.

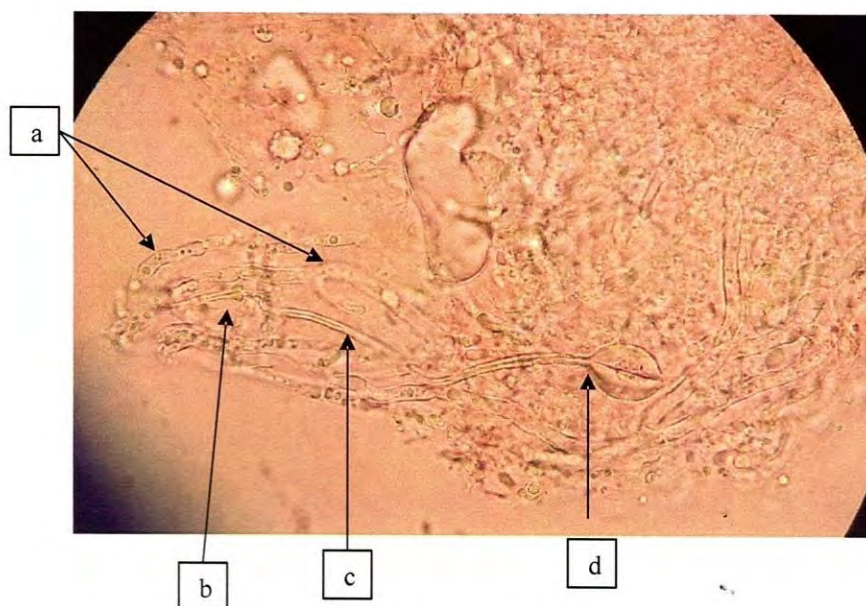


Fig. 25.- Hembra de *M. incognita* parasitada por *T. harzianum*, con hifas (a) en su interior. Se aprecian claramente estilete (b), lumen (c) y válvula del metacarpus (d).



Fig. 26.- Parte posterior de una hembra de *M. incognita* parasitada por *T. harzianum*, con hifas en su interior (a), observándose su patrón perineal (b).



Fig. 27.- Desarrollo de micelio de *T. harzianum* sobre hembra de *M. incognita* (a) sin masa de huevecillos, 48 horas después de la incubación en cámara dual.

El filtrado del hongo afectó huevecillos separados de las masas y en menor cantidad aquellos que se encontraban dentro de las masas; notándose en comparación con el testigo (Fig. 28), diferentes alteraciones a partir del 5^o día de incubación, como deformación (Fig. 29 a y c), degradación y destrucción de su contenido (Fig. 29 b y d). No se observó ningún efecto sobre hembras con o sin masa de huevecillos ni en juveniles de segundo estadio (J2).



Fig. 28.- Huevecillo de *M. incognita* después de 5 días de incubación sin Trichoderma (Testigo).

