

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA



Efectividad de *Bacillus subtilis* Cohn (1872) y *Trichoderma harzianum* Rifai (1969) sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder & Hansen, en semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* var. CENTA CUSCATLÁN)

Trabajo de graduación presentado por:

Carla Vanesa Quintanilla Villegas

Judith Mabel Reyes Bonilla

Para optar al grado de:

Licenciada en Biología

Ciudad Universitaria, San Salvador, agosto 2023

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA



Efectividad de *Bacillus subtilis* Cohn (1872) y *Trichoderma harzianum* Rifai (1969) sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder & Hansen, en semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* var. CENTA CUSCATLÁN)

Trabajo de graduación presentado por:

Carla Vanesa Quintanilla Villegas

Judith Mabel Reyes Bonilla

Para optar al grado de:

Licenciada en Biología

Docente Asesora interna:

M.Sc. Zoila Virginia Guerrero Mendoza

Asesor externo:

M.Sc. Moisés Ulises López Torres

Ciudad Universitaria, San Salvador, agosto 2023

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA



Efectividad de *Bacillus subtilis* Cohn (1872) y *Trichoderma harzianum* Rifai (1969) sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder & Hansen, en semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* var. CENTA CUSCATLÁN)

Trabajo de graduación presentado por:

Carla Vanesa Quintanilla Villegas

Judith Mabel Reyes Bonilla

Para optar al grado de:

Licenciada en Biología

Tribunal Evaluador:

M.Sc. Zoila Virginia Guerrero Mendoza
Docente Asesora Interna

Ing. Agr. Reina Flor Guzmán de Serrano

Lic. Roberto Amado Vásquez Díaz

Ciudad Universitaria, San Salvador, agosto 2023

AUTORIDADES UNIVERSITARIAS

RECTOR

M.Sc. ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO.

VICERRECTOR ACADÉMICO

PhD. RAÚL ERNESTO AZCÚNAGA LÓPEZ.

SECRETARIO GENERAL

ING. FRANCISCO ANTONIO ALARCÓN SANDOVAL.

FISCAL GENERAL

LIC. RAFAEL HUMBERTO PEÑA MARÍN.

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA.

DECANO

LIC. ERNESTO AMÉRICO HIDALGO CASTELLANOS.

VICE DECANO

M.Sc. ZOILA VIRGINIA GUERRERO MENDOZA.

DIRECTORA ESCUELA DE BIOLOGÍA

LICDA. MILAGRO ELIZABETH SALINAS DELGADO.

DEDICATORIA

Baruj Atá Ad-nai El-heinu Melej HaOlam

Al creador del universo por darme sabiduría, y permitir finalizar esta etapa de mi vida

A mis amados padres y hermanos, por su comprensión y apoyo abnegado

A la ciencia por despertar mi curiosidad

y deseo de aprender.

Judith Reyes.

*A Dios por mantenerme sobre la delgada línea de permanecer firme en terminar mi carrera
a pesar de las duras pruebas que he pasado durante todo este desafío.*

*A mis padres y hermanos por apoyarme siempre. En especial a mis padres que su sueño siempre
fue verme como toda una profesional, aunque de distinta manera lo he logrado,
estoy siendo lo mejor que puedo para ser lo que siempre ellos quisieron para mí.*

A mis abuelos Concepción y Rodrigo por llenarme de amor,

*y a pesar de ser la consentida de mi abuela siempre me enseñaron a como valerme por mí misma
y hacer números como él siempre lo dijo.*

Vanesa Quintanilla.

AGRADECIMIENTOS

- ◆ A la maestra Virginia Guerrero por la orientación, dedicación, paciencia y perseverancia desde principio a fin de este trabajo.
- ◆ A nuestro asesor externo M.Sc. Moisés López por su generosidad, paciencia, predisposición, valiosos consejos y facilitar todo lo necesario para el desarrollo de esta investigación.
- ◆ Al Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal “Enrique Álvarez Córdova” por darnos la oportunidad de realizar la investigación en sus instalaciones así también el acceso a semillas de la variedad CENTA-CUSCATLÁN y contribución en general.
- ◆ Al personal del Laboratorio de Parasitología Vegetal por abrirnos las puertas, compartir su experiencia así también orientarnos en algunas actividades. En especial a la Técnico Andrea Rivera por compartir sus conocimientos, tiempo e incondicional colaboración. Personas así son las que necesita nuestro país, siempre la recordaremos con mucho cariño.
- ◆ A la empresa MICSA por el acceso a sus productos biológicos y algunos materiales para los ensayos.
- ◆ Al laboratorio CENEM de la empresa MICSA por la identificación de la cepa *Fusarium oxysporum*.
- ◆ Al Ph.D. Gary Vallad, & Yang Jingya, de la Universidad de Florida por su aporte en la identificación de *F. oxysporum*.
- ◆ A Lic. Roberto Gámez Mendoza de la Escuela de Matemática por las asesorías y ayuda en la parte estadística.

INDICE DE CONTENIDO

| | |
|--|----------|
| DEDICATORIA | V |
| AGRADECIMIENTOS | VI |
| INDICE DE CONTENIDO | VII |
| INDICE DE TABLAS | XI |
| INDICE DE FIGURAS | XII |
| RESUMEN | XIII |
| ABSTRACT | XIV |
| 1 INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2 OBJETIVOS..... | 2 |
| 3 JUSTIFICACIÓN..... | 3 |
| 4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 5 |
| 5 MARCO TEÓRICO | 7 |
| 5.1 Origen y reseña histórica del tomate..... | 7 |
| 5.2 Principales países productores | 8 |
| 5.3 Características botánicas del tomate | 9 |
| 5.4 Principales plagas y enfermedades del tomate..... | 12 |
| 5.5 Postulados de Koch..... | 14 |
| 5.6 Descripción de <i>Fusarium</i> spp. | 14 |
| 5.6.1 Sistema de clasificación taxonómico | 14 |
| 5.6.2 Patogenia y prevalencia | 15 |
| 5.6.3 Formas especiales | 18 |
| 5.6.4 Razas y variedades..... | 18 |
| 5.6.5 Genes de avirulencia y proteínas efectoras de <i>Fol</i> | 19 |
| 5.6.6 Identificación y características de <i>Fusarium</i> spp..... | 20 |
| 5.6.7 Hábitat..... | 21 |
| 5.7 Alternativas para el control de la marchitez | 22 |

| | | |
|---------|--|----|
| 5.8 | Control biológico en la agricultura | 23 |
| 5.9 | Mecanismos de acción en interacciones antagónicas | 24 |
| 5.10 | Bioformulados comerciales | 26 |
| 5.11 | Taxonomía del género <i>Trichoderma</i> spp | 27 |
| 5.11.1 | Clasificación taxonómica de <i>Trichoderma harzianum</i> | 28 |
| 5.11.2 | Identificación molecular | 29 |
| 5.11.3 | Morfología, crecimiento y reproducción | 30 |
| 5.11.4 | Hábitat y requerimientos nutricionales | 31 |
| 5.11.5 | Biocontrol de <i>Trichoderma</i> spp | 31 |
| 5.11.6 | Metabolitos secundarios..... | 32 |
| 5.11.7 | Estudios de la actividad antagónica de <i>Trichoderma</i> spp..... | 33 |
| 5.11.8 | Bioformulados de <i>Trichoderma</i> spp | 35 |
| 5.12 | Protección de semillas con bioformulados comerciales (<i>T. harzianum</i>) | 36 |
| 5.13 | Biocebado de semillas..... | 37 |
| 5.14 | El género <i>Bacillus</i> spp | 39 |
| 5.14.1 | Descripción del Género..... | 39 |
| 5.14.2 | Características de la colonia..... | 40 |
| 5.14.3 | Taxonomía | 40 |
| 5.14.4 | Morfología celular | 41 |
| 5.14.5 | Flagelos | 41 |
| 5.14.6 | Nutrición y condiciones de crecimiento | 41 |
| 5.14.7 | Hábitat..... | 42 |
| 5.14.8 | Fisiología y desarrollo celular..... | 42 |
| 5.14.9 | Formación de endosporas y germinación | 43 |
| 5.14.10 | Identificación y clasificación de especies de <i>Bacillus</i> | 43 |
| 5.14.11 | Grupos de <i>Bacillus</i> spp | 44 |
| 5.14.12 | <i>Bacillus subtilis</i> Cohn 1872 | 44 |
| 5.14.13 | Clasificación del género <i>Bacillus subtilis</i> Cohn 1872 | 45 |
| 5.14.14 | Capacidad antagonista de <i>Bacillus</i> spp..... | 45 |
| 5.15 | Métodos de conservación..... | 47 |
| 5.16 | Análisis estadístico..... | 49 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 5.16.1 | Diseño Completamente al Azar (DCA) | 49 |
| 5.16.2 | ANOVA | 49 |
| 6 | HIPÓTESIS | 50 |
| 7 | METODOLOGÍA..... | 51 |
| 7.1 | FASE DE LABORATORIO..... | 52 |
| 7.1.1 | Preparación de los medios de cultivo..... | 52 |
| 7.1.2 | Aislamiento e identificación de <i>Fusarium</i> spp | 52 |
| 7.1.3 | Cultivos puros de <i>Fusarium</i> spp | 53 |
| 7.1.4 | Prueba de patogenicidad | 54 |
| 7.1.5 | Conservación de las cepas de <i>Fusarium</i> spp..... | 55 |
| 7.1.6 | Reproducción y conservación de <i>Fusarium</i> spp | 56 |
| 7.1.7 | Identificación genética de <i>Fusarium</i> spp | 58 |
| 7.1.8 | Aplicación de los bioformulados (<i>B. subtilis</i> y <i>T. harzianum</i>) | 58 |
| 7.1.9 | Morfología microscópica de <i>B. subtilis</i> y <i>T. harzianum</i> | 59 |
| 7.1.10 | Evaluación del porcentaje de inhibición y capacidad antagonica..... | 60 |
| 7.1.11 | Bioensayo de la efectividad <i>in vitro</i> | 62 |
| 7.2 | FASE DE CAMPO | 66 |
| 7.2.1 | Bioensayo <i>in vivo</i> | 66 |
| 7.2.2 | Obtención de los inóculos..... | 66 |
| 7.2.3 | Inoculación del sustrato y semillas | 67 |
| 7.3 | Análisis de Datos | 69 |
| 8 | RESULTADOS | 70 |
| 8.1 | Colecta y aislamiento de <i>Fusarium</i> spp | 70 |
| 8.2 | Caracterización morfológica..... | 71 |
| 8.3 | Pruebas de patogenicidad de aislamientos de <i>Fusarium</i> spp..... | 73 |
| 8.4 | Identificación de Fol mediante PCR (ITS y TEF-1 α)..... | 74 |
| 8.5 | Conservación de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> | 75 |
| 8.6 | Antagonismo <i>in vitro</i> | 75 |
| 8.7 | Bioensayo <i>in vitro</i> | 79 |
| 8.8 | Bioensayo <i>in vivo</i> | 81 |

| | |
|--|-----------|
| 8.8.1 Germinación <i>in vivo</i> | 81 |
| 9 DISCUSIÓN | 86 |
| 10 CONCLUSIONES..... | 93 |
| 11 RECOMENDACIONES..... | 94 |
| 12 REFERENCIAS..... | 95 |
| 13 ANEXOS..... | |

INDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla. 1 Clasificación taxonómica del tomate | 9 |
| Tabla. 2 Clasificación taxonómica de <i>Fusarium oxysporum</i> | 15 |
| Tabla. 3 Clasificación taxonómica de <i>Trichoderma harzianum</i> | 29 |
| Tabla. 4 Clasificación taxonómica de <i>Bacillus subtilis</i> | 45 |
| Tabla. 5 Escala de evaluación de antagonismo <i>in vitro</i> , tomando en cuenta la invasión de la superficie, colonización y esporulación de los microorganismos sobre <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> | 61 |
| Tabla. 6 Características de los tipos de interacciones evaluados en enfrentamientos duales entre <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> | 62 |
| Tabla. 7 Tratamientos para evaluar la efectividad de los biocontroladores sobre el patógeno en la germinación de semillas de tomate. | 69 |
| Tabla. 8 Porcentaje de inhibición de <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Bacillus subtilis</i> sobre <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> | 77 |
| Tabla. 9 Porcentaje de germinación <i>in vitro</i> en semillas de tomate. Evaluación a los 15 días después de la siembra | 80 |
| Tabla. 10 Porcentaje de germinación <i>in vivo</i> en semillas de tomate biocebadas con diferentes concentraciones de biocontroladores y biopolímeros | 82 |
| Tabla. 11 Medias de las variables biométricas diámetro del tallo, longitud de raíz, longitud de tallo, longitud total, peso fresco y peso seco de plantas de tomate | 83 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura. 1 Órganos de la planta de tomate | 10 |
| Figura. 2 Morfología de la semilla de tomate | 10 |
| Figura. 3 Mapa que muestra la ubicación del CENTA..... | 51 |
| Figura. 4 Morfología de los biocontroladores | 59 |
| Figura. 5 Tratamientos para evaluar la efectividad de los biocontroladores sobre el patógeno en la germinación de semillas de tomate | 65 |
| Figura. 6 Invernadero utilizado para los ensayos <i>in vivo</i> | 66 |
| Figura. 7 Plantas de tomate con síntomas de Fusariosis..... | 70 |
| Figura. 8 Estructuras propagativas de <i>F. oxysporum</i> producidas en medio de cultivo PDA..... | 72 |
| Figura. 9 Estructuras propagativas de <i>Fusarium solani</i> | 73 |
| Figura. 10 A-B) Plantas con síntomas de marchitez vascular; C) Tallo con mancha marrón; D) Reaislamiento del <i>Fusarium</i> FM1 en medio de cultivo PDA..... | 74 |
| Figura. 11 Inhibición de crecimiento de <i>Fol</i> <i>in vitro</i> | 76 |
| Figura. 12 Porcentaje de inhibición de <i>B. subtilis</i> y <i>T. harzianum</i> sobre <i>Fol</i> después de 8 días de crecimiento <i>in vitro</i> | 77 |
| Figura. 13 Tasa de crecimiento micelial de <i>Fol</i> después de 8 días de crecimiento <i>in vitro</i> | 77 |
| Figura. 14 Antagonismo de <i>Trichoderma harzianum</i> | 78 |
| Figura. 15 Interacción de <i>Fol</i> , y los biocontroladores comerciales sobre la germinación de las semillas de tomate..... | 80 |
| Figura. 16 Porcentaje de germinación <i>in vitro</i> de semillas de tomate biocebadas con biocontroladores y biopolímeros..... | 81 |
| Figura. 17 Porcentaje de germinación a los 3 y 10 días e Índice de Velocidad de Germinación (IVG)..... | 83 |
| Figura. 18 A) Diámetro del tallo; B) Longitud de raíz; C) Longitud del tallo; D) Longitud total; E) Peso fresco; F) Peso seco. | 85 |

RESUMEN

El tomate durante su ciclo vegetativo es atacado por diversas enfermedades entre las que destaca la marchitez vascular cuyo agente etiológico es *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*), hongo fitopatógeno que está diseminado en muchas partes del mundo disminuyendo la producción y calidad del producto, la aplicación indiscriminada de agroquímicos para reducir las pérdidas causadas por el patógeno ocasiona contaminación y reducción de la biodiversidad edáfica además de producir alimentos con residuos tóxicos afectando la salud humana y ecosistemas. En la actualidad el uso de soluciones basadas en la naturaleza es una alternativa prometedora, el biocontrol con microorganismos antagonistas como *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* tiene gran potencial, porque la capacidad de estas especies ha sido demostrada desde hace mucho tiempo al inhibir fitopatógenos, además de estimular el crecimiento e inducir mecanismos de resistencias en las plantas; por otra parte, el biocebado es una herramienta eficaz que protege a la semilla del ataque de patógenos, mejorando la germinación, vigor, emergencia homogénea y desarrollo de las plántulas. El objetivo de esta investigación fue determinar la efectividad de las cepas comerciales *Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum* sobre un aislamiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en semillas de tomate var. CENTA CUSCATLAN a nivel *in vitro* e *in vivo*. Se evaluó el comportamiento de los biocontroladores a diferentes concentraciones y con biopolímeros para inhibir el crecimiento *in vitro* de *Fol*, estimular la germinación de las semillas y el desarrollo de las plantas de tomate. Los resultados demostraron la capacidad antagonista *in vitro* de los biocontroladores al inhibir el crecimiento micelial del patógeno. En el bioensayo de germinación *in vitro* se comprobó que T9 (*Th* 10^8 esp/ml⁻¹ + Al) incrementó el número de semillas germinadas, mientras que en el ensayo de germinación *in vivo* T6 (*Th* 10^6 esp/ml⁻¹ + Ga) destacó por tener mayor porcentaje de germinación, pero T8 (*Bs* 10^8 esp/ml⁻¹ + Ga) redujo el tiempo de germinación de las mismas. Las variables fenológicas: largo de raíz, largo del tallo, largo total, peso fresco y peso seco fueron superiores con T5 (*Th* 10^6 esp/ml⁻¹ + Al), mientras que T4 (*Bs* 10^6 esp/ml⁻¹ + Ga) favoreció el aumento del diámetro del tallo. Este estudio es un esfuerzo para contribuir en la búsqueda de tecnologías innovadoras como el biocebado de semillas y aplicación de métodos de biocontrol para desarrollar un sistema de producción agrícola sostenible, estratégico frente a las actuales condiciones climáticas; además de ser la primera investigación y reporte de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en El Salvador.

Palabras claves: Marchitez, *Fol*, *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum*, biocebado.

ABSTRACT

The tomato during its vegetative cycle is attacked by various diseases, among which vascular wilt stands out, whose etiological agent is *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*), a phytopathogenic fungus that is widespread in many parts of the world, decreasing the production and quality of the product, the indiscriminate application of agrochemicals to reduce the losses caused by the pathogen causes contamination and reduction of soil biodiversity in addition to producing food with toxic residues affecting human health and ecosystems. Nowadays, the use of solutions based on nature is a promising alternative, biocontrol with antagonistic microorganisms such as *Trichoderma harzianum* and *Bacillus subtilis* has great potential, because the capacity of these species has been demonstrated for a long time to inhibit phytopathogens, in addition to stimulate growth and induce resistance mechanisms in plants; on the other hand, biopriming is an effective tool that protects the seed from the attack of pathogens, improving germination, vigor, homogeneous emergence and seedling development. The objective of this research was to determine the effectiveness of the commercial strains *Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum* on an isolate of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in CENTA CUSCATLAN tomato seeds *in vitro* and *in vivo*. The behavior of the bio controllers at different concentrations and with biopolymers to inhibit the *in vitro* growth of *Fol*, stimulate seed germination and the development of tomato plants was evaluated. The results demonstrated the *in vitro* antagonistic capacity of the bio controllers by inhibiting the mycelial growth of the pathogen. In the *in vitro* germination bioassay, it was found that T9 (*Th* 10^8 esp/ml⁻¹ + Al) increased the number of germinated seeds, while in the *in vivo* germination assay T6 (*Th* 10^6 esp/ml⁻¹ + Ga) It stood out for having a higher germination percentage, but T8 (*Bs* 10^8 esp/ml⁻¹ + Ga) reduced their germination time. The phenological variables: root length, stem length, total length, fresh weight and dry weight were higher with T5 (*Th* 10^6 esp/ml⁻¹ + Al), while T4 (*Bs* 10^6 esp/ml⁻¹ + Ga) favored the increase in stem diameter. This study is an effort to contribute to the search for innovative technologies such as seed biopriming and the application of biocontrol methods to develop a sustainable, strategic agricultural production system against current climatic conditions; besides being the first investigation and report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in El Salvador.

Key words: Wilt, *Fol*, *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum*, biopriming.

1 INTRODUCCIÓN

El cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) representa uno de los principales cultivos tanto a nivel mundial como nacional, debido a la importancia que tiene para el consumo, así como para su utilización en la agroindustria. Sin embargo, cada año los rendimientos son afectados en gran parte por la incidencia de enfermedades causadas por hongos del suelo (Jiménez & Sanabria, 2008; Lugo et al., 2001). Entre estos hongos se presenta *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*), causante de la fusariosis o marchitez del tomate, el cual se ha reportado en diferentes siembras alrededor del mundo (Jiménez, 2004; Lugo & Sanabria, 2001).

El tomate es una hortaliza con gran demanda nacional, y es considerada una de la más importantes en el rubro económico como en el sector alimenticio por su alto contenido de vitaminas y minerales. Se puede sembrar todo el año mediante regadíos, y en alturas que comprenden los 100-1,500 msnm, se adapta a clima cálido o templado (Larín et al., 2018).

Con el fin de reducir la marchitez vascular que ocasiona *Fol*, aunado a la variabilidad de las razas que éste patógeno presenta y al uso desmedido de los fungicidas se han desarrollado tecnologías que permiten disminuir la incidencia de la enfermedad en el campo al aplicar productos a base de microorganismos (Beltrán-Acosta & Garcés de Granada, 2005), como por ejemplo especies del género *Trichoderma*, que ejerce un efecto de hiperparasitismo sobre este hongo.

