

**Evaluación de *Trichoderma koningii* como inductor de resistencia sistémica en tomate contra
*Fusarium oxysporum***

Yeirme Yaneth Jaimes Suárez

Tesis de Maestría

**Maestría en Biología Aplicada
Facultad de Ciencias
Universidad Militar Nueva Granada
Bogota, D. C. 2008**

Tabla de Contenido

	Pág.
Resumen	6
Abstract	7
1. Introducción	8
2. Objetivos	13
2.1 Objetivo general	13
2.2 Objetivos específicos	13
3. Materiales y Métodos	14
3.1 Microorganismos y medios de cultivo	14
3.2 Material Vegetal	14
3.3 Selección de sustrato y forma de separación de las raíces para el establecimiento de plantas de tomate.	15
3.4 Prueba de patogenicidad de <i>Fusarium oxysporum</i> en plantas de tomate.	16
3.5 Determinación del efecto de inducción de resistencia sistémica de <i>Trichoderma koningii</i> en plantas de tomate.	16
3.6 Determinación del efecto de estimulación de crecimiento vegetal por la cepa Th003.	17
3.7 Análisis estadístico.	18
4. Resultados y discusión	19
4.1 Selección de sustrato y forma de separación de las raíces para el establecimiento de plantas de tomate.	19
4.2 Prueba de patogenicidad de <i>F. oxysporum</i> en plantas de tomate.	22
4.3 Determinación del efecto de inducción de resistencia sistémica de la cepa Th003 sobre <i>F. oxysporum</i> .	25
4.4 Determinación del efecto de estimulación del crecimiento vegetal por la cepa Th003.	31
Conclusiones	39
Recomendaciones	40
Referencias	41
Agradecimientos	52
Anexos	53

Índice de figuras

	Pág.
Figura 1. Efecto del sustrato y sistema de división de raíces sobre la altura de las plantas de tomate.	20
Figura 2. Efecto del sustrato y sistema de división de raíces sobre la emisión de hojas de las plantas de tomate.	20
Figura 3. (a) Compactación del sustrato arena; (b) Síntomas de deficiencia de fósforo en plantas de tomate de nueve semanas de edad establecidas en sustrato arena.	22
Figura 4. Presencia de <i>F. oxysporum</i> en tejido vegetal indexado 15 días después de su inoculación en plantas de tomate.	23
Figura 5. Presencia de la cepa Fu040 de <i>F. oxysporum</i> en segmentos de tallo de plantas de tomate 15 días después de la inoculación del patógeno.	26
Figura 6. Colonización del tallo de plantas de tomate tratadas con la cepa Th003 de <i>T. koningii</i> 4 días antes de la inoculación con la cepa Fu040 de <i>F. oxysporum</i> , evaluada 15 días después de la infección.	28
Figura 7. Colonización del tallo de plantas de tomate tratadas con la cepa Th003 de <i>T. koningii</i> 4 días antes de la infección con la cepa Fu041 de <i>F. oxysporum</i> , evaluada 15 días después de la infección.	28
Figura 8. Emergencia de plántulas de tomate.	33
Figura 9. Efecto de la cepa Th003 sobre el crecimiento de plantas de tomate 33 días después del transplante.	38

Índice de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Efecto de los tratamientos biológicos sobre la altura, el peso seco foliar y peso seco radical de plantas de tomate.	33
Tabla 2. Efecto del tratamiento con <i>T. koningii</i> Th003 sobre la acumulación de materia seca en los tejidos vegetales de plantas de tomate.	35
Tabla 3. Efecto del tratamiento con <i>T. koningii</i> Th003 sobre el diámetro de los dos primeros entrenudos y el área foliar días después del transplante (ddt).	36
Tabla 4. Concentración de elementos mayores en tejido foliar de plantas de tomate.	36
Tabla 5. Concentración de elementos menores en tejido foliar de plantas de tomate.	37

Resumen

Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici* es el agente causal del marchitamiento vascular del tomate y es el responsable de importantes pérdidas económicas en cultivos comerciales tanto en campo abierto como bajo invernadero. La principal estrategia para su control es el uso de cultivares resistentes, pero la gran variabilidad genética de este patógeno hace que la enfermedad en la actualidad continúe siendo persistente. La inducción de resistencia con agentes biocontroladores en plantas ha recibido gran atención en los últimos años, con aplicaciones exitosas en diferentes especies vegetales para el control de *F. oxysporum*. El presente estudio determinó la capacidad de la cepa Th003 de *Trichoderma koningii* como inductor de resistencia sistémica en tomate contra las cepas Fu040 y Fu041 de *F. oxysporum*. Para esto se usó el sistema de división radical en dos porciones, inoculándose una porción con el biocontrolador y la otra con el patógeno, este último aplicado 4 días después de *T. koningii*. El efecto inductor se determinó mediante la medición del ascenso del patógeno por los haces vasculares. También se evaluó la capacidad de la cepa Th003 de promover el crecimiento en plantas de tomate, mediante un tratamiento de pregerminación controlada de las semillas en presencia del biocontrolador, con inoculaciones posteriores a la siembra. Se tomaron como parámetros de medición el área foliar, el diámetro del tallo, el peso seco tanto radical como foliar. En la evaluación del efecto sistémico, se encontró que al tratar una porción de raíces con la suspensión en concentración 10^5 conidios.mL⁻¹ de Th003, y al aplicar *F. oxysporum* en la otra porción de raíces se observó que el ascenso del patógeno en el xilema se retardó, encontrándose que el ascenso de las cepas Fu040 y Fu041 se limitó al 1 cm del tallo en el 33% y 66%, respectivamente. Este retraso sugiere un efecto sistémico de la Th003 sobre las respuestas de defensa de la planta. Además se encontró que Th003 promueve el crecimiento de las plantas tratadas con respecto a plantas testigo absoluto, encontrándose un 80% de emergencia de plántulas durante los primeros 9 días después de la siembra, resultado que contrasta con el 40% de emergencia encontrado en el testigo absoluto. Además se observó un incremento de hasta el 40% en el peso seco foliar y radical con respecto a plantas del testigo absoluto. Así mismo se observó un efecto sobre la concentración de calcio (por encima de 22 mg.g⁻¹) en el tejido foliar de plantas tratadas con Th003. Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que *T. koningii* Th003 tiene la capacidad de inducir resistencia sistémica y de promover el crecimiento vegetal.

Palabras clave: Resistencia sistémica inducida, *Trichoderma koningii*, tomate, *Fusarium oxysporum*.

Abstract

Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici* causes *Fusarium* wilting of tomato and is responsible for important economic losses in field and greenhouse commercial crops. Even the primary control strategy for this pathogen is to use wilt-resistant cultivars, the disease continues being persistent due to the high genetic variability of the pathogen. During the last years, the induction of plant resistance by several biological control agents has received great attention, with successful for control *F. oxysporum* in different plant species. The present work showed the ability of the isolate of *Trichoderma koningii* Th003 to induce tomato systemic resistance against *F. oxysporum* Fu040 and Fu041. The method of split root was used in this study. It consists in the inoculation of half of the root with the Th003 and the other one with the pathogen *F. oxysporum*. The pathogen in the plant was applied 4 days after *T. koningii* application. The capacity of Th003 to induce systemic resistance was determined by measuring the pathogen colonization along the vascular system. Th003 strain ability to promote vegetal growth was also evaluated in tomato plants, by using seed priming in the presence of Th003 and repetitive inoculations after sowing. Foliar area, stem diameter and foliar and root dry weight were measured during the studies. When tomato root (half) was treated with Th003 (10^5 conidios.mL⁻¹) and the remaining portion was treated with *F. oxysporum*, the pathogen xylem colonization was delayed, limiting the Fu040 and Fu041 isolates to the first cm of the stem in the 33% and 66% of plants evaluated. This delay in the movement of the pathogen suggests a systemic effect of Th003 on the plant defense response. In addition, it was found that Th003 isolate promotes plant growth, in comparison to untreated plants, resulting in a 80% emergence seedlings during the first 9 days after sowing. This result contrasts with an emergency of a 40% found in the control seedling emergence. An increase of up to 40% in foliar and root dry weight was presented in treated plants in comparison with the control. An effect on the calcium concentration was observed in foliar tissue of plant treated with Th003 strain (up to 22 mg.g⁻¹). The results found in this study suggest a capacity of *T. koningii* Th003 to induce systemic resistance and growth plant promotion.

Keywords: Induced systemic resistance, *Trichoderma koningii*, tomato, *Fusarium oxysporum*.

1. Introducción

Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici* es el agente causal del marchitamiento vascular del tomate y el responsable de importantes pérdidas económicas en cultivos comerciales tanto, en campo abierto como bajo invernadero (Attitalla, 2004; Benhamou *et al.*, 1997, 1998; De Cal *et al.*, 2000; Larena *et al.*, 2003). La invasión de este patógeno ocurre principalmente a través de heridas en raíces ocasionadas por nematodos o aquellas ocasionadas por el hombre, y a la capacidad del patógeno de penetrar por acción enzimática. (OEPP/EPPO, 2004). Este patógeno invade el sistema vascular induciendo marchitamiento de la planta debido al bloqueo de los vasos del xilema, lo cual impide el movimiento del agua a la parte aérea de la misma (De Cal *et al.*, 2000). Al igual que con otras enfermedades vasculares, el control químico resulta frecuentemente inefectivo y las medidas de sanitización como la vaporización o pasteurización del suelo generan un vacío biológico, pudiendo ser fácilmente recolonizado por el patógeno debido a la ausencia de microorganismos antagonistas (Brayford, 1992; De Cal *et al.*, 2000; Larena *et al.*, 2003). Otras medidas empleadas en el control de este patógeno se basan en el uso de material vegetal resistente y prácticas culturales complementarias (De Cal *et al.*, 1997; Larena *et al.*, 2003; OEPP/EPPO, 2004). Los mecanismos de resistencia de la planta a *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* involucran la restricción del avance del patógeno, ya sea por la acción independiente de barreras físicas sintetizadas por la planta tales como tilosas, gomas y geles. Las tilosas son estructuras en forma de balón resultantes de la hinchazón de las cavidades cercanas a las membranas de las vesículas y células adyacentes del parénquima que poseen paredes celulares bien desarrolladas y un contenido citoplasmático denso. Las gomas son estructuras formadas a partir de células adyacentes a las vesículas y son obstruidas aparentemente a través de cavidades dentro de las lamelas del parénquima. Los geles son materiales peptídicos resultantes de la acumulación de dióxido de carbono de la respiración fúngica durante la noche y subsiguiente disolución de calcio de las membranas de las células vegetales mediada por ácidos orgánicos (Talboys, 1972). Otro mecanismo involucra la producción de fitoalexinas, moléculas de bajo peso molecular derivadas de una o más rutas biosintéticas (Talboys, 1972; Hammerschmidt, 1999; De Cal *et al.*, 2000). Sin embargo, aunque éste es un hongo de reproducción asexual, ha logrado superar estos mecanismos de defensa mediante su variación genética atribuida principalmente a la presencia de elementos transposables en su genoma, como el elemento *impala* y *Hop* o ciclos parasexuales seguidos de heterocariosis controlada por un grupo de loci *het* (Hua-Van *et al.*, 2001; Chalvet *et al.*, 2003). Esto explica por qué la marchitez causada por *Fusarium* continua siendo una enfermedad seria y persistente (De Cal *et al.*, 2000; Di Pietro *et al.*, 2003).

La dificultad en el control de la enfermedad ha sugerido la implementación de diferentes medidas en un programa de manejo integrado, en este sentido el control biológico con el uso de antagonistas tiene gran potencial. Es así como para el control del marchitamiento vascular causado por *Fusarium* sp. en

tomate se han reportado varios agentes de control biológico (ACB), dentro de los que se encuentran *Cephalosporium* sp. (De Cal *et al.*, 1997), bacterias del género *Pseudomonas* (Akköprü y Demir, 2005), *Bacillus pumilus* (Benhamou *et al.*, 1998), cepas no patógenas de *Fusarium oxysporum* (Larkin y Fravel, 2002), *Penicillium oxalicum* (De Cal *et al.*, 1997; Del Cal y Malgarejo, 2001) y especies del género *Trichoderma* (Spiegel y Chet, 1998; Cotes *et al.*, 2001; Woo *et al.*, 2006). La implementación exitosa de esta práctica requiere de un amplio conocimiento del agente de control biológico, tal que facilite la optimización de su uso y ayude a la selección de cepas más eficientes (De Cal *et al.*, 1997; Fravel, 2005).

Las cepas biocontroladoras del género *Trichoderma* han mostrado gran habilidad para interactuar tanto parasítica como simbióticamente con otros organismos, incluyendo plantas y otros microorganismos (Woo *et al.*, 2006). Las especies del género *Trichoderma* se encuentran dentro de los ACB más ampliamente estudiados y han mostrado gran capacidad para el control de patógenos del suelo incluyendo a *Fusarium* sp. (Howell, 2003). Dentro de los mecanismos mediante los cuales los aislamientos de *Trichoderma* spp. controlan las poblaciones patogénicas en la rizósfera se encuentra la producción de metabolitos que son liberados durante la interacción antagonista-patógeno como son los antibióticos (Ghisalberti y Sivasithamparam, 1991; Schirmböck *et al.*, 1994) o enzimas hidrolíticas (Schirmböck *et al.*, 1994), asociados con la competencia por nutrientes (Benítez *et al.*, 2004; Harman *et al.*, 2004a; Silvan y Chet, 1993; Yedidia *et al.*, 1999). Otros mecanismos incluyen la interacción directa con el patógeno como el micoparasitismo, éste involucra además del contacto físico, la síntesis de enzimas hidrolíticas para degradar la pared celular, produciéndose la lisis de la célula y la producción de componentes tóxicos o antibióticos (Schirmböck *et al.*, 1994; Benhamou y Chet, 1997); además las especies de *Trichoderma* exhiben efectos positivos en las plantas, como el incremento en el crecimiento (biofertilización) y la estimulación de mecanismos de defensa, lo que resulta en la capacidad para reconocer fitopatógenos potenciales antes o durante la infección (Benítez *et al.*, 2004; Harman *et al.*, 2004a; Woo *et al.*, 2006).

En los ambientes naturales las plantas tienen que enfrentarse a varios factores de estrés, incluyendo el ataque de insectos herbívoros y la invasión de patógenos. Para sobrevivir las plantas han desarrollado mecanismos de defensa efectivos, que les permiten evitar o mitigar los efectos nocivos generados por el estrés biótico o abiótico. La resistencia de las plantas a las enfermedades depende tanto de barreras preexistentes como de mecanismos de defensa inducidos (Durrant y Dong, 2004). Las barreras preexistentes, tales como paredes celulares gruesas y metabolitos secundarios tóxicos para el invasor, forman la primera línea pasiva de defensa de las plantas (Nandakumar *et al.*, 2001; Attitalla, 2004; Beckers y Spoel, 2006). Durante el reconocimiento del patógeno los mecanismos de defensa inducidos son activados en el sitio de infección (respuesta primaria), en las células adyacentes al tejido afectado (respuesta secundaria) y en partes distantes de la planta a los tejidos infectados (respuesta sistémica).

Estos mecanismos existentes son los responsables de la sobrevivencia de los genotipos de las plantas a la presión selectiva de la evolución (Kuč, 1987; Attitalla, 2004).