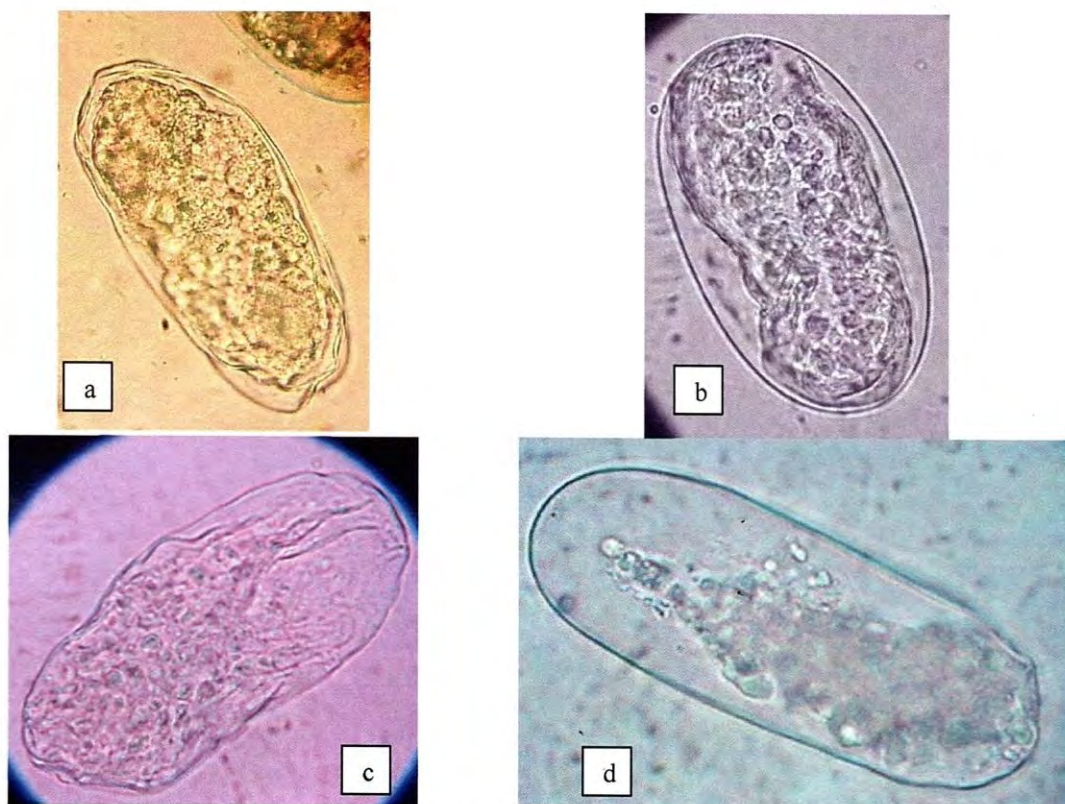


Fig. 29.- Huevecillos de *M. incognita* con diferentes tipos de alteraciones después de 5 (a y b) y 7 (c y d) días de incubación con filtrado de *T. harzianum*.

CORTES PERINEALES.- En base a 10 cortes perineales de hembras utilizadas en las pruebas *in vitro*, se confirmó que la especie fue *Meloidogyne incognita* (Fig. 30).

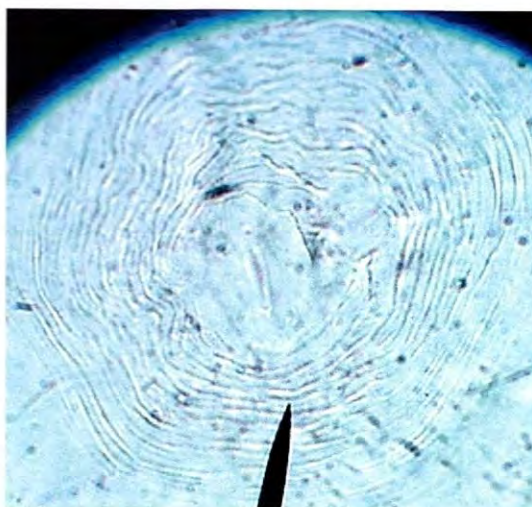


Fig. 30.- Corte perineal de hembra utilizada en los experimentos *in vitro*.

Observaciones Adicionales.- En una de las pruebas *in vitro* donde se utilizaron juveniles de segundo estadio de *Meloidogyne*, a los cinco días de incubación se observaron nemátodos del género *Rhabditis* con esporas de *Trichoderma* dentro del estoma (Fig. 31), así como especímenes parasitados por *Trichoderma* (Figuras 32 y 33).

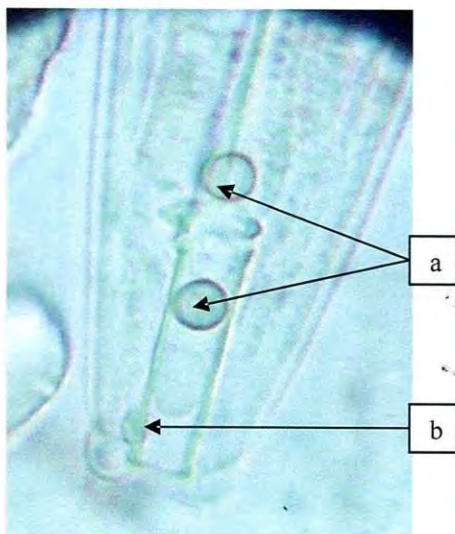


Fig. 31.- Conidias de *Trichoderma* (a) en el interior del estoma (b) de *Rhabditis sp.*