En esta investigación se evaluó la capacidad antagonista (agresividad) de las cepas comerciales *Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum* en condiciones *in vitro* e *in vivo* sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, en semillas de tomate.

2 OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

- Determinar la efectividad de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum* sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* var. CENTA CUSCATLÁN) a nivel *in vitro* e *in vivo*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Aislar e identificar a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. de tejidos con marchitez vascular en plantas de tomate var. CENTA CUSCATLÁN, para ser utilizado como cepa infectiva.
- Evaluar la actividad antagónica *in vitro* de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum* sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, a través del porcentaje de inhibición.
- Evaluar la efectividad de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum* a diferentes concentraciones (10^6 , 10^8 esp/ml⁻¹) y con adherente de biopolímeros (almidón y goma arábica) sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en semillas de tomate, mediante pruebas *in vitro* e *in vivo*.

3 JUSTIFICACIÓN

Por la importancia económica y nutricional el tomate constituye una de las principales hortalizas en todo el mundo, se cultiva en más de 100 países siendo china uno de los principales productores, seguido de Estados Unidos, India, Turquía y Egipto. La producción global del tomate está en constante crecimiento, tanto por las áreas cultivadas como también por la aplicación de tecnologías que permiten a los agricultores elevar el rendimiento del cultivo (Monardes et al., 2009).

En El Salvador el tomate (*Solanum lycopersicum* L.) constituye una de las hortalizas de mayor cultivo y consumo. Se caracteriza por ser un cultivo intensivo, realizado durante todo el año por pequeños y medianos productores, cuya producción se ha concretado en la búsqueda de nuevas tecnologías, como la identificación de mejores materiales genéticos con alto rendimiento y con tolerancia a plagas y enfermedades, uso de diferentes fuentes orgánicas, riego, fertirriego, hidroponía, manejo del cultivo en general, en condiciones protegidas y a campo abierto.

Esta hortaliza a nivel mundial es cultivada aproximadamente en 5 millones de ha, con una producción de 170.08 millones de toneladas de tomate fresco en el año 2014. Actualmente, Asia domina el mercado, con prácticamente un 60% de la producción global (FIRA, 2017), seguido por India y Estados Unidos (Manrique, 2018) este último es el mayor productor de pasta de tomate siendo la pulpa, el principal producto que se obtiene del proceso agroindustrial (Monardes et al., 2009).

La producción de tomate está limitada por factores bióticos y abióticos. En el periodo de 2014-2015 el tomate a nivel nacional fue cultivado en un área de 1,060 mz, con una producción total de 19,396,600 kg, cifra muy por debajo de la demanda (\$109,554,703 kg); como consecuencia se importó alrededor de 90,158,103 kilogramos con valor de \$12,165,670.00 (MAG, 2016). Para 2021 la superficie de producción se redujo a 603 mz, mientras que el volumen de producción fue de 506, 638 qq con un rendimiento total de 840.3 qq/mz, presentando incremento en la importación de 125, 522, 975 kg con un valor de inversión de \$18,563,456 (MAG, 2022). Para lograr suplir la demanda interna se requieren sembrar alrededor de 3,990 ha⁻¹ e implementar medidas como: a) aplicación de nuevas tecnologías con el uso de infraestructura protegido (microtunel, macrotunel, casa malla, invernadero), riego, fertirriego, hidroponía, agricultura orgánica, variedades tolerantes a plagas y enfermedades; b) incrementar las áreas de siembra; c) los productores dispongan de la tecnología (Larín et al., 2018).

La presión por prácticas sostenibles transversales a los organismos reguladores y el creciente problema de la resistencia a los plaguicidas, están obligando a encontrar alternativas a los agroquímicos. El control biológico, se está utilizando en nichos específicos de la agricultura y puede ser efectivo, si se tiene una comprensión clara del agroecosistema y sus limitaciones; un ejemplo son las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) que tienen gran potencial, porque además de promover el crecimiento de las plantas, reducen la severidad de enfermedades e inducen mecanismos de resistencia (Antoun, 2013).

La Fitoepidemiología, se ha convertido en una estrategia para el manejo sostenible de los agroecosistemas. Existe un grupo importante de hongos y bacterias que presentan efectos antagonicos contra otros microorganismos y esta acción puede ser aprovechada como una forma de control biológico de patógenos vegetales (Fernández-Larrea, 2001), pues los métodos de control biológico, integrados a las prácticas culturales, podrían colaborar en la prevención y en la disminución de la incidencia y severidad del patógeno. En este aspecto, se presentan como métodos promisorios la biofumigación y aplicación de microorganismos utilizados para el control de fitopatógenos fúngicos como el hongo antagonista *Trichoderma* spp (Perniola et al., 2014), también bacterias del género *Bacillus* spp. (Martin & Travers, 1989; Meadows et al., 1992) debido a que tienen la facilidad de digerir la quitina, además de la producción de antibióticos como: bacitracina, polimixina, tirocidina, gramicidina y circulina, entre otros (Bernal et al., 2002).

4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El tomate es la segunda hortaliza de mayor importancia económica, por lo que su producción, comercio y demanda mundial está en continuo aumento; Sin embargo, dentro de los factores limitantes de la producción juegan un papel primordial aquellos de orden fitosanitario, porque causan severas pérdidas económicas, especialmente en el producto para la industria (Arreaza, 2001).

El control basado en hongos como *Trichoderma* spp, es una estrategia efectiva a largo plazo, ya que es necesaria la adaptación del microorganismo al ambiente y su establecimiento en los ecosistemas, un mecanismo muy diferente al de los productos químicos, que son compuestos inertes. Todos estos aspectos deben tenerse en cuenta dentro del manejo integrado de enfermedades de plantas. Los mecanismos empleados por los agentes de control biológico son muchos y complejos, así también dependen del tipo de interacción hospedero-patógeno. Estos mecanismos pueden verse influenciados por el tipo de suelo, la temperatura, pH, y humedad del ambiente, así como por otros miembros de la microbiota (Guédez et al., 2012).

Los microorganismos del género *Bacillus* spp. representan una amplia variedad de bacterias del suelo, Gram positivas, aerobias estrictas o anaerobias facultativas y pertenecen al grupo de las bacterias formadoras de endospora (BAFEs). Son un grupo de bacterias que tienen la capacidad de resistir condiciones climáticas adversas como temperatura extrema, radiación UV, agentes oxidantes y corrosivos, sequías, fuertes lluvias, y procesos de esterilización debido a su potencial de formación de esporas (Bai et al., 2002; Bashan et al., 2010; Kloepper & Ryu, 2006; Vessey, 2003). Además, este género es considerado como una fábrica microbiana para la producción de una amplia variedad de moléculas biológicamente activas y potencialmente inhibitorias para el crecimiento de fitopatógenos (Ongena & Jacques, 2008). Las bacterias de este género, son consideradas de las mejores candidatas para el desarrollo de productos biopesticidas y biofertilizantes eficientes desde un punto de vista tecnológico, por su capacidad para producir esporas resistentes lo que hace que los productos tengan larga duración, su formulación y producción sea más fácil (Earl et al., 2008; Hamdache et al., 2011). Entre ellos, se destacan las cepas de *B. subtilis* como las más utilizadas para la promoción de crecimiento y para controlar enfermedades cuando se aplica desde semillas hasta a plántulas (Kokalis-Burelle et al., 2006).

Hasta el momento existen muy pocas investigaciones en cuanto a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) y su manejo en el cultivo de tomate en Centro América. En el caso de El

Salvador a la fecha, no hay registros sobre este patógeno en los datos presentados por CABI (2021b), por esta razón con este estudio se ha logrado tener evidencia de su existencia por lo que esta investigación es de carácter básica, pionera e inédita que contribuirá a que futuras investigaciones estén dirigidas hacia la búsqueda incesante de soluciones basadas en la naturaleza como el biocontrol de la marchitez vascular. Según Vallejo (1999), el control de la marchitez es muy difícil, sobre todo cuando las condiciones ambientales son favorables al hongo, pues se disemina por medio del agua de superficie, implementos agrícolas, insectos, plántulas contaminadas, uso de semilla infectada entre otros (Dixon & Tilston, 2010). Debido a que el hongo se establece como endófito en células y tejidos vasculares, se dificulta su control (Hossain et al., 2013), lo que sugiere un manejo integrado, que permita reducir la población del patógeno y obtener los rendimientos necesarios para tener un cultivo rentable. El uso de variedades resistentes reduce la incidencia de la enfermedad; sin embargo, la emergencia de nuevas razas del hongo y de nuevos biotipos dentro de las razas, supera su resistencia, conllevando a la búsqueda de nuevas estrategias (Horinouchi et al., 2011).

Con la finalidad de reducir las pérdidas económicas debido a la enfermedad de marchitez vascular, los agricultores aplican un gran número de productos químicos por ciclo y en ocasiones sin tener un control adecuado sobre el número y momento de las aplicaciones, concentración e ingrediente activo, entre otros; lo que frecuentemente implica contaminación ambiental; esto ocasiona riesgos para el equilibrio ecológico y la salud humana (León & Arosemena, 1980). La práctica del monocultivo y la contaminación por el uso indiscriminado de agroquímicos, han impactado el medio ambiente, reduciendo la biodiversidad (microorganismos) de los agroecosistemas edáficos, ocasionando la inestabilidad de los mismos, la cual se refleja, entre otros efectos nocivos, en una mayor incidencia y severidad de esta enfermedad en las plantas de tomate. Esto y los problemas de seguridad y salud pública inherentes a la fabricación y uso de agroquímicos han conducido a la búsqueda y establecimiento de alternativas ecológicas para el manejo de las enfermedades (Báez-Valdez et al., 2010).

Por las razones expuestas anteriormente la presente investigación estableció como objetivo: determinar la efectividad de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum* sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* a nivel *in vitro* e *in vivo* con la finalidad de aportar conocimientos al sector agrícola productivo como una solución alterna basada en la naturaleza para el desarrollo sostenible de los ecosistemas.

5 MARCO TEÓRICO

5.1 Origen y reseña histórica del tomate

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una planta originaria de la región andina, que se extiende desde el sur de Colombia hasta el norte de Chile desde allí, se trasladó a Centro América y México donde se domesticó y ha formado parte de la dieta alimenticia durante siglos. Posteriormente los conquistadores la llevaron a Europa (Monardes et al., 2009). Fue introducida a Europa en el siglo XVI, al principio era considerada planta ornamental, pero cuando la cultivaron en la región Napolitana y utilizaron con propósitos culinarios se expandió por todo el Mediterráneo y centro de Europa (Gorini, 2018); sin embargo se empezó a cultivar desde el siglo XIX con fines comerciales, desde entonces inició la industrialización y mejoramiento de las variedades para mesa e industria (InfoAgro, 2018). Hoy en día este cultivo es un componente vital de la alimentación diaria y se consume como frutos frescos, así también como diversos tipos de productos procesados (Blancard et al., 2011; Brookie et al., 2018).

La presión de selección ejercida por el hombre a través de la diversidad en el uso de este cultivo, los diferentes tipos de clima y la presión de los patógenos han originado la gran variabilidad genética existente en *Solanum lycopersicum* y sus parientes silvestres (Agrios, 2005). En la región andina del Perú, se encuentran a lo largo y ancho, numerosos parientes silvestres y cultivados del tomate; también en Ecuador y Bolivia, así como en las islas Galápagos (Alcazar-Esquinas, 1981). Esos parientes silvestres ocupan distintas condiciones ambientales basadas en latitud - altitud y representan un amplio grupo de genes para el mejoramiento de la especie (Alcazar-Esquinas, 1981; Rick, 1986).

Dentro de las especies de hortalizas es una de la más importantes en muchos países del mundo y presenta una variedad de cultivares que difieren en color, forma, sabor y tamaño (Eshbaugh, 2012). La importancia del tomate radica en su contenido nutricional y gran prestigio en la alimentación (Vera-Guzmán et al., 2011). En la Actualidad se reconoce su valor debido al alto contenido de vitamina C (Mateos et al., 2013); además, posee propiedades terapéuticas como analgésico, anti-inflamatorio y antioxidante (González-Zamora et al., 2015), incluso se destaca por sus propiedades anti carcinogénicas (Lin & Salveit, 2012). El fruto es fuente de vitaminas A, B1, B2, B6, C y E, y de minerales como fósforo, potasio, magnesio, manganeso, zinc, cobre, sodio, hierro y calcio; incluyendo proteínas, hidratos de carbono, fibra, ácido fólico, ácido tartárico, ácido succínico y ácido salicílico. El aporte de cada 100 g de nutrientes del tomate en agua es del 93,5%.

En cuanto a calorías es de 23 kcal, proporcionando al organismo la energía diaria que necesita (CCB, 2015). Son considerados importantes fuentes de carotenoides en la dieta humana, de entre los cuales el licopeno representa el componente principal ya que comprende de un 80% a 90% de los pigmentos que contiene (Rao et al., 2006).

Por tantos beneficios esta hortaliza ocupa el segundo lugar mundialmente debido a su nivel de producción, la cual es superada solamente por el cultivo de la papa (SAGARPA, 2005). Su demanda aumenta continuamente y con ella su cultivo, producción y comercio, siendo esta una de las especies vegetales más consumidas en todos los países además de ser una de las de mayor valor económico (Bosland et al., 2010; Hernández et al., 2014).

5.2 Principales países productores

A nivel mundial esta hortaliza es cultivada aproximadamente en 5 millones de hectáreas, con una producción de 170.08 millones de toneladas de tomate fresco en el año 2014. Actualmente, Asia domina el mercado, con prácticamente un 60% de la producción global (FIRA, 2017), seguido por India y Estados Unidos (Manrique, 2018). Este último es el mayor productor de pasta de tomate siendo la pulpa, el principal producto que se obtiene del proceso agroindustrial (Monardes et al., 2009). La producción global en el 2017 fue de 241.641.489 t. (FAOSTAT, 2017). En el año 2013, la extensión que ocupó el cultivo mundialmente fue de 4,734,000 ha, con una producción de 163 millones de t; donde China fue el primer productor con 50 millones de t, seguido por India con 18 millones de t, Estados Unidos con 12 millones de t. (ver Anexo.1). México se ubica en la décima posición con 3,282 millones de t. (FAO, 2013).

Según FAOSTAT (2017) el tomate se cultiva en más de 100 países para consumo fresco e industrial; el 81% de la producción, se concentra en China, India, Estados Unidos, Turquía, Egipto, Irán, Italia, España, Brasil y México. El consumo promedio en países desarrollados es de 86 g diarios per cápita y en vía de desarrollo, 27 g. Colombia produjo 714.314 t en el 2017, con un rendimiento promedio de 33,94 t/ha. El rendimiento promedio mundial es de 55,27 t/ha, cifra por debajo de la obtenida en áreas con mayor rendimiento y gran tecnificación como Bélgica (496 t/ha), Reino Unido (388,95 t/ha) y Noruega (320,39t/ha) (FAOSTAT, 2017; Vásquez & Castaño, 2017).

La clasificación taxonómica del tomate se detalla en la Tabla.1 de la siguiente manera:

Tabla. 1

Clasificación taxonómica del tomate, Adaptado de ITIS (2021).

| | |
|------------------|---------------------|
| Reino: | Plantae |
| División: | Magnoliophyta |
| Clase: | Magnoliopsida |
| Subclase: | Asteridae |
| Orden: | Solanales |
| Familia: | Solanaceae |
| Género: | <i>Solanum</i> |
| Especie: | <i>lycopersicum</i> |

5.3 Características botánicas del tomate

Son plantas dicotiledóneas herbáceas anuales o perennes (Cestoni et al., 2006) autógamas, de hasta más de 1,5 m de altura, vellosas e inermes. De porte arbustivo, se desarrolla de forma rastrera, semi-erecta o erecta, dependiendo de la variedad (Larín et al., 2018).

Tallo

Inicialmente el tallo tiene una apariencia herbácea; está compuesto de epidermis con pelos glandulares, corteza, cilindro vascular y tejido medular (Escobar & Lee, 2009). Sus características son de color verde pubescente y anguloso. Mide entre 2 y 4 cm de ancho y es más delgado en la parte superior. En el tallo principal se forman tallos secundarios, que dan origen a hojas nuevas y racimos florales, y en la porción distal se ubica el meristemo apical, de donde surgen nuevos primordios florales y foliares (Monardes et al., 2009).

Hoja

Es pinnada y compuesta. Presenta de siete a nueve folíolos peciolados que miden 4-60 mm x 3-40 mm, lobulados y con borde dentado, alternos, opuestos y, por lo general, de color verde, glanduloso-pubescente por el haz y ceniciento por el envés (Fig.1A). Se encuentra recubierta de pelos glandulares y dispuestos en posición alterna sobre el tallo (Monardes et al., 2009). La posición de las hojas en el tallo puede ser semi-erecta, horizontal o inclinada. Puede ser de tipo enana, hoja de papa, estándar, peruvianum, pimpinellifolium o hirsutum (IPGRI, 1996).

Flor

Es perfecta y regular. Los sépalos, los pétalos y los estambres se insertan en la base del ovario. El cáliz y la corola constan de cinco o más sépalos y de cinco pétalos de color amarillo,

que se encuentran dispuestos de forma helicoidal. Poseen cinco o seis estambres que se alternan con los pétalos (Fig.1B), formando los órganos reproductivos. El ovario tiene dos o más segmentos (InfoAgro System S.L., 2016).

Las flores se agrupan en inflorescencias de tipo racimo, en grupos de tres a diez en variedades comerciales de tomate medianas y grandes. Las inflorescencias se ubican en las axilas, cada dos o tres hojas (INTA, 2014). Es normal que se forme la primera flor en la yema apical, mientras que las demás aparecen en posición lateral y por debajo de la primera, siempre colocándose alrededor del eje principal, siendo el pedicelo el que une la flor al eje floral (InfoAgro System S.L., 2016).

Figura. 1

Órganos de la planta de tomate. A) Tipos de hojas. B) Flor. Fuente: López-Marín (2017).



Fruto

De tipo baya que puede tener dos o más lóculos, con un peso que puede alcanzar hasta 600 g. Está compuesto por el pericarpio, el tejido placentario y semillas (Gorini, 2018).

Semilla

Son ovoides, comprimidas, lisas o muy velludas, parduzcas y están envueltas en una abundante masa mucilaginosa dentro del fruto (Fig.2), presentan un tamaño promedio de 5x4x2 mm. Cada semilla está conformada por el embrión, el endospermo y la cubierta seminal (Díaz & Hernández, 2003). Almacenarlas durante períodos prolongados es recomendable hacerlo a una humedad del 5%. Por otra parte una semilla de calidad tendrá por lo menos el 95% de germinación (Larín et al., 2018).

Figura. 2

Morfología de la semilla de tomate. Fuente: Larín et al. 2018.



Germinación

Comprende tres etapas:

- Rápida absorción de agua, que dura 12 horas.
- Reposo durante 40 horas, el cual absorbe agua nuevamente.
- Las capas de células que rodean las semillas se disuelven en la madurez, formando una masa gelatinosa rica en granos de almidón (Larín et al., 2018).

López-Marín (2017) menciona que la semilla germina en promedio de cinco a ocho días después de la siembra. Sin embargo, la germinación depende de la calidad de la semilla (vigor), en la que influye la temperatura (óptima de 16°C a 28°C) y la humedad del sustrato (capacidad de campo).

Sistema radicular

Es importante conocer la estructura radical por ser un elemento fundamental en su crecimiento para llegar a un pleno desarrollo, al germinar la semilla se desarrolla una raíz vertical que puede conseguir una profundidad de 60 cm cuando se realiza el trasplante, este pivote se rompe y lo sustituyen raíces ramificadas o adventicias (Gorini, 2018); estas últimas son numerosas y potentes y no superan los 30 cm de profundidad (INTA, 2014; Monardes et al., 2009).

El interior de la raíz presenta tres partes: epidermis, córtex y cilindro vascular. La epidermis contiene pelos que absorben el agua y los nutrientes, mientras que el córtex y el cilindro vascular cumplen la función de transportar los nutrientes (InfoAgro System S.L., 2016).

Tipos de crecimiento

Desde el punto de vista sistemático, por el hábito de crecimiento la planta de tomate se divide en dos grupos:

- **Plantas de crecimiento determinado.** Tienen forma de arbusto, las ramas laterales son de crecimiento limitado. Estas plantas presentan en cada extremo de crecimiento una yema floral y tienen periodos definidos de floración y formación de frutos. El tamaño de la planta varía de acuerdo a la variedad; pudiendo ser plantas compactas, medianas y largas. La mayoría de cultivares de pasta o cocina sembrados en el país se encuentran dentro de esta clasificación y la producción se obtiene en un periodo relativamente corto (Larín et al., 2018).
- **Plantas de crecimiento indeterminado.** Son plantas cuyos tallos principal y lateral crecen en un patrón continuo, siendo la yema terminal del tallo la que desarrolla el siguiente tallo. La floración, fructificación y cosecha se extienden por periodos muy largos. Poseen condiciones

adecuadas para un crecimiento continuo, pues forman hojas y flores de manera ilimitada. La aparición de flores en los racimos y su grado de desarrollo son escalonados: las primeras flores del racimo pueden estar totalmente abiertas, mientras que las últimas aún no se abren (López-Marín, 2017)

Temperatura de crecimiento

La temperatura óptima de desarrollo del cultivo oscila entre 20°C y 30°C durante el día y entre 10°C y 17°C durante la noche. Temperaturas superiores a los 30°C reducen la fructificación y fecundación de los óvulos, afectan el desarrollo de los frutos y disminuyen el crecimiento y la biomasa de la planta. Temperaturas diurnas inferiores a 12-15°C pueden originar problemas en el desarrollo. Las plantas de tomate se desarrollan mejor con temperaturas de entre 18°C y 24°C (MAG, 2007).