A inicios del siglo pasado, Beauverie (1901) y Ray (1901) observaron que tras la infección por un patógeno, las plantas podían desarrollar resistencia ante futuros ataques del patógeno. Más tarde Chester (1933) resumió varios fenómenos de resistencia a enfermedades inducidos por patógenos. Uno de estos fenómenos es la inducción de resistencia sistémica (Kuč, 2001; Heil y Bostock, 2002; Attitalla, 2004). La inmunidad de las plantas, inducida por agentes bióticos o abióticos, ha sido reportada desde los años 30 cuando Chester (1933) propuso el término “Inmunidad Fisiológica Adquirida”. Desde entonces varios términos han sido usados para describir el fenómeno de inducción de resistencia (Attitalla, 2004). Éste se define como el realce de la capacidad defensiva de las plantas, adquirido después de una estimulación apropiada contra un amplio espectro de patógenos y plagas (Ryals *et al.*, 1996; Sticher *et al.*, 1997; van Loon *et al.*, 1998; Knoester *et al.*, 1999; Ramamoorthy *et al.*, 2001; Attitalla, 2004; Durrant y Dong, 2004; Vallad y Goodman, 2004). Dependiendo de la naturaleza del agente elicitor, la planta activa diferentes rutas de señalización para la biosíntesis de una mezcla óptima de compuestos defensivos (Beckers y Spoel, 2006). Las dos formas claramente definidas de inducción de resistencia son la Resistencia Sistémica Adquirida (RSA) y la Resistencia Sistémica Inducida (RSI), éstas pueden ser diferentes con base en el agente elicitor y las rutas biosintéticas involucradas (Vallad y Goodman, 2004).

El fenómeno de resistencia sistémica adquirida está asociado con la acumulación de ácido salicílico tanto en los tejidos locales como en tejidos distantes, siendo una respuesta a un elicitor biótico o abiótico (Durrant y Dong, 2004). El ácido salicílico induce la expresión de genes relacionados con la patogénesis mediante la activación de la proteína NPR1, también conocida como proteína de inmunidad no inducible 1 (Mou *et al.*, 2003; van Loon *et al.*, 2006). Dicha proteína es un modulador de la expresión de los genes relacionados con la patogénesis, que actúa a través de miembros del subgrupo de la familia de los factores de transcripción con cierres de leucina. Además se producen cambios redox inducidos por la acumulación de ácido salicílico durante la resistencia sistémica adquirida, brindando un cambio conformacional de oligómeros de NPR1 a monómeros activos, como un prerrequisito para el transporte nuclear de las proteínas relacionadas con la patogénesis (Mou *et al.*, 2003; Durrant y Dong, 2004; Pieterse y van Loon, 2004; van Loon *et al.*, 2006).

La resistencia sistémica inducida es elicitada por un agente biótico no patogénico. Al igual que la resistencia sistémica adquirida es activa frente a un amplio rango de bacterias y hongos fitopatógenos (Vallad y Goodman, 2004), aún contra virus (Raupach *et al.*, 1996). Esta respuesta no se encuentra asociada con la acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis, sino con la producción de metabolitos secundarios como las fitoalexinas. La activación de las rutas biosintéticas asociadas con la resistencia sistémica inducida está mediada por el ácido jasmónico y el etileno, que actúan como

moléculas de señalización (Vallad y Goodman, 2004). Observaciones realizadas por Van Wees *et al.* (2000) indican que la resistencia sistémica adquirida y la resistencia sistémica inducida son tipos complementarios de inducción de resistencia con un traslape parcial, de acción parcialmente específica contra diferentes tipos de patógenos (van Loon *et al.*, 2006).

En varios estudios se ha demostrado que *Trichoderma* spp. activa sistémicamente los mecanismos de defensa de las plantas contra hongos patógenos (De Meyer *et al.*, 1998; Yedidia *et al.*, 1999, 2000, 2003; Hanson, 2000; Howell *et al.*, 2000, 2006; Harman *et al.*, 2004b; Khan *et al.*, 2004), en más de 10 plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, entre las que se incluye arroz, maíz (Harman *et al.*, 2004b), algodón (Hanson, 2000; Howell *et al.*, 2000; Hanson y Howell, 2004, Djonović *et al.*, 2006), begonia (Horst *et al.*, 2005), frijol (Brunner *et al.*, 2005), lechuga (De Meyer *et al.*, 1998), pepino (Yedidia *et al.*, 1999, 2000, 2003; Khan *et al.*, 2004; Viterbo *et al.*, 2005), pimentón (De Meyer *et al.*, 1998; Sid Ahmed *et al.*, 2000), tabaco (De Meyer *et al.*, 1998) y tomate (De Meyer *et al.*, 1998; Alfano *et al.*, 2007). Además se ha demostrado el efecto contra la infección por hongos, bacterias y virus (Woo *et al.*, 2006). Se ha encontrado que especies de *Trichoderma* spp. están relacionadas con la sobre-expresión de proteínas relacionadas con la patogénesis (enzimas con actividad glucanasa, quitinasa y peroxidasa) (Yedidia *et al.*, 2000), sustancias relacionadas con las defensas (fitoalexinas terpenoides) (Howell *et al.*, 2000, 2006; Sid Ahmed *et al.*, 2000; Yedidia *et al.*, 2003) y la actividad de las enzimas que típicamente se activan durante el ataque del patógeno (Woo *et al.*, 2006). Las cepas de *Trichoderma* producen tres tipos de compuestos elicitors, proteínas de avirulencia (avr), oligosacáridos y compuestos de bajo peso molecular que son liberados por la actividad de enzimas líticas, que degradan la pared celular de las plantas y de los hongos (Harman *et al.*, 2004a; Woo *et al.*, 2006).

Otro beneficio que ofrecen las cepas del género *Trichoderma* es la capacidad de colonizar las raíces de las plantas, en cuya interacción se encuentran genes como *TasHyd1* de la familia de las hidrofobinas, las cuales realzan el crecimiento y la productividad de las plantas (Benítez *et al.*, 2004; Harman *et al.*, 2004a; Viterbo y Chet., 2006); además *Trichoderma* spp. producen factores de crecimiento que incrementan la tasa de germinación de las semillas y la producción de fitohormonas como auxinas, citoquininas y etileno (Benítez *et al.*, 2004). La penetración por este hongo está limitada a la primera o a la segunda capa de células y sólo a los espacios intercelulares de las raíces de las plantas (Viterbo y Chet, 2006). Junto con la producción de fitohormonas, se ha encontrado que la mayoría de las cepas de *Trichoderma* acidifican su ambiente circundante mediante la secreción de ácidos orgánicos tales como ácido cítrico, glucónico o fumárico. Estos ácidos orgánicos son capaces de solubilizar fosfatos, micronutrientes y cationes minerales, lo que resulta en biofertilización mediante la solubilización de minerales y el incremento en la productividad del cultivo (Benítez *et al.*, 2004; Harman *et al.*, 2004a).

La cepa Th003 de *Trichoderma koningii* ha mostrado tener alta actividad biocontroladora contra diferentes hongos fitopatógenos tanto foliares como del suelo (Cotes, 1993; Cotes *et al.*, 1996; Cotes *et al.*, 2001; Moreno, 2003; Villamizar *et al.*, 2004). Así mismo, en estudios tendientes a dilucidar los modos de acción de esta cepa, se encontró que ésta estimula en la planta la actividad de proteínas relacionadas con la patogénesis del tipo β -1,3-glucanasas y endoquitinasas, sugiriendo un efecto de respuesta de defensa (Cotes *et al.*, 1996). Por lo cual este estudio pretendió determinar la capacidad que tiene la cepa Th003 como agente elicitador de una respuesta sistémica y como promotor de crecimiento vegetal empleado como patosistema modelo *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*-tomate.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Demostrar la capacidad de *Trichoderma koningii* (Th003) para inducir respuestas de defensa y promover el crecimiento en plantas de tomate.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar la expresión de resistencia sistémica inducida por *T. koningii* contra *F. oxysporum* en plantas de tomate.
- Determinar el efecto promotor del crecimiento vegetal por *T. koningii* en plantas de tomate.

3. Materiales y Métodos

3.1 Microorganismos y medios de cultivo

Se utilizaron las cepas Fu040 y Fu041 de *Fusarium oxysporum*. La cepa Fu040 se aisló de plantas de tomate de 15 días de edad post-transplante, cultivadas bajo condiciones de invernadero en el municipio de Fusagasugá, estas plantas presentaban síntomas de pudrición del cuello y de la raíz. La cepa Fu041 se aisló de plantas de tomate de tres meses de edad post-transplante cultivadas bajo condiciones de invernadero en el Centro de Biotecnología y Bioindustria-CBB de CORPOICA ubicado en Mosquera (Cundinamarca), estas plantas presentaban síntomas de marchitamiento vascular. Las dos cepas del patógeno se mantuvieron en tubos de ensayo con medio agar papa dextrosa (PDA) inclinado a 4°C (Anexo 1). La producción del inóculo del patógeno se realizó en bolsas de polietileno de alta densidad con capacidad de 1 Kg, éstas contenían 100 g de salvado de trigo y 100 mL de medio nutritivo (Hidrolizado de Caseína) (Anexo 2) cubiertas con tapones de gasa y algodón, el sustrato se esterilizó a 120°C con una presión de 15 PSI durante 60 min. Posteriormente cada bolsa se inoculó con 5 discos de agar de 6 mm de diámetro con el hongo crecido durante 7 días a 25°C para cada cepa. Las bolsas inoculadas se incubaron en un cuarto de crecimiento con luz constante durante 15 días (Cárdenas, 1999).

Como agente inductor de respuestas de defensa se utilizó la cepa Th003 de *Trichoderma koningii*, ésta fue suministrada por el Banco de germoplasma de microorganismos con interés en control biológico del Laboratorio de Control Biológico del CBB de CORPOICA. La cepa Th003 se mantuvo en suelo estéril en condiciones de 4°C. Previo a la producción del inóculo para los experimentos, la cepa Th003 se activó en medio PDA, permitiendo que creciera a 25°C durante siete días y luego se hizo un nuevo pase en medio PDA. El inóculo de la cepa Th003 consistió en una suspensión conidial a partir de cultivos de siete días de edad, obtenida mediante lavado con agua estéril. La suspensión obtenida se filtró con velo Suizo y con ayuda de una cámara de Neubauer mediante diluciones sucesivas se ajustó la concentración a 10^5 , 10^6 y 10^7 conidios.mL⁻¹.

3.2 Material vegetal

En todos los ensayos se usaron semillas de tomate tipo milano híbrido Rocío® (Syngenta). Para los experimentos de evaluación del efecto de inducción de resistencia sistémica, las semillas se sembraron en bandejas de germinación de 72 alvéolos, usando como sustrato turba estéril. Las plántulas se mantuvieron bajo condiciones de invernadero durante seis semanas de edad. En el caso de los

experimentos de promoción de crecimiento el material vegetal se trató con la cepa Th003 desde la fase de semilla como se describirá más adelante.

Con el fin de determinar si la cepa Th003 induce respuestas de resistencia sistémica en plantas de tomate y teniendo en cuenta los principios de separación espacial entre agente elicitor y el patógeno, para evitar la interacción directa entre ellos, se hizo necesario dividir la raíz de la planta en dos porciones, como lo sugirieron Fuchs *et al.* (1997) y Duijff *et al.* (1998) con el patosistema tomate-*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y la cepa no patogénica Fo47 de *F. oxysporum*. Para el presente estudio se seleccionó el sistema de división de raíces separándolas físicamente, con el fin de evitar respuestas debidas al daño mecánico cuando se realizan cortes verticales en el cuello de la planta. Las plántulas de seis semanas de edad después de la siembra se transplantaron a alvéolos de mayor capacidad (230 cm³), donde el sistema radical se dividió cuidadosamente en dos porciones, sembrando cada porción en un alvéolo. Se empleó como sustrato para el crecimiento y establecimiento de las plantas vermiculita estéril.

3.3 Selección de sustrato y forma de separación de las raíces para el establecimiento de plantas de tomate

Con el fin de seleccionar un sustrato que permitiera el establecimiento de las plantas de tomate con el sistema radical separado físicamente, se evaluaron los sustratos arena de río y vermiculita. Para esto se utilizaron plántulas de tomate de seis semanas de edad crecidas en turba. Después de sacar las plántulas de las bandejas de germinación, se realizó un lavado del sistema radical con agua potable para eliminar los residuos del sustrato adherido a la superficie de la raíz. Posteriormente la raíz se desinfectó con hipoclorito de Calcio (5 %) durante dos minutos seguido de varios lavados con abundante agua estéril. Para cada sustrato se evaluó la división física del sistema radical en dos porciones, para esto cada porción de la raíz se dispuso en un alvéolo con sustrato. Los parámetros que se tuvieron en cuenta para evaluar el efecto del estrato sobre el desarrollo de la planta fueron: altura de la planta, número de hojas, cambios en coloración de hojas y morfológicos.

Las plantas se fertilizaron cada dos días con una solución nutritiva (Anexo 3). Estas plantas se dispusieron en mesones de concreto elevados (75 cm) y se mantuvieron bajo condiciones de invernadero (T° max=37°C, T° min= 8°C, %HR= 60-75%).

Se incluyó un testigo absoluto para cada sustrato que consistió en plantas sin separación de raíces. El diseño experimental fue completamente al azar con 15 repeticiones por tratamiento. La unidad experimental consistió en una planta.

3.4 Prueba de patogenicidad de *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate

Este bioensayo se realizó con el fin de evaluar la capacidad patogénica de las cepas Fu040 y Fu041 de *F. oxysporum* en las plantas de tomate. Cada cepa del patógeno se evaluó por separado. El patógeno se inoculó en una de las porciones del sistema radical dividido. Para esto, el inóculo del patógeno producido de acuerdo con lo especificado en el numeral 3.1, se mezcló en una proporción de 5% p/p (Cárdenas, 1999) con el sustrato vermiculita estéril, previamente humedecido hasta capacidad de campo. Se evaluó la incidencia de la infección causada por el patógeno, mediante la indexación del tallo a los 15 y 28 días después de la inoculación, de acuerdo con la metodología empleada por Rekah *et al.* (2000). Para esto, se analizó el tallo de la planta cortándolo desde el cuello y con la ayuda de un pelador de vegetales se eliminó la corteza, el tallo se dividió en segmentos de 1 cm y 3 cm en el primer y segundo muestreo respectivamente. Los tallos se lavaron con abundante agua, se desinfectaron con etanol al 70% durante 2 min y posteriormente se lavaron tres veces con abundante agua estéril. El segmento se manipuló cuidadosamente para no perder su ubicación en el tallo. Estos segmentos de tallo se sembraron en medio PDA y se incubaron durante siete días a 25 °C. Con este procedimiento se midió el ascenso del patógeno por el sistema vascular de la planta, según se presentará crecimiento de *F. oxysporum* a partir del tejido de los segmentos.

En este experimento además de las dos cepas de *F. oxysporum* se incluyó un testigo relativo, el cual consistió en plantas con separación física de raíces sin ningún inóculo y un testigo absoluto que consistió en plantas sin ningún tratamiento. El diseño experimental fue completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento. La unidad experimental consistió en seis plantas.