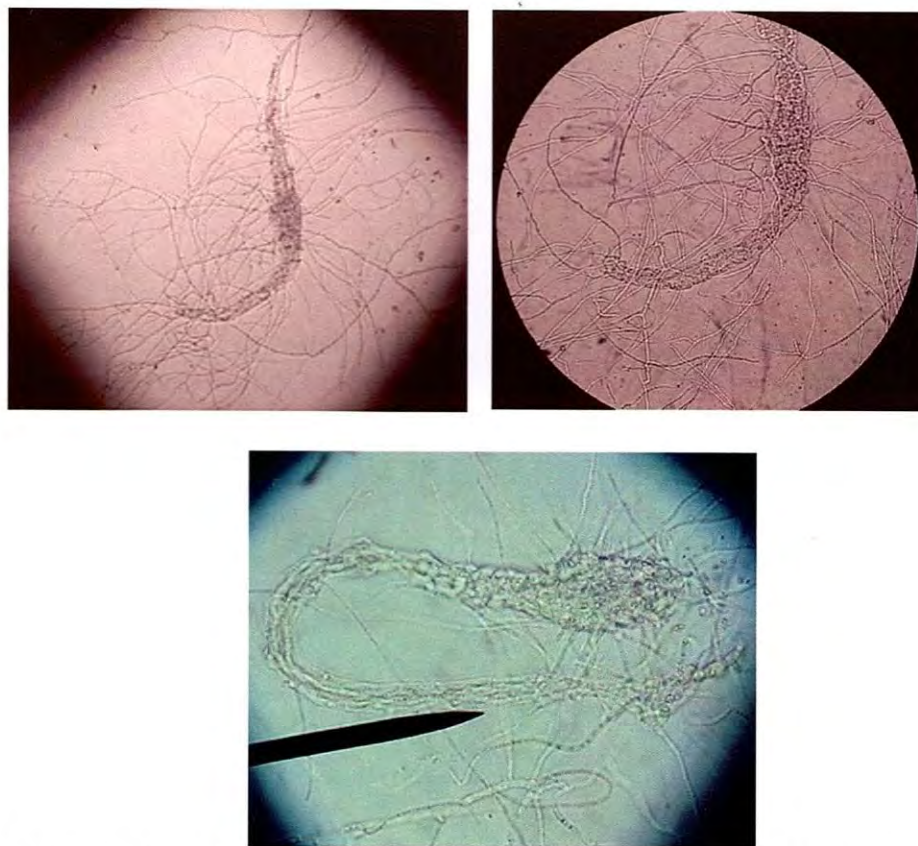


Fig. 32.- Nemátodos del género *Rhabditis sp* parasitados por *Trichoderma harzianum*.

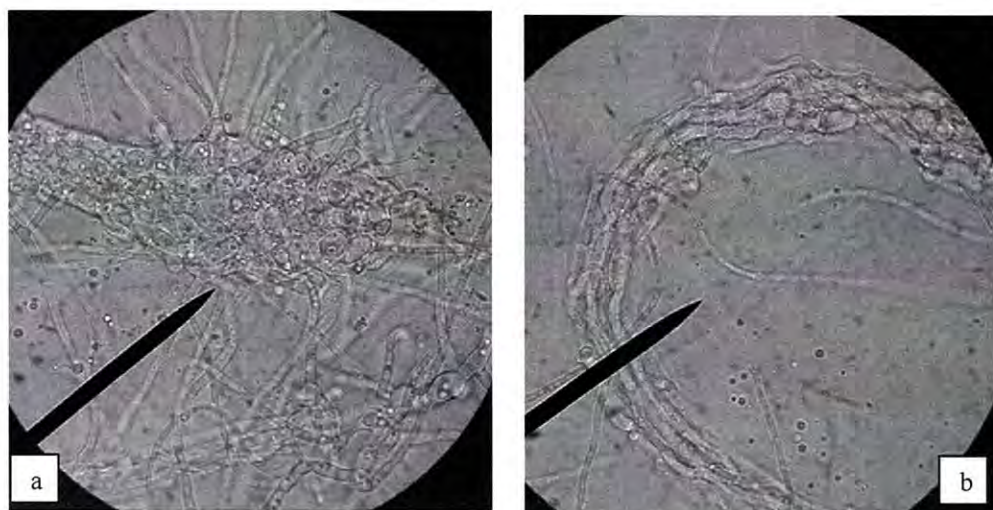


Fig. 33.- Acercamiento de la parte anterior (a) y media (b) del cuerpo de *Rhabditis*, parasitado por *Trichoderma*.

Trichoderma harzianum mostró una evidente actividad de control contra el nematodo *Meloidogyne incognita*, en plantas de tomate que desarrollaron en cámara de crecimiento, obteniéndose un efecto significativo en la reducción del número de agallas en las plantas que fueron tratadas con el hongo, con su filtrado o con ambos, en comparación con el testigo. Estos resultados confirman la capacidad de *T. harzianum*, reportada en numerosos trabajos (Rodríguez-Kabana, *et. al.*, 1978; Mukerji y Garg, 1988; Elad, 1995, Esquer, F. F. 2004; Haran, *et. al.*, 1996; Howell, 2003; Sharon *et. al.*, 2001), de utilizar varios mecanismos para ejercer un control biológico efectivo.

La presencia de numerosas agallas en las plantas tratadas con *Meloidogyne* solo y la disminución de las mismas en las inoculadas con *Meloidogyne* y *Trichoderma* revela que pocos nemátodos penetraron las raíces en suelos tratados con el hongo, pero una vez dentro de ellas, el desarrollo del nematodo no se detiene o inhibe; Sharon, *et. al.*, (2001) sugiere que la principal actividad antinematodo causada por *T. harzianum* tiene lugar en el suelo y no dentro de las raíces.

El hecho de recuperar huevecillos únicamente del suelo de las plantas tratadas con *Meloidogyne* solo (Tratamiento 4) indica que el nematodo en presencia de *Trichoderma* o de su filtrado, fue incapaz de causar infección y reproducirse en las

raíces, en cambio, en ausencia del hongo penetró las raíces y completó su ciclo de vida hasta la formación de hembras y producción de huevecillos.