5.4 Principales plagas y enfermedades del tomate

El cultivo de tomate durante su ciclo vegetativo es atacado por distintos agentes causales de plagas, entre los principales destacan: nematodos, hongos, bacterias, virus, insectos y ácaros; todos ellos son causantes de la baja productividad y calidad del fruto. La incidencia de enfermedades es un problema muy grande en el desarrollo de este cultivo, gran parte de los hongos fitopatógenos ocasionan pérdidas entre 10 y 100% de la producción, además la mayor parte de hongos varían en dependencia de su región, variedades sembradas y condiciones ambientales (Sanogo & Ji, 2012).

Tal como expresa Agrios (2005), los hongos fitopatógenos causan pérdidas elevadas a nivel global tanto económicas como agrícolas. Según, datos relevantes de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2019), la agricultura mundial, tiene una pérdida anual del 12% de su producción por daños causados por hongos fitopatógenos, más que por cualquier otro agente. Existen más de 100.000 especies de hongos y un 8% son capaces de colonizar los tejidos vegetales causando así una enfermedad en la planta. El estilo de vida de estos hongos fitopatógenos es muy diverso lo que les ha permitido desarrollar diferentes estrategias para interactuar con sus huéspedes (Agrios, 2005).

De acuerdo a Horbach et al. (2011) los hongos fitopatógenos se han clasificado tradicionalmente en función de su estilo de vida, de igual manera, se establecen tres grupos:

- ◆ **Patógenos biótrofos:** colonizan las células vivas de su huésped y toman los nutrientes que necesitan para vivir, los cuales le ayudan a completar parcialmente su ciclo de vida, causando daños relativamente diminutos en la pared celular vegetal.
- ◆ **Patógenos necrótrofos:** infectan de manera especializada, provocando una muerte celular de los tejidos de su hospedador secretando toxinas y enzimas degradadoras de la pared celular. Posteriormente se alimentan de forma saprofítica de esta materia orgánica muerta. *Alternaria* spp., *Botrytis* spp. y *Verticillium* spp; son algunos ejemplos.
- ◆ **Patógenos hemibiótrofos:** presentan una primera fase de vida biotrófica durante la cual el hongo penetra dentro del huésped y se establece en el tejido colonizado, en la siguiente fase de su vida necrotrófica utiliza los nutrientes de las células del huésped ya muertas, se incluyen en este grupo hongos como *Fusarium oxysporum*, y *Colletotrichum* spp.

Entre las enfermedades más importantes en el cultivo del tomate causadas por hongos, de acuerdo a Velasco et al. (2011), se encuentran:

- **Tizón tardío** (*Phytophthora infestans*): esta enfermedad se propaga en climas fríos y húmedos, causando la pérdida total del cultivo, lesiones de forma irregular, hundidas y de color verdoso, y ataca a todas las partes de la planta.
- **Tizón temprano** (*Alternaria solani*): esta enfermedad, es propicia en humedades relativas superiores al 70%. La presencia de los síntomas en las hojas son manchas circulares de color café y negro, en el fruto causan lesiones hundidas y oscuras debilitando así el tallo.
- **Moho gris** (*Botrytis cinerea*): se presenta cuando existe una humedad relativa superior al 90%, ocasionando daños a las flores, frutos y el tallo causando manchas de color gris.
- **Damping off o ahogamiento del tallo** (*Phytophthora* spp, *Pythium* spp, *Fusarium* spp y *Rhizoctonia* spp): ataca a las semillas y a las plántulas emergentes, se presenta por condiciones de alta humedad y mal drenaje del sustrato, causando problemas de germinación y mortalidad de plántulas en los semilleros.
- **Marchitez vascular.** Producida por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen es la principal enfermedad que causa problemas en el cultivo, disminuye en un 60% el rendimiento y afecta la calidad del producto. Esta enfermedad, se ha reportado en por lo menos 32 países (Jones et al., 2001), ha sido identificada como una de las más devastadoras en todas

las regiones del mundo donde se cultiva el tomate (Marlatt et al., 1996), prospera en una diversidad de condiciones ambientales desde trópicos secos hasta climas templados (Cai et al., 2003).

5.5 Postulados de Koch

Los postulados de Koch formulados en 1882, sirven para determinar cuándo un microorganismo es el agente causal de una enfermedad infecciosa en un hospedero susceptible., están detallados en el libro Brock. Biología de los Microorganismos (Madigan et al., 2015) y en Robledo D'Angelo (2016) se resumen de la siguiente manera:

1. El agente causal de la enfermedad o patógeno debe estar siempre presente en los organismos hospederos enfermos y ausente en los sanos.
2. El patógeno debe aislarse y multiplicarse *in vitro* en cultivo puro, a partir del hospedero enfermo.
3. El patógeno aislado, debe provocar la misma enfermedad cuando es inoculado en hospederos sanos susceptibles.
4. El patógeno debe reaislarse a partir de los hospederos que fueron inoculados, obtenerse nuevamente un cultivo axénico de éste, presentando las mismas características observadas en el aislamiento original.

5.6 Descripción de *Fusarium* spp.

5.6.1 Sistema de clasificación taxonómico

En el año de 1809, Link describió por primera vez el género *Fusarium* spp, que lo definió como una forma de canoa o banana, siendo éste su carácter primario distintivo, puesto que esta descripción se basó en las observaciones de *Fusarium roseum*, primera especie descrita, y debido a su falta de información, se podría aplicar al menos 50 géneros de *Hyphomycetes* (Marasas et al., 1984; Nelson et al., 1994). Es por ello que la definición original ha sufrido una serie de modificaciones quedando como: especies con macroconidios fusoides, ligeramente curvados, septados y con una célula basal pedicelada. Con microconidios y clamidosporas terminales o intercalares, que pueden estar ausentes o presentes (Nelson et al., 1994). Por lo tanto, se han realizado investigaciones que aún existen desacuerdos en la sistemática de *Fusarium* spp, que exhibe un grado notable de variación con respecto a características morfológicas, culturales y fisiológicas. De tal manera que, la variación ha conducido a dificultades considerables en el desarrollo de un sistema taxonómico estable y extremadamente aceptado por el género (Leslie &

Summerell, 2006; Summerell et al., 2003). En *Fusarium* spp se han reconocido entre nueve y 78 especies, dependiendo del sistema taxonómico utilizado, el cual se basa principalmente en las características culturales de las colonias y de las esporas del hongo. Snyder y Hansen, Messian y Cassini reconocen nueve especies, Gordon considera 26 especies, Booth 44 especies, Wollenweber y Reinking 65 especies y Gerlach reconoce 78 especies (Nelson & Ploetz, 1990). Esto muestra la complejidad taxonómica del género; por tal razón, la identificación de las especies debe ser hecha por expertos para evitar errores (Arbeláez-Torres, 2000) debido a que han sido descritas más de 1.000 especies, variedades y formas, mencionadas en base a observaciones superficiales (Toussoun & Nelson, 1975). La exigencia de buscar un sistema correcto y fiable de clasificación, se produjo cuando especies del género *Fusarium* causaron serias enfermedades en muchas plantas. A partir de 1913 -1935 se estudió este género, y se redujo el número de especies, variedades y formas de *Fusarium* a 142, agrupados en 16 secciones (Nelson et al., 1994).

La especie *Fusarium oxysporum* se clasifica de forma taxonómica en la Tabla.2.

Tabla. 2

Clasificación taxonómica de Fusarium oxysporum, Adaptado de CABI (2021a).

| | |
|-------------------|---------------------------|
| Dominio: | Eucariota |
| Reino: | Fungi |
| Phylum: | Ascomycota |
| Subphylum: | Pezizomycotina |
| Clase: | Sordariomycete |
| Subclase: | Hypocreomycetidae |
| Orden: | Hypocreales |
| Familia: | Nectriaceae |
| Género: | <i>Fusarium</i> |
| Especie: | <i>Fusarium oxysporum</i> |

5.6.2 Patogenia y prevalencia

Una de las fitopatologías de mayor importancia para el cultivo de tomate es la marchitez vascular causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) este hongo está completamente extendido en todo el mundo haciendo su aparición en Europa en el siglo XIX (Blancard et al., 2011). Sin embargo, esta enfermedad continúa apareciendo como consecuencia del cultivo intensivo de tomate y otras especies vegetales, causando pérdidas entre 21 y 47% en campos a libre exposición y bajo cubierta (Ramyabharathi et al., 2012). De tal manera, que la forma de infección de este patógeno penetra por las raíces tanto activa como por aberturas naturales (Enespa & Dwivedi, 2014). La producción de clamidosporas, microconidios y macroconidios; se

han relacionado con la diseminación aérea, lo que sugiere una fase policíclica, no común en patógenos habitantes del suelo (Katan et al., 1997).

Los suelos ácidos, altas temperaturas, deficiencias de nutrientes y el ataque de nematodos son aspectos que favorecen la invasión del hongo en el hospedero (Agrios, 1996). El hongo puede sobrevivir en el suelo como micelio o como esporas en ausencia de sus hospederos. Se disemina a distancias cortas, mediante el agua, equipos agrícolas y herramientas infestadas y a distancias largas, por medio de semillas, plantas enfermas o suelo adherido a ellas. Una vez el suelo es infestado, permanece así indefinidamente (Joshi, 2018; McGovern, 2015).

Para el caso específico del cultivo de tomate se puede decir según García et al. (2012) que la micosis se manifiesta por una podredumbre intensa de la raíz principal, que alcanza la base del tallo con una necrosis de color marrón que se describió por primera vez, como “Mancha chocolate”. El sistema radicular secundario puede expresar una podredumbre marrón más o menos intensa. El xilema se necrosa hasta una altura de 50 cm o más desde la base del tallo. En consecuencia, la planta se marchita irreversiblemente y termina por morir. Esta forma especializada (*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*) se diferencia en que no ocasiona podredumbre radicular y necrosa el xilema en su totalidad. La forma especial (f. sp.) *lycopersici* infecta solo a plantas de tomate susceptibles (Inami et al., 2014); no obstante, Fassihiani (2000) comprobó que esta forma especial es capaz de colonizar las raíces de plantas pertenecientes a otros géneros, como *Oryzopsis* sp, *Digitaria* sp, *Amaranthus* sp y *Malva* sp; además de plantas de zanahoria (*Daucus carota*), trigo (*Triticum aestivum*), berenjena (*Solanum melongena*) y chile (*Capsicum annum*).

En las etapas tempranas del cultivo, las plántulas son susceptibles al mal del talluelo causado por el patógeno debido a la carencia de lignina en el tallo, lo que facilita la rápida colonización en el xilema vascular; causando finalmente el colapso del tejido (Agrios, 2005). Pero cuando el hongo infecta a una planta adulta produce la marchitez vascular, ocasionando amarillamiento foliar que comienza por las hojas inferiores que posteriormente mueren, la base del tallo adquiere color oscuro y se produce taponamiento de los vasos del xilema tornándolos color pardo oscuro, mientras que la médula permanece sana (ver Anexo.2), y en ocasiones ocurre infección en el fruto, que se detecta porque el tejido vascular muestra decoloración interna (Jones, 1991). Algunas ramas pueden expresar síntomas, en donde las hojas presentan marchitez en los folíolos de un lado del peciolo y del lado opuesto se ven sanos. Los síntomas de marchitez se observan mejor después de la floración y formación de frutos y durante los períodos más

calurosos del día, pues temperaturas altas alrededor de 28°C, aplicación de fertilizantes amoniacales y pH bajo del suelo facilitan la virulencia de *Fol* (McGovern & Datnoff, 1992).

El patógeno puede sobrevivir en el suelo en forma de clamidosporas, como saprófito o en restos vegetales, donde se mantiene viable hasta por 10 años (Kant et al., 2011). Cuando una planta sana crece en suelo infestado, el contacto con las raíces induce la germinación de los conidios, el tubo germinativo de la espora o el micelio penetra directamente por el ápice de las raíces o ingresa a éstas, a través de heridas o de los puntos de formación de las raíces laterales. El micelio avanza por medio del córtex de las raíces intercelularmente y cuando alcanza los vasos del xilema entra por los extremos. El micelio permanece en los vasos y se transloca a través de ellos, principalmente, hacia arriba, hacia el tallo y la corona de la planta (Agrios, 2005). En los vasos, el micelio se ramifica y produce microconidios, que son liberados y llevados hacia el ápice en la corriente de la savia. Los microconidios germinan en el punto en donde el movimiento se detiene, el micelio penetra la pared superior del vaso y se producen más microconidios en el próximo vaso. El micelio también avanza lateralmente, dentro de los vasos adyacentes, penetrando por los extremos. La combinación de estos procesos, llamado taponamiento de los vasos por micelio, esporas, gel, gomas y tílides y el aplastamiento de los vasos por proliferación de células adyacentes de parénquima, es la responsable de la marchitez (Yadeta & Thomma, 2013). Luego, el hongo invade todos los tejidos vegetales, alcanza la superficie externa de la planta muerta y allí esporula. Las esporas pueden ser diseminadas a nuevas plantas por el viento, el agua y así, sucesivamente (Dixon & Tilston, 2010; Srinivas et al., 2019).

Las especies de este género afectan una amplia variedad de hospedantes la marchitez vascular es uno de los problemas más comunes que produce *Fusarium* spp y es catalogado como uno de los hongos fitopatógenos más importantes del suelo no solo por los daños, sino también por la frecuencia con que se presentan (Duarte et al., 2016). Cultivos de importancia económica son perjudicados por este tipo de hongo, ya que existen registros de que también afecta a cultivos de algodón, aguacate, plátanos y los mayores reportes son en solanáceas como la papa, ajíes y el tomate. El efecto negativo en los cultivos mencionados puede llegar a ocasionar grandes pérdidas económicas al ocasionar la muerte de las plantas en más del 50% del cultivo y si las condiciones son favorables para el desarrollo del hongo puede terminar con el cultivo completo (González et al., 2002; Lugo & Sanabria, 2001; Miller et al., 1996). Los síntomas que causa el género *Fusarium* spp, pueden confundirse con otros agentes fitopatógenos o bacterianos. Además,

puede llegar afectar en distintas etapas del desarrollo de la planta y en distintas zonas de ella (Agrios, 1996).

5.6.3 Formas especiales

Fusarium oxysporum se caracteriza por producir distintas formas especiales (formae especiales) Snyder & Hansen (1940) reconocieron 25 formas especiales, Booth (1971) registró 70 formas especiales así mismo Armstrong & Armstrong (1981) reconocieron 72 formas especiales patógenas de cultivos de gran importancia económica; de acuerdo a otros autores, las formas especiales de la especie podrían pasar de un centenar. Farr et al. (1989) reconocieron 41 formas especiales causando enfermedades en plantas de importancia económica en los Estados Unidos. Pardo-Cardona (1995) registró la presencia en Colombia de diez formas especiales, pero además mencionó 21 tipos de plantas atacadas por *F. oxysporum*.

A pesar del gran número de plantas afectadas por diversas formas especiales de *F. oxysporum*, se observa una muy alta especialización en las plantas hospedantes que pueden atacar. La mayoría de las formas especiales son muy especializadas en los géneros de plantas hospedantes que pueden infectar. Por ejemplo, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* ataca solamente tomate (Arbeláez-Torres, 2000).

5.6.4 Razas y variedades

Tres razas del hongo *Fol* se han reportado, las cuales se distinguen por las proteínas de virulencia en materiales diferenciales de tomate que contienen diferentes genes de resistencia (Cai et al., 2003; Panthee & Chen, 2010; Scott et al., 2004). La existencia de razas fisiológicas en *Fol* fue demostrada mediante pruebas de patogenicidad, donde las razas son distinguidas por su virulencia sobre variedades de tomate que llevan genes específicos para resistencia (McGrath et al., 1987; Stall, 1961).

La existencia de la raza 1 fue descrita por primera vez en 1886 (Booth, 1971) y la resistencia a esta raza fue encontrada en el locus I de *Solanum pimpinellifolium* PI-79532, que confería resistencia a la raza 1 del *Fol* (Bohn & Tucker, 1940), la raza 2 fue identificada inicialmente en 1945 en Ohio (Alexander & Tucker, 1945) y la resistencia a esta nueva raza a eliminar se encontró en el nuevo locus (I-2) del híbrido natural *S. esculentum* x *S. pimpinellifolium* PI-126915 (Alexander & Hoover, 1955). La raza 3, capaz de atacar los cultivares con los loci para resistencia 1 y (I-2) fue identificada en Queensland, Australia en 1978 (Grattidge & O'Brien, 1982). Ésta raza se ha observado en Estados Unidos de América (Bost, 2001;

Chemelli et al., 1992; Davis et al., 1988; Marlatt et al., 1996) en México (Ascencio-Álvarez et al., 2008; Valenzuela-Ureta et al., 1996) y en Brasil (Reis et al., 2004). La fuente de resistencia a esta nueva raza se encontró en la especie silvestre *Solanum pennellii* P1414773 designando al locus que le confiere control a esta raza de *Fol* (1-3) (McGrath et al., 1987). Actualmente pocos cultivares comerciales con resistencia a la raza 3 están disponibles (Cai et al., 2003; Chemelli et al., 1992).

Se asume que la interacción entre *Fol* y el tomate sigue la teoría de Flor, gen por gen (Flor, 1956), puesto que las tres razas presentan resistencias monogénicas dominantes (Enríquez-Acosta, 2019). Por lo tanto, se han descrito tres razas del hongo 1, 2 y 3 o 0, 1 y 2, las cuales, se han identificado en los loci: I-1, I-2 e I-3, otorgando resistencia al patógeno (Panthee & Chen, 2010; Scott et al., 2004). Según Inami et al. (2012) la raza 2 de *Fol*, surgió de la raza 1, por la pérdida del gen *avr1*, por inserción de un trasposón, mientras que la raza 3 emergió cuando un punto de mutación ocurrió en el gen *avr2*. Diferentes razas del hongo portan en varias combinaciones tres genes de avirulencia, a saber: *avr1*, *avr2* y *avr3*, que activan respuestas de defensa contra el hongo, al ser reconocidos por los correspondientes genes de resistencia en tomate.

5.6.5 Genes de avirulencia y proteínas efectoras de *Fol*

Los patógenos fúngicos de plantas tienen estrategias para reconocer al hospedante adecuado, penetrar e invadir el tejido vegetal, superar las defensas de la planta y optimizar su crecimiento dentro de la misma. Para realizar estos procesos, generalmente, el hongo tiene que percibir las señales químicas y físicas del hospedante y responder con los cambios metabólicos y morfogenéticos requeridos para el desarrollo patogénico (Fourie, 2011; Moretti, 2009). De acuerdo a Di Pietro et al. (2001) tales cambios requieren la síntesis de productos génicos específicos y dependen de las vías de transducción de señales conservadas involucradas con la activación de proteínas G, las señales de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y las cascadas de proteínas quinasas activadas por mitógenos (de sus siglas en inglés MAPK).

El hongo *Fol*, es capaz de secretar enzimas y pequeñas proteínas durante la colonización de los vasos xilemáticos de la planta de tomate (Houterman et al., 2007). Estas proteínas promueven la colonización del hospedante, por ejemplo por la supresión de los mecanismos de resistencia basales de la planta (Chisholm et al., 2006; Jones & Dangl, 2006). El repertorio de proteínas efectoras, determina la virulencia de un patógeno hacia un hospedante particular (Bray-Speth et al., 2007).

Se han identificado 11 proteínas de *Fol*, las cuales se han denominado proteínas secretadas en el xilema (SIX) (Houterman et al., 2007; Lievens et al., 2009). Tres de estas proteínas son contrarrestadas por los genes I de tomate: Avr1 (SIX4) es reconocida por los genes I e I-1 no alélico (Houterman et al., 2008), Avr2 (SIX3) es reconocido por I-2 (Houterman et al., 2009); y Avr3 (SIX1) es reconocido por I-3 (Amaral et al., 2008). Avr2, Avr3 (Amaral et al., 2008; Houterman et al., 2009) así como SIX6, son efectores genuinos, y se ha encontrado que contribuyen con la virulencia general. Esto se ha evidenciado por la reducida virulencia del respectivo gen en cepas que no lo contienen, un efecto que usualmente es mejor observado en la infección de plantas adultas que en los retoños. Avr1 no es requerido para la virulencia general. Este gen tiene la función de suprimir específicamente la habilidad de I-2 e I-3 para conferir resistencia contra las cepas de la raza 1 (Houterman et al., 2008).