3.5 Determinación del efecto de inducción de resistencia sistémica de *Trichoderma koningii* en plantas de tomate

Con el fin de determinar si la cepa Th003 tenía la capacidad de causar un efecto de inducción de resistencia sistémica en plantas de tomate, una porción de las raíces de la planta se inoculó con 10 ml de una suspensión conidial de *T. koningii* en concentración de 10^5 , 10^6 y 10^7 conidios.mL⁻¹. Cuatro días después de la inoculación del biocotrolador, el inóculo del patógeno se mezcló con el sustrato de la otra porción de raíces de la planta en una concentración de 5% p/p siguiendo los procedimientos descritos en el numeral 3.4 (Cárdenas, 1999). Para determinar el efecto de inducción de resistencia sistémica, se evaluó la colonización del patógeno en el sistema vascular mediante la indexación del tallo (Rekah *et al.*, 2000) a los 15 y 28 días después de la inoculación del patógeno, según lo descrito en la prueba de

patogenicidad. Se consideró que existió un efecto de inducción de resistencia sistémica cuando el ascenso del patógeno se bloqueó o retrasó, con respecto al testigo patógeno.

Se evaluó el efecto de tres concentraciones de inóculo de *T. koningii* y se utilizó como inóculo patogénico las cepas Fu040 y Fu041. Se incluyó un testigo patógeno para cada cepa de *F. oxysporum* evaluada, un testigo relativo que consistió en plantas con el sistema de separación física de raíces sin ningún inóculo y un testigo absoluto que consistió en plantas sin ningún tratamiento. El diseño experimental fue completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento. La unidad experimental consistió en diez plantas y el tamaño de la muestra fue de una planta.

3.6 Determinación del efecto de estimulación de crecimiento vegetal por la cepa Th003

Se evaluó el efecto de estimulación del crecimiento vegetal por la cepa Th003 de *T. koningii* en plantas de tomate durante la fase de semillero. Para la aplicación de la cepa Th003 se empleó la técnica de pregerminación de semillas en presencia del antagonista, para esto las semillas se sumergieron en una suspensión de *T. koningii* en concentración de 10^7 conidios.mL⁻¹ durante 10 min. Luego, éstas se colocaron durante 48 h en una matriz sólida de cascarilla de arroz estéril humedecida con agua al 80% de capacidad de retención (Saldamando, 1996; Cotes *et al.*, 2001). Pasado el tiempo de pregerminación se realizó la siembra de las semillas en bandejas de germinación con sustrato turba estéril. A los 7 y 48 días después de la siembra se aplicaron al sustrato que soporta cada plántula 5 ml de suspensión conidial de la cepa Th003 en concentración de 10^6 conidios.mL⁻¹. Se midió el porcentaje de emergencia de las plántulas; a partir de plántulas con dos hojas verdaderas se registró su altura y mediante muestreo destructivo se determinó el peso seco de la parte aérea y de la parte radical de las plantas, metodología empleada por Ozbay y Newman (2004). El tamaño de la muestra para la determinación del peso seco fue de tres plantas (Ozbay y Newman, 2004).

Se evaluaron tres tratamientos, de los cuales uno consistió en semillas pregerminadas en presencia de la cepa Th003 con posteriores inoculaciones de ésta (PThI). Un segundo tratamiento consistió en semillas pregerminadas en ausencia de Th003 con posteriores inoculaciones de éste microorganismo (PI) y un tratamiento que consistió en semillas sin pregerminar con posteriores inoculaciones de la cepa Th003 (I). También se incluyó un testigo del efecto de la pregerminación, el cual consistió en semillas pregerminadas sin posteriores inoculaciones y un testigo absoluto que consistió en semillas no pregerminadas y plántulas sin ningún tratamiento. La unidad experimental consistió en 20 semillas y se utilizó un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones.

En un segundo ensayo las semillas se trataron como se describió anteriormente, pero en este caso las plántulas de siete semanas de edad se transplantaron a materas (2000 cm³) con sustrato mezcla de

suelo-cascarilla en una proporción de 2:1. Se midió el diámetro del tallo en el primer y segundo entrenudo. Mediante muestreo destructivo se determinó el área foliar, el peso seco de la parte aérea y de la parte radical de las plantas. El tamaño de la muestra fue de tres plantas. Con el fin de determinar el efecto promotor de crecimiento sobre la composición del tejido foliar de las plántulas, se hizo una caracterización fisicoquímica de la mezcla suelo-cascarilla y análisis químico del tejido foliar de las plantas de 9 y 12 semanas de edad.

Se evaluó un tratamiento que consistió en semillas pregerminadas en presencia de Th003 con posteriores inoculaciones y un testigo absoluto sin ningún tratamiento. La unidad experimental consistió en 12 plantas y se usó un diseño completamente al azar con tres repeticiones.

3.7 Análisis de Datos

Los datos de los ensayos de patogenicidad y determinación del efecto de inducción de resistencia sistémica de la cepa Th003 en plantas de tomate sobre *Fusarium oxysporum* se sometieron a una prueba para análisis de datos no paramétricos de Chi cuadrado. Los datos de los ensayos de selección de sustrato y forma de tratamiento del sistema radical y determinación del efecto de estimulación de crecimiento vegetal por la cepa Th003 se sometieron a un Análisis de Varianza (ANAVA) y a una prueba de comparación de medias de tratamiento por el método de Tukey ($\alpha=0,05$).

4. Resultados y discusión

4.1 Selección de sustrato y forma de separación de las raíces para el establecimiento de plantas de tomate

Con el ánimo de estandarizar un sistema para la evaluación del fenómeno de inducción de resistencia sistémica de la cepa Th003 de *T. koningii* contra *F. oxysporum* en plantas de tomate, en este bioensayo se seleccionó un sustrato inerte que le sirvió de soporte para el crecimiento y desarrollo aéreo y radical a las plantas, teniendo en cuenta que este último se dividió en dos porciones.

El análisis de los datos no mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos para las variables medidas. Sin embargo, a los 21 días después del trasplante se presentaron las mayores diferencias entre los tratamientos evaluados (Figuras 1 a 3). Se observó que las plantas establecidas en sustrato vermiculita con el sistema de división física del sistema radical, la altura de las plantas fue en promedio de 20.3 cm, para las plantas establecidas en sustrato vermiculita sin división del sistema radical el valor promedio de altura fue de 18.78 cm. Las plantas establecidas en sustrato arena presentaron los valores más bajos de altura, siendo de 16.63 cm para aquellas con el sistema de división física del sistema radical y de 14.72 cm para las plantas establecidas sin el sistema de división física del sistema radical (Figura 1). Con estos resultados se determinó que el establecimiento de plantas de tomate en el sustrato vermiculita con el sistema de división física de las raíces, presentó el mejor comportamiento en el crecimiento vegetal en cuanto a esta variable.

En relación con la variable número de hojas, se observó que las plantas establecidas en el sustrato vermiculita con el sistema de división del sistema radical presentaron mayor desarrollo de hojas en comparación con los demás tratamientos, en este caso el valor promedio fue de 8.33 hojas, mientras que las plantas establecidas en sustrato vermiculita sin el sistema de división del sistema radical el valor promedio fue de 7.17 hojas, para las plantas establecidas en sustrato arena con la división del sistema radical el valor promedio fue de 6.55 hojas y para las plantas establecidas en sustrato arena sin división del sistema radical el valor promedio fue de 6.67 hojas (Figura 2).

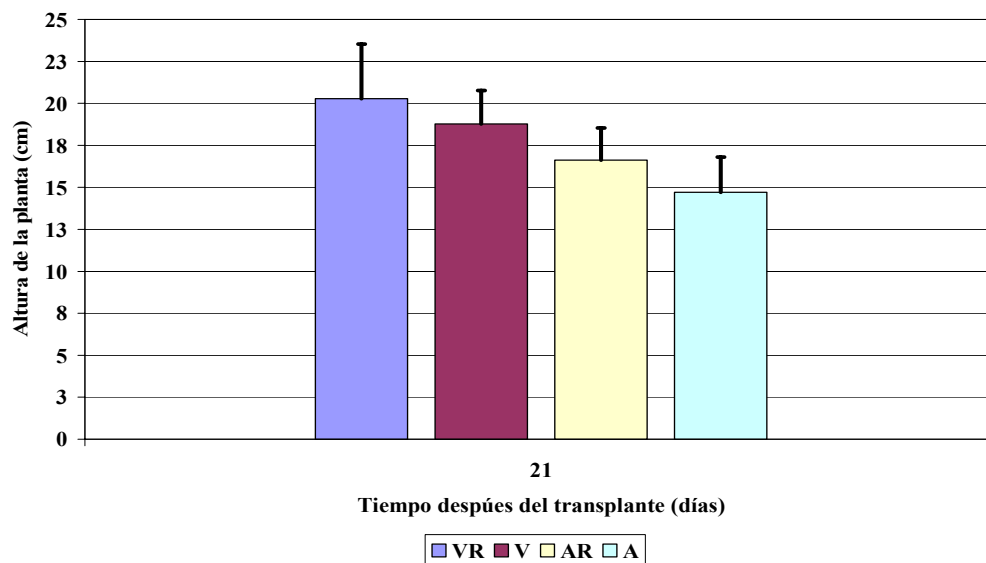


Figura 1. Efecto del sustrato y sistema de división de raíces sobre la altura de las plantas de tomate. VR: plantas establecidas en sustrato vermiculita con división física del sistema radical; V: plantas establecidas en sustrato vermiculita sin división física del sistema radical. AR: plantas establecidas en sustrato arena con división física del sistema radical. A: plantas establecidas en sustrato arena sin división física del sistema radical.

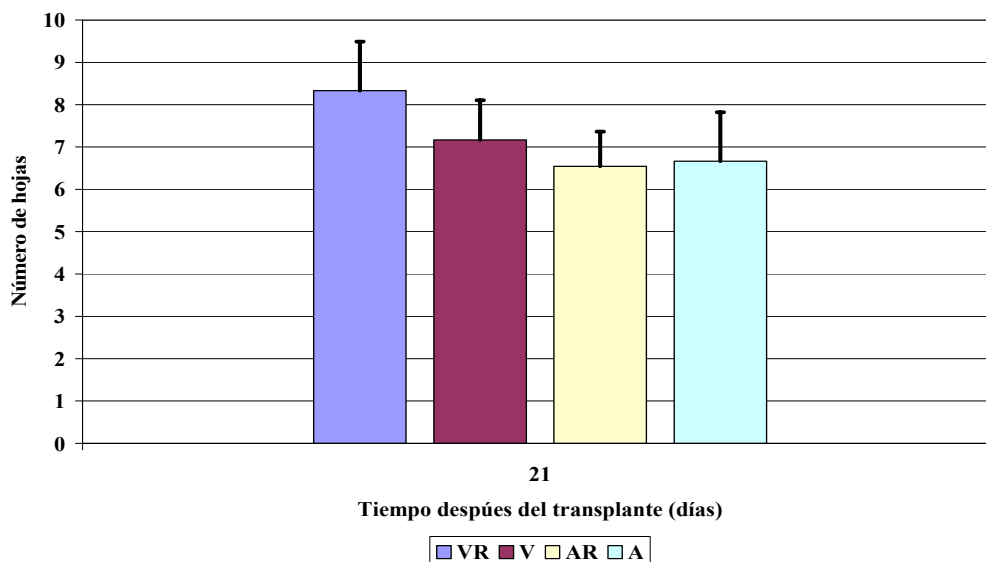


Figura 2. Efecto del sustrato y sistema de división de raíces sobre la emisión de hojas de las plantas de tomate. VR: plantas establecidas en sustrato vermiculita con división física del sistema radical; V: plantas establecidas en sustrato vermiculita sin división física del sistema radical. AR: plantas establecidas en sustrato arena con división física del sistema radical. A: plantas establecidas en sustrato arena sin división física del sistema radical.

De acuerdo con estos resultados, las plantas establecidas en el sustrato vermiculita presentaron el mejor comportamiento en el crecimiento vegetal. Esto se relaciona con lo reportado por Olivo y Buduba (2006), quienes al evaluar la influencia de seis sustratos sobre el crecimiento de *Pinus ponderosa* producido en contenedores bajo condiciones de invernadero, encontraron que el mejor comportamiento de crecimiento vegetal se presentó en el sustrato vermiculita, debido a que dicho componente inorgánico brindó las mejores condiciones fisicoquímicas para el crecimiento vegetal. La vermiculita es una pequeña piedra volcánica que presenta alta porosidad, lo cual permite una buena aireación y regulación de la temperatura. Además presenta una alta capacidad de retención de humedad. El agua cumple un papel fundamental en la dinámica de la continua relación sustrato-planta-atmósfera, debido a su participación en la mayoría de procesos metabólicos de la planta. Junto con esto, el agua favorece la penetración de raíces, a través de la lubricación del sustrato y permite la absorción de nutrientes (Ansorena, 1995). Lo anterior explica el por qué se presentó un mayor crecimiento en las plantas establecidas en este sustrato, comparado con el menor crecimiento que presentaron las plantas establecidas en sustrato arena.

Además se encontró que el sustrato arena presentó compactación (Figura 3a). La compactación del suelo disminuye la aireación del mismo (el intercambio gaseoso), dificultando el crecimiento de las raíces y disminuyendo la infiltración, así como también promoviendo la erosión hídrica debido a que se favorece la escorrentía superficial (McGarry, 2001). El contenido de humedad edáfico es el factor más importante que influencia los procesos de compactación (Soane y Van Ouwerkerk, 1994). Para todos los niveles de compactación, la resistencia a la penetración de las raíces aumenta a medida que disminuye el potencial de agua en el suelo (Lipiec *et al.*, 2002). En general, las plantas que crecen bajo suelos compactados poseen menor cantidad de raíces secundarias y menor materia seca radical que aquellas que crecen bajo condiciones controladas (Panayiotopoulos *et al.*, 1994). En el presente estudio se observaron síntomas de deficiencia de fósforo, caracterizados por una coloración púrpura en las plantas establecidas en el sustrato arena (Figura 3b) y menor crecimiento de las plantas, lo cual se debió posiblemente a la baja disponibilidad de nutrientes y agua como resultado de la compactación presentada por el sustrato arena de río.

El establecimiento de las plantas de tomate con su sistema radical dividido físicamente en dos porciones, no afectó el crecimiento vegetal comparado con las plantas establecidas sin división radical (Figuras 1-2). Estos resultados permitieron seleccionar el establecimiento de plantas de tomate en el sustrato vermiculita con un sistema de división física de las raíces, como el sistema de evaluación adecuado para los posteriores ensayos realizados en este estudio.



Figura 3. (a) Compactación del sustrato arena; (b) Síntomas de deficiencia de fósforo en plantas de tomate de nueve semanas de edad establecida en sustrato arena.

4.2 Prueba de patogenicidad de *F. oxysporum* en plantas de tomate

En la prueba de patogenicidad, la capacidad de infección de las cepas Fu040 y Fu041 de *F. oxysporum* en plantas de tomate se confirmó mediante la indexación del tallo. A los 15 días después de la inoculación, se encontró que las dos cepas de *F. oxysporum* colonizaron el sistema vascular de las plantas, desde el cuello hasta 3 cm (Figura 4) en todas la muestras (100%). En cuanto al testigo relativo y testigo absoluto, no se observó infección por *F. oxysporum* en el tejido vegetal indexado (Figura 4).