En este trabajo se observó parasitismo más marcado en hembras sin masa de huevecillos y huevecillos separados de las masas, que en hembras que tenían la masa de huevos adherida o en los huevecillos que se encontraban en la matriz gelatinosa, aunque el hongo colonizó finalmente esta última, lo que parece indicar que la masa gelatinosa les brinda cierta protección a los huevos. Lo anterior concuerda con Santos *et. al.*, (1992) quienes al evaluar *T. harzianum* y *Paecilomyces lilacinus* entre otros hongos, como agentes de biocontrol contra *M. incognita*, encontraron que estos colonizaron la matriz gelatinosa, pero muy pocos huevos fueron parasitados, a diferencia de los resultados obtenidos por Freire y Bridge (1985), al trabajar con *P. lilacinus* y *Verticillium chlamidosporium* que consideran que la matriz gelatinosa facilitó el parasitismo debido a la agregación de los huevecillos.

Sharon *et. al.*, (2001) concluyen que es necesario utilizar el hongo vivo para obtener un control biológico exitoso en invernadero y en laboratorio porque según sus resultados la aplicación de la preparación sola de Trichoderma al sistema radicular no resultó en suficiente control biológico, no previno la penetración de nemátodos ni su desarrollo en el interior de las raíces; sin embargo nuestros resultados demostraron que tanto el hongo vivo como su filtrado ejercieron un control biológico efectivo contra *M. incognita* en cámara de crecimiento y en pruebas *in vitro*.

En el presente trabajo, la aplicación de nematodo, hongo vivo y filtrado del mismo a las macetas se realizó 5 días después del trasplante. Es recomendable modificar la secuencia de las aplicaciones en futuros experimentos, inoculando primero el nematodo, después el hongo y posteriormente efectuar el trasplante, ya que Sharon (2001) al monitorear diferentes estados de desarrollo de *Meloidogyne javanica* dentro de raíces de tomate plantado en suelos tratados con *Trichoderma harzianum*, mostraron que pocos nematodos penetraron las raíces en suelos tratados con el hongo en comparación con los no tratados; concluyendo que las aplicaciones del hongo antes del trasplante, en

suelos infestados con nemátodos, podría permitir la producción de metabolitos, por parte del hongo, con actividad antinematodo que inmovilicen los juveniles de segundo estadio (J2) y en consecuencia reducir la penetración de nemátodos.

Los resultados de este trabajo respecto al número de agallas fueron muy alentadores, sin embargo, respecto al peso fresco de raíces los resultados no fueron significativos y el análisis estadístico de este parámetro arrojó resultados erráticos; esto pudo deberse a que fue muy difícil la extracción del sistema radicular completo de cada planta. Además la apariencia de las raíces de las plantas de todos los tratamientos fue similar, lo que parece indicar que el hongo no influyó en el desarrollo de las plantas. El elevado peso radicular en algunos de los tratamientos parece ser el resultado de un mejor desarrollo del sistema radicular inherente a las plantas más que a la acción del hongo o al incremento de peso originado por la presencia de agallas.

En este trabajo no se observaron J2 parasitados; lo cual no concuerda con los resultados obtenidos por Sharon *et. al.*, (2001). Es posible que la cepa utilizada en este trabajo sea más eficiente para parasitar huevecillos y hembras sin masa gelatinosa, que juveniles de segundo estadio (J2).

El descubrimiento de hongos parásitos de huevecillos de nemátodos es reciente. Godoy et al (1984), reportan algunas especies del genero *Paecilomyces* parasitando huevos de *Meloidogyne* y mencionan que este hongo penetra el corión del huevo por medio de hifas, produciendo un crecimiento o hinchazón, posteriormente, por medio de un apresorio se distribuye totalmente en el contenido del huevo. Los mecanismos que se consideran para la habilidad del hongo pueden ser, primero una alteración enzimática que afecta la permeabilidad del corión del huevo ocasionándole desordenes fisiológicos antes de la penetración de la hifa, y segundo toxinas fungosas que podrían afectar los huevos deteriorándolos y finalmente matándolos.

Evidencia considerable indica que quitinazas de diversas fuentes afectan el desarrollo e incubación de huevos de nemátodos, Jatala (1986) reporta que muchos

parásitos de huevos producen enzimas con actividad quitinolítica que se requieren para la penetración de la cubierta quitinosa del huevo; aunque la quitina no está presente en la cutícula de los juveniles, otras enzimas específicas pueden ser esenciales para penetrar la cutícula de los juveniles vivos.

La cubierta de los huevos de nemátodos es en la única estructura en la cual la presencia de quitina ha sido plenamente demostrada (Bird and Bird, 1991). En las especies de *Meloidogyne* la cubierta de los huevos consiste de tres capas. La capa vitelina exterior tiene una estructura gruesa semejante a una membrana, la capa media es quitinosa le proporciona resistencia estructural a la cubierta del huevo y es la mas delgada (0.4 micras aprox.) y es la capa mas obvia; la capa mas interna consiste de una mezcla de lípidos y proteínas, que le confiere un alto grado de impermeabilidad (Bird and McClure, 1976).