5.6.6 Identificación y características de *Fusarium* spp

La mayor parte de las especies de *Fusarium* presentan distintas características en medios de cultivo sintéticos, como pueden ser; colonias blancas, cremas, naranjas, pardo, pardo rojizo, rojo carmín, rosa, púrpura e incluso azuladas (ver Anexo.3). Esta pigmentación puede estar dada por la coloración del micelio o por la difusión de algún pigmento en el medio de cultivo en el cual se desarrolla el hongo (Arvayo-Ortiz et al., 2011). Sin embargo, los medios de cultivo son utilizados con la intención de poder valorar aspectos morfológicos tanto macro y microscópicos; además, de conseguirse una buena esporulación. Con Agar Papa Dextrosa (PDA) se valora muy bien el aspecto morfológico y coloración de la colonia; su alto contenido en carbohidratos ejerce un mayor crecimiento en la esporulación, que suele retrasarse y los conidios pueden ser atípicos (Leslie & Summerell, 2006).

El hongo se caracteriza por producir colonias de crecimiento rápido y tres tipos de esporas asexuales denominadas: microconidias, macroconidias y clamidosporas (ver Anexo.4). Las microconidias son esporas unicelulares, sin septas, hialinas, de elipsoidales a cilíndricas, rectas o curvadas, se forman sobre fiálides laterales, cortas y simples, o sobre conidióforos poco ramificados. Los microconidios miden entre 5 y 12 μm de largo por 2,5 a 3,5 μm de ancho (Leslie & Summerell, 2006; Nelson, 1981).

Las macroconidias, son esporas de pared delgada, fusiformes, largas, moderadamente curvadas, con varias células y de tres a cinco septos transversales, con la célula basal elongada y la célula apical atenuada. Se forman en esporodoquios de color naranja pálido, generalmente

abundantes cuando se siembran en agar de papa dextrosa (PDA) complementado con hojas de clavel (Leslie & Summerell, 2006; Lugo & Sanabria, 2001). Los macroconidios del hongo producidos sobre los tejidos del hospedante pueden ser transportados por el viento, las gotas de lluvia, la maquinaria agrícola o por los humanos, entre otros. Las infecciones secundarias suelen producirse a través de las raíces, aunque también son posibles a través de heridas en la parte aérea de las plantas (Kranz, 1982).

Las clamidosporas son esporas formadas a partir de la condensación de células de las hifas o de las macroconidias y se caracterizan por poseer paredes bastante gruesas (Agrios, 1996; Arbeláez-Torres, 2000; Nelson et al., 1994). Las clamidosporas permiten al hongo sobrevivir por largo tiempo; se producen a partir de la modificación de hifas o células conidiales; su formación está relacionada con factores de estrés como la ausencia del hospedante, agotamiento de nutrientes y ambientes adversos (Smith, 2007). Este tipo de células germinan en condiciones favorables, incluyendo la presencia de exudados radicales; se ha demostrado que resisten temperaturas altas y sobreviven más tiempo en el suelo que los conidios, además que causan síntomas más severos que los microconidios (McGovern, 2015).

Algunas especies de *Fusarium* producen las tres formas de esporas (macroconidios, microconidios y clamidosporas), mientras que otras no. Por lo tanto, el macroconidio es el órgano primario para la caracterización, su forma y tamaño varía según la especie. Éste se puede formar en una estructura especializada llamada esporodoquio, como también en monofiálides, polifiálides y en el micelio aéreo. Para algunas especies es una característica relativamente constante y estable, pero se debe utilizar cautelosamente como criterio taxonómico (Leslie & Summerell, 2006).

El reconocimiento de géneros y de especies puede ser muy complejo. Es así, como la identificación basada en la morfología presenta un importante grado de dificultad, sobre todo, para distinguir especies cercanas, con características fenotípicas muy similares. Los métodos moleculares se han convertido en una herramienta eficiente para confirmar la identidad de especies dentro del género, basada, especialmente, en marcadores específicos, que amplifican una región de su genoma (Unda et al., 2011).

5.6.7 Hábitat

Fusarium spp es un patógeno facultativo con alta capacidad de sobrevivir en materia orgánica en el suelo y a su vez tiene la capacidad de atacar la planta cuando esta sufre algún tipo de desbalance (Michielse & Rep, 2009), asimismo puede durar en el suelo por varios periodos

esperando a su vez un hospedero. Es uno de los hongos más comunes del suelo, siendo cosmopolita cuyo comportamiento es de dos tipos; el primero, como un saprofito común de suelos que puede competir con saprofitos obligados con algunos hongos que infectan raíces para colonizar tejido vegetal muerto; y el segundo, se comporta como un importante hongo vascular sobre muchas especies de plantas a nivel del mundo (Zaquinaula, 2018). Sin embargo, las diferentes formas especiales (f. sp.) de *Fusarium oxysporum* a menudo tienen distintos grados de distribución (Bawa, 2016; Debbi et al., 2018).

5.7 Alternativas para el control de la marchitez

Con la finalidad de reducir las pérdidas económicas debido a la enfermedad de Marchitez vascular, los agricultores aplican un gran número de productos químicos por ciclo y en ocasiones sin tener un control adecuado sobre el número y momento de las aplicaciones, concentración e ingrediente activo, entre otros; lo que frecuentemente da lugar a mayores costos de producción y contaminación ambiental; esto ocasiona riesgos para el equilibrio ecológico y la salud humana (León & Arosemena, 1980).

La práctica del monocultivo y la contaminación por el uso indiscriminado de agroquímicos, han impactado el medio ambiente, reduciendo la biodiversidad (microorganismos) de los agroecosistemas, ocasionando la inestabilidad de los mismos, la cual se refleja, entre otros efectos nocivos, en una mayor incidencia y severidad de esta enfermedad en las plantas de tomate. Esto y los problemas de seguridad y salud pública inherentes a la fabricación y uso de agroquímicos han conducido a la búsqueda y establecimiento de alternativas ecológicas para el manejo de las enfermedades (Báez-Valdez et al., 2010).

Existen muy pocas investigaciones en cuanto a *Fusarium oxysporum* y su manejo en el cultivo de tomate. Vallejo (1999), enfatiza que el control de la marchitez es muy difícil, sobre todo cuando las condiciones ambientales son favorables al hongo, pues se disemina por medio del agua de superficie, implementos agrícolas, insectos, plántulas contaminadas, uso de semilla sin contaminación entre otros (Dixon & Tilston, 2010). Debido a que el hongo se establece como endófito en células y tejidos vasculares, se dificulta su control (Hossain et al., 2013), lo que sugiere un manejo integrado, que permita reducir la población del patógeno y obtener los rendimientos necesarios para tener un cultivo rentable. El uso de variedades resistentes reduce la incidencia de la enfermedad; sin embargo, la emergencia de nuevas razas del hongo y de nuevos biotipos dentro

de las razas, supera su resistencia, conllevando a la búsqueda de nuevas estrategias (Horinouchi et al., 2011).

La presión por prácticas sostenibles transversales a los organismos reguladores y el creciente problema de la resistencia a los plaguicidas, están obligando a hallar alternativas a los agroquímicos. El control biológico, se está utilizando en nichos específicos de la agricultura y puede ser efectivo, si se tiene una comprensión clara del agroecosistema y sus limitaciones; un ejemplo son las PGPR que tienen gran potencial, porque además de promover el crecimiento de las plantas, reducen la severidad de enfermedades e inducen mecanismos de resistencia (Antoun, 2013). La Fitoepidemiología, se ha convertido en una estrategia para el manejo sostenible de los agroecosistemas. Existe un grupo importante de hongos y bacterias que presentan efectos antagónicos con otros microorganismos y esta acción puede ser aprovechada como una forma de control biológico de patógenos vegetales (Fernández-Larrea, 2001), pues los métodos de control biológico, integrados a las prácticas culturales, podrían colaborar en la prevención y en la disminución de la incidencia y severidad del patógeno. En este aspecto, se presentan como métodos promisorios la biofumigación y aplicación de microorganismos utilizados para el control de fitopatógenos fúngicos como el hongo antagonista *Trichoderma* spp (Perniola et al., 2014), también bacterias del género *Bacillus* spp. (Martin & Travers, 1989; Meadows et al., 1992) debido a que tienen la facilidad de digerir la quitina, además de la producción de antibióticos como: bacitracina, polimixina, tirocidina, gramicidina y circulina, entre otros (Bernal et al., 2002).

5.8 Control biológico en la agricultura

En el desarrollo sostenible de la agricultura moderna, la utilización de microorganismos para el manejo de plagas y enfermedades constituye una alternativa viable para asegurar la producción de alimentos sanos (Funes-Aguilar & Monzote, 2006; López-Bucio et al., 2015; López-Mondéjar et al., 2011). La baja eficiencia de productos químicos para el control de enfermedades promueve la búsqueda de otras alternativas como el control biológico. Una respuesta positiva es la utilización de microorganismos antagónicos para proteger los cultivos de patógenos del suelo (Rosero, 2008).

En patología vegetal el control biológico se entiende como: “la destrucción o inhibición total o parcial de poblaciones del patógeno por otros microorganismos” (Ciampi & Silva, 1991).

La utilización de microorganismos saprófitos, especialmente seleccionados, pertenecientes a la microbiota de los suelos agrícolas para controlar patógenos vegetales representa una

importante herramienta de control biológico (Ciampi & Silva, 1991). Por ejemplo, muchos microbios asociados a plantas tienen actividades antagonistas contra *Fol* y se han utilizado como BCA (Agentes de Control Biológico), incluidos *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Lactobacilli* spp., *Rhizobia* spp., *Trichoderma* spp. y *Gliocladium* spp. (Larkin & Fravel, 1998; Nuzzo et al., 2020; Ousley et al., 1993). Las especies de BCA tienen diferentes mecanismos en la supresión de enfermedades, incluida la competencia por la nutrición y los nichos ecológicos, la producción de componentes antibióticos y la resistencia sistémica inducida de la planta (Kwak et al., 2018; Mendes et al., 2011). El uso de estos antagonistas se basa en su promoción (ocurriendo naturalmente) y en la introducción artificial de ellos, siendo este último el más utilizado en el control biológico (Wainwright, 1992).

Los microorganismos antagonistas ofrecen varios beneficios para los cultivos entre ellos se encuentran: que permiten mayor absorción de nutrientes (Behie et al., 2012; Behie & Bidochka, 2014; Igiehon & Babalola, 2018; Plett et al., 2014) mayor tolerancia al estrés biótico y abiótico (Schirawski & Perlin, 2018; Stringlis et al., 2018) e inducen sistemas de defensas en plantas (Beckers et al., 2009; Hermosa et al., 2012; Jayaraman et al., 2014; Malmierca et al., 2015).

5.9 Mecanismos de acción en interacciones antagónicas

Varios autores han puntualizado que en las interacciones antagónicas pueden estar involucrados diversos mecanismos de acción. Incluso pueden manifestarse de forma simultánea en un mismo aislado, no siendo excluyentes ninguno de ellos. Por tanto, el éxito en el control del patógeno dependerá de la eficacia de cada uno de los mecanismos de acción o de la combinación entre ellos y pueden ser directos e indirectos (Hoyos-Carvajal et al., 2008; López-Mondejar et al., 2010; Martínez et al., 2008). En el primer grupo se encuentran la antibiosis (Morton et al., 2004; Vinale et al., 2008), la competencia por espacio y nutrientes (Bélanger et al., 1995; Harman, 2000) y el micoparasitismo (Larralde-Corona et al., 2008; Woo & Lorito, 2007). Mientras, en el segundo grupo de mecanismos se encuentran la estimulación del crecimiento (Harman et al., 2004; Mathivanan et al., 2005; Parets, 2002) y la inducción de resistencia a estrés biótico y abiótico (Harman, 2006; Jayaraman et al., 2014; Schirawski & Perlin, 2018; Stringlis et al., 2018; Vinale et al., 2008). Se plantea que algunos de estos mecanismos actúan de forma indirecta sobre los patógenos, debido a que su acción consiste en elicitar los mecanismos de defensa fisiológicos y bioquímicos en la planta. La multiplicidad de

estos mecanismos en un aislado es una característica importante para su selección como agente de control biológico (Companioni et al., 2019).

Para que un antagonista susceptible se convierta en un eficaz agente de control biológico, debe ser capaz de producir inóculo abundante en cualquier condición climática. Además, debe ser genéticamente estable y poseer una alta especificidad sobre el hospedero al que se quiere controlar. También debe infectar y destruir eficazmente al patógeno en un amplio rango de condiciones ambientales y ser inocuo para el medio ambiente y animales. Como condición final tiene que tolerar la acción de otros antagonistas (Morales, 1997).

Agrios (1997), señala que los mecanismos usados por los microorganismos antagónicos que afectan a las poblaciones de patógenos no siempre son claros, pero en general se pueden mencionar:

- ◆ Parasitismo directo y muerte del patógeno.
- ◆ Competencia con el patógeno por el alimento.
- ◆ Efectos tóxicos directos sobre el patógeno por medio de sustancias antibióticas liberadas por el antagonista.
- ◆ Efectos tóxicos indirectos sobre el patógeno por sustancias volátiles, como el etileno, liberadas por la actividad metabólica del organismo antagonista.

Existen algunos factores que limitan el uso de controladores biológicos como la menor competitividad con respecto al control químico; el nivel sociocultural del agricultor; la dificultad de obtener resultados positivos que se repitan año tras año y en distintas localidades; el tener un efecto relativo en el control de enfermedades policíclicas y además por la variable estabilidad en cuanto a los resultados del control por efecto de las condiciones ambientales y edáficas sobre la adaptación del microorganismo controlador (Campbell, 1989).

Los hongos poseen características que los hacen potencialmente ideales como agentes biocontroladores. Muchos de ellos, como saprofitos antagonizan a patógenos de plantas, malezas e insectos, además son fácilmente cultivables, pudiendo ser producidos económicamente en grandes cantidades, para luego liberarlos principalmente como inóculo en forma de esporas o fragmentos miceliares al medio ambiente. Los inóculos del agente germinan o crecen para producir micelio activo, los cuales pueden parasitar o inhibir el patógeno objetivo sin dañar los otros organismos. Sobreviven relativamente por largos períodos de tiempo como cuerpos inactivos, para luego germinar, crecer y controlar la población objetivo (Wainwright, 1992). En este marco, una

alternativa a los productos químicos para el control de enfermedades es el uso de agentes biológicos entre los que se encuentran especies y cepas de *Trichoderma* (Pérez et al., 2013). Se conocen más de cien especies que funcionan como agentes biocontroladores de patógenos causales de enfermedades en especies vegetales de interés agrícola (Kubicek et al., 2008). Hongos *Trichoderma* spp han sido ampliamente utilizados como agentes de control biológico debido a su alta capacidad antagónica frente a otros organismos como invertebrados, bacterias y hongos (Verma et al., 2007).

5.10 Bioformulados comerciales

Los bioformulados fúngicos que se comercializan se formulan con el objetivo de transportar el mayor número posible de propágulos (esporas) viables, para el control de enfermedades fúngicas y bacterianas de plantas. Para ello, se debe lograr la estabilidad de las esporas las cuales deben permanecer viables durante mucho tiempo antes y después de su uso; con un tiempo mínimo de caducidad de 18 meses a 20°C (Deshpande, 1999). Sin embargo, el éxito en el uso y comercialización de estos biopreparados fúngicos está en lograr una correcta y óptima formulación lo cual implica asegurar su fácil aplicación, la concentración suficiente de inóculo y la viabilidad de las esporas (Fravel, 2005; Martínez et al., 2008; Montesinos et al., 2008). Además, se debe tener en cuenta durante este proceso la selección precisa de cepas a utilizar, así como del conocimiento previo de sus mecanismos de acción y contar con un estricto sistema de calidad para su producción (Martínez et al., 2013; Montesinos et al., 2008).

En estos formulados fúngicos, las especies más utilizadas son *Trichoderma viride* y *Trichoderma harzianum* (Verma et al., 2007) las cuales constituyen el ingrediente principal siendo efectivos contra un amplio grupo de hongos patógenos entre los que se encuentran *Phytophthora nicotianae*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium* spp., *Phytophthora aphanidermatum*, *Phytophthora parasitica*, *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia rolfsii*, entre otros (Stefanova, 2007). Estos efectos beneficiosos justifican el uso de los microorganismos antagonistas como alternativas reales a los fungicidas químicos. Por lo cual, su uso contribuye al desarrollo sostenible de la agricultura y a su vez permite responder a la demanda de alimentos orgánicos y protege el entorno ecológico (Karanasios et al., 2012; Stefanova, 1997, 2007; Stefanova et al., 1999; Vásquez, 2010).

Existen cuatro formas fundamentales de producción de biopreparados: cultivos bifásicos, fermentación en estado sólido, fermentación líquida estática y líquida agitada (Elósegui, 2006). Por lo general para la reproducción masiva de las cepas promisorias de *Trichoderma* spp. se

utilizan métodos bifásicos, líquido-líquido y líquido-sólido (Stefanova, 2003). La bifásica es la más rápida, porque se produce el inóculo por fermentación líquida; que luego se usa para fermentar el sustrato sólido (García & Durán, 2006); además está reportado que en medio líquido se producen sustancias promotoras del crecimiento de la planta como ácido indolacético, ácido giberélico, citoquininas y vitaminas (Lin et al., 2006).

Fermentación en estado sólido

La fermentación en estado sólido o en superficie, se lleva a cabo en medios de cultivos sólidos con presencia o ausencia de agua pues el sustrato debe contener la humedad suficiente para el desarrollo del microorganismo, ya que los niveles óptimos de humedad aumentan la difusión del microorganismo sobre el medio, donde se verá favorecido el crecimiento del microorganismo y la degradación del sustrato (Cruz, 2007; Ward, 1991). Este proceso fermentativo, se caracteriza principalmente por requerir bajos niveles económicos y a la vez obtener alta formación de biomasa y producto, lo cual se da por su bajo requerimiento de aplicación de aireación, control de temperatura y otros factores que son de carácter necesario en un proceso de fermentación líquida (Lecault et al., 2009; Pandey, 2003).

5.11 Taxonomía del género *Trichoderma* spp

La Taxonomía de este género es complicada pues aún en la actualidad se continúa profundizando en este aspecto. Villegas (2005), menciona que el género *Trichoderma* spp se ubica en la clase Hyphomycetes, orden Moniliales, familia: Moniliaceae. Su fase sexual (estado Teleomorfo) se encuentra ubicado en la clase Ascomycetes, serie Pyrenomycetes, orden Hypocreales, género *Hypocrea* (Druzhinina et al., 2006; Samuels et al., 2006; Villegas, 2005). Las especies del género *Trichoderma* son un grupo de derivados clonales de *Hypocrea* que han perdido la capacidad de completar un ciclo sexual (Kuhls et al., 1996). Se distinguen por su morfología alrededor de 30 especies del género *Trichoderma*; sin embargo, el uso de la biotecnología vegetal mediante la introducción de técnicas moleculares en micología evolutiva en los últimos años, han permitido revelar la existencia de más de 100 especies distintas (Druzhinina et al., 2006; Torres-De la Cruz et al., 2015).

El género *Trichoderma* fue descrito por primera vez por Peerson (1794), posteriormente, Rifai en 1969 lo revisó y propuso nueve especies agregadas: *Trichoderma piluliferum* Webster & Rifai, *Trichoderma polysporum* (Link ex Pers) Rifai, *Trichoderma hamatum* (Bon) Bain, *Trichoderma koningii* Rifai, *Trichoderma aureoviride* Rifai, *Trichoderma harzianum* Rifai,

Trichoderma longibrachiatum Rifai, *Trichoderma pseudokoningii* Rifai y *Trichoderma viride* Pers ex S. F Gray (Rifai, 1969). Estas especies se identificaron teniendo en cuenta diferencias morfológicas y fisiológicas; sin embargo, con la taxonomía establecida sobre caracteres morfológicos no se diferencian satisfactoriamente las especies en el género (Martínez et al., 2015).

En la actualidad, la taxonomía basada en caracteres morfológicos no permite una identificación adecuada de las especies del género. Es por ello que la introducción de técnicas moleculares tiene una función decisiva en la identificación y clasificación de las especies de *Trichoderma*. El uso de estas herramientas por Samuels et al. (1999) trajo como consecuencia la nueva caracterización de *Trichoderma viride* y la descripción de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg y, en 2010, de *Trichoderma asperelloides* Samuels como nueva especie (Samuels et al., 2010). Las técnicas moleculares mostraron su gran potencial en estudios a nivel inter específico y, combinadas con criterios morfológicos, condujeron a la reubicación de algunas especies (Lieckfeldt et al., 1999), la definición de otras nuevas (Samuels et al., 1999) y/o conectar fases anamorfos con su teleomorfo (Kuhls et al., 1996).

5.11.1 Clasificación taxonómica de *Trichoderma harzianum*

Caracterizados por tener ascos unitunicados en peritecios. Su estado anamorfo es *Trichoderma*, y su telomorfo es *Hypocrea*.

Las especies europeas de *Hypocrea* identificadas y agrupadas por Jaklitsch (2009) con ascosporas verdes se distribuyen entre varios clados. Estos son: Chlorospora, Spinulosa, Harzianum, Strictipilosa y Cerámica. La especie *H. lixii* teleomorfo de *T. harzianum*, en esta clasificación es ubicado dentro del clado Harzianum.