Se observó que 28 días después de la inoculación de la cepas Fu040 y Fu041 de *F. oxysporum*, éstas habían colonizado el 100% de la longitud del tallo (12 cm) de la planta de tomate. Estos resultados confirmaron que las cepas Fu040 y Fu041 tienen la capacidad de infectar plantas de tomate híbrido Rocío® y de ascender por los haces vasculares de la plantas. En las plantas del testigo absoluto y testigo relativo no se observó colonización del tejido vegetal indexado por *F. oxysporum*.

En relación con el ascenso del patógeno por el xilema de las plantas evaluadas, no se presentaron diferencias entre las cepas Fu040 y Fu041 de *F. oxysporum*. Se esperaba encontrar un comportamiento diferente entre las dos cepas, ya que se considera que son dos formas especiales diferentes, esto de acuerdo con los síntomas presentados por las plantas a partir de las cuales se aislaron. La cepa Fu040 se aisló de plantas de tomate con síntomas de pudrición del cuello y de la raíz, considerándose de acuerdo con los síntomas como *F. oxysporum* f .sp. *radicis-lycopercisi* (Agris, 2005). La cepa Fu041 se aisló de plantas de tomate de tres meses de edad post-transplante que presentaban síntomas de marchitamiento vascular, considerándose que es *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Agris, 2005). Sin embargo, es necesario hacer un análisis molecular para determinar con más precisión la identidad de las dos cepas de *Fusarium oxysporum* mediante técnicas basadas en el análisis filogenético de los espacios intergénicos del DNA ribosomal (Kawabe *et al.*, 2005) y

la caracterización de los ácidos grasos que permitan la definición de las formas especiales (Matsumoto, 2006).

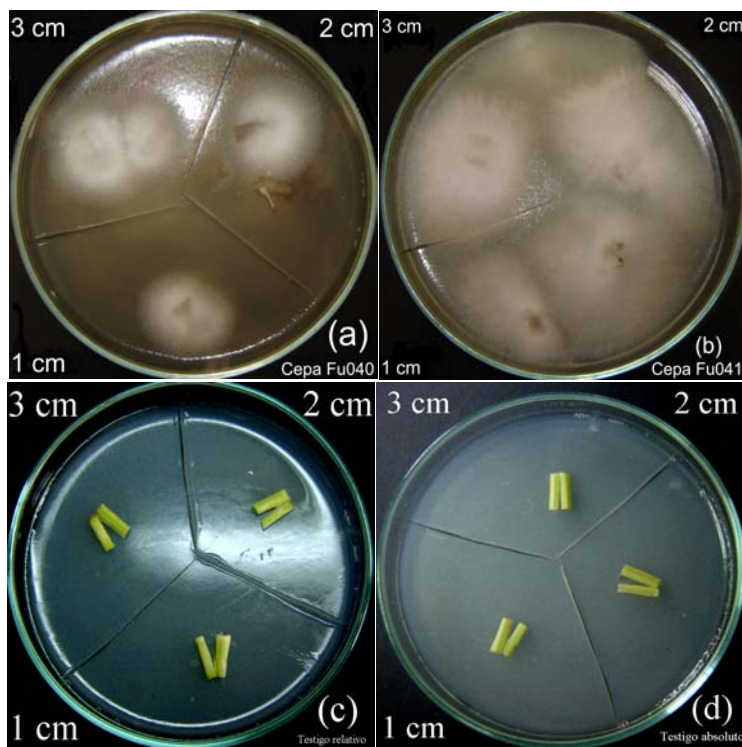


Figura 4. Presencia de *F. oxysporum* en tejido vegetal indexado 15 días después de su inoculación en plantas de tomate. (a) Fu040: segmentos de planta inoculada con la cepa Fu040 de *F. oxysporum*; (b) Fu041: segmentos de planta inoculada con la cepa Fu041 de *F. oxysporum* (c) Testigo relativo y (d) Testigo absoluto.

En este ensayo no se observaron síntomas de pudrición de raíces en las plantas tratadas con la cepa Fu040, los cuales son característicos de la enfermedad causada por *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Tampoco se observaron síntomas de marchitamiento vascular en las plantas inoculadas con la cepa Fu041 de *F. oxysporum*, los cuales son característicos de la enfermedad causada por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Tampoco se observaron síntomas de pudrición de raíces ni de marchitamiento vascular en el testigo relativo y en el testigo absoluto. Estos resultados son contrastantes con los reportados por Cárdenas (1999), quien encontró que el 83.3% de las plantas de tomate de seis semanas de edad inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, desarrollaron síntomas de la enfermedad marchitamiento vascular 15 días después de la inoculación, esto cuando se usó una concentración de 5% del patógeno en el sustrato de siembra. Esto posiblemente se debió a la gran variabilidad genética de *F. oxysporum*, encontrándose variación en la virulencia entre las cepas Fu040 y Fu041 con la cepa usada por Cárdenas (1999). La virulencia depende de la forma especial y de la raza de cada cepa de *F. oxysporum* (Gordon y Martin, 1997; Fravel *et al.*, 2003).

La presencia de las cepas del patógeno en el sistema vascular de las plantas infectadas en el presente estudio, se relaciona con la capacidad que tienen las cepas patogénicas de *F. oxysporum* para penetrar las raíces y colonizar el tejido vascular del hospedero, en contraste, las cepas no patogénicas sólo penetran la corteza de las raíces y no alcanzan el sistema vascular de las plantas (Gordon y Martin, 1997; Fravel *et al.*, 2003). Lo cual permitió confirmar para el presente estudio la capacidad patogénica de las cepas Fu040 y Fu041 en plantas de tomate. Una vez se establece el patógeno en el sistema vascular, éste alcanza la parte superior de la planta mediante su dispersión a través del sistema vascular (Rocero *et al.*, 2000), esto ocurrió en el presente estudio 28 días después de la inoculación para las dos cepas de *F. oxysporum* evaluadas.

En el caso específico de *F. oxysporum*, las formas patogénicas incluyen la colonización asintomática del xilema (Gordon y Martin, 1997). En este estudio el hospedero pudo simplemente tolerar el crecimiento limitado del hongo en las vesículas del xilema, permitiendo una asociación parasítica. La aparición de síntomas está sujeta a cambios subsecuentes ya sea en el hospedero o en el parásito que alteren la relación establecida por los dos organismos, dando inicio al desarrollo de la enfermedad (Gordon y Martin, 1997). En el presente estudio dicha alteración de la asociación planta-patógeno no se presentó, que significó la ausencia de síntomas en las plantas establecidas bajo el sistema de evaluación. Los resultados son contrastantes con otros estudios donde la colonización del sistema vascular determinó el grado de desarrollo de los síntomas (Liu *et al.*, 1995; De Cal *et al.*, 2000; Attitalla *et al.*, 2001), pudiéndose establecer una directa relación entre el porcentaje de tejido colonizado y la aparición de los síntomas de la enfermedad.

La técnica de indexación del material vegetal seleccionada para la evaluación de esta prueba, ha sido ampliamente utilizada para establecer la capacidad de infección y colonización de cepas de *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Rekah *et al.*, 2000) y *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Duijff *et al.*, 1998; Ito *et al.*, 2004). Rekah *et al.* (2000) encontraron que la tasa de colonización a lo largo del tallo, está directamente relacionada con la concentración del inóculo del *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (10^6 macroconidias.mL⁻¹), la temperatura de 22-27°C y alta humedad relativa, obteniendo bajo estas condiciones hasta un 100% de colonización de la planta de tomate. Otras condiciones importantes que favorecen el desarrollo de la enfermedad son un pH de 5.7 ± 0.2 y una conductividad eléctrica de 3.3 ± 0.5 mS.cm⁻² del sustrato de enraizamiento. Bajo éstas condiciones Duijff *et al.* (1998) obtuvieron 100% de incidencia de la enfermedad y presencia de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* en el tejido vegetal de tomate indexado, 11 semanas después de la infección. Ito *et al.* (2004) demostraron que esta técnica permite determinar en corto tiempo el avance del patógeno y es adecuada para la evaluación del fenómeno de inducción de resistencia sistémica. En el presente estudio, el establecimiento de este sistema de evaluación permitió establecer en corto tiempo el avance del patógeno, determinándose la capacidad de infección las cepas Fu041 y Fu040 de

F. oxysporum. Sin embargo, no se pudo determinar la incidencia de la enfermedad, ya que no se presentaron síntomas, lo que plantearía la necesidad de determinar las condiciones medio ambientales, como el pH del sustrato favorables para el desarrollo de la enfermedad, además de la etapa fenológica de las plantas de tomate de mayor susceptibilidad, ya que como lo reportaron Di Pietro *et al.* (2003) la aparición de síntomas del marchitamiento vascular se presentan hacia el final de la etapa de floración o al inicio de la etapa productiva en tomate. La determinación de estos factores permitiría establecer una relación directa entre el porcentaje de tejido colonizado y la aparición de los síntomas de la enfermedad.

De acuerdo con estos resultados, en los cuales se observó un comportamiento similar entre las cepas Fu040 y Fu041, se determinó usar las dos cepas de *F. oxysporum* en posteriores ensayos, ya que se consideran dos formas especiales diferentes.

4.3 Determinación del efecto de inducción de resistencia sistémica de la cepa Th003 sobre *Fusarium oxysporum*

Se observó que 15 días después de la inoculación del patógeno, en las plantas tratadas con la cepa Th003 de *T. koningii* se presentó un retraso en el ascenso del patógeno por los haces vasculares, en comparación con las plantas del testigo patógeno. El mayor retraso del ascenso del patógeno por los haces vasculares del xilema, se presentó en las plantas tratadas con la suspensión de la cepa Th003 en concentración de 10^5 conidios.mL⁻¹, encontrándose que el ascenso de la cepa Fu040 se limitó al 1 cm (Figura 5) por encima del cuello del tallo en el 33 % de las plantas evaluadas (Figura 6) mientras que el ascenso de la cepa Fu041 se limitó al 1 cm por encima del cuello del tallo en el 66% de las plantas evaluadas (Figura 7).

El mayor ascenso del patógeno por los haces vasculares del xilema en plantas tratadas con la cepa Th003, se encontró en las unidades experimentales tratadas con la suspensión de la cepa Th003 en concentración 10^6 conidios.mL⁻¹ a los 15 días después de la inoculación de *F. oxysporum*, encontrándose en el caso de las dos cepas un ascenso hasta 3 cm por encima del cuello del tallo en el 33% de plantas evaluadas (Figura 6). En las plantas del testigo absoluto y testigo relativo no se observó infección del patógeno (Figuras 6 y 7). En el testigo patógeno, las cepas Fu040 y Fu041 ascendieron hasta el 3cm por encima del cuello del tallo en el 100% de plantas evaluadas (Figura 6 y 7).

De acuerdo con los resultados, se estableció que la suspensión de *T. koningii* en concentración de 10^5 conidios.mL⁻¹ generó una mayor respuesta de defensa en las plantas de tomate que permitió

limitar el ascenso del patógeno al 1 cm del tallo a los 15 días después de la inoculación de la cepa Fu040.

A los 28 días después de la inoculación del patógeno se observó la presencia de la cepa Fu040 y Fu041 en todos los tratamientos, en el 100% del tejido vegetal. En plantas de los tratamientos testigo absoluto y testigo relativo no se presentó infección de las cepas del patógeno el xilema. Resultados que coinciden con lo encontrado en la prueba de patogenicidad para la cepa Fu041 en plantas de tomate, donde se determinó que el patógeno se dispersó por toda la longitud (12 cm) del tallo a los 28 días después de la inoculación de *F. oxysporum*.

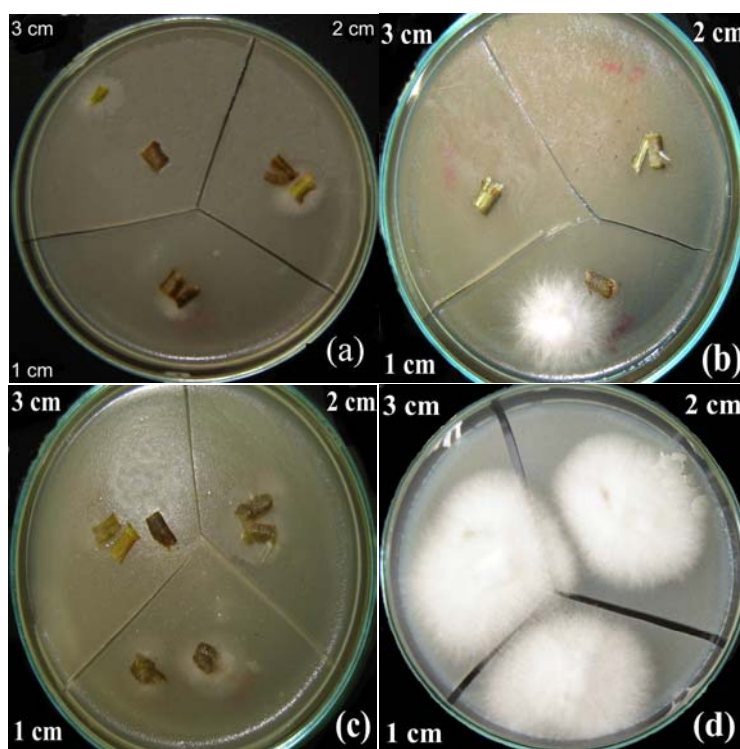


Figura 5. Presencia de la cepa Fu040 de *F. oxysporum* en segmentos de tallo de plantas de tomate 15 días después de la inoculación del patógeno. (a) Segmentos de tallo de una planta tratada con una suspensión de 10^7 conidios·mL⁻¹ de la cepa Th003. (b) Segmentos de tallo de una planta tratada con una suspensión de 10^6 conidios·mL⁻¹ de la cepa Th003. (c) Segmentos de tallo de una planta tratada con una suspensión de 10^5 conidios·mL⁻¹ de la cepa Th003. (d) Segmentos de tallo correspondientes a una planta del testigo patógeno. La inoculación de la cepa Th003 se realizó 4 días antes de la inoculación con el patógeno.