T. harzianum y *Pythium oligandrum* produjeron quitinasa y β -1,3-glucanasa al crecer en medio de cultivo liquido con quitina o micelio de hongo deshidratado (fungal dried mycelium) como única fuente de carbono. El micelio deshidratado de *Fusarium oxysporum* fue la fuente de carbono mas selectiva para la producción de enzimas. La producción de compuestos volátiles por *P. oligandrum* o *T. harzianum* inhibió el desarrollo de *F. oxysporum*; se logró inhibirlo al 100% al incrementar la cantidad de inóculo (El-Katatny et al 2006).

Igual que los huevos de nemátodos, muchos hongos contienen quitina embebida en sus paredes celulares. En los últimos años se han producido plantas transgénicas con genes provenientes de varias fuentes (hongos, plantas, bacterias e insectos) para la expresión de endoquitinasas; algunos de ellos fueron efectivos en el control de diversos hongos e insectos que contienen quitina. Las endoquitinasas de *Trichoderma harzianum* han mostrado los resultados más prometedores y en varios casos han proporcionado resistencia completa a varios hongos (Lorito *et. al.*, 1998).

Los abonos de quitina al suelo pueden disminuir las poblaciones de nematodos y permiten incrementar la producción de los cultivos (Ehteshamul, *et. al.*, 1997; Godoy *et. al.*, 1984). Se cree que parte de este efecto supresor se debe a la liberación de quitinasa por los microorganismos del suelo aprovechando la quitina como fuente de nitrógeno (Burrows and De Waele, 1997). Sin embargo Spiegel *et. al.*, (1987) demostraron que la degradación de la quitina libera amoníaco, que puede ser al menos parcialmente responsable de la reducción de las poblaciones de nematodos en el suelo.

Debido a la importancia de la quitina en la integridad estructural de los huevos, es posible que factores relativamente menores podrían desestabilizar el desarrollo del huevo y su durabilidad. Cambios en la permeabilidad de la membrana de los huevos podría conducir a la muerte del embrión o impedir la eclosión. (Burrows y De Waele, 1997).

El trabajo de Sharon (2001), sostiene la hipótesis de la importancia de incrementar la actividad proteolítica de las cepas de *Trichoderma* para el proceso de biocontrol en los dos mecanismos sugeridos: efecto de los metabolitos producidos por el hongo en el suelo y parasitismo directo del antagonista.

En el presente trabajo se observaron esporas de *Trichoderma harzianum* en el interior del estoma de *Rhabditis*. Ferry y De Leij (1992), mencionan que en los hongos endoparásitos las esporas hacen contacto con la cutícula del nematodo o por la ingestión de ellas, posteriormente germinan en el esófago y desarrollan su micelio en el interior del nematodo, hasta que las estructuras reproductoras de los hongos rompen su pared debido a la esporulación. Pueden parasitar larvas, hembras, quistes y huevos. Los grupos a los que pertenecen son Chytridiomycetos, Oomycetos, Zygomycetos, Deuteromycetos y Basidiomycetos.

De acuerdo a la literatura revisada en el desarrollo de la presente investigación, numerosos autores coinciden en que la utilización de microorganismos para el control de nemátodos fitoparásitos sólo puede ser efectuada mediante el análisis de las

interacciones naturales entre "planta huésped-nematodo fitoparásito-agente de control biológico-medio ambiente", y que en la medida que se comprendan mejor estas complejas interacciones, el control biológico de los nemátodos será más acertado. Además la colaboración multidisciplinaria y la integración de agentes biológicos con otros métodos de control podrán contribuir a prácticas de control de mayor éxito.

CONCLUSIONES

1. *Trichoderma harzianum* ejerció un eficiente control sobre el nematodo de los nódulos *Meloidogyne incognita*, mediante la acción de dos mecanismos:
 - a) Parasitismo directo
 - b) Producción de sustancias (metabolitos) tóxicas
2. *T. harzianum* parasitó huevecillos y hembras de *M. incognita*. Igualmente el filtrado de este hongo ejerció control sobre huevecillos y hembras de este nematodo.
3. *T. harzianum* no parasitó juveniles de segundo estadio ni hembras con masa gelatinosa.
4. Los resultados obtenidos indican que el control biológico que ejerce *T. harzianum* sobre *Meloidogyne incognita* se lleva a cabo en el suelo y no dentro de las raíces.
5. Se sugiere continuar y profundizar en el estudio de los mecanismos de acción de este hongo, particularmente sobre el tipo de sustancias (enzimas, antibióticos, toxinas, etc.) producidas por el agente de control e involucradas en el proceso de inhibición o muerte del nematodo.