El clado Harzianum es filogenéticamente complejo e *H. lixii* es un agregado de especies en lugar de una especie bien definida. Chaverri & Samuels (2002) establecieron la relación teleomorfo/anamorfo de *H. lixii* y *T. harzianum* sensu stricto; Sin embargo Druzhinina et al. (2010) rechazaron la relación teleomorfo/anamorfo después de un análisis profundo que implicó numerosas cepas. Los anamorfos de los diferentes linajes *H. lixii* morfológicamente son difíciles de distinguir unos de otros, a partir de *T. harzianum* (ver clasificación taxonómica de la Tabla.3). Para ello, se necesitan más aislamientos del teleomorfos '*H. lixii*' en todo el mundo.

La ubicación de las especies en clados reconocidos por Chaverri et al. (2003); Degenkolb et al. (2006); Jaklitsch et al. (2008) se reafirma en el trabajo de investigación de Jaklitsch, (2009). Los nombres de los clados o las secciones se adoptan incluyendo el nuevo clado

Spinulosa que está integrado por tres nuevas especies europeas. La sección *Trichoderma* está integrada por 14 especies que se encuentran en Europa, como una entidad filogenética (Jaklitsch et al., 2006). Después de la exclusión de *T. aureoviride* y el grupo de *T. harzianum* (a veces considerados como miembros de esta sección) por Gams & Bissett (1998); esta sección está concebida como un grupo filogenéticamente homogéneo, con la inclusión de *H. voglmayrii*. El análisis del factor de elongación (*tef1*) es necesarios para definir completamente el clado (Jaklitsch et al., 2006; Samuels et al., 2006).

Tabla. 3

Clasificación taxonómica de Trichoderma harzianum. Adaptado de Schoch et al. (2020).

| | |
|-------------------|------------------------------|
| Dominio: | Eucariota |
| Reino: | Fungi |
| Phylum: | Ascomycota |
| Subphylum: | Pezizomycota |
| Clase: | Sordaromycetes |
| Subclase: | Hipocreomycetidae |
| Orden: | Hypocreales |
| Familia | Hypocreaceae |
| Género: | <i>Trichoderma</i> |
| Especie | <i>Trichoderma harzianum</i> |

5.11.2 Identificación molecular

La identificación de las especies del género *Trichoderma* resulta ambigua mediante la caracterización morfológica con el uso de claves tradicionales. Por estas razones se introdujeron técnicas moleculares que apoyaron y facilitaron la caracterización e identificación de las especies del género con mayor precisión (Druzhinina et al., 2006). No obstante, es posible que la ambigüedad en la identificación morfológica sea una de las causas por lo que existan secuencias en las bases de datos del GenBank que no se corresponden con las especies nominadas, lo que exige una revisión de las mismas. Dentro de las herramientas moleculares más usadas para la identificación se incluyen: cariotipos electroforéticos y la secuenciación de las regiones ITS1 e ITS2 del DNA ribosomal (DNAr) y del Factor de Elongación (Martínez et al., 2015).

Estas técnicas, además de resolver problemas taxonómicos, proporcionan marcadores específicos de cepas que permiten evaluar la estabilidad genética a través de diferentes

generaciones sucesivas de propagación y el monitoreo de la supervivencia y destino ambiental, después de su liberación en campo (Brimner & Boland, 2003; Punja & Utkhede, 2003).

5.11.3 Morfología, crecimiento y reproducción

Las colonias de los aislamientos de *Trichoderma* spp presentan rápido crecimiento. En 1969, Rifai señaló que poseen color blanco y se tornan verde oscuro con abundante esporulación. En general, en medio Papa Dextrosa Agar (PDA) este hongo no presenta micelio aéreo y su pigmentación puede variar desde verde oscuro hasta verde claro y, en ocasiones, tornarse amarillento. Algunos aislamientos tienen olor típico a coco (Harman, 2003; Rifai, 1969; Samuels, 1996). Durante su desarrollo y crecimiento producen hifas de 5-10 μm de ancho (Rodríguez, 2002) que conforman el micelio septado, con paredes compuestas por quitina y glucano (Martínez et al., 2015). Poseen conidióforos erectos o arrastrados, altamente ramificados, más o menos cónicos; al final del conidióforo las conidias se agrupan en forma de pelota (ver Anexo.5). Las conidias son de distinto tamaño y forma, pueden ser subglobosas u ovoides. Comúnmente forma clamidosporas intercaladas o raramente terminales, las cuales pueden ser azules a verdes (Cook & Kenneth, 1983).

Presentan conidióforos hialinos ramificados, fiálides simples o en grupos, conidios de 3 a 5 μm de diámetro. Posee la capacidad de producir clamidosporas en sustratos naturales. Estas estructuras toleran condiciones ambientales adversas y son de gran importancia para la supervivencia del género en el suelo bajo condiciones desfavorables (Harman, 2001). *Trichoderma* tiene cinco especies consideradas las de mayor aplicación en el desarrollo de la agricultura moderna sostenible como antagonistas: *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma pseudokoningii* y *Trichoderma viride* (Larone, 1995; Sutton et al., 1998). Estas especies se caracterizan por presentar un rápido crecimiento y una amplia capacidad de esporulación y adaptación a diversos tipos de suelos agrícolas (Companioni et al., 2019).

En el estadio temprano de *Trichoderma harzianum* (Rifai), el color del micelio es blanco y eventualmente desarrolla un color verde oscuro después de la esporulación. Las colonias de *T. harzianum* (Rifai), crecen y maduran rápidamente a los cinco días de incubación en medio de cultivo agar de papa-dextrosa (PDA) a 25°C. Las especies de este género generalmente prefieren un pH ácido de 4.5-5 y, además se desarrolla en áreas con un excesivo contenido de humedad y un estancamiento del bióxido de carbono en la atmósfera (Romero-Arenas et al., 2009).

El principal mecanismo de reproducción en *Trichoderma* spp. es mediante la producción de conidios (reproducción asexual). Estos se producen en respuesta a señales de estrés para permitir al hongo sobrevivir y dispersarse. La inducción de la conidiogénesis es afectada por las condiciones ambientales como disponibilidad de nutrientes, luz y pH bajo. Por ejemplo la máxima producción de conidios en *T. atroviride* es a pH 4,4 y en *T. harzianum* a pH 5,5 y en presencia de luz (Carreras-Villaseñor et al., 2012).

El ciclo de vida de *T. harzianum* (Rifai), inicia cuando el organismo crece y se ramifica como una hifa fúngica típica que mide de 5-10 μ de diámetro. La esporulación asexual ocurre cuando las esporas de 3-5 μ de diámetro son liberadas en un gran número. También se forman clamidosporas intercaladas, de forma individual, aunque a veces dos o más clamidosporas se pueden fusionar (Romero-Arenas et al., 2009).

5.11.4 Hábitat y requerimientos nutricionales

El hongo *Trichoderma* spp. se distribuye ampliamente en todas las latitudes ha sido reportado en diferentes ambientes, sustratos naturales y artificiales, lo cual demuestra su capacidad como oportunista y adaptabilidad a diferentes nichos ecológicos (Friedl & Druzhinina, 2012). Se puede encontrar desde suelos con abundante materia orgánica y alta densidad radicular como también asociado a la superficie de plantas y corteza de madera descompuesta (Harman, 1990).

5.11.5 Biocontrol de *Trichoderma* spp

Los hongos *Trichoderma* spp poseen buenas cualidades por su versatilidad, adaptabilidad y fácil manipulación, lo que ha permitido su utilización en el manejo de enfermedades causadas por patógenos fúngicos del suelo, como *Phytophthora* spp, *Rhizoctonia* spp, *Sclerotium* spp, *Pythium* spp y *Fusarium* spp, entre otros (Fernández-Larrea, 2001; Harman et al., 2004; Nawrocka & Małolepsza, 2013).

Los mecanismos de acción mediante los cuales los aislamientos de éste género enfrentan al patógeno, son fundamentalmente de tres tipos: competencia directa por el espacio o los nutrientes, fungistasis mediante producción de metabolitos secundarios de naturaleza volátil o no volátil y parasitismo directo de las especies sobre los hongos fitopatógenos (Elias et al., 1993; Ezziyyani et al., 2004).

La habilidad antifúngica de *Trichoderma* spp fue descubierta en 1930, y desde entonces se ha hecho un esfuerzo extensivo en su uso para el control de enfermedades de las plantas; sin embargo, su comercialización es reciente. Varios mecanismos de acción antagónica del hongo se

han demostrado durante años, lo que explica el control microbiano de fitopatógenos con su uso en antibiosis, lisis de células, micoparasitismo, competencia por espacio y nutrientes y persistencia en el medio ambiente (Ayer & Adams, 1981; Cook & Kenneth, 1983; Papavizas & Lumsden, 1980). Los primeros estudios a nivel mundial sobre producción de metabolitos tóxicos en hongos por *Trichoderma* spp datan de 1934, cuando Weindling, al hacer filtrados de cultivos de *T. lignorum*, aisló un metabolito orgánico en forma cristalina, muy tóxico aún a altas diluciones sobre *Rhizoctonia solani*. Este metabolito recibió el nombre común de Gliotoxin (Weindling, 1934; Weindling & Emerson, 1936). Posteriormente se publicó la producción de otros como Viridin por *T. viride* (Brian et al., 1946), soluble en cloroformo, y Trichodermin en *T. viride* y *T. polysporum* (Dennis & Webster, 1971). Recientemente se ha encontrado que cepas específicas del hongo pueden colonizar y penetrar los tejidos de las raíces de las plantas, e inician una serie de cambios morfológicos y bioquímicos, lo cual conlleva a la resistencia sistemática inducida de la planta (ISR). La capacidad de *T. harzianum* de promover el crecimiento fue verificada en experimentos de invernaderos y en sistemas hidropónicos, donde fue observado 30% de incrementos en la emergencia de la semilla, y estas plantas presentaron un incremento de 25% del área radicular, asimismo un incremento en las concentraciones de fósforo y hierro (Yedidia et al., 1999, 2001).

De acuerdo a Hjeljord & Tronsmo, (1998) los modos de acción de *Trichoderma* spp. que pueden ocurrir en una interacción con otro hongo son:

- **Antibiosis**, que involucra la producción de metabolitos secundarios (volátiles o difusibles) que inhiben el crecimiento del otro hongo pudiendo provocar la muerte del mismo.
- **Competencia**, donde *Trichoderma* spp. limita el acceso del otro hongo a un recurso compartido por ambos mediante la utilización de un amplio rango de sustratos, rápida velocidad de crecimiento, producción de enzimas y compuestos antibióticos.
- **Micoparasitismo**, en el cual se producen enzimas extracelulares para la lisis de la pared del hospedador (celulasas, quitinasas, glucanasas) y la interacción es específica.

5.11.6 Metabolitos secundarios

Trichoderma spp. se caracteriza por producir una gran diversidad de metabolitos secundarios. Estos son un grupo heterogéneo de compuestos naturales que participan en funciones básicas como competencia, simbiosis, transporte de metales, diferenciación y señalización. Debido a sus propiedades químicas y biológicas son utilizados en la industria médica, farmacéutica o con

fines agronómicos. La producción de metabolitos secundarios depende de la cepa (Vinale et al., 2008). Hasta el momento existen reportes de las estructuras de más de 100 compuestos (Reino et al., 2007; Sivasithamparam & Ghisalberti, 1998). Estos incluyen compuestos no polares de bajo peso molecular como pironas, terpenoides, esteroides y policétidos.

Los compuestos volátiles pertenecen a numerosas clases estructurales como mono y sesquiterpenos, alcoholes, cetonas, lactonas, ésteres o compuestos C8. Las condiciones de estrés influyen en la expresión de los metabolitos volátiles (Corallo, 2012), que actúan de forma antibiótica contra hongos patógenos de las plantas y pueden promover el crecimiento de las mismas, así como otorgarles resistencia sistémica. Estudios recientes reportan la eficacia de algunas especies del género *Trichoderma* como inductores de resistencia sistémica contra fitopatógenos (Chowdappa et al., 2013). A su vez ha sido demostrado que los metabolitos volátiles juegan un rol importante en el micoparasitismo. Algunos ejemplos son: el 6-pentilo-alfa-pirona que reduce la producción de la micotoxina DON por *Fusarium graminearum*, reduce el crecimiento del micelio de *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* y promueve crecimiento en plantas de tomate. Los compuestos C8 (ej. 3-octanona) inducen la conidiación en tanto los sesquiterpenos exhiben acción antimicrobiana y antiviral. Las especies *T. harzianum*, *T. atroviride* y *T. asperellum* son muy utilizadas como agentes protectores de plantas y como promotores de crecimiento (Stoppacher et al., 2010). Adicionalmente, está reportado que las celulasas producidas por este hongo son las más eficientes para la degradación de sustratos celulósicos en monómeros de glucosa (Esterbauer et al., 1991). Por lo que se considera a *Trichoderma* spp. como uno de los hongos más útiles en la producción de enzimas industriales, la agricultura y la biorremediación (Rey et al., 2004).

Romo & Ávila (2000) sustentan que *Trichoderma* spp. tiene propiedades antifúngicas y antibacteriales, gracias a que produce sustancias tales como: trichodermina, dermadina, sequisterpeno, suzukacillina, alameticina, trichotoxina y acetaldehído; adicionalmente están implicadas enzimas extracelulares como β -1,3 glucanasa, quitinasa y celulasa que degradan las paredes celulares del hospedante y posibilitan la introducción de las hifas del antagonista.

5.11.7 Estudios de la actividad antagónica de *Trichoderma* spp

Trichoderma spp tiene diferentes tipos de interacción hifal -como parasitismo-, la cual es potencialmente usada como biorregulador de otros hongos del suelo (Correa, 1997). Bernal et al. (2004) encontró enrollamiento y penetración de hifas de *Trichoderma* spp. en hifas

de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*; por su parte, Harman (2001) observó penetración en hifas de *Pythium* sp. y *Rhizoctonia solani*. Así también, Stefanova et al. (1999) informaron la presencia de metabolitos no volátiles con actividad antifúngica en cuatro aislamientos de *Trichoderma* sp. y concluyeron que reducen el crecimiento micelial de *Phytophthora nicotianae*. Por otra parte, Rivero (2008) evaluó *in vitro*, el efecto de antibiosis de dos aislados de *Trichoderma* spp. en cultivo dual con *Alternaria padwickii*, *Bipolaris oryzae*, *Curvularia lunata* y *Phoma* sp., y observó inhibición significativa del crecimiento radial de estos patógenos.

Existen informes de investigaciones donde *F. oxysporum* puede ser atacado por especies de *Trichoderma* y se ha observado parasitismo de aislamientos de este antagonista sobre *F. solani*. La competencia por nutrientes es un mecanismo empleado por *Trichoderma* para el control de *F. oxysporum* (Benítez et al., 2004). Un ejemplo de competencia por nutrientes es el notificado por Durman et al. (2003), quienes encontraron una disminución del crecimiento de *R. solani* y de la viabilidad de los esclerocios por la acción de diferentes aislamientos de este biocontrolador. Recientemente se ha descubierto que, además de estos mecanismos, este hongo tiene la capacidad de incrementar la tolerancia de plantas al estrés ya que promueve la proliferación de raíces, participa en la solubilización y asimilación de nutrientes inorgánicos, activa los mecanismos de resistencia de las plantas e inactiva las enzimas de los patógenos (Altomare et al., 1999; Harman, 2000). En este sentido Páez (2006), obtuvo que una cepa de *Trichoderma* sp, contribuyó al crecimiento de las raíces de maíz (*Zea mays* L.) y algunos pastos lo cual brindó a estos cultivos mayor resistencia a la sequía. En el cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) este mismo autor observó que aislamientos seleccionados de este género fúngico estimularon la germinación y la altura de plantas de frijol con una ganancia en peso de 60% aproximadamente. Por su parte, Mathivanan et al. (2005) lograron un incremento significativo del crecimiento y floración en plantas de arroz con aplicaciones de *T. viride*.

Así, en Cuba la reducción de la incidencia de varios hongos patógenos de plantas de los géneros *Phytophthora* sp, *Fusarium* sp, *Sclerotium* sp, *Rhizoctonia* sp y *Pythium* sp., que causaron problemas de importancia económica, se logró mediante el uso de biopreparados de cepas nativas de *Trichoderma* spp (Stefanova, 1995, 1997; Stefanova et al., 1995, 1999). Por todo lo anterior *Trichoderma* spp posee buenas cualidades para el control de enfermedades en plantas causadas por patógenos fúngicos del suelo. Las especies de este género son los antagonistas más utilizados para el control de enfermedades de plantas producidos por hongos, debido a su ubicuidad, a su

facilidad para ser aislados y cultivados, a su crecimiento rápido en un gran número de sustratos (Ezziyyani et al., 2004; Papavizas et al., 1982).

Dentro del manejo integrado de fitopatología es necesario tomar en cuenta que la aplicación de *Trichoderma* spp. es una estrategia a largo plazo y un mecanismo totalmente distinto al de los productos químicos que son compuestos inertes, ya que es necesario el establecimiento del microorganismo en el ecosistema así como su adaptación en el ambiente (Bale et al., 2008). Los mecanismos empleados por los agentes de control biológico, para controlar enfermedades de las plantas son muchos y complejos, y dependen del tipo de interacción hospedero-patógeno. Estos mecanismos pueden verse influenciados por el tipo de suelo, la temperatura, pH, humedad del ambiente y del suelo, así como por otros miembros de la microbiota (Howell, 2003).

5.11.8 Bioformulados de *Trichoderma* spp

Aunque las especies de *Trichoderma* han sido evaluadas durante más de 70 años como antagonistas de hongos fitopatógenos, sólo hasta inicios del siglo XXI se empezaron a comercializar como biocontroladores agrícolas. Las especies más comunes para este fin son *Trichoderma viride* y *Trichoderma harzianum* (Hermosa et al., 2000), que constituyen el ingrediente principal de los bioinsumos comercializados; siendo efectivos contra los hongos *P. nicotianae*, *R. solani*, *Pythium* spp., *P. aphanidermatum*, *P. parasítica*, *P. capsici*, *R. rolfsii*, entre otros (Stefanova, 2003). El tratamiento de las semillas es la forma más extensiva del uso de *Trichoderma* spp. porque asegura la protección inmediata de la plántula naciente (Stefanova, 1997).

Trichoderma spp. posee resistencia innata a la mayoría de los agroquímicos, incluyendo a los fungicidas. Sin embargo, el nivel de resistencia difiere entre cepas. Algunas líneas han sido seleccionadas o modificadas para ser resistentes a agroquímicos específicos (Harman, 2000).

La producción de biopreparados a partir de las esporas de este hongo contribuye al desarrollo sostenible de la agricultura y permite ofertar alimentos libres de fungicidas a los consumidores (Pineda-Insuasti et al., 2017). Alrededor del 90% de los fungicidas que se comercializan en el mercado para el biocontrol de agentes patógenos de plantas contienen como principio activo las esporas (conidios y clamidiosporas) de *Trichoderma* spp. (Ezziyyani et al., 2004; López-Mondejar et al., 2010; Martínez et al., 2013; Martínez & Pérez, 2015; Whipps & Lumsden, 2001; Woo et al., 2006). Desde el punto de vista de

Zambrano (2005) las marcas comerciales en el mercado varían desde polvos hidrosolubles, peletizados (formulados o biopreparados en arroz) a compuestos líquidos.

Es muy importante utilizar el organismo correctamente, como también tener en cuenta que cualquier organismo de biocontrol no podrá proteger las semillas de la misma forma que los fungicidas químicos. Pero, por otro lado, el biocontrolador coloniza raíces, aumentando su masa y vigor, proporcionando con ello aumentos en la producción de la planta, lo que un fungicida químico aplicado en dosis comercial no puede hacer (Lisboa-Minguzzi, 2003).

5.12 Protección de semillas con bioformulados comerciales (*T. harzianum*)

Las semillas constituyen para un gran número de cultivos el punto de partida que marca el futuro de la cosecha por lo que su sanidad es cuestión de primer orden. Las semillas infectadas son la vía principal de diseminación de hongos, virus y bacterias, los que pueden ocasionar pérdidas entre 40-60 % en los rendimientos y sobrevivir desde meses hasta más de 25 años en condiciones de almacenamiento (Castellanos et al., 1995).

Entre los principales hongos que las afectan se encuentran *Alternaria solani* (Ell.et Mart.), *Alternaria alternata* Nees, *Alternaria* spp., *Fusarium oxysporum* Schlecht, *Fusarium solani* (Mart), *Fusarium* spp., *Phoma* sp., *Rhizoctonia solani* Kühn, *Phytophthora* spp., *Pythium* spp. y especies de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Rhizopus*. Estos patógenos pueden localizarse en la parte exterior e interior de la semilla, produciendo diferentes síntomas como enanismo, exudaciones y bajo poder germinativo. En ocasiones, la semilla puede estar infectada y no presentar síntomas (Rodríguez et al., 2008).

Existen diferentes métodos para el control de patógenos en semillas y se conoce que la aplicación de *Trichoderma* sp. a las mismas, ocasiona la multiplicación del antagonista en el suelo y/o en la zona radical de la planta para inhibir al patógeno. La integración de estos métodos de aplicación juega un papel importante en el éxito del control biológico hacia los fitopatógenos (Papavizas, 1985).