El análisis de varianza realizado no detectó diferencias significativas entre los tratamientos evaluados y los testigos. Sin embargo, se observó que el comportamiento del ascenso del patógeno varió de acuerdo con la concentración de la suspensión conidial de Th003, encontrándose un mayor retraso cuando se trató una porción del sistema radical con la suspensión en concentración de 10^5

conidios·mL⁻¹. Se han descrito diferentes mecanismos como explicación a este retraso, también relacionados en la reducción de la colonización de *F. oxysporum* en cultivares resistentes. Dentro estos mecanismos se encuentran la formación de barreras que previenen el progreso del patógeno (Benhamou *et al.*, 1996), el confinamiento del patógeno al xilema primario (Benhamou *et al.*, 1996; De Cal *et al.*, 2000), la proliferación de vesículas libres del patógeno (Scheffer y Walter, 1954; De Cal *et al.*, 2000) y la inhibición del crecimiento del patógeno (Gao *et al.*, 1995; De Cal *et al.*, 2000). El retraso en el ascenso del patógeno se debe a una respuesta generalizada en las plantas de tomate, en este caso estimulada por la cepa Th003 de *T. koningii*, éste podría asociarse con el cambio en la composición de la pared celular de las células de las raíces. Estos resultados se relacionan con lo reportado por De Cal *et al.* (2000), quienes encontraron que al inocular *P. oxalicum* 7 días antes de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, disminuyó el porcentaje de tejido vascular colonizado por el patógeno. También se ha encontrado que la reducción de la infección de *F. oxysporum* en plantas de tomate tratadas con *Bacillus subtilis* presentan cambios celulares sustanciales, principalmente caracterizados por un considerable aumento de las yuxtaposiciones de la pared celular, ricas en calosa depositada en la superficie interior de la pared celular de la epidermis y corteza exterior, lo cual permitió la disminución de la infección de *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Benhamou *et al.*, 1998). Yedidia *et al.* (1999) igualmente encontraron cambios celulares en las raíces de plantas de pepino tratadas con *T. harzianum* T-203, caracterizados por yuxtaposiciones de la pared celular ricas en calosa, mostrando una notable modificación en la pared celular de las células epidermales y corticales, también como la presencia de depósitos de nuevas barreras formadas y activadas por el tratamiento con la cepa T-203. De la misma manera, se ha encontrado que el retraso del ascenso de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* en plantas tratadas con *P. oxalicum* involucra cambios histológicos, que están relacionados con la producción de reguladores de crecimiento, causando división, diferenciación y crecimiento de las células, soportando la hipótesis de que los reguladores de crecimiento son al menos uno de los mecanismos de acción de *P. oxalicum* con un inductor de resistencia sistémica (De Cal *et al.*, 2000).

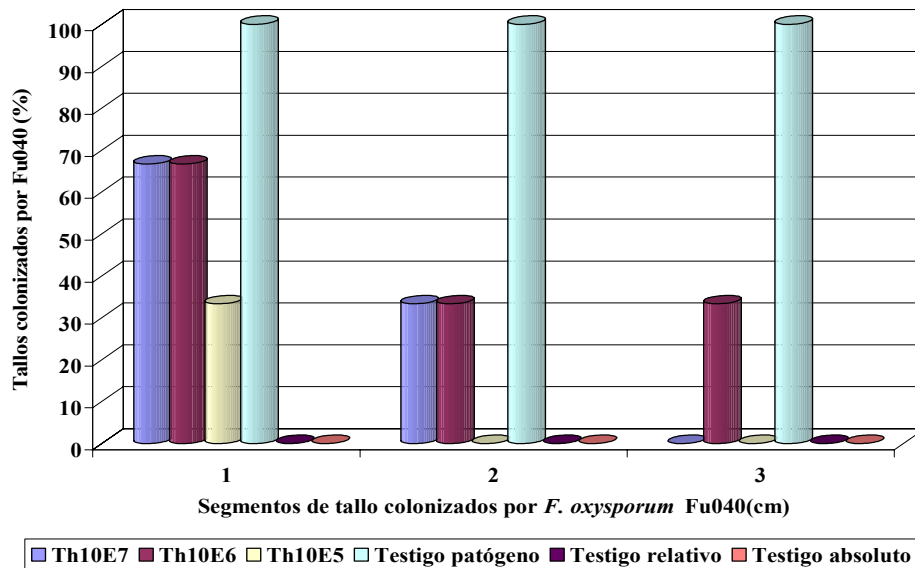


Figura 6. Colonización del tallo de plantas de tomate tratadas con la cepa Th003 de *T. koningii* 4 días antes de la inoculación con la cepa Fu040 de *F. oxysporum*, evaluada 15 días después de la infección. Th10E7: plantas tratadas con una suspensión de 10^7 conidios·mL⁻¹ de la cepa Th003. Th10E6: plantas tratadas con una suspensión de 10^6 conidios·mL⁻¹ de la cepa Th003. Th10E5: plantas tratadas con una suspensión de 10^5 conidios·mL⁻¹ de la cepa Th003.

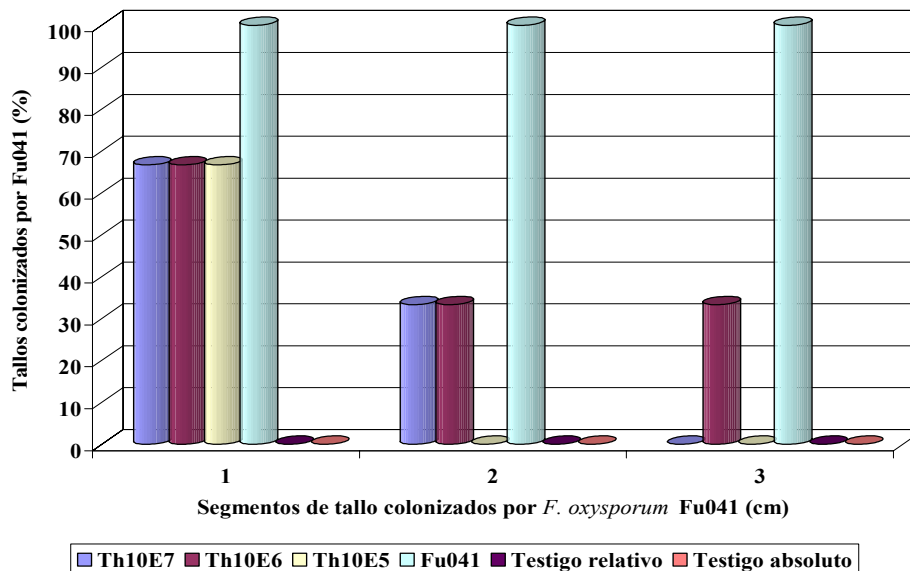


Figura 7. Colonización del tallo de plantas de tomate tratadas con la cepa Th003 de *T. koningii* 4 días antes de la infección con la cepa Fu041 de *F. oxysporum*, evaluada 15 días después de la infección. Th10E7: plantas tratadas con una suspensión de 10^7 conidios·mL⁻¹ de la cepa Th003. Th10E6: plantas tratadas con una suspensión de 10^6 conidios·mL⁻¹ de la cepa Th003. Th10E5: plantas tratadas con una suspensión de 10^5 conidios·mL⁻¹ de la cepa Th003.

Los cambios estructurales en los tejidos de las raíces de las plantas de tomate podrían explicar en parte el fenómeno encontrado en el presente estudio, donde la reducción en el porcentaje de colonización del tallo puede describirse como un efecto sistémico de *T. koningii* sobre las plantas de tomate. Esto se puede afirmar ya que dentro de los mecanismos de defensa de las plantas se encuentra la modificación de la composición de la pared celular, ésta sufre modificaciones estructurales como respuesta a la invasión de los microorganismos (Talboys, 1972). Dentro de los cambios sufridos se encuentra la síntesis de glicoproteínas, acumulación de calosa y lignificación de los tejidos vegetales (Benhamou *et al.*, 1996). La acumulación de calosa al igual que la densidad de ésta, se correlaciona con el éxito o fracaso de las infecciones microbianas, especialmente de hongos (Aist *et al.*, 1988; Kogel *et al.*, 1988). Su formación está relacionada positivamente con la resistencia al ataque micótico. La lignificación de la pared celular aumenta la resistencia de las células vegetales al ataque de enzimas hidrolíticas de origen microbiano, al cubrir y entrecruzar los polisacáridos y las proteínas de la pared celular (Ride y Barber, 1987; Doster y Bostock, 1988).

Pocos estudios se han realizado con cepas del género *Trichoderma* como agentes elicitors de respuestas sistémicas contra patógenos del suelo, al respecto, la mayoría de estudios reportan a bacterias promotoras de crecimiento como agentes elicitors de dicha resistencia. Dentro de estos estudios se encuentra el realizado por Khan *et al.* (2004), quienes encontraron que en plantas de pepino tratadas con *T. harzianum* T382 en un sistema de evaluación de división de raíces, se redujo la severidad del ataque de *Phytophthora capsici* en un 7.5% con respecto al control patógeno. En el presente estudio el ascenso del patógeno por los haces vasculares del xilema se retrasó 2 cm con respecto al testigo patógeno, cuando se trató previamente el sistema radical de las plantas de tomate con una suspensión en concentración de 10^5 conidios·mL⁻¹. Esto realza la importancia que tienen los resultados obtenidos en el presente estudio, en el cual se encontró el efecto de resistencia sistémica en plantas de tomate contra *F. oxysporum*.

En cuanto al sistema de división de raíces empleado en este estudio, éste permitió cumplir con la condición de separación espacial del agente elicitor y del patógeno para evaluar el efecto de inducción de resistencia. Este sistema ha sido ampliamente usado por otros autores para demostrar la capacidad de agentes de biocontrol de inducir las respuestas de defensa sistémica en plantas de tomate contra *F. oxysporum* (Liu *et al.*, 1995; Fuchs *et al.*, 1997; Duijff *et al.*, 1998; De Cal *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2004). Adicionalmente la indexación del material vegetal sirvió tanto para la determinación del ascenso como para corroborar la ausencia de una interacción directa entre *T. koningii* y *F. oxysporum*, lo cual se pudo determinar por la presencia sólo del patógeno en el tejido vegetal evaluado. Esto aseguró que el retraso del ascenso del patógeno se dió en respuesta a un mecanismo de acción indirecto (De Cal *et al.*, 2000) y no a mecanismos de acción directo de la cepa Th003.

Adicionalmente, la eficiencia del fenómeno de resistencia se encuentra asociada a una compleja interacción entre rutas metabólicas, involucradas en las respuestas de defensa. Las condiciones ambientales, al generar estrés abiótico interfieren con las respuestas de defensa en las plantas, generándose otras moléculas como citoquininas y ácido abscísico, que influyen directamente en la concentración de las moléculas de señalización (Davies, 1995; Bostock, 2005). Entre otras variables que afectan la eficiencia de la respuesta, se encuentra el tiempo requerido por el elicitor para generar la respuesta en las plantas (Bostock, 2005). Todo lo anterior tiene un efecto directo sobre el fenómeno de resistencia sistémica, determinando la eficiencia en los mecanismos de defensa de la planta (Bostock, 2005). En el presente estudio estos son dos factores que pudieron influenciar las respuestas elicidadas en las plantas, ya que éstas no se establecieron bajo condiciones ambientales controladas y no se determinó el tiempo requerido por la cepa Th003 para elicitar las respuestas en las plantas.

Aunque aún no se conocen con exactitud todos los mecanismos involucrados en la respuesta generada en las plantas de tomate por la cepa Th003, Cotes *et al.* (1993) reportaron el efecto elicitor de respuestas de defensa por la cepa Th003 en semillas de frijol y Clavijo (1998) reportó este mismo efecto sobre semillas de tomate, donde *T. koningii* estimuló en las semillas tratadas en combinación con un tratamiento de pregerminación controlada, la producción de enzimas hidrolíticas β -1,3-glucanasa y endoquitinasas. Adicionalmente, en estudios preliminares realizados con el fin de dilucidar el efecto sistémico de la cepa Th003, Castillo *et al.* (2007), encontraron mediante la técnica de microarreglos, que en plantas de tomate híbrido Roció tratadas con Th003 se expresan 42 genes diferenciales, dentro de los cuales se encuentran en la categoría funcional, genes reguladores de crecimiento, genes de señalización, genes de respuesta a hormonas, genes de transporte, genes de traducción de señales, entre otros. Todos estos resultados permiten afirmar que la cepa Th003 elicita respuestas de defensa en plantas de tomate. En relación con el estudio de Castillo *et al.* (2007) se puede afirmar que dichas respuestas involucran la síntesis de proteínas relacionadas con la patogénesis, hormonas, reguladores de crecimiento entre otros mecanismos, ocasionando el retraso del ascenso de *F. oxysporum* por los haces vasculares del xilema de las plantas de tomate.

Estos resultados permiten resaltar que el uso de *Trichoderma* spp. en el suelo suprime las enfermedades de las plantas, lo cual ha sido ampliamente documentado (Silvan y Chet, 1993; Yedidia *et al.*, 1999; Harman *et al.*, 2004a; Woo *et al.*, 2006). El biocontrol ejercido por *Trichoderma* spp. se considera como el resultado de procesos multifacéticos, que requieren la contribución sinérgica de varios mecanismos de acción, dentro de los cuales puede incluirse la activación de los mecanismos de defensa de las plantas (Yedidia *et al.*, 1999; Cotes *et al.*, 2001; Harman *et al.*, 2004a; Woo *et al.*, 2006). El género *Trichoderma* ha sido también reportado como

agente de biocontrol que tiene la capacidad de activar sistémicamente las respuestas de defensa de las plantas contra la infección de hongos, tales como *R. solani* (Harman *et al.*, 2004b); *Colletotrichum* spp. (Harman *et al.*, 2004a), *B. cinerea* (Elad, 1996), *Magnaporthe grisea* (Harman *et al.*, 2004b), *Phytophthora* spp. (Harman *et al.*, 2004a), además de los mecanismos de acción directos sobre los fitopatógenos. De acuerdo con estos reportes, se puede considerar los resultados de este estudio como el primer reporte de *Trichoderma koningii* Th003 como agente elicitor de resistencia sistémica en plantas de tomate contra el hongo fitopatógeno del suelo *F. oxysporum*.

4.4 Determinación del efecto de estimulación del crecimiento vegetal por la cepa Th003

Al evaluar el potencial de *T. koningii* Th003 como agente inductor de crecimiento de plantas de tomate en la etapa de semillero, se encontró que el tratamiento de semillas pregerminadas en presencia de Th003 con posteriores inoculaciones de este microorganismo a los 7 y 48 días después de la siembra (PThI), fue el que presentó los mayores valores para las variables evaluadas.

Para la variable de emergencia de las plántulas se detectaron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los tratamientos a los 7, 8 y 9 días después de la siembra. A los 7 días después de la siembra se encontró que el porcentaje de emergencia para las semillas pregerminadas en presencia de Th003 con posteriores inoculaciones *T. koningii* fue del 36.7% (Figura 8), mientras que el porcentaje de emergencia para las semillas pregerminadas en ausencia de Th003 con posteriores inoculaciones de *T. koningii* fue del 3.3% (Figura 8) y para las semillas pregerminadas en ausencia de Th003 sin posteriores inoculaciones fue del 1.7% (Figura 8). Los menores porcentajes de emergencia se observaron en los tratamientos de semillas sin pregerminación con posteriores inoculaciones de la cepa Th003 y para las semillas sin ningún tratamiento (testigo absoluto), en el que no se observó emergencia en este tiempo (Figura 8).

A los 8 días después de la siembra el porcentaje de emergencia para las semillas pregerminadas en presencia de Th003 con posteriores inoculaciones *T. koningii* fue del 65% (Figura 8), mientras que el porcentaje de emergencia para las semillas pregerminadas en ausencia de la cepa Th003 con posteriores inoculaciones de *T. koningii* fue del 35% (Figura 8) y para las semillas no pregerminadas con posteriores inoculaciones de Th003, éste fue del 30%. Los menores porcentajes de emergencia se observaron para los testigos semillas pregerminadas en ausencia de Th003 sin posteriores inoculaciones (testigo relativo), siendo éste de 20% (Figura 8) y para las semillas sin ningún tratamiento (testigo absoluto), en donde se encontró 15% de emergencia (Figura 8).