LITERATURA CITADA

- Alexopoulos, C. J. and C. W. Mims. 1979. Introductory Mycology. 3^a ed. John Wiley & Sons. New York. U. S. A. p. 561-563.
- Álvarez-Zamorano R. y C. M. Armenta. 2000. Manejo Integrado de Enfermedades en tomate en el Sur de Sonora. INIFAP. Campo Experimental Valle del Yaqui. Folleto técnico 39, (6): 58-59.
- Bird, A. F., and M. A. McClure. 1976. The Tylenchid nematode egg shell structure composition and permeability. *Parasitology* 72:19-28.
- Bird, A. F., and J. Bird. 1991. The structure of nematodes. San Diego: Academic Press. p. 78-81.
- Bissett, J. 1984. A revision of the genus *Trichoderma*. *J. Bot.* 62: 924.
- Burrows, P. R., and D. De Waele. 1997. Engineering resistance against plant-parasitic nematodes using antinematode genes. pp. 217-236 in C. Fenoll, F. M. W. Grundler, and S. A. Ohl, eds. Cellular and molecular aspects of plant-nematode interactions. Boston: Kluwer Academic Publishers.
- Cid del Prado, V. I., S. A. Tovar y J. A. Hernández. 2001. Distribución de especies y razas de *Meloidogyne* en México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 19(1):32-39.
- Eisenback, J. D., H. Hirschmann, J. N. Sasser, and A. C. Trintaphyllou. 1981. A Guide To The Four Most Common Species of Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne* Species). International *Meloidogyne* Project. Raleigh, North Carolina., USA. 48 pp.
- Elad, Y. 1995. Mycoparasitism. In: Kohmoto, K., U. S. Singh, and R. P. Singh. Pathogenesis and Host Specificity in Plant Disease. Vol. 2. Ed. Elsevier Science, Oxford, U. K. p. 289-307.
- El-Katatny, M. H., H. M. A. Abdelzaher and M. A. Shoulkamy. 2006. Antagonistic actions of *Pythium oligandrum* and *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi (*Fusarium oxysporum* and *Pythium ultimum* var. *ultimum*). *Archives of Phytopathology And Plant Protection*. 39(4):289-301.

- Esquer-Fimbres F. 2004. Biocontrol *in vitro* de *Trichoderma Harzianum* Rifai sobre algunos fitopatógenos de importancia en cultivos hortícolas de Sonora. Hermosillo, Sonora. Departamento de Agricultura y Ganadería. Universidad de Sonora. Tesis de Licenciatura. 31 pp.
- Esquer-Fimbres R. 2004. Evaluación de *Trichoderma harzianum* Rifai para el Control de *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood, en el Cultivo del Tomate. Hermosillo, Sonora. Departamento de Agricultura y Ganadería. Universidad de Sonora. Tesis de Licenciatura. 40 pp.
- Ehteshamul Haque. S., V. Sultana, J. Ara, R. Qasim, and A. Ghaffar. 1997. Use of crustacean chitin and plant-growth-promoting bacteria for the control of *Meloidogyne javanica* root-knot nematode in chickpea. Pakistan Journal of Nematology 15:89-93.
- Ferry, B. R. and De Leij, A. 1992. Key factors in the development of fungal agents for the control of cyst and root-knot nematodes. Biological Control plant Diseases. Athens, Greece, New York.
- Freire , F. C. O., and J. Bridge. 1985. Parasitism of eggs, females and juveniles of *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* and *Verticillium chlamydosporium*. Fitopatologia Brasileira 10:577-596.
- Gams, W. and J. Bisset. 1998. Morphology and identification of *Trichoderma*. In: G. E. Harman and C. P. Kubicek.. *Trichoderma & Gliocladium*. Vol. I. Ed. Taylor and Francis. London. Pp. 3-34.
- Godoy, G., R. Rodriguez-Kabana, R. A. Shelby, and G. Morgan-Jones. 1984. Chitin amendments for control of *Meloidogyne arenaria* in infested soil. Effects on microbial population. Nematropica 13:63-74.
- Haran, S., H. Shickler, and I. Chet. 1996. Molecular Mechanisms of Lytic Enzymes Involved in the Biocontrol Activity of *Trichoderma harzianum*. Microbiology 142:2321-2331.
- Harman, G. E. 2000. Myths and Dogmas of Biocontrol: Changes in Perceptions Derived from Research on *Trichoderma harzianum* T-22. Plant Dis. 84:377-393.
- Howell, C. R. and R. D. Stipanovic. 1983. Gliovirin, a New Antibiotic from *Gliocladium virens*, and its Role in the Biological Control of *Pythium ultimum*. Can. J. Microbiol. 29:321-324.