Es conocida la ventaja que ofrece la protección a las semillas con los biopreparados. En tal sentido Bhargava (1995), en estudios realizados con el tratamiento a las semillas de col y el uso de la peletización y el antagonista *Trichoderma longibrachiatum*, aumentó la germinación de estas y su establecimiento, así como se redujo el crecimiento y transmisión del hongo patógeno *Alternaria brassisicola*. También Castellanos et al. (1995), en tratamiento realizado con la cepa A-34 a semillas de ají chay y tomate, obtuvieron gran efectividad en el control de hongos

patógenos, principalmente con el uso de la peletización; mientras que Sandoval et al. (1995) determinaron que el tiempo de tratamiento de *T. harzianum* a las semillas durante 10 min. y el secado al sol hasta tres días era óptimo para alcanzar una adecuada cobertura del biopreparado, con vistas al biocontrol de hongos parásitos. Harman (1996), señala que *Trichoderma harzianum* protege eficazmente a semillas con o sin tratamientos de fungicidas.

En Cuba, con el tratamiento de semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), pimiento (*Capsicum annuum* L.) y en tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) con *Trichoderma* spp se protege de forma efectiva a las plantas frente a *R. solani* sin necesidad de tratamiento al suelo previo a la siembra (Stefanova, 2007). Otro ejemplo se encuentra en el cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.) donde Mathivanan et al. (2005) emplearon el tratamiento combinado a semilla y suelo con la cepa de *T. viride* (NCC 34) unos 25 días previos al trasplante y lograron una reducción de la incidencia del tizón de la vaina. También, Meneses et al. (2008) proponen el tratamiento de semillas con *Trichoderma* sp de forma óptima para el control de *Sarocladium oryzae* mientras, Martínez et al. (2008), para el control de *Rhizoctonia* sp. demostraron que las aplicaciones a las plantas antes del trasplante y durante el primer estrés hídrico del cultivo se logra una eficacia técnica de más del 70% con dos cepas de *T. asperellum*, incluso se estimula el ahijamiento de las plantas. Otros autores, en semilleros de algodón (*Gossypium hirsutum* L.) obtuvieron cerca del 60% de reducción de la pudrición del cuello, causada por *R. solani*, cuando se aplicaron dos aislamientos de *T. asperellum* (Hoyos-Carvajal et al., 2008). De igual forma, en el cultivo de tomate Jiménez et al. (2011) realizaron aplicaciones de *T. harzianum* en la etapa de semillero, en el momento del trasplante y a los quince días después. Estos autores observaron efectos beneficiosos tanto en el crecimiento aéreo como en las raíces de las plántulas.

5.13 Biocebado de semillas

La demanda del mercado mundial de semillas recubiertas con tratamientos biológicos está en pleno apogeo (Markets and Markets, 2018). El biocebado protege a la semilla de patógenos transmitidos por el suelo mejorando la germinación, vigor y emergencia homogénea de las plántulas y el potencial de rendimiento (Meena et al., 2017; Shahrajabian et al., 2021). El biocebado de semillas está considerado una herramienta eficiente para la inoculación de diferentes cultivos, porque se aplica de forma precisa cantidades mínimas de inóculo (Accinelli et al., 2018a, 2018b; Oliveira et al. 2016; Rocha et al., 2019a, 2019c; Roupael et al. 2017).

La inoculación de semillas es implementada por transportadores que generalmente son aglutinantes o polímeros que incluye la metilcelulosa (Amutha, 2017; Lopisso et al., 2017) o goma arábica (Dawar et al., 2008; Ehteshamul-Haque et al., 2007; Kyei-Boahen et al., 2001) que se aplican durante o al final del recubrimiento disminuyendo la cantidad de producto en polvo utilizado (Pedrini et al., 2017) asegurando así la adhesividad del inóculo en la superficie de la semilla, su actividad de adherencia, evita la desecación y prolonga su vida (Jambhulkar et al., 2016). El biocebado facilita la colonización del agente microbiano en la zona radicular de la planta promoviendo el crecimiento vegetal (Raj et al., 2004; Sarkar et al., 2020). Pues se envía directamente el agente a la rizosfera del cultivo objetivo, donde se establece un contacto íntimo entre la planta y el microbio desde la germinación (Philipot et al., 2013). Los microorganismos PGPM asociados desarrollan mecanismos para proteger a las plantas ante estrés abiótico (Ajouri et al., 2004; Ibrahim, 2016; Marthandan et al., 2020; Rajendra-Prasad et al., 2016; Rhaman et al., 2020). Algunos estudios demuestran que aplicar biocebado mejora el rendimiento de los cultivos en condiciones climáticas extremas, mejora el ciclo de nutrientes, promueve la actividad enzimática y acumula estímulos en la rizosfera (Adhikary et al., 2021; Sarkar et al., 2021). En el aspecto bioquímico el biocebado facilita la interrupción de la latencia de semillas, cataliza diversas reacciones bioquímicas dentro de ella (Khan et al., 2008) produciendo un efecto directo en el número de mitocondrias, asegura la síntesis temprana de proteínas y ADN, división celular, síntesis de ácidos nucleicos; seguido de producción de ATP, esteroides, y fosfolípidos (Samota et al., 2017). Producción de fitohormonas ante factores abióticos como sequías, salinidad, temperaturas extremas, estrés oxidativo o metales pesados (Hamid et al., 2021). La semilla recibe estímulos que desemboca un conjunto de cambios intracelulares como la activación de enzimas, la síntesis de sustancias promotoras del crecimiento, el metabolismo de los inhibidores de la germinación y la reparación del daño celular (Chatterjee et al., 2018; Farooq et al., 2019).

El cebado de semillas con agentes de biocontrol es una estrategia viable, económica y respetuosa para mantener en equilibrio los ecosistemas y sistemas de producción sostenible de alimentos a través de la mejora en la fertilidad de los suelos, reducción de la contaminación y disminución de la incidencia de patógenos (Johnson & Puthur, 2021) esta técnica es útil para el biocontrol de patógenos en cultivos que reduce los costos de los pesticidas y aumenta la productividad de las plantas y resistencia al estrés (Fernando et al., 2020). Por otro lado la

inoculación de semillas es una forma rentable de administrar a gran escala microbios en campo (John et al., 2010; O'Callaghan, 2016).

La selección del tipo y la concentración adecuados de aglutinante y relleno es crucial para la germinación de semillas, el desarrollo de plantas y la viabilidad del inoculante microbiano aplicado. También se deben tener en cuenta otras características como la disponibilidad, el costo, el origen y los impactos ambientales al elegir los materiales de recubrimiento más adecuados (Rocha et al., 2019b). Los factores físicos, químicos y biológicos, como la naturaleza de los solutos y el contenido de agua, los cebadores, el tiempo, la temperatura, la existencia o no de luminosidad, la aireación y el estado de la semilla también controlan el éxito del cebado y deciden la tasa y el tiempo de germinación, el vigor de las plántulas y, finalmente, el crecimiento y desarrollo. La ósmosis controla la entrada de exceso de agua en la semilla durante la imbibición, reduciendo así la acumulación de ROS y protegiendo así a la célula del daño oxidativo (Devika et al., 2021).

La técnica del encapsulado con productos biodegradables permite que agentes de control biológico como *Trichoderma* sp, sean transportados por un recubrimiento en el tegumento de la semilla en cantidades suficientes y en medios de cultivos apropiados para su establecimiento en el suelo. El estudio de Caballero et al. (2016) demostró que el encapsulado de *Trichoderma* sp. en semillas con biopolímero a base de almidón mejoró los parámetros fisiológicos como: tamaño de plantas y rendimiento, así también una reducción en la incidencia de enfermedades por *Botrytis* sp., *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia* spp.

5.14 El género *Bacillus* spp

5.14.1 Descripción del Género

El filo Firmicutes lo constituyen importantes bacterias formadoras de endosporas, grampositivas con bajo contenido de G+C, conocidas como *Bacillus* y *Clostridium* (Tortora et al., 2007), dichos géneros pertenecen a la familia Bacillaceae, cuyos miembros comparten la capacidad de formar esporas, y son diferenciados por los requerimientos de oxígeno al ser *Clostridium* spp. un anaerobio estricto, mientras que *Bacillus* spp. son aerobios y anaerobios facultativos (Murray et al., 2006; Reyes & Lázaro, 2015).

El género fue creado por Cohn en 1872, con *Bacillus subtilis* como la especie tipo. Los miembros del género son bacterias que tienen forma de bastón aerobios o anaerobios facultativos y muestran una extraordinaria diversidad metabólica e incluyen especies termófilas, psicrófilas, alcalófilas y acidófilas (Bron et al., 1999).

5.14.2 Características de la colonia

A pesar que las especies de *Bacillus* tienen una amplia gama de morfologías coloniales, en medios rutinarios generalmente no son difíciles de reconocer: las colonias de *Bacillus cereus* y sus parientes son muy variables, pero se reconocen fácilmente por ser grandes (2-7 mm de diámetro) y varían en forma desde circular a irregular, con bordes enteros a ondulados, dentados o fimbriados; tienen texturas mate o granulares, pero las colonias lisas y húmedas no son infrecuentes (Vos et al., 2001).

MacFaddin (2004) detalla las siguientes características del género *Bacillus*:

- Catalasas variables, por lo común positivas; son pocas y raras las especies que son Gramnegativas, pero raras veces se observan en un laboratorio.
- Capsulas, sólo *B. anthracis*.
- Movilidad por lo común positiva excepto *B. anthracis* y *B. mycooides*; flagelos peritricos. La movilidad depende del medio de crecimiento.
- Reducción de los nitratos variable
- Oxidasa variable.
- O/F de la glucosa: F(fermentativos) u O (oxidativos) o ambos (F/O).
- Temperatura óptima de crecimiento: 35°C; excepción: *B. stearothermophilus* no crece a 35°C, crecimiento a 65°C. La cápsula de *B. anthracis* se destruye a 42-43°C, lo que convierte al microorganismo en avirulento.
- Especie tipo: *B. subtilis* subesp. *subtilis* ATTC 6051, CCM 2216, NCIB 3610.

5.14.3 Taxonomía

Bacillus spp es un género muy heterogéneo tanto filogenéticamente como fenotípicamente, de hecho, en la última década, nueve géneros nuevos se han separado de este taxón original (Ruíz-García, 2005). Este género perteneciente a la familia Bacillaceae, es extremadamente heterogéneo en su composición genética entre especies (porcentaje de Guanina + Citocinina de las diversas especies oscila desde 32 hasta 69), estudios del gen 16 rRNA y 23S confirman que el género *Bacillus* puede dividirse en muchos más. En 1991 Ash y sus colegas, usando análisis de secuencias de 16S rRNA de 51 especies, los clasificaron en cinco grupos filogenéticos (Goldman & Green 2009; Gómez 2013). La variabilidad metabólica es directamente proporcional a la diversidad genética, el contenido de G+C del DNA varía entre las diferentes especies

aproximadamente 33 a 67% moles, indicando que las 60-70 especies de *Bacillus* deben reasignarse a un número mayor de géneros más claramente definidos (Bron et al., 1999).

Bacillus spp puede estar relacionado con otros géneros bacterianos, ya que análisis del rRNA por secuenciación parcial de oligonucleótidos han indicado una relación estrecha entre estas bacterias y los géneros: *Planococcus*, *Spororsarcina*, *Staphylococcus*, y *Thermoactinomyces* revelando que *Bacillus* es un taxón bastante coherente equivalente en profundidad a las actinobacterias o al grupo de bacterias Vibrio entérico (Priest et al., 1988). Anteriormente los criterios de clasificación del género se basaron en la capacidad de esporular y el uso de características bioquímicas, morfológicas y fisiológicas; sin embargo, esto no revela información adecuada sobre las relaciones cladísticas entre las especies. Actualmente análisis de 16S rRNA han dado lugar a la reasignación de especies de *Bacillus* y pueden ser la base para la reasignación de especies a nuevos géneros (Bron et al., 1999).

5.14.4 Morfología celular

Las células de *Bacillus* tienen forma de bastón con extremos redondos, pero las del grupo *B. cereus* suelen ser cuadradas; las células pueden ocurrir individualmente, en pares o cadenas (que pueden ser de gran longitud), y como filamentos, con diámetros que oscilan entre 0.4 y 1.8 μm y las longitudes de 0.9 a 10.0 μm , pero las células de una cepa particular suelen tener un tamaño bastante regular, y las especies individuales tienen dimensiones dentro de límites bastante estrechos (Vos et al., 2001).

5.14.5 Flagelos

Los miembros del género *Bacillus* spp son móviles por medio de flagelos peritricos, que suelen ser pocos; aunque este carácter taxonómico no es útil a nivel de género, la ausencia o presencia de motilidad sigue estando indicada para la descripción de muchas especies y tiene algún valor en la identificación (Vos et al., 2001).

5.14.6 Nutrición y condiciones de crecimiento

Muchas de las especies de *Bacillus* crecerán óptimamente bajo condiciones de laboratorio en medios rutinarios tales como: agar nutritivo o agar tripticasa de soya, y la mayoría crecerá en agar sangre (Vos et al., 2001). Crecen bien en medios definidos, pero en condiciones naturales sobreviven gracias a que su metabolismo utiliza diversas fuentes de carbono produciendo enzimas extracelulares, como hidrolasas, que rompen polisacáridos complejos, ácidos nucleicos o ácidos

grasos; convirtiendo estos productos en unidades asimilables a la célula que les sirven como fuentes de carbono y donadores de electrones (Madigan et al., 2015).

5.14.7 Hábitat

Las bacterias del género *Bacillus* pueden aislarse de diversos ambientes naturales desde el suelo hasta el agua, pues son microorganismos de los más ampliamente adaptados en la naturaleza (Bron et al., 1999). Estas bacterias pueden prosperar en ambientes tan extremos como los lagos y su hábitat incluye suelo normal, agua, y aire (Vinod & More 2013), específicamente es posible encontrarlos en agua dulce y salada, materia vegetal en descomposición, desiertos y la Antártida. Igualmente *B. subtilis* se ha aislado en alimentos, incluidas las especias, cacao, legumbres, semillas, y pan (Layton et al., 2011). Se les puede encontrar distribuidos habitando suelos de todo tipo, desde ácido hasta neutral, alcalino, cálido, frío, y fértil hasta el desierto, las columnas de agua y los depósitos de fondo de las aguas dulces y marinas (Vos et al., 2001), el éxito de esta distribución es gracias a la longevidad de una estructura peculiar: la endospora (Carrión, 2014).

5.14.8 Fisiología y desarrollo celular

Esporulación

A la producción de esporas se le denomina esporulación y se trata de una diferenciación que está mediada por factores sigma transcripcionales, este proceso tarda aproximadamente ocho horas en completarse una vez que ha iniciado la división celular asimétrica y ha sido estudiado en *B. subtilis* como organismo modelo (Wan, 2013) Se han definido siete etapas morfológicas sucesivas de la esporulación de *B. subtilis*.

La esporulación representa en todo caso solo uno de los varios resultados posibles del crecimiento estacionario tardío, en el que células genéticamente idénticas pueden cambiar reversiblemente a diferentes estados fisiológicos o tipos de células para enfrentar y superar las condiciones ambientales adversas presentes y futuras (Zeigler & Perkins 2008).

Cuando la espora formada, se convierte a su forma vegetativa, las esporas se hinchan, aumentan de tamaño, incrementa su contenido en agua y se intensifican sus procesos metabólicos (Piatkin, 1968).

La activación, germinación y crecimiento son los tres pasos para que una espora latente se convierta en una célula vegetativa. En la morfosis de una célula madura a una espora madura están implicados al menos 239 genes que gracias a ellos, una célula en crecimiento puede dividirse en

un compartimiento de dos células en el que se ensamblan las estructuras macromoleculares que constituyen la espora (Zeigler & Perkins 2008).

5.14.9 Formación de endosporas y germinación

El desarrollo de la endospora se da exclusivamente cuando las condiciones ambientales se tornan desfavorables como resultado de un agotamiento de nutrientes. Una bacteria que forma endospora detiene su desarrollo y activa el proceso de esporulación llegando a formar una endospora por célula (López-Granados et al., 2005), una vez que las condiciones mejoran comienzan los procesos de activación, germinación y crecimiento, los cuales están regulados por interacciones proteína-proteína y proteína-DNA (Wan, 2013). Por lo tanto estas estructuras pueden permanecer latentes durante muchos años; sin embargo las esporas detectan cuando las condiciones ambientales se vuelven favorables para el crecimiento, posiblemente gracias a las enzimas presentes en su superficie, y se convierten en un ciclo celular vegetativo regular a través de la germinación (Potot, 2010).

Para que inicie la germinación las esporas activas deben colocarse en presencia de nutrientes específicos. A medida la espora germina se vuelve menos resistente, el paso final es el crecimiento que provoca una inflamación debido a la captación de agua y la síntesis de DNA, RNA y proteínas. Finalmente, la célula crece fuera de la espora rota y reanuda toda la función como una célula normal, hasta que las condiciones ambientales críticas vuelvan a generar el proceso de esporulación (Wan, 2013) .

5.14.10 Identificación y clasificación de especies de *Bacillus*

Para clasificar las especies dentro del género es importante tomar en cuenta la formación de endosporas, ya que la morfología de las esporas tradicionalmente ha recibido un peso considerable en la clasificación e identificación (Priest et al., 1988). Esta característica típica de formar endosporas, sirvieron para definir originalmente el género, pero no todas las especies están estrechamente relacionadas y muchas se han trasladado a otro género del filo Firmicutes (Torome, 2015) por lo que la hibridación cruzada de DNA-DNA, junto con la comparación del contenido del genoma %G+C, sigue siendo el "estándar de oro" en la definición de nuevas especies; además pruebas fenotípicas fisiológicas y morfológicas, junto con la comparación de la secuencia del gen 16S rRNA, proporcionan una base sólida para la taxonomía bacteriana (Zeigler & Perkins 2008). Es así que a nivel mundial en los diferentes laboratorios se aíslan cepas de este tipo de bacteria tomando en cuenta la capacidad de producir endosporas; aunque, también

se recurre a la identificación de cepas de *Bacillus* spp. por métodos moleculares, con el propósito de una mejor identificación y garantía de seguridad biológica (Milián et al., 2014).

5.14.11 Grupos de *Bacillus* spp

Recientemente el género *Bacillus* spp ha sido ampliamente modificado como consecuencia de la heterogeneidad filogenética y fenotípica entre las especies (Ivanova et al., 1999). El género fue descrito por Ferdinand Julius Cohn entre 1870 y 1880, mediante el análisis molecular de la secuencia del 16S rRNA ha sido subdividido en cuatro grupos: el primer grupo es *Bacillus* sensu stricto con especies como *Bacillus subtilis*, el segundo grupo *Bacillus* sensu lato que incluye principalmente *B. anthracis*, *B. thuringiensis* y *B. cereus*, (Corrales et al., 2017). En el tercer grupo hay diez representantes, dentro de los que se encuentra *B. polymyxa* y *B. macerans*, los cuales están reclasificados en un nuevo género, *Paenibacillus*. El grupo cuatro, lo forman especies reclasificadas en los géneros *Aneuribacillus* y *Brevibacillus*. Finalmente, se han descrito nuevas especies del género aisladas de diversos ecosistemas que incluyen a *B. mojavensis*, *B. vallismortis*, *B. ehimensis*, *B. chitinolyticus*, *B. infernus*, *B. carboniphilus* y *B. horti* (Tejera-Hernández, 2011).

5.14.12 *Bacillus subtilis* Cohn 1872

La especie más antigua de tipo nomenclatural es *Bacillus subtilis*, quien tiene forma de bastón de tamaño moderado aproximadamente 0.7 a 0.8 μm por 2.0 a 3.0 μm , con flagelos peritricos largos y motilidad fuerte. Puede crecer a temperaturas tan bajas como de 5 a 20°C y tan altas de 45 a 55°C y en salinidades tan altas como 7% de NaCl (peso/vol). Las endosporas generalmente son redondas pero moderadamente alargadas y están ubicadas en o cerca del final de la célula madre (Zeigler & Perkins 2008).

Las colonias son de forma redonda a irregular y de diámetro moderado (2-4 mm), con márgenes que varían de ondulados a fimbriados; el color es blanquecino y puede volverse cremoso o marrón; las texturas varían desde húmedas y butíricas o mucoides (ver Anexo.6). El crecimiento se produce entre pH 5,5 y 8,5, pero no se han registrado límites (Vos et al., 2001).

El crecimiento se produce en un medio mínimo con glucosa y una sal de amonio como únicas fuentes de carbono y nitrógeno. Catalasa positiva, oxidasa variable. La caseína, la esculina, la gelatina y el almidón se hidrolizan, la fenilalanina y la urea no se hidrolizan. La mayoría de las cepas utilizan el citrato como única fuente de carbono; no se utiliza propionato. El nitrato se reduce a nitrito. Voges – Proskauer positivo. Producen ácido sin gas a partir de la glucosa y de una amplia gama de otros carbohidratos (Vos et al., 2001).