A los 9 días después de la siembra el porcentaje de emergencia para las semillas pregerminadas en presencia de Th003 con posteriores inoculaciones de *T. koningii* fue del 80% (Figura 8), mientras

que el porcentaje de emergencia para las semillas pregerminadas en ausencia de la cepa Th003 con posteriores inoculaciones de *T. koningii* fue del 55% (Figura 8) y para las semillas no pregerminadas con posteriores inoculaciones de Th003 éste fue del 45%. Los menores porcentajes de emergencia se observaron cuando las semillas se pregerminaron en ausencia de Th003 y sin posteriores inoculaciones, siendo éste de 36.7% (Figura 8) y en el testigo absoluto, en el que se obtuvo 40% (Figura 8). De acuerdo con estos resultados las semillas pregerminadas en presencia de la cepa Th003 con posteriores inoculaciones de *T. koningii*, presentaron un mayor porcentaje de emergencia durante los primeros 9 días después de la siembra. Después de este tiempo, los demás tratamientos se igualaron en número de plantas emergidas, no encontrándose diferencias hacia la segunda semana después de la siembra (Figura 8).

Los resultados de emergencia de plántulas evidencian que el tratamiento de las semillas pregerminadas en presencia de Th003 acelera el desarrollo vegetativo de las plántulas durante sus primeras etapas de desarrollo. La respuesta en la germinación de este tratamiento se debe en parte al tratamiento de pregerminación, el cual provee a la semilla una hidratación parcial, sumado al efecto que tiene la cepa Th003 como inductora de crecimiento. Esto puede representar ventajas para el agricultor en términos económicos, ya que las semillas tratadas bajo este esquema, tienen como ventajas un 80% de emergencia de las plántulas más rápido durante los primeros nueve días después de la siembra.

Para la variable altura no se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P>0.05$) entre los tratamientos evaluados. Sin embargo, se observó el mejor comportamiento cuando las semillas se pregerminaron en presencia de la cepa Th003 y se realizaron posteriores inoculaciones de *T. koningii*, obteniéndose al finalizar la evaluación plántulas con una longitud promedio de 12.55 cm (Tabla 1). Estos resultados fueron superiores a los registrados en las plántulas del testigo absoluto en donde se obtuvo una altura de 11.46 cm a los 49 dds (Tabla 1).

Para la variable de acumulación de materia seca, se observaron valores significativamente diferentes ($P>0.05$) a los 21 dds entre las plántulas provenientes de semillas pregerminadas en presencia de la cepa Th003 con posteriores inoculaciones de *T. koningii* y el testigo absoluto, obteniéndose para la variable de peso seco foliar valores de 0.1 g y 0.06 g, respectivamente (Tabla 1). Estos resultados mostraron el efecto positivo de la cepa Th003 durante los primeros 21 dds sobre la acumulación de materia seca foliar.

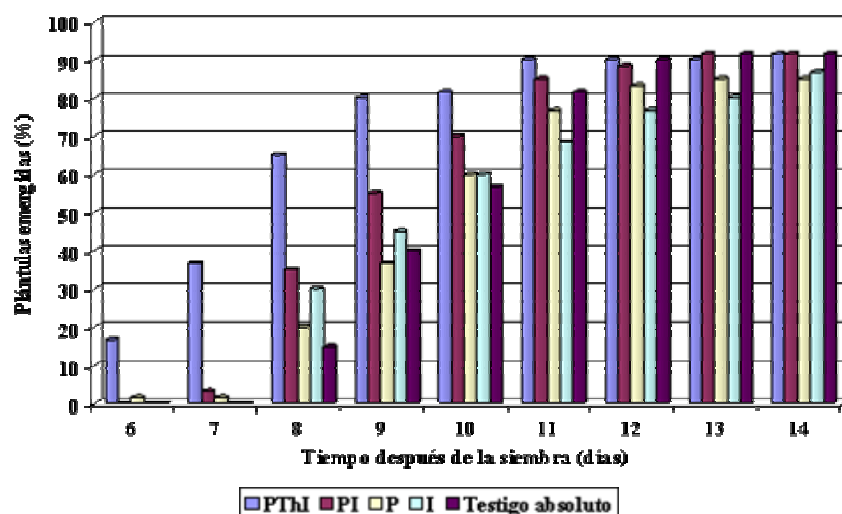


Figura 8. Emergencia de plántulas de tomate. P: semillas pregerminadas. Th: semillas pregerminadas en presencia de la cepa Th003 de *T. koningii*. I: inoculaciones de la cepa Th003 a los 7 y 42 días después de la siembra. Control: testigo absoluto. dds: días después de la siembra. Se presentan los valores de la variable \pm la desviación estándar de tres plántulas por repetición.

Tabla 1. Efecto de los tratamientos biológicos sobre la altura, el peso seco foliar y peso seco radical de plantas de tomate.

Tratamiento	Tiempo de muestreo (dds)	Altura (cm)	Peso seco foliar (g)	Peso seco radical (g)
PThI	21	3,61 \pm 0,21	0,10 \pm 0,00	0,03 \pm 0,01
	28	4,93 \pm 0,43	0,19 \pm 0,02	0,05 \pm 0,10
	35	7,24 \pm 1,16	0,46 \pm 0,06	0,14 \pm 0,02
	42	10,26 \pm 1,80	0,75 \pm 0,14	0,20 \pm 0,03
	49	12,55 \pm 1,82	0,67 \pm 0,41	0,24 \pm 0,01
PI	21	3,42 \pm 0,10	0,06 \pm 0,01	0,02 \pm 0,01
	28	4,40 \pm 0,05	0,20 \pm 0,06	0,05 \pm 0,01
	35	6,86 \pm 0,32	0,44 \pm 0,07	0,15 \pm 0,02
	42	9,12 \pm 0,61	0,61 \pm 0,15	0,17 \pm 0,03
	49	10,97 \pm 1,01	1,37 \pm 0,19	0,25 \pm 0,00
P	21	3,42 \pm 0,15	0,07 \pm 0,02	0,02 \pm 0,00
	28	4,46 \pm 0,08	0,19 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01
	35	7,11 \pm 0,37	0,36 \pm 0,02	0,13 \pm 0,01
	42	9,99 \pm 0,30	0,76 \pm 0,07	0,21 \pm 0,02
	49	12,28 \pm 0,26	1,47 \pm 0,09	0,25 \pm 0,02
I	21	3,20 \pm 0,02	0,13 \pm 0,21	0,03 \pm 0,01
	28	4,38 \pm 0,14	0,19 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01
	35	7,08 \pm 0,66	0,38 \pm 0,03	0,13 \pm 0,03
	42	10,23 \pm 0,63	0,91 \pm 0,05	0,22 \pm 0,03
	49	12,80 \pm 0,11	0,98 \pm 0,30	0,21 \pm 0,04
Control	21	3,25 \pm 0,11	0,06 \pm 0,00	0,05 \pm 0,01
	28	4,19 \pm 0,27	0,20 \pm 0,03	0,05 \pm 0,01
	35	6,90 \pm 0,89	0,36 \pm 0,11	0,12 \pm 0,04
	42	10,02 \pm 0,68	0,72 \pm 0,12	0,17 \pm 0,03
	49	11,46 \pm 0,96	1,33 \pm 0,30	0,26 \pm 0,05

P: semillas pregerminadas. Th: semillas pregerminadas en presencia de la cepa Th003 de *T. koningii*. I: inoculaciones de la cepa Th003 a los 7 y 42 días después de la siembra. Control: testigo absoluto. dds: días después de la siembra. Se presentan los valores de la variable \pm la desviación estándar de tres plántulas por repetición

También se evaluó el potencial de *T. koningii* Th003 como inductor de crecimiento de plantas de tomate después del trasplante. El parámetro de altura se descartó debido a una elongación pronunciada de las plantas durante la etapa de semillero, siendo en éste caso un parámetro influenciado por factores externos a los efectos de los tratamientos.

El análisis de varianza realizado a los parámetros considerados en este ensayo, mostró diferencias significativas ($P>0.05$) entre los tratamientos evaluados. Se observó un efecto significativo de la cepa Th003 sobre el peso seco foliar y el peso seco radical con valores de 5.42 y 1.09 g, respectivamente, a los 15 días después del trasplante (ddt). Comparado con el testigo absoluto donde obtuvieron menores valores para estas variables, los cuales fueron de 2.86 y 0.57 g, respectivamente (Tabla 2).

Así mismo se observó un efecto significativo de la cepa Th003 sobre el diámetro del tallo en el primer entrenudo, con valor de 4.16 mm a los 8 días después del trasplante (ddt) y 4.61 mm en el segundo entrenudo a los 15 ddt, en comparación con el comportamiento presentado por las plantas del testigo absoluto, en las cuales se obtuvieron valores de 3.42 mm para el primer entrenudo a los 8 ddt y 4.16 mm para el segundo entrenudo a los 15 ddt (Tabla 3).

Con base en estos resultados, se podría afirmar que las plantas tratadas con la cepa Th003 poseen un mayor intercambio y flujo de nutrientes en el sistema vascular, lo cual se vio reflejado en la mayor acumulación de materia seca a los 15 ddt. Estos resultados se relacionan con los encontrados por Terán *et al.* (2006), quienes determinaron una relación directa entre el diámetro del tallo y los niveles de agua en el tejido foliar. El agua cumple un papel fundamental en el transporte de minerales y en su participación en la mayoría de procesos metabólicos de la planta (Ansorena, 1995).

Los parámetros de diámetro del tallo, el peso seco foliar y peso seco radical, permitieron determinar un efecto positivo de la cepa Th003 sobre las plantas de tomate estimulando el crecimiento vegetal. Esto se ajusta con lo reportado por Yedidia *et al.* (2001), quienes encontraron que en plantas de pepino tratadas con *T. harzianum* T-203 se presentó mayor acumulación de materia seca en brotes, raíces y tejido foliar, alcanzando incrementos de hasta el 40% con respecto a plantas del testigo absoluto, bajo un sistema hidropónico con condiciones controladas.

Con el objeto de analizar el contenido foliar de elementos mayores y menores a los 15 y 33 días después del trasplante, se tomaron muestras que en el primer caso coincidían con la etapa vegetativa y en el segundo con el inicio de la etapa reproductiva. A los 15 días después del trasplante sólo se presentaron diferencias significativas ($P>0.05$) entre los tratamientos para el

contenido de calcio (Ca). Los niveles de Ca se incrementaron en aproximadamente 20% en las plantas tratadas con Th003 con respecto a las plantas del testigo absoluto (Tabla 4). Esto podría estar relacionado con el rol que ejerce el calcio en la respuesta de defensa de las plantas y pudo ser consecuencia del efecto inductor de resistencia sistémica inducido por la cepa Th003. Se ha demostrado que el calcio es esencial en la activación de las rutas de síntesis de las fitoalexinas, induciendo la expresión de genes relacionados con la patogénesis y la respuesta hipersensible de la planta (Zimmermann *et al.*, 1997; Soto-Suárez *et al.*, 2006). También tiene un papel en la estabilidad de la lámina media de la pared celular, donde la acumulación de poligalacturonato de calcio se relaciona con la resistencia a la penetración de patógeno (Maschner, 1995).

Tabla 2. Efecto del tratamiento con *T. koningii* Th003 sobre la acumulación de materia seca en los tejidos vegetales de plantas de tomate.

Tratamiento	ddt	Peso seco foliar (g)	Peso seco radical (g)
Th003	7	4,14 ± 0,98	0,84 ± 0,81
	15	5,42 ± 0,83*	1,09 ± 0,17*
	33	28,80 ± 11,94	4,25 ± 1,46
Testigo absoluto	7	3,25 ± 0,45	0,40 ± 0,10
	15	2,86 ± 1,21*	0,57 ± 0,20*
	33	20,98 ± 5,60	3,05 ± 1,36

Th003: pregerminación de semillas en presencia de la cepa Th003 con posteriores inoculaciones a los 7 y 42 días después de la siembra. *Valores que presentan diferencias significativas (P=0,05%) para el mismo tiempo de evaluación. Los valores se presentan como promedio ± desviación estándar.

En la etapa vegetativa, aunque según el análisis de varianza realizado a los datos no se presentaron diferencias significativas, se observó que los niveles de fósforo (P), potasio (K), magnesio (Mg), azufre (S), cobre (Cu) y manganeso (Mn) se incrementaron en aproximadamente un 26, 28, 20, 68, 31 y 23 % en plantas tratadas con Th003 con respecto a las plantas del testigo absoluto (Tablas 4 y 5). Yedidia *et al.* (2001) también encontraron que en plantas de pepino tratadas con *T. harzianum* T-203 se presentó un aumento de los niveles en el tejido foliar de P, Ca, Fe, Zn, Na, Cu y Mn, esto comparado con las plantas del testigo absoluto, a los 10 y 20 días después de la siembra.

El segundo muestreo, coincidió con el inicio de la etapa reproductiva, en éste se encontró que los niveles de nutrientes en el tejido foliar disminuyeron tanto en las plantas de tomate tratadas con Th003 como en las del testigo absoluto. Se encontraron diferencias significativas (P>0.05) entre los niveles de N y P, encontrándose que los valores en las plantas del testigo absoluto presentaron concentraciones del 19 y 38% respectivamente, mayores a las encontradas en las plantas tratadas con Th003 (Tabla 4). Las concentraciones de los otros elementos, aunque no fueron significativamente diferentes, tuvieron un comportamiento similar, siendo menores las

concentraciones en los tejidos de las plantas tratadas con Th003 (Tablas 4 y 5). Esto puede explicarse debido al efecto que tienen las cepas de *Trichoderma* sp. durante las primeras etapas de crecimiento de las plantas y el efecto inductor que tienen sobre los mecanismos de transporte (Yedidia *et al.*, 2001). También se sabe que durante el período vegetativo las plantas alcanzan la máxima acumulación de materia seca. Este período se caracteriza también por la progresiva acumulación de elementos minerales, en cantidades importantes. Durante la floración o la antesis se observa la redistribución de los elementos inorgánicos (Maschner, 1995), lo cual puede explicar las reducciones significativas encontradas entre las dos etapas evaluadas. El efecto de *T. koningii* Th003 sobre los mecanismos de transporte (Castillo *et al.*, 2007) podría explicar los menores valores encontrados en las plantas tratadas con este microorganismo, ya que durante el inicio de la etapa reproductiva se presenta una movilización de los nutrientes hacia las partes de las plantas encargadas de la formación de las flores (Maschner, 1995).

Tabla 3. Efecto del tratamiento con *T. koningii* Th003 sobre el diámetro de los dos primeros entrenudos y el área foliar días después del transplante (ddt).

Tratamiento	ddt	Diámetro 1er	Diámetro 2do	Área foliar (cm ²)
		entrenudo (mm)	entrenudo (mm)	
Th003	7	4,16 ± 0,14*	3,97 ± 0,31	289,79 ± 86,92
	15	4,59 ± 0,13	4,61 ± 0,14*	640,61 ± 10,201
	33	5,45 ± 0,44	5,22 ± 0,21	1436,02 ± 170,78
Testigo absoluto	7	3,42 ± 0,32*	3,35 ± 0,23	212,50 ± 52,48
	15	3,97 ± 0,38	4,16 ± 0,17*	458,26 ± 335,01
	33	4,99 ± 0,21	5,20 ± 0,16	1245,24 ± 219,68

*Valores que presentan diferencias significativas (P=0.05%) para el mismo tiempo de evaluación. Los valores se presentan como el promedio ± desviación estándar.