- Howell, C. R. 2002. Cotton seedling preemergence damping-off incited by *Rhizopus oryzae* and *Pythium spp.* and its biological control with *Trichoderma spp.* *Phytopathology* 92:177-180.
- Howell, C. R. 2003. Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. *Plant Disease* 87 (1): 4-10.
- INEGI. 2006a. Anuario Estadístico del Estado de Sonora. Tomo II. México. p. 507.
- INEGI. 2006b. El Sector Alimentario en México. México. p. 19, 43 y 217.
- Invar, J., M. Abramsky, D. Cohen, and I. Chet. 1994. Plant Growth Enhancement and Disease Control by *Trichoderma harzianum* in Vegetable Seedlings Grown under Commercial Conditions. *Eur. J. Plant Pathol.* 100:337-346.
- Jatala, P. 1986. Biological control of plant-parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology* 24: 453-489
- Jiménez-León M., R. Ruiz y R. Moreno. 1985. Extracción, conteo de huevecillos de *Meloidogyne* e inoculación de las plantas diferenciales. Curso Internacional sobre nematodos agalladores y formadores de quistes: vision integral y perspectivas. Colegio de Posgraduados, Chapingo-Montecillos Mexico. Cuaderno de Técnicas.
- Khan, T. A., S. T. Khan, M. Fazal, and Z. A. Siddiqui. 1997. Biological Control of *Meloidogyne incognita* and *Fusarium solani* Disease Complex in Papaya using *Paecilomyces lilacinus* and *Trichoderma harzianum*. *Int. J. Nematol.* 7:127-132.
- Lifshitz, R., M. T. Windham and R. Baker. 1986. Mechanism of biological control of preemergence damping-off of pea by seed treatment with *Trichoderma spp.* *Phytopathology* 76:720-725.
- Lewis, J. A. and G. C. Papavizas. 1988. Chlamidospore Formation by *Trichoderma sp.* *Phytopathology* 78 (12): 862.
- Lopez- Cruz G. 1996. Efecto de *Trichoderma harzianum* Rifai y extracto de cañagria sobre *Phymatotrichum omnivorum* Shear-Duggar. Departamento de Agricultura y Ganadería. Universidad de Sonora. Tesis de Licenciatura. 76 pp.

- Lorito, M., S. L. Woo, I. G. Fernández, G. Colucci, G. E. Harman, T. J. A. Pintor, E. Filippone, S. Muccifora, C. B. Lawrence, A. Zoina, S. Tuzun, and F. Scala. 1998. Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 95:7860–7865.
- Meyer, S. and D. Roberts. 2002. Combinations of Biocontrol Agents for Management of Plant-Parasitic Nematodes and Soilborne Plant-Pathogenic Fungi. *J. Nematol.* 34 (1):1-8.
- Mukerji, K. G. and K. L. Garg. 1988. *Biocontrol of Plant Diseases*. Vol I. CRC Press. USA. pp. 71-82.
- Pal, K. K. and B. McSpadden. 2006. *Biological Control of Plant Pathogens*. The Plant Health Instructor. 25 pp.
(<http://www.apsnet.org/education/AdvancedPlantPath/Topics/biolcontrol/default.htm>)
- Rodríguez-Kabana, R., W. D. Kelly, and E. A. Curl. 1978. Proteolytic Activity of *Trichoderma viridae* in Mixed Culture with *Sclerotium rolfii* in Soil. *J. Microbiol.* 24: 487-490.
- Romo-López I., J. Avila y G. López. 1997. Efecto de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre esclerocios de *Phymatotrichum omnivorum* Shear-Duggar. *Horticultura Mexicana* 5(3):276-281.
- SAGARPA. 2002. Servicio de Información Estadística Agroalimentaria y Pesquera. (<http://www.siea.sagarpa.gob.mx/InfOMer/analisis/antomate.html#prodmexico>).
- Samuels, G. J., S. L. Dodd, W. Gams, L. A. Castlebury, and O. Petrini. 2002. *Trichoderma* species Associated with the Green Mold Epidemic of Commercially Grown *Agaricus bisporus*. *Micol.* 94:146-170.
- Santos, M. A., S. Ferraz and J. J. Muchovej. 1992. Evaluation of 20 species of fungi from Brazil for biocontrol of *M. incognita*. *Nematropica* 22 (2): 183-192.
- Saxena, G. and K. G. Mukerji. 1988. *Biological Control of Nematodes*. In: Mukerji, K. J. and K. L. Garg. *Biocontrol of Plant Diseases*. Vol I. CRC Press. USA. pp. 113-115.
- Sharon, E., M. Bar-Eyal, I. Chet, A. Herrera-Estrella, O. Kleifeld, and Y. Spiegel. 2001. Biological Control of the Root-Knot Nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 91(7):687-693.