5.14.13 Clasificación del género *Bacillus subtilis* Cohn 1872

El grupo *Bacillus subtilis* está clasificado "Considerado generalmente como seguro" (GRAS, por sus siglas en inglés) por la Administración de Drogas y Alimentos y aunque comparte un 72% de homología genotípica con el grupo de *Bacillus cereus*, los únicos casos de problemas infecciosos con *B. subtilis* se informaron en individuos inmunodeprimidos o después de un traumatismo (Aperce, 2008). El grupo tradicionalmente comprende cuatro especies: *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* y *B. subtilis*, pero recientemente mediante estudios ecológicos se han identificado algunos parientes muy cercanos: *B. atrophaeus*, *B. mojavensis* y *B. vallismortis* y han subdividido *B. subtilis* en subsp. *subtilis* y subsp. *spizizenii*. El grupo tradicional puede distinguirse fenotípicamente, pero *B. mojavensis*, *B. subtilis* y *B. vallismortis* son indistinguibles y solo pueden identificarse por medios moleculares (European Commission, 2000). La clasificación taxonómica actual de *Bacillus subtilis* aparece en la Tabla.4.

Tabla. 4

Clasificación taxonómica de Bacillus subtilis. Adaptado de CABI (2019) y Vos et al. (2001).

| | |
|--------------------|---|
| Dominio: | Bacteria |
| Filum XIII: | Firmicutes |
| Clase I. | "Bacilli" |
| Orden I. | Bacillales ^{AL(T)} |
| Familia I. | Bacillaceae ^{AL} |
| Género I. | <i>Bacillus</i> ^{AL(T)} |
| Especie: | <i>Bacillus subtilis</i> Cohn 1872, 174 ^{AL} . |

5.14.14 Capacidad antagonista de *Bacillus spp*

Las bacterias del género *Bacillus spp.* han demostrado tener un gran potencial como antagonistas debido a la cantidad de compuestos que sintetizan, como efectos de control sobre varias especies de organismos patógenos (Méndez-Úbeda et al., 2017). Producen una amplia cantidad de metabolitos secundarios en forma de antibióticos que les sirven para controlar patógenos, defender su hábitat y colonizar el medio (Shinde et al., 2015). Los antibióticos que sintetizan estas bacterias en las primeras etapas de esporulación son de los más impresionantes y diversos que se hayan caracterizado, incluyendo polimixina, Colistina, etc. (Das et al., 2014). Estas sustancias difieren en cuanto a su espectro de actividad y estructura, desempeñando funciones reguladoras en las poblaciones vecinas de microorganismos del suelo, agua y aguas residuales (Khusro et al., 2014).

Algunos de los antibióticos polipeptídicos utilizados en medicina son gramicidina, bacitracina, tirocidina y polimixina. Dentro del género las especies que han demostrado producir mayor cantidad de antibióticos son: *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. brevis*, *B. polymyxa*, *B. circulans* y *B. cereus* (Sharif et al., 2016). Por su parte Rafiq et al. (2018), clasifica los compuestos antimicrobianos polipeptídicos de importancia biotecnológica y farmacéutica que estas especies producen: *B. cereus* (Zwittermicina, Cerexina), *B. brevis* (Tirotricina, Gramicidina), *B. circulans* (Circulina), *B. licheniformis* (Bacitracina) *B. laterosporus* (Laterosporina), *B. polymyxa* (Colistina, Polymyxina), *B. subtilis* (Bacitracina, Polymyxina, Subtilina, Difficidina, Mycobacillina,) y *B. pumilus* (Pumulina).

Entre el espectro de acción de los metabolitos secundarios se menciona a la bacitracina producida por *B. licheniformis* asociada a antagonismo de microorganismos gram positivos como *Staphylococcus*, *Streptococo*, coco anaeróbico, *Corynebacterium* y *Clostridium* así también la Iturina sintetizada por *B. subtilis* y la gramicidina que es una mezcla de antimicóticos polipeptídicos secretada por *B. brevis*, y es que algunas especies del género *Bacillus* pueden dedicar hasta el 8% de su equipo genético en la producción de estos compuestos antimicrobianos (Gupta & Rana 2017). En lo que respecta al poder de acción de los antibióticos sintetizados por estas especies la surfactina posee poder bactericida, modificando la estructura hidrófoba bacteriana, mientras que otros antibióticos polipeptídicos pueden destruir bacterias al dañar la pared celular como la bacitracina o interferir en la función de la membrana celular, al destruir la barrera permeable, como las iturinas y surfactinas (Osman, 2008). Otro de los metabolitos producidos son las bacteriocinas, compuestos peptídicos que inhiben el crecimiento de especies que están o no relacionadas filogenéticamente. Las cepas productoras están autoprotegidas por proteínas de inmunidad específicas para sus propias bacteriocinas (Salcido, 2013).

Por ello estos antibióticos de proteína soluble que sintetizan y secretan en el medio de cultivo, son aprovechados comercialmente debido al bajo costo de producción y efectividad (Sharif et al., 2016). Actualmente muchas investigaciones se orientan a la producción industrial del género y a la búsqueda y análisis de compuestos antimicrobianos de alta calidad que puedan ser utilizados como agentes terapéuticos (Gupta & Rana 2017). Por lo que varios investigadores recomiendan seguir en esta incesante búsqueda con el objetivo de mantener controladas las poblaciones microbianas en el futuro (Kuta et al., 2009).

Bacillus es un género calificado como referente para el desarrollo de productos biológicos que aplicados en campo denotan actividad de control de enfermedades de origen fúngico (Collaguazo & Tenorio, 2018) numerosos estudios demuestran que estas bacterias poseen gran potencial como biocontroladoras de organismos patógenos (Castillo-Reyes et al., 2015; López & Pazos, 2005; Méndez Úbeda, 2018), como agentes de control biológico (Ariza & Sánchez, 2012; Osman, 2008) y en la disminución de las concentraciones de iones amonio, nitrito, nitrato y fosfato (Lalloo et al., 2007) actuando solos o en consorcios bacterianos (López-Granados et al. 2005; Gutiérrez 2016) por lo tanto este tipo de bacterias presenta un buen potencial por su capacidad para ejercer actividad antagónica ante el crecimiento de poblaciones patógenas (Ruiz-Sánchez et al., 2014). Tariq et al. (2016), mencionan que los caracteres bioquímicos y la riqueza de las enzimas celulares del género los hacen idóneos para hacer preparados de Microorganismos Eficientes (EM) para el mantenimiento apropiado de los ecosistemas.

Barsuto-Cadena et al. (2006), demostraron que *B. subtilis* inhibía *in vitro* a *F. verticillioides*, obtenido en el cultivo de la fresa. Virgen et al. (1990), obtuvieron una reducción en la incidencia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* en plantas de sandía, mediante el tratamiento de la semilla con *B. subtilis*. Podile & Prakash (1996), demostraron que la aplicación de esta bacteria a las semillas de cacahuete produce una reducción en la incidencia de la podredumbre de la corona en un suelo infestado de *A. niger*. Lazzaretti et al. (1994), aseguraron que el efecto benéfico de *B. subtilis* no se debe exclusivamente al antagonismo proporcionado a los patógenos, sino que influye positivamente en la germinación, desarrollo y rendimiento del cultivo debido a la producción de sustancias promotoras del crecimiento y al mejoramiento de la nutrición de las plantas. También se obtuvieron aislados de *Bacillus subtilis* de semilla de cebolla que inhibían el crecimiento fúngico *in vitro* y que podían resultar de interés para el tratamiento contra hongos de la semilla (Hernández et al., 2012).

5.15 Métodos de conservación

Los cambios degenerativos normales que se producen a nivel celular y que conducen al envejecimiento y degeneración de las cepas, en la medida de lo posible se evitan al preservarlas adecuadamente con algún método de conservación (Ángel, 2006). Para que la pureza del cultivo permanezca intacta y así evitar generaciones sucesivas manteniendo la estabilidad genética y viabilidad, el método de conservación aplicado debe tener un mínimo o nulo porcentaje de contaminación (Hernández & Loaiza, 2014).

Existen varios métodos de conservación de microorganismos, los cuales pueden clasificarse de acuerdo al tiempo de conservación, en largo, mediano o corto plazo (Parra et al., 2006; Pinzón et al., 2009). Para la conservación a largo plazo existen métodos como la criopreservación y liofilización, los cuales detienen el crecimiento de células sin causar pérdida de viabilidad, limitan la aparición de generaciones sucesivas y la actividad celular durante años (Pinzón et al., 2009; Trappe et al., 2009).

Criopreservación

Los microorganismos pueden ser preservados de -5 a -20 °C durante uno o dos años por congelación en cultivo en caldo o en suspensiones celulares en viales. Para los procesos de profunda congelación requieren crioprotectores como el glicerol o dimetil sulfoxido (DMSO), cuando son almacenados a -70°C o en nitrógeno líquido de -156 a -196°C. Alternativamente, se puede preparar una suspensión de glicerol al 10% v/v de crecimiento del microorganismo desde cajas de Petri. En este caso la suspensión es pipeteada a viales criogénicos o ampollitas, se congela y se almacenan (Ángel, 2006).

Métodos a mediano plazo

Requieren la cepa activa, este método puede estar acompañado de compuestos crioprotectores, como el glicerol, que recubre las células e impide la lisis o cambios osmóticos debido a la disminución de la temperatura en la suspensión (Borman et al., 2006; Fernández et al., 2012).

Métodos a corto plazo

Son métodos que ayudan al mantenimiento de las cepas, generalmente para el uso frecuente donde se requiere la cepa activa (García & Uruburu, 2000). Consisten en resembrar los microorganismos cada cierto tiempo en un medio de cultivo adecuado, este método tiene la limitante de incrementar el riesgo de contaminación, o de permitir el crecimiento del microorganismo, que puede cambiar espontáneamente sus características (Parra et al., 2006).

Dentro de ellos, se incluyen los subcultivos o el cultivo seriado, preservación en aceite mineral o agua destilada estéril y otro grupo de métodos de preservación denominados métodos restringidos, basados en la paralización del crecimiento mediante la eliminación del agua disponible de la célula (García et al., 1991). Entre ellos se destacan la conservación en suelo y la desecación haciendo uso de papel filtro, sal gorda y bolitas de alginato (Acosta-Ovallos, 2019).

5.16 Análisis estadístico

5.16.1 Diseño Completamente al Azar (DCA)

Cuando los tratamientos se ensayan en condiciones homogéneas del material experimental, es decir, las unidades experimentales (UE) son homogéneas (tienen en principio igual capacidad de respuesta), y cuando solo se tiene como factor de clasificación los tratamientos y la asignación de estos a las UE, se hace en forma aleatoria (aleatorización irrestricta), entonces el modelo caracteriza el Diseño completamente aleatorizado (DCA). Además, cada UE tiene igual probabilidad de asignación a cualquiera de los conjuntos de tratamientos (Melo et al., 2020).

Un diseño completamente al azar (DCA) es usado para establecer tratamientos ubicados espacialmente al azar. En cualquier ensayo de investigación es probable la presencia de una fuente de variación que puede alterar los resultados, al conocer esta fuente se la puede controlar y así minimizar el error experimental (Martínez & Meza, 2003).

5.16.2 ANOVA

El análisis de varianza (ANOVA) es un método estadístico afín con la comparación de medias de varias muestras. Tiene como fin examinar las diferencias significativas existentes en las medias de las clases (Ostertagová & Ostertag, 2013).

Un análisis de varianza se caracteriza por su dirección hacia un conjunto específico de pruebas estadísticas a través de diferentes condiciones, que se encuentran enfocadas en probar los efectos principales de cada factor y las interacciones entre los mismos (Henson, 2015).

6 HIPÓTESIS

Hipótesis nula (H0):

- *Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum* a diferentes concentraciones y con biopolímeros (almidón y goma arábiga) presentan igual efectividad *in vitro* sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* var. CENTA CUSCATLÁN).
- *Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum* a diferentes concentraciones y con biopolímeros presentan igual efectividad *in vivo* sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. en semillas de tomate.

Hipótesis alterna (H1):

- Existe diferencia significativa en la efectividad *in vitro* de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum* a diferentes concentraciones y con biopolímeros, sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en semillas de tomate.
- Existe diferencia significativa en la efectividad *in vivo* de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum* a diferentes concentraciones y con biopolímeros, sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en semillas de tomate.

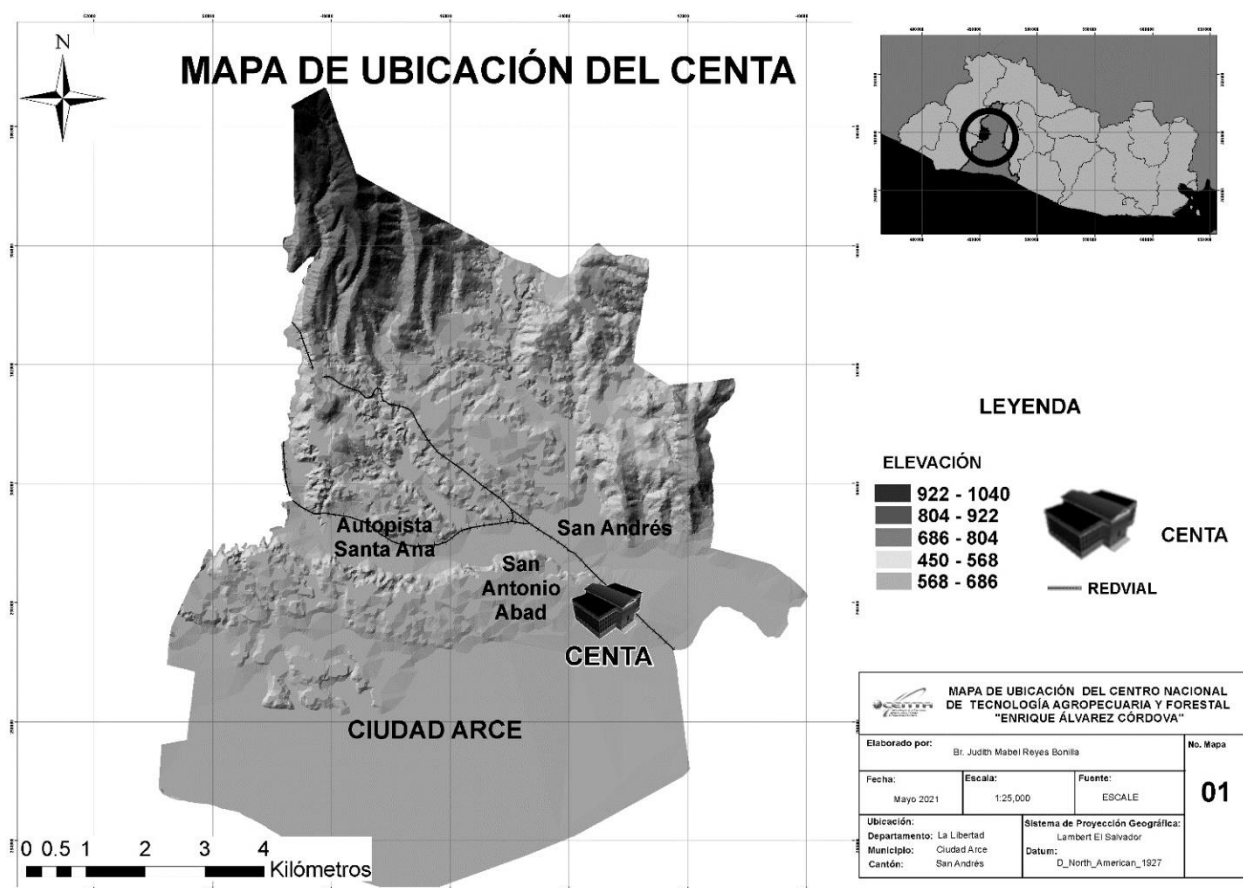
7 METODOLOGÍA

Ubicación geográfica del área de estudio

Esta investigación se desarrolló en el Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal “Enrique Álvarez Córdova” (CENTA), ubicado en Km 33 1/2, carretera hacia Santa Ana, Cantón San Andrés, Municipio de Ciudad Arce, departamento de la Libertad, El Salvador, Centro América con coordenadas geográficas de 3°48’09.75’’N y 89°24’02.64’’O, este lugar presenta temperatura anual promedio máxima de 32.5 °C, y mínima de 18.7 °C (MARN, 2022) y una elevación de 470 msnm (Fig.3). La fase de laboratorio se realizó dentro del Laboratorio de Parasitología Vegetal; que es la unidad especialista en diagnóstico e identificación de plagas y enfermedades de los diferentes cultivos, que tiene como objetivo apoyar a la generación y transferencia de tecnología agropecuaria y forestal (CENTA, 2018). La fase de campo fue desarrollada en un invernadero, ubicado dentro de las instalaciones de la institución.

Figura. 3

Mapa que muestra la ubicación del CENTA.



7.1 FASE DE LABORATORIO

7.1.1 Preparación de los medios de cultivo

Medio de cultivo agar nutriente

Medio de cultivo nutritivo no selectivo, en el cual la pluripeptona y el extracto de carne constituyen la fuente de carbono, nitrógeno y aporta nutrientes para el desarrollo bacteriano (ver Anexo.7). El agregado de cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el agar es el agente solidificante (Britania Laboratorios, 2015).

Medio de cultivo Papa dextrosa

Este medio de cultivo cumple con las recomendaciones de la American Public Health Association for food y la United States Pharmacopeia (Vanderzant & Splittstoesser, 1992). La infusión de carbohidratos y papa promueve el crecimiento de levaduras y mohos, mientras que el valor de pH bajo inhibe parcialmente el crecimiento de la microbiota bacteriana acompañante (ver Anexo.8). Los hongos crecen en este medio para desarrollar una morfología típica (Beever & Bollard, 1970; MERCK, 2017).

Durante la ejecución de los experimentos se utilizó el medio Papa Dextrosa Agar (PDA) marca HIMEDIA para el crecimiento de los hongos, mientras que agar nutriente para el desarrollo de la bacteria. Para la preparación se siguieron las indicaciones del proveedor, así también las recomendaciones de Romero-Arenas et al. (2017) y los manuales de Sánchez (2004) y Guerrero (2016).

Antes de efectuar cada uno de los procedimientos experimentales, se desinfectó el área de trabajo con alcohol etílico 70° y papel toalla descartable, practicando principios y medidas de bioseguridad como uso de mascarilla, redecilla, bata de laboratorio, zapato cerrado, evitando derrames tóxicos y contaminación microbiológica, tal como está detallado en el manual de Guerrero (2016).

7.1.2 Aislamiento e identificación de *Fusarium* spp

Los aislamientos fueron obtenidos de plantas de tomate variedad CENTA CUSCATLÁN afectadas, que presentaban síntomas característicos por *Fusarium* sp. como marchitez, amarillamiento y pudrición radicular, provenientes de muestras de las parcelas San Andrés I y Zapotitán, departamento de La Libertad (ver Anexo.9). Secciones a nivel de raíz y tallo se cortaron para ver la existencia de síntomas de marchitez y decoloración vascular del tejido y luego seleccionar aquellas zonas donde se evidenció manchas marrones o parduzcas típicas de fusariosis

(Carrillo-Fasio et al., 2003). Utilizando una pinza anatómica y bisturí se hicieron cortes de 1 cm² de la zona necrosada del tallo o raíz de la planta (French & Hebert, 1980), que luego se desinfectaron 1 min. en alcohol etílico (96°) y en hipoclorito de sodio al 3% durante otro 1 min., posteriormente se lavaron 3 veces con Agua Destilada Estéril (ADE) y se secaron en papel filtro estéril para absorber los restos de agua presentes en las muestras en condiciones de asepsia dentro de una cámara de flujo laminar (Cardona-Piedrahita & Castaño-Zapata, 2019; Reyes-Zambrano et al., 2020; Rojas, 2011). Tiempo después se sembraron de forma equidistante en cajas Petri de vidrio de 9 cm de diámetro conteniendo medio de cultivo PDA con 2 repeticiones e incubaron a temperatura ambiente. Se realizaron observaciones periódicas hasta la aparición de colonias desarrolladas al final de 7 días con crecimiento micelial algodonoso blanquecino (Robles et al., 2017), las cuales fueron identificadas a partir de la caracterización morfológica de sus estructuras de reproducción asexual hasta género siguiendo las claves taxonómicas descritas por Barnett & Hunter (1998); Burgess & Trimboli (1986); Finch & Finch (1971) con bases en la coloración de colonias y comparación morfológica de las conidias, macroconidias, clamidosporas y esporodocios, según Leslie & Summerell (2006).

Las cepas de las diferentes muestras se identificaron con el código FM1, FM2 y FM3 por sus siglas en español (*Fusarium* Muestra 1, 2 y 3).

7.1.3 Cultivos puros de *Fusarium* spp

De acuerdo a Covacevich & Consolo (2014) se deben obtener cultivos puros generados a partir de una sola espora. Un cultivo puro es aquel en que está presente únicamente el hongo de interés sin ningún tipo de contaminante (Gómez et al., 2014).