Tabla 4. Concentración de elementos mayores en tejido foliar de plantas de tomate.

Tratamiento	ddt	N	P	K	Ca	Mg	S
		mg/g					
Th003	15	38,14 ± 2,91	5,98 ± 1,28	14,78 ± 2,02	22,18 ± 2,04*	7,91 ± 1,15	2,87 ± 1,70
	33	29,58 ± 2,30	1,76 ± 0,06	9,94 ± 0,21*	17,85 ± 0,46	8,05 ± 0,83	0,37 ± 0,00
Testigo absoluto	15	49,66 ± 10,47	4,41 ± 0,27	10,68 ± 2,55	17,75 ± 0,80*	6,29 ± 0,35	0,89 ± 0,74
	33	36,58 ± 0,58	2,85 ± 0,37*	10,41 ± 0,84	22,35 ± 2,28	9,49 ± 0,75	0,47 ± 0,06

*Valores que poseen diferencias significativas (P=0,05). Los valores son media ± la desviación estándar.

A pesar de que en el sustrato suelo-cascarilla se presentaron bajas concentraciones de fósforo, calcio, magnesio, cobre y boro con concentraciones de 9 mg·Kg⁻¹, 1.9 cmol₍₊₎·Kg⁻¹, 0.9 cmol₍₊₎·Kg⁻¹, 1.6 mg·Kg⁻¹ y 0.12 mg·Kg⁻¹, respectivamente (Anexo 5), no se detectó deficiencia de estos elementos en el tejido vegetal de las plantas de tomate. Esto último acorde con los niveles de

nutrientes establecidos para plantas de tomate; ya que en ambos tratamientos se encontraron niveles altos a los 15 días después del trasplante y óptimos a los 33 días después del trasplante (Tablas 5 y 6; Anexo 6). Lo anterior podría deberse a que la cantidad de nutrientes disponibles en el suelo cubrió los requerimientos nutricionales de las plantas en sus primeras etapas de desarrollo. Además, se mantuvo un riego periódico, de acuerdo con la frecuencia establecida para ensayos anteriores.

Tabla 5. Concentración de elementos menores en tejido foliar de plantas de tomate.

Tratamiento	ddt	mg/Kg				
		Fe	Cu	Mn	Zn	B
Th003	15	278,81 ± 55,52	52,69 ± 37,62	167,75 ± 22,41	63,81 ± 13,52	24,45 ± 3,51
	33	184,20 ± 45,06	8,00 ± 0,82	194,54 ± 12,69	48,58 ± 7,22	53,20 ± 3,55
Testigo absoluto	15	274,03 ± 33,24	35,91 ± 21,87	129,06 ± 4,01	58,70 ± 10,16	27,32 ± 4,05
	33	157,19 ± 12,46	8,89 ± 0,16	244,46 ± 49,89	54,36 ± 9,94	59,51 ± 6,46

*Valores que poseen diferencias significativas (P=0,05). Los valores son media ± la desviación estándar.

Los resultados obtenidos muestran el potencial de la cepa Th003 de *T. koningii* como un agente promotor de crecimiento vegetal. El fenómeno ha sido reportado por varios autores, con diferentes especies y cepas de *Trichoderma* (Chang *et al.*, 1986; Inbar. *et al.*, 1996; Yedidia *et al.*, 2001; Ozbay y Newman, 2004). Una posible explicación a este fenómeno, se debe a que estos organismos son solubilizadores de elementos menores, que no se encuentran disponibles para la planta naturalmente en el suelo, además son capaces de producir algunas hormonas de crecimiento (Yedidia *et al.*, 2001). Esto puede explicar la relación directa entre el efecto sobre el sistema radical que tienen *Trichoderma* spp. y el efecto benéfico general sobre el crecimiento de la planta (Ozbay y Newman, 2004), relacionándose con los datos obtenidos en este estudio, donde se presentó un aumento del peso seco radical y peso seco foliar a los 15 días después del trasplante en plantas tratadas con Th003, datos significativamente diferentes con respecto a los datos obtenidos por las plantas del testigo absoluto. Las variables de peso seco radical y foliar también podrían relacionarse con el diámetro mayor del tallo en las plantas tratadas con la cepa Th003 a los 8 días después del trasplante, siendo que la variable diámetro del tallo se relaciona con los niveles de agua en el tejido foliar, permitiendo un mayor transporte de nutrientes y una eficiencia de los mecanismos metabólicos de las plantas de tomate (Figura 9).

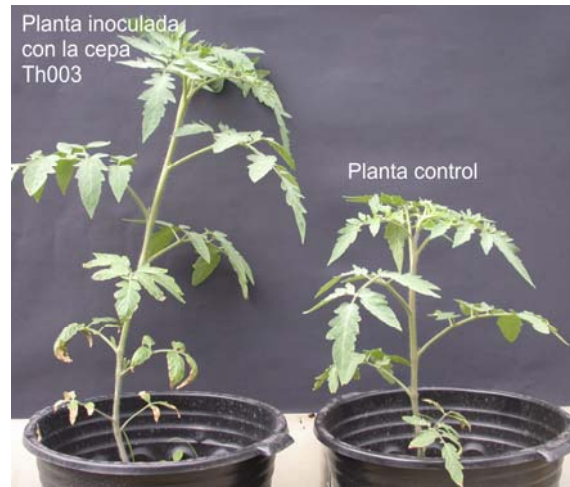


Figura 9. Efecto de la cepa Th003 sobre el crecimiento de plantas de tomate 33 días después del transplante.

Conclusiones

- Se determinó que *Trichoderma koningii* Th003 presentó un efecto de inducción de resistencia sistémica en plantas de tomate, ya que su aplicación en una porción del sistema radical retrasó el ascenso de *F. oxysporum* por el xilema, cuando éste fue inoculado en otra porción del sistema radical en la misma planta.
- Se determinó que *T. koningii* Th003 también posee la capacidad de promover el crecimiento vegetal ya que su aplicación en semillas de tomate provocó un aumento en la velocidad de emergencia de las plántulas. La aplicación de Th003 al sustrato de siembra estimuló la acumulación de materia seca en las plantas de tomate, así mismo se observó que el hongo estimuló la toma de nutrientes durante la etapa vegetativa de las plantas de tomate.

Recomendaciones

- Determinar el tiempo óptimo de aplicación de la cepa Th003 para inducir la respuesta sistémica en plantas de tomate y la durabilidad del efecto sistémico.
- Identificar las formas especiales de las cepas Fu040 y Fu041 de *F. oxysporum*, lo que permitirá corroborar la naturaleza de las cepas con los síntomas presentados por las plantas a partir de las cuales fueron aisladas. Además de relacionar mejor los mecanismos del patógeno y los tejidos vegetales de las plantas que pueden colonizar.
- Establecer una técnica de evaluación cuantitativa de *F. oxysporum* en los segmentos del tallo, que permitan establecer el número de vesículas colonizadas.

Referencias

- Agrios, G. 2005. Plant Pathology. Fifth Edition. *Elvesier Academic Press*. London, UK. 530 p.
- Akköprü A., Demir, S. 2005. Biological control of *Fusarium* wilt in tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by AMF *Glomus intraradices* and some rhizobacteria. *Journal of Phytopathology*. 153: 544-550.
- Aist, J., Gold, R., Bayles, C., Morrison, G., Subhasn, C., Israel, H. 1988. Evidence that molecular components of papillae may be involved in ml-o resistance to barley powdery mildew. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 33: 17-32.
- Alfano, G., Lewis Ivey, M., Cakir, C., Bos, J., Miller, S., Madden, L., Kamoun, S., Hoitink, H. 2007. Systemic modulation of gene expression in tomato by *Trichoderma hamatum* T-382. *Phytopathology*. 97: 429-437.
- Ansorena, J. 1995. Propiedades físicas de los sustrato. *Chile Agricola*. 20: 217-218.
- Attitalla, I., Johnson, P., Brishammar, S., Quintanilla, P. 2001. Systemic resistance to *Fusarium* wilt in tomato induced by *Phytophthora cryptogena*. *Journal of Phytopathology*. 149: 373-380.
- Attitalla, I. 2004. Biological and molecular characteristics of microorganism-stimulated defense response in *Lycopersicon esculentum* –L. Tesis de doctorado. *Acta Universitatis Upsaliensis*, Suiza. 82 p.
- Beauverie, J. 1901. Essais d'immunisation des végétaux contre des maladies cryptogamique. *C R Comptes rendus de l'academie des Sciences*. Serie III. 133: 107-110.
- Beckers, G., Spoel, S. 2006. Fine-tuning plant defense signalling: Salicylate versus jasmonate. *Plant Biology*. 8: 1-10.
- Benhamou, N., Kloepper, J., Quadt-Hallman, J., Tuzun, S. 1996. Induction of defense-related ultrastructural modification in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria. *Plant Physiology*. 112: 919-929.
- Benhamou, N., Chet, I. 1997. Cellular and molecular mechanisms involved in the interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 2095-2099.

Benhamou, N., Rey, P., Chérif, M., Hockenhull, J., Titilly, Y. 1997. Treatment with the mycoparasite *Pythium oligandrum* triggers induction of defense-related reactions in tomato roots when challenged with *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Biochemistry and Cell Biology*. 87: 108-122.

Benhamou, N., Kloepper, J., Tuzun, S. 1998. Induction of resistance against *Fusarium* wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response. *Planta*. 204: 153-168.

Benítez, T., Rincón, A., Limón, M., Codón, A. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*. 7: 249-260.

Bostock, R. 2005. Signal crosstalk and induced resistance: Straddling the line between cost and benefit. *Annual Review of Phytopathology*. 43: 545-580.

Brayford, D. 1992. IMI description of fungi and bacteria no. 1117. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Mycopathology*. 118: 51-53.

Brunner, K., Zeilinger, S., Ciliento, R., Woo, S., Lorito, M., Kubicek, C., Mach, R. 2005. Improvement of the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride* to enhance both antagonism and induction of plant systemic disease resistance. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 3959-3965.

Cárdenas, A. 1999. Control biológico bajo condiciones de invernadero de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en tomate *Lycopersicon esculentum* empleando pregerminación controlada de semillas y los agentes biocontroladores *Trichoderma koningii* y *Pseudomonas fluorescens*. Trabajo de grado. Biología. Pontificia Universidad Javeriana. 140p

Castillo, F., Moreno, C., Jaimes, Y., Cotes, A., Restrepo, S. 2007. Gene expression of tomato plants treated with *Trichoderma koningii*. CD-ROM de Memorias (Presentaciones orales) 6LABS. 27p

Chalvet, F., Grimaldi, C., Kaper, F., Langin, T., Daboussi, M. 2003. *Hop*, an active mutator-like element in the genome of the fungus *Fusarium oxysporum*. *Molecular Biology and Evolution*. 20: 1362-1375.

Chang, Y., Chang, Y., Baker, R., Kleifeld, O., Chet, I. 1986. Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. *Plant Disease*. 70: 145-148.

- Chester, K. 1933. The problem acquired physiological immunity in plants. *Quarterly Review of Biology*. 8: 274-324.
- Clavijo, G. 1998. Estudio de la actividad quitinolítica en procesos de control biológico de *Rhizoctonia solani* Kuhn en tomate (*Lycopersicum esculentum*), mediante tratamientos de pregerminación de semillas en presencia de *Trichoderma koningii* Oudemans. Trabajo de grado. Biología. Pontificia Universidad Javeriana. 114p.
- Cotes, A. 1993. Study of common bean protection against damping-off by treatment of seeds with *Trichoderma koningii* Oudemans. Tesis de doctorado. Universidad de Gembloux, Bélgica. 121 p.
- Cotes, A., Lepoivre, p., Semal, J. 1996. Correlation between hydrolytic enzymes activities measured in bean seedlings after *Trichoderma koningii* combined with pregermination and the protective effect against *Pythium splendens*. *European Journal of Plant Pathology*. 102: 487-506.
- Cotes, A., Cardenas, A., Pinzon, H. 2001. Effect of seed priming in the presence of *Trichoderma koningii* on seed and seedling disease induced in tomato by *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *IOBC WPRS Bulletin*. 24(3): 259-263.
- Davies, P. 1995. Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology. ed (Dordrecht, The Netherlands: *Kluwer Academic Publishers*). pp. 1-12.
- De Cal, A., Pascual, S., Melgarejo, P. 1997. Involvement of resistance induction by *Penicillium oxalicum* in the biocontrol of tomato wilt. *Plant Pathology*. 46: 72-79.
- De Cal, A., Garcia-lepe, R., Melgarejo, p. 2000. Induced resistance by *Penicillium oxalicum* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*: Histological studies of infected and induced tomato stems. *Phytopathology*. 90: 260-268.
- De Cal, A., Melgarejo, P. 2001. Repeated applications of *Penicillium oxalicum* prolongs biocontrol of *Fusarium* wilt tomato plants. *European Journal of Plant Pathology*. 107: 805-811.
- De Meyer, G., Bigirimana, J., Elad, Y., Höfte, M. 1998. Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*. 104: 279-286.

- Di Pietro, A., Madrid, M., Caracuel, Z., Delgado-Jarana, J., Rocero, M. 2003. *Fusarium oxysporum*: Exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Molecular Plant Pathology*. 4: 315-325.
- Djonović, S., Pozo, M., Dangott, L., Howell, C., Kenerley, C. 2006. Sm1, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic resistance. *Molecular Plant-Microbe Interaction*. 19: 838-853.
- Doster, M., Bostock, R. 1988. Quantification of lignin formation in almond bark in response to wounding and infection by *Phytophthora* species. *Phytopathology*. 78: 473-477.
- Duijff, B., Pouhair, D., Olivian, C., Alabouvet, C., Lemanceau, P. 1998. Implication of systemic induced resistance in the suppression of *Fusarium* wilt of tomato by *Pseudomonas fluorescens* WCS417r and by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. *European Journal of Plant Pathology*. 104: 903-910.
- Durrant, W., Dong, X. 2004. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*. 43: 337-359.
- Elad, Y. 1996. Mechanisms involved in the biological control of *Botrytis cinerea* incited diseases. *European Journal of Plant Pathology*. 102: 719-732.
- Fravel, D., Olivian, C., Alabouvette, C. 2003. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phytologist*. 157: 493-502.
- Fravel, D. 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*. 43: 337-359.
- Fuchs, J., Moënné-Loccoz, Y., Défago, G. 1997. Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 induces resistance to *Fusarium* wilt in tomato. *Plant Disease*. 81: 492-496.
- Gao, H., Beckman, C., Muller, W. 1995. The nature of tolerance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in polygenically field-resistance marglobe tomato plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*.
- Ghisalberti, E., Sivasinthamparam, K. 1991. Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. *Soil Biology and Biochemistry*. 23: 1011-1020.