- Siddiqui, I. A., M. Amer-Zareen, J. Zaki, and S. S. Shaukat. 2001. Use of *Trichoderma* Species in the Control of *Meloidogyne javanica*, Root Knot Nematode in Okra and Mungbean. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 4(7): 846-848.
- Spiegel, Y., I. Chet, and E. Cohn. 1987. Use of chitin for controlling plant-parasitic nematodes II. Mode of action. *Plant and Soil* 98:337-346.
- Spiegel, and I. Chet. 1998. Evaluation of *Trichoderma spp* as a Biocontrol Agent against Soilborne Fungi and Plant-Parasitic Nematodes in Israel. *Integr. Pest Manag. Rev.* 3: 169-175.
- Taylor, A. L. y J. N. Sasser. 1983. *Biología, Identificación y Control de los Nemátodos de Nódulo de la Raíz*. Departamento de Fitopatología de la Universidad de Carolina del Norte. USA. pp. 1-15.
- Tello, M. J. y J. Del Moral. 2001. Enfermedades no Víricas del Tomate. *In: Rodríguez, F., D. Tello y J. Baldomero. El Cultivo del Tomate*. Ed. Mundi-prensa. España. pp. 523-564.
- Triantaphyllou, A. C. 1973. Gametogenesis and reproduction of *Meloidogyne graminis* and *M. ottersoni*. *J. Nematol.* 5:84-87.
- Weindling, R. 1932. *Trichoderma lignorum* as a Parasite of other Soil Fungi. *Phytopathology* 22:837-845.
- Weindling, R. 1934. Studies on a Lethal Principle Effective in the Parasitic Action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other Soil Fungi. *Phytopathology* 24:1153-1179.
- Weindling, R. 1941. Experimental consideration of the mold toxin of *Gliocladium* and *Trichoderma*. *Phytopathology* 31:991-1003.
- Wells, H. 1988. *Trichoderma* as a Biocontrol Agent. *In Mukerji, K. J. and K. L. Garg. Biocontrol of Plant Diseases. Vol I.* CRC Press. USA. pp. 71-77.
- Windham, G. L., M. T. Windham, and W. P. Williams. 1989. Effects of *Trichoderma spp* on Maize Growth and *Meloidogyne arenaria* reproduction. *Plant Dis.* 494.
- Yedidia, I., N. Benhamou, and I. Chet. 1999. Induction of Defense Response in Cucumber Plants (*Cucumis sativus* L.) by the Biocontrol Agent *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1061-1070.

APENDICE

Cuadro 5.- Análisis de varianza para el numero de agallas presentes en las raíces de plantas de tomate tratadas, 10 semanas después de la inoculación

F. de V.	G.L.	S.C	C.M.	FO	Pr > F
TRATAMIENTOS	3	4828,1500	1609,38	18,4404	<.0001
ERROR	16	1396,4000	87,27		
TOTAL	19	6224,5500			

R2 0,775662

Cuadro 6.- Análisis de varianza para peso fresco de raíz de plantas de tomate tratadas, 10 semanas después de la inoculación.

F. de V.	G.L.	S.C	C.M.	FO	Pr > F
TRATAMIENTOS	7	73,79775	10,5425	5,9311	<.0002
ERROR	32	56,88000	1,7775		
TOTAL	39	130,67775			

R2 0,56473

Durante el desarrollo del experimento algunas de las plantas manifestaron daño por frío que consistió en una coloración púrpura de los brotes (Fig. 34). Además se presentaron dos plagas, minador *Liriomyza sp* (Fig. 35) y la palomilla del gusano bellotero *Heliothis sp.* (Fig. 36).

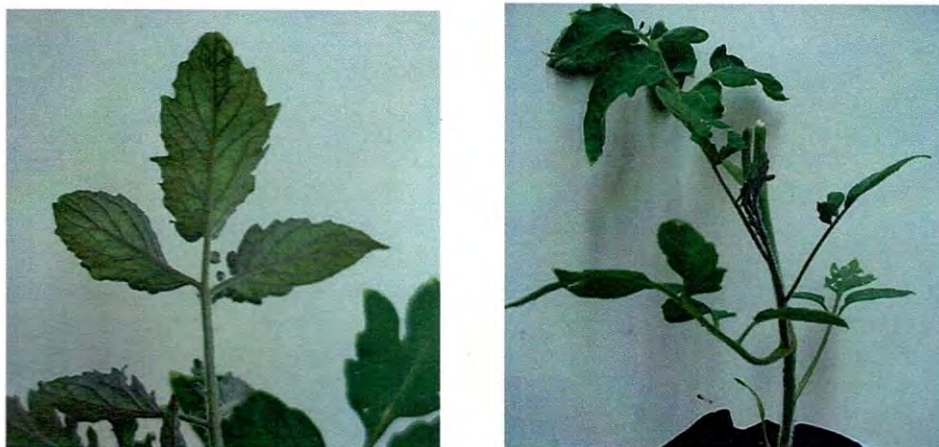


Fig. 34.- Plantas de tomate mostrando síntomas de daño por frío.



Fig. 35.- Síntomas del minador en plantas de tomate en cámara de crecimiento.



Fig. 36.- Palomilla del gusano bellotero en planta de tomate en cámara de crecimiento.