Después del tiempo de incubación se observaron las características culturales macroscópicas del micelio con aspecto algodonoso blanquecino y tipo de pigmentación difusible rosa o violeta características del género *Fusarium*. Se examinó la morfología con el microscopio compuesto de campo claro, extrayendo una porción del micelio con aguja de disección y realizando un frotis fresco en un portaobjetos, tiñendo con azul de metileno, para luego seleccionar aquellas colonias que presentaron características propias de las estructuras asexuales de *Fusarium oxysporum* (Hernández-Amasifuen et al., 2019; Pérez & García, 2019). El hongo se purificó con la técnica de cultivos monospóricos, mediante repiques, transfiriendo pequeños trozos de micelio a cajas con nuevo PDA para su desarrollo en condiciones asépticas (Dickinson & Lucas, 1987; Santiago et al., 2017). Las cajas fueron selladas con papel parafilm con su respectiva identificación

e incubadas a temperatura ambiente durante 7 días, bajo condiciones de luz continua (Cárdenas, 2010; Robles et al., 2017; Samaniego-Fernández et al., 2018).

7.1.4 Prueba de patogenicidad

Semillas de tomate var. CENTA CUSCATLÁN se sembraron en bandejas de poliestireno de 200 celdas conteniendo sustrato esterilizado en autoclave a 121°C, 15 psi por 30 min. Cuando las plántulas alcanzaron una edad de 15-20 días se determinó la patogenicidad de las cepas de *Fusarium spp.* anteriormente aisladas de las muestras de plantas de tomate que presentaban fusariosis. Mediante las pruebas de patogenicidad y los postulados de Koch (ver Anexos.10 y 11), se evidenció la capacidad infectiva de estos hongos., al ser inoculados en plántulas sanas de tomate a partir de varios cultivos axénicos de 7 días de crecimiento (Córdova, 2003; Retana et al., 2018).

Para determinar un método de inoculación eficaz se compararon los métodos adaptados de las investigaciones de Carmona (2019) e Inami et al. (2012) que comprenden:

- A. Inmersión de puntas de raíz,
- B. Aplicación de una suspensión al suelo y
- C. Combinación de A y B (inmersión de puntas de raíz e inoculación directa en el suelo).

Para el método de inmersión de puntas de raíz, a los 15 días de germinación, las plántulas se extrajeron con cuidado de los alvéolos de la bandeja y se eliminó con agua de grifo el suelo adherido a ellas (Inami et al., 2012; Williams, 1981), teniendo cuidado para mantener íntegras las raíces, a las cuales se hicieron pequeñas heridas cortando con tijeras aproximadamente dos centímetros del ápice radicular (Ascencio-Álvarez et al., 2008), en seguida, se sumergieron durante 15 min. en una suspensión de conidios a una concentración de 10^5 con/ml⁻¹ de *Fusarium spp.* cepas FM1, FM2 y FM3, la concentración de cada una se determinó mediante conteos con cámara de Neubauer ajustando a los volúmenes y concentraciones requeridos, con la fórmula sugerida en Peña & Páez (2014): $C1V1 = C2V2$ (ver Anexo.12). Posterior a la inoculación las plántulas se trasplantaron en vasos de poliestireno marca Dipsa, con tierra esterilizada.

En la aplicación de la suspensión directa al suelo, las plántulas se extrajeron de las bandejas y se sembraron directamente en el suelo contenido en vasos desechables de poliestireno, luego se aplicó con jeringa 1 ml de la suspensión del patógeno a la misma concentración anteriormente descrita, inoculando cerca de las raíces. En el método de inoculación C, se combinaron ambos métodos anteriores; es decir inmersión de puntas de raíz e inoculación del suelo con la suspensión del patógeno a la misma concentración. Las plantas control se inocularon solo con ADE (Carrillo-

Fasio et al., 2003). Los tratamientos se distribuyeron completamente al azar manteniendo bajo protección contra los insectos con una malla a temperatura ambiente promedio de 27° a 30°C, se fertilizaron a los 15 días con una solución de 1g/L⁻¹, 30-15-30 (NPK) y regaron cada tercer día con agua de chorro. En este ensayo se utilizaron 3 réplicas de plantas por cada tratamiento y 15 en total.

La evaluación de la respuesta a la prueba de patogenicidad se realizó con base a la presencia o ausencia de síntomas de la enfermedad (ver Anexo.13), considerados estos como: amarillamiento foliar, marchitez, coloración amarillenta o café de los haces vasculares y coloración café en la raíz (Hernández et al., 2014). La respuesta de las plantas de tomate a la inoculación del patógeno se determinó en función de la escala del 1 al 5 de Marlatt et al. (1996) modificada por (Gayosso et al., 2021), para estimar la severidad de la enfermedad, donde cada número corresponde a:

1. Planta libre de síntomas,
2. Planta con clorosis leve en las hojas inferiores,
3. Clorosis moderada,
4. Clorosis severa y
5. Planta muerta.

7.1.5 Conservación de las cepas de *Fusarium* spp

Para evitar el envejecimiento de las cepas y asegurar la estabilidad de las propiedades morfológicas y fisiológicas es necesario preservarlas adecuadamente y retardar los cambios degenerativos que ocurren en las células (Covacevich & Consolo, 2014).

7.1.5.1 Conservación en Agua Destilada

A cepas de *Fusarium* spp. con 7 días de desarrollo en placas, se adicionaron 10 ml de ADTE. Con un asa estéril se desprendieron los conidios; la suspensión resultante se filtró con gaza y se vació en un Erlenmeyer, luego se introdujo 5 ml en tubos de ensayo estériles para luego homogenizar en vórtex, obteniendo una suspensión de 10⁸ esp/ml⁻¹ mediante conteo en cámara de Neubauer. Seguidamente se dispensó 1.8 ml en tubos eppendorf los cuales se rotularon por lotes, con una viñeta que contenía: código del hongo, fecha, tipo de medio, número de cepa y se conservaron a 4°C en una refrigeradora General Electric (Acosta-Ovallos, 2019; Ángel, 2006).

7.1.5.2 Conservación en Glicerol

Ya que el glicerol viene a una concentración del 100% (v/v) entonces se diluyó hasta una concentración final del 10% (v/v), se esterilizó a 121°C por 15 min. a 15 libras de presión por pulgada cuadrada (psi). Éste crioconservante se utiliza en un rango de 10 al 20% (v/v) ya que si supera esta concentración llega a ser tóxica para el microorganismo (Camero & Linares, 2013; Ocares & Castro, 2020). A tubos de ensayo con tapa roscas estériles, se le introdujo 5 ml del glicerol al 10% y posteriormente, se transfirió el microorganismo a preservar; con un asa esterilizada en llama se cortaron bloques de 1 cm² del hongo esporulado y se inoculó cada tubo. Las cepas se rotularon con viñeta de identificación y mantuvieron a 4°C (Stocco, 2014).

7.1.5.3 Conservación en tubos con pico de flauta

Se transfirió 1cm² del hongo esporulado a tubos con PDA inclinado los cuales se recubrieron con glicerol al 10%. Luego se guardaron en refrigeración a temperatura de 4°C, asegurando de esta forma una conservación hasta por un año (Gómez et al., 2014). Otros tubos con agar inclinado se inocularon con 1.8 ml de la suspensión de *Fusarium* spp y se recubrieron con glicerol al 10% (Caicedo & Chacón, 2017).

7.1.5.4 Conservación en papel filtro

En este método se cortaron con perforador, discos de papel filtro Whatman N°1 absorbente que se esterilizó en autoclave y después se impregnó con una suspensión de 10⁸ esp/ml⁻¹, se secó al aire en la cámara de flujo laminar y una vez secos los discos se colocaron en tubos Eppendorf estériles y guardaron a 4°C dentro de una refrigeradora (Acosta-Ovallos, 2019; Sosa et al., 2011).

7.1.6 Reproducción y conservación de *Fusarium* spp

Preparación del sustrato

El sustrato utilizado fue arroz blanco, el cual se lavó varias veces hasta que el agua salió transparente descartando el líquido con un colador, una vez limpio se introdujo en frascos de vidrio y Erlenmeyer estériles ocupando 1/3 de su capacidad volumétrica (Michael-Aceves et al., 2005), en seguida se sellaron con torundas de gaza y algodón para luego esterilizar en autoclave a 121°C, 15 psi por 15 min. (Troya & Vaca-Granda, 2014).

Siembra por parche

De las placas con crecimiento de *Fusarium* sp. cepas FM1, FM2 y FM3, se cortó con un bisturí (previamente flameado y enfriado) un cuadrado de 1 cm del medio de cultivo con la cepa esporulada y se inoculó cada una por separado en el arroz dentro de cada uno de los botes, teniendo

cuidado de flamear la boca del frasco al abrir y cerrar, agitando el recipiente para que fuera distribuido el inóculo homogéneamente por todo el sustrato (Michael-Aceves et al., 2005; Sandoval & Belesansky, 2020).

Siembra por lavado

Al tubo con agar inclinado que contenía el cultivo se le introdujo 10 ml de ADE y Tween 20 al 0.1% y con un asa estéril se removió con cuidado el micelio para obtener las esporas, paso siguiente se filtró con gaza estéril, de esta solución obtenida se tomaron 2 ml para inocular las matrices de arroz (Fernández-Larrea, 1997; Pineda-Insuasti et al., 2017).

Almacenamiento

Los frascos inoculados con el hongo se almacenaron en un cuarto protegido de la luz solar, hasta la producción de esporas. Para impedir la formación de grumos y facilitar la colonización del sustrato, se agitaron los frascos cada dos días verificando también la diseminación a través del desarrollo de coloración del hongo, con la consecuente producción de micelio sobre los granos (Sandoval & Belesansky, 2020). Eliminando aquellos recipientes donde el sustrato presentó contaminación (Gómez et al., 2014).

Secado

Este proceso se realiza para que los conidios y clamidosporas permanezcan viables durante el almacenamiento (Sivila & Álvarez, 2013).

En bandejas desinfectadas con hipoclorito de sodio al 3% y alcohol 70° se colocó papel Kraft y dispensó el sustrato contenido en los frascos, con el fin de reducir la humedad hasta el 15%, para favorecer la colonización y esporulación del hongo dejando en incubación hasta que estuviera completamente colonizado en un lugar con buena ventilación, finalmente el bioproducto seco y colonizado se cosechó.

Cosecha de conidias

Consistió en separar las conidias del hongo y recolectarlas para su formulación posterior (ver Anexo.14). La conidias fueron cosechadas manualmente mediante frotación con un tamiz de 600 µm marca Fisher Scientific (Gómez et al., 2014).

Determinación de la concentración

Se determinó la concentración de esporas por conteo directo en cámara de Neubauer haciendo diluciones logarítmicas, tomando 1 gramo de sustrato colonizado más 9 ml de ADE dentro de un tubo de ensayo, posteriormente se homogenizó en vórtex luego se diluyó hasta obtener

una dilución 10^{-6} (Vásquez, 2010), en seguida fue realizado el conteo de esporas en los retículos de la cámara de Neubauer con microscopio de campo claro (Sandoval & Belesansky, 2020).

7.1.7 Identificación genética de *Fusarium* spp

Placas Petri con cultivos puros de los hongos FM1, FM2 y FM3 de 7 días de crecimiento, se enviaron a identificar al Laboratorio de Biología Molecular “CENEM” propiedad de la empresa MICSA. Por otro lado tubos eppendorf con discos de agar, y papel filtro inoculados con las cepas; se enviaron a la Universidad de Florida, para la extracción del DNA, amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para así obtener la secuencia completa con los cebadores correspondientes e identificación con una base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI), utilizando el programa BLAST para una confirmación exacta de la especie *Fusarium oxysporum* que fue el patógeno de interés en este estudio (ver Anexos.15, 16 y 17).

7.1.8 Aplicación de los bioformulados (*B. subtilis* y *T. harzianum*)

Los experimentos se realizaron a partir de biopreparados comerciales provenientes de la empresa productora e importadora de insumos para el manejo integrado de plagas y enfermedades de los cultivos (MICSA®) que son utilizados como control biológico en estrategias fitosanitarias (MICSA & Salvagro, 2021). Estos bioformulados son a base de esporas del hongo *Trichoderma harzianum* llamado comercialmente “Rikoderma®” y de la bacteria *Bacillus subtilis* registrada comercialmente “Radicillus®” los cuales fueron facilitados por el investigador del CENTA, M.Sc. M. López (comunicación personal, 9 de abril de 2021).

Diluciones decimales

Los aislamientos comerciales, en presentación sólida (polvo) se multiplicaron en medios de cultivo; para lo cual se aplicó el método de diluciones seriada descrito en el manual de Cervera (2011) y Méndez (2011), el cual consistió en pesar 10 g de cada biopreparado y diluirlo en 90 ml de agua destilada estéril dentro de en un Erlenmeyer con capacidad de 500 ml (dilución 10^{-1}). Seguidamente se tomó 1 ml y diluyó en 9 ml de ADE en un tubo de ensayo el cual se agitó durante 5 min. en vórtex, transcurrido este tiempo se realizó la siguiente dilución hasta 10^{-3} (ver Anexo.18). De la dilución 10^{-2} y 10^{-3} se tomó con una jeringa 1 ml y depositó en placas Petri de 9 cm por triplicado, luego se extendió por agotamiento en el medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA), para *Trichoderma harzianum*. Las placas Petri se sellaron con papel parafilm e

incubaron boca abajo a temperatura ambiente en hielera de poliestireno, durante siete días hasta el desarrollo de colonias fúngicas de color verdoso.

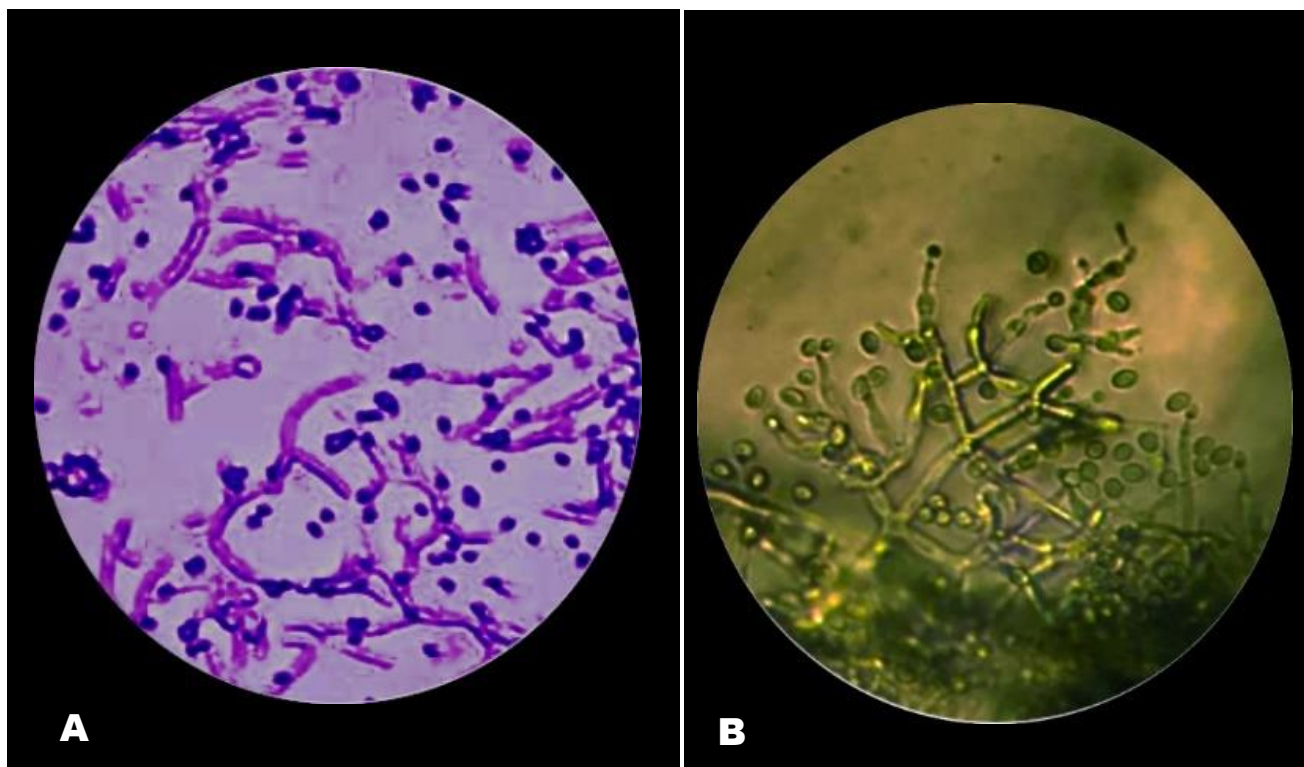
Para el desarrollo de *Bacillus subtilis* se tomó con una pipeta de la dilución 10^{-2} y 10^{-3} e inoculó 1 ml en placas Petri de 9 cm por triplicado, luego se sembró por agotamiento en el medio de cultivo Agar Nutriente (AN) Merck Millipore. Las placas Petri se sellaron con papel parafilm e incubaron de forma inversa, a temperatura ambiente hasta el crecimiento de la bacteria después de 48 h. con colonias de color crema mucoides (González, 2016; Guédez et al., 2012; López & Pazos, 2005; Santiago et al., 2017).

7.1.9 Morfología microscópica de *B. subtilis* y *T. harzianum*

A los microorganismos provenientes de los bioformulados en polvo hidrosolubles y desarrollados en las placas, se observó la morfología microscópica a través de frotis utilizando un microscopio compuesto Nikon Eclipse E400, observando de *Trichoderma harzianum* la disposición de sus fiálides y conidias (Fig.4). Mientras que *Bacillus subtilis* fue visualizado con el objetivo de inmersión (100X) para ver la forma bacilar y posible presencia de esporas bacterianas (Tariq et al., 2016; Vos et al., 2001).

Figura. 4

Morfología de los biocontroladores. A) *Bacillus subtilis*; B) *Trichoderma harzianum*, vistos a 100X



7.1.10 Evaluación del porcentaje de inhibición y capacidad antagonística

Para evaluar la capacidad antagonística de los biopreparados, se realizaron cultivos duales enfrentando la cepa patógena FM1 identificada previamente como *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*) con cada antagonista de acuerdo a los estudios de: García et al. (2006); Gonzáles (2016); Martínez-Scott (2016); Rojas et al. (2011); Tejera-Hernández (2011).

En la técnica de cultivo dual (hongo vs hongo), a cultivos de siete días de crecimiento tanto de *T. harzianum* como de *Fol*. se cortó un tapón de 5 mm de diámetro con una punta de micropipeta estéril, del borde de la colonia que es la zona en crecimiento activo según Corallo (2012) y se confrontaron los discos en cada extremo de una caja de Petri de 9 cm conteniendo 20 ml de medio de cultivo PDA.

La capacidad antagonística de *Bacillus subtilis* se determinó por el método de contacto directo descrito por Pérez & García (2019) con algunas modificaciones. Este experimento consistió en ajustar la concentración inicial del bioproducto formulado a 2.4×10^8 UFC/ml⁻¹ a la concentración final de 10^8 UFC/ml⁻¹, mediante la ecuación: $C1V1=C2V2$. Posteriormente se sembró por agotamiento con un hisopo estéril la suspensión bacteriana, en una placa con medio PDA e inmediatamente se colocó en el centro un tapón de 5 mm del fitopatógeno (ver Anexo.19). Como testigos se dispusieron placas Petri inoculadas en el centro con un tapón del hongo fitopatógeno sin la presencia de los antagonistas, posteriormente, los cultivos se dispusieron completamente al azar con tres repeticiones, cada repetición estuvo compuesta de 10 placas Petri e incubaron a temperatura ambiente. Se realizaron mediciones del crecimiento radial de *Fol*. cada 24 horas post siembra (Sánchez et al., 2015). Y se continuó con las mediciones hasta que el testigo sin antagonista llenó la placa Petri (Martínez-Scott, 2016).

Con las mediciones obtenidas se determinó el porcentaje de inhibición, aplicando la ecuación que aparece en Rojas-Badía et al. (2017).

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{D.C.C - D.C.P}{D.C.C} \times 100$$

Dónde:

D.C.C: Diámetro de la colonia control (cm).

D.C.P: Diámetro de la colonia problema (hongo patógeno en presencia de los antagonistas) (cm).

El antagonismo se evidenció estudiando el diámetro de crecimiento radial del hongo fitopatógeno en presencia del antagonista y porcentaje de inhibición del crecimiento radial. Considerando como índice de antagonismo la invasión de *T. harzianum* sobre la superficie del

micelio patógeno, empleando la escala mostrada en la tabla.5. Escala empleada por Ezziyani et al., (2004) y modificada por Morán Quintero (2007).

Tabla. 5

Escala de evaluación de antagonismo in vitro, tomando en cuenta la invasión de la superficie, colonización y esporulación de los microorganismos sobre Fusarium oxysporum f. sp.

lycopersici. Adaptada de Morán Quintero 2007.

| Grado | Capacidad Antagónica |
|--------------|--|
| 0 | Ninguna invasión de la superficie de la colonia del hongo patógeno. |
| 1 | Invasión del 25% de la superficie de la colonia del hongo patógeno. |
| 2 | Invasión de 50% de la superficie de la colonia del hongo patógeno. |
| 3 | Invasión de 75% del total de la superficie de la colonia del hongo patógeno. |
| 4 | Invasión del 100% de la superficie de la colonia del hongo patógeno y esporulación sobre ella. |