- Gordon, T., Martin, R. 1997. The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. *Annual Review of Phytopathology*. 35: 111-128.
- Hammerschmidt, R. 1999. Phytoalexins: What have we learned after 60 years?. *Annual Review of Phytopathology*. 37: 285-306.
- Hanson, L. 2000. Reduction of *Verticillium* wilt symptoms in cotton following seed treatment with *Trichoderma virens*. *Journal of Cotton Sciences*. 4: 224-231.
- Hanson, L., Howell, C. 2004. Elicitors of plant defense responses from biocontrol strains of *Trichoderma virens*. *Phytopathology*. 94: 171-176.
- Harman, G., Howell, C., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M. 2004a. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews*. 2: 43-56.
- Harman, G., Petzoldt, R., Comis, A., Chen, I. 2004b. Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology*. 94: 147-153.
- Heil, M., Bostock, R. 2002. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defense. *Annals of Botany*. 89: 503-512.
- Horts, L., Locke, J., Krause, C., McMahon, R., Madden, L., Hoitink, H. 2005. Suppression of *Botrytis* blight of begonia by *Trichoderma hamatum* 382 in peat and compost amended potting mixes. *Plant Disease*. 89: 1195-1200.
- Howell, C., Hanson, L., Stipanovic, R., Puckhaber, L. 2000. Induction of terpenoid synthesis in cotton root and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology*. 90: 248-252.
- Howell, C. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease*. 87: 4-10.
- Howell, C. 2006. Understanding the mechanisms employed by *Trichoderma virens* to effect biological control of cotton diseases. *Phytopathology*. 96: 178-180.
- Hua-Van, A., Langin, T., Daboussi, M. 2001. Evolutionary history of the *impala* transposon in *Fusarium oxysporum*. *Molecular Biology and Evolution*. 19: 1959-1969.

- Inbar, J., Menéndez, A., Chet, I. 1996. Hyphal interaction between *Trichoderma harzianum* and *Sclerotinia sclerotiorum* and its role in biological control. *Soil Biology and Biochemistry*. 26: 757-763.
- Ito, S., Eto, T., Tanaka, S., Yamauchi, N., Takahara, H., Ikeda, T. 2004. Tomatidine and lycotetraose, hydrolysis products of α -tomatine by *Fusarium oxysporum* tomatinase, suppress induced defense response in tomato cells. *FEBS Letters*. 571: 31-34.
- Kawabe, M., Kobayashi, Y., Okada, G., Yamagushi, I., Teraoka, T., Arie, T. 2005. Three evolutionary lineages of tomato wilt pathogen, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, based on sequences of IGS, MAT1, and *pg1*, are each composed of isolates of a single mating type and a single or closely related vegetative compatibility group. *Journal of Genetic Plant Pathology*. 71: 263-272.
- Khan, J., Ooka, J., Miller, S., Madden, L., Hoitink, H. 2004. Systemic resistance induced by *Trichoderma hamatum* 382 in cucumber against *Phytophthora* crown rot and leaf blight. *Plant Disease*. 88: 280-286.
- Knoester, M., Pieterse, C., Bol, J., van Loon, L. 1999. Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by rhizobacteria requires ethylene-dependent signalling at the site of application. *Molecular Plant-Microbe Interaction*. 12: 720-727.
- Kogel, G., Beissman, B., Reisener, H. 1988. A single glycoprotein from *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* cell wall elicits hypersensitive lignification response in wheat. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 33: 173-185.
- Kuč, J. 1987. Translocated signals for plant immunization. *The Annals of the New York Academic of Science*. 494: 221-223.
- Kuč, J. 2001. Concepts and direction of induced systemic resistance in plant and its application. *European Journal of Plant Pathology*. 107: 7-12.
- Larena, I., Sabuquillo, P., Melgarejo, P., De Cal., A. 2003. Biocontrol of *Fusarium* and *Verticillium* wilt of tomato by *Penicillium oxalicum* under greenhouse and field conditions. *Journal of Phytopathology*. 151: 507-512.

- Larkin, R., Fravel, D. 2002. Effects of varying environmental conditions on biological control of *Fusarium* wilt of tomato by nonpathogenic *Fusarium* spp. *Biological Control*. 92: 1160-1166.
- Lipiec, J., Ferrero, A., Giovanetti, V., Nosalewicz, A., Turski, M., 2002. Response of structure to simulated trampling of woodland soil. *Advances in Geoecology*. 35: 133–140.
- Liu, L., Kloepper, J., Tuzun, S. 1995. Induction of systematic resistance in cucumber against *Fusarium* wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology*. 85: 695-698.
- Marschner, H. 1995 Mineral Nutrition of Higher Plants. Second Edition. Academic Press. San Diego (USA). 889 p.
- Matsumoto, M. 2006. Comparison of two fatty acid analysis protocols to characterize and differentiate *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Mycoscience*. 47: 190-197.
- McGarry, D. 2001. Tillage and soil compaction. In: Garcia-Torres, L., Benites, J., Martinez-Vilela, A. (Eds.), First World Congress on Conservation Agriculture, 1–5 October 2001, Madrid, Spain, Natural Resource Sciences. pp. 281–291.
- Moreno, C. 2003. Control biológico de enfermedades foliares del cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) con énfasis en mildew polvoso (*Oidium* sp.). Trabajo de Grado. Ingeniería Agronómica. Universidad Nacional de Colombia. 160p.
- Mou, Z., Fan, W., Dong, X. 2003. Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell*. 113: 935-944.
- Nandakumar, R., Babu, S., Viswanathan, R., Raguchander, T., Samiyappan, R. 2001. Induction of systemic resistance in rice against sheath blight diseases by *Pseudomonas fluorescens*. *Soil Biology and Biochemistry*. 33: 603-612.
- Olivo, V., Buduba, C. 2006. Influencia de seis sustrato en el crecimiento de *Pinus ponderosa* producido en contenedores bajo condiciones controladas de invernáculo. *Bosque*. 27: 267-271.
- Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la protection des plantes/European and Mediterranean Plant protection organization (OEPP/EPPO) 2004. Outdoor solanaceous crops. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 34: 79-90.

Ozbay, N., Newman, S. 2004. Effect of *Trichoderma harzianum* strain to colonize tomato roots and improve transplant growth. *Plant disease*. 81: 492-496.

Panayiotopoulos, K., Papadopoulou, C., Hatjioannidou, A. 1994. Compaction and penetration resistance of an Alfisol and Entisol and their influence on root growth of maize seedlings. *Soil Tillage Research*. 31: 323-337.

Pieterse, C., van Loon, L. 2004. NPR1: The spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology*. 7: 456-464.

Ramamoorthy, V., Wiswanathan, R., Raguchander, T., Prakasam, V., Samiyappa R. 2001. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pest and diseases. *Crop Protection*. 20: 1-11.

Raupach, G., Liu, L., Murphy, J., Tuzun, S., Kloepper, J. 1996. Induced systemic resistance in cucumber and tomato against cucumber mosaic cucumovirus using plant growth-promoting rhizobacteria (PGRP). *Plant Disease*. 80: 891-894.

Ray, J. 1901. Les maladies cryptogamiques des végétaux. *Revue Générale de Botanique*. 13: 145-151.

Rekah, Y., Shtienberg, D., Katan, J. 2000. Disease development following infection of tomato and basil foliage by airborne conidia of the soilborne pathogens. *Phytopathology*. 90: 1322-1329.

Ride, J., Barber, M. 1987. The effects of various treatments on induced lignification and the resistance of wheat to fungi. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 31: 349-360.

Rocero, M., Di Pietro, A., Ruiz, C., Huertas, D., García, F., Méglecz, E., Jiménez, A., Caracuel, Z., Sancho, R., Hera, C., Gómez, E., Ruiz, M., González, C., Páez, J. 2000. Role of cell wall-degrading enzymes in pathogenicity of *Fusarium oxysporum*. *Revista Iberoamericana de Micología*. 17: S47-S53.

Ryals, J., Neuenschwander, U., Willits, M., Molina, A., Steiner, H. and Hunt, M. 1996. Systemic acquired resistance. *The Plant Cell*. 8: 1809-1819.

Saldamando, C. 1996. Control de *Rhizoctonia solani* Kuhn en tomate (*Lycopersicon esculentum*) mediante la combinación de tratamientos de pregerminación controlada y el agente de control

biológico *Trichoderma koningii* Oudemans. Trabajo de grado. Biología. Universidad de los Andes. 79 p.

Scheffer, R., Walter, J. 1954. Distribution and nature of Fusarium resistance in the tomato plant. *Phytopathology*. 44: 94-101.

Schirmböck, M., Lorito, M., Wang, Y., Hayes, C., Arisan-Atac, I., Scala, F., Harman, G. Kubicek, C. 1994. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaboi antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Applied and Environmental Microbiology*. 60: 4364-4370.

Sid Ahmed, A., Pérez, C., Candela, M. 2000. Evaluation of induction of systemic resistance in pepper plants (*Capsicum annuum*) to *Phytophthora capsici* using *Trichoderma harzianum* and its relation with capsidiol accumulation. *European Journal of Plant Diseases*. 106: 817-824.

Silvan, A., Chet, I. 1993. Integrated control of *Fusarium* Crown and Root Rot of tomato with *Trichoderma harzianum* in combination with methyl bromide or soil solarization. *Crop Protection*. 12: 380-386.

Soane, B.D., Van Ouwerkerk, C. 1994. Soil Compaction in Crop Production, Developments in Agricultural Engineering Series, vol. 11. *Elsevier Science*, Amsterdam, The Netherlands, 662 p.

Soto-Suárez, M., Restrepo, S., Mosquera, G., Verdier, V., Tohme, J. 2006. Análisis de expresión génica durante la respuesta de defensa de yuca a la bacteriosis vascular (Añublo bacteriano). *Revista Colombiana de Biotecnología*. 8: 16-28.

Spiegel, Y., Chet, I. 1998. Evaluation of *Trichoderma* spp. as a biocontrol agent against soilborne fungi and plant-parasitic nematodes in Israel. *Integrated Pest Management Reviews*. 3: 169-175.

Sticher, L., Mauch-Mani, B., Métraux, J. 1997. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*. 35: 235-270.

Talboys, P. 1972. Resistance to vascular wilt fungi. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Science*. 181: 319-332.

Terán, C., Villaneda, E., Cubillos, P., Argüelles, J., Gomez, C. 2006. Determinación de requerimientos hídricos y manejo de la fertirrigación para tomate en la sabana de Bogota. Informe final. *CORPOICA-Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural*. 69 p.

- Vallad, G., Goodman, R. 2004. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Science*. 44: 1920-1934.
- van Loon, L., Bakker, P. and Pieterse, C. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual review of Phytopathology*. 36: 453-483.
- van Loon, L., Rep, M., Pieterse, C. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*. 44: 135-162.
- Van Wees, S., De Swart, E., van Pelt, j., van Loon, L., Pieterse, C. 2000. Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate and jasmonate – dependent defenses pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of National Academic of Science of the United State of American*. 97: 8711-8716.
- Villamizar, L., Moreno, C., Paris, A., Cotes, A., Garzón, C. 2004. Development of biopesticide prototypes for controlling pathogens in vegetables. En: Diseases Biocontrol. International Workshop. Development of biocontrol agents of diseases for comercial applications in food production systems. Book of Abstracts. Sevilla, España. Ediciones de la UdL. 136p.
- Viterbo, A., Harel, M., Horwitz, B., Chet, I., Mukherjee, P. 2005. *Trichoderma* mitogen-activated protein kinase signaling is involved in induction of plant systemic resistance. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 6241-6246.
- Viterbo, A., Chet, I. 2006. *TasHyd1*, a new hydrophobin gene from the biocontrol agent *Trichoderma asperellum*, is involved in plant root colonization. *Molecular Plant Pathology*. 7: 249-258.
- Woo, S., Scala, F., Ruocco, M., Lorito, M. 2006. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plant. *Phytopathology*. 96: 181-185.
- Yedidia, I., Benhamou, N., Chet, I. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 1061-1070.
- Yedidia, I., Benhamou, N., Kapulnik, Y., Chet, I. 2000. Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. *Plant Physiology and Biochemistry*. 38: 863-873.

Yedidia, I., Srivastva, A., Kapulnik, Y., Chet, I. 2001. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant and Soil*. 235: 235-242.

Yedidia, I., Shores, M., Benhamou, N., Kapulnik, Y., Chet, I. 2003. Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-2003) and accumulation of phytoalexins. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 7343-7353.

Zimmermann, S., Nürnberger, T., Frachisse, J., Wirtz, W., Guern, J., Hedrich, R., Scheel, D. 1997. Receptor-mediated activation of a plant Ca²⁺-permeable ion channel involved in pathogen defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 94: 2751-2755.

Agradecimiento

A Colciencias y Corpoica por ser las entidades financiadoras del proyecto en el que se enmarcó el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Alba Marina por contribuir a mi formación profesional, por todo el apoyo, dedicación y sobre todo por ser una excelente profesional y ser humano.

Al Dr. Aristobulo López por sus constantes consejos y apoyo incondicional.

A Carlos Andrés por sus comentarios y sugerencias en la realización de este trabajo.

A todos mis compañeros y amigos del Laboratorio de Control Biológico por su ayuda y apoyo incondicional.

A todas aquellas personas que contribuyeron directamente e indirectamente a la realización de este trabajo.

Y especialmente a Dios, mis padres y hermanos por su constante apoyo, amor y por ser mis más exigentes críticos.

Anexo 1

Medio Agar Papa Dextrosa (PDA)

Composición (g.L⁻¹)

Papa	200
Glucosa	2
Agar-agar	15

Preparación: Preparar la solución de glucosa en 1 L de agua destilada y licuarla con la papa hasta lograr una mezcla homogénea. Esterilizar el medio de cultivo en el autoclave a 121 °C con una presión de 15 PSI durante 15 min. Servir en cajas petri previamente esterilizadas cuando el medio de cultivo este a 40 °C.

Anexo 2

Medio de Producción Masiva de Caseína

Composición (g.L⁻¹)

Glucosa	15
Extracto de levadura	1
Caseína Hidrolizada	1
KH ₂ PO ₄	1.5
MgSO ₄ .7H ₂ O	1

Solución de elementos traza (g por 100 mL)

FeSO ₄ .7H ₂ O	0.1
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.1
Agar-agar	0.1

Preparación: Disolver en 900 mL de agua destiladas los siguientes reactivos: glucosa, extracto de levadura, caseína hidrolizada, KH₂PO₄ y MgSO₄.7H₂O. Disolver en 100 mL los componentes de la solución traza. Adicionar 10 mL de la solución de elementos traza a la solución de macroelementos y aforar a un volumen final de 1L. Esterilizar el medio de cultivo en el autoclave a 121 °C con una presión de 15 PSI durante 15 min.

Anexo 3

Solución Nutritiva HidroColjap.

Composición

Presentación A: Solución elementos mayores (g.L⁻¹)

Nitrógeno total (N)	44.0
Nitrógeno amoniacal	4.0
Nitrógeno nítrico	40
Fósforo asimilable (P ₂ O ₅)	20.0
Potasio (K ₂ O)	50.0
Calcio (CaO)	50.0

Presentación B: Solución elementos menores (g.L⁻¹)

Magnesio (MgO)	40.0
Azufre (S)	16.0
Hierro (Fe)	2.8
Cobre (Cu)	0.015
Zinc (Zn)	0.065
Boro (B)	0.13
Manganeso (Mn)	0.13
Molibdeno (Mo)	0.003
Cobalto (Co)	0.001
Cloro (Cl)	0.45

Dosis: la dosis general es de 5 mL de la presentación A mas 2 mL de la presentación B por 1L de agua.

Anexo 4

Anexo 5

Anexo 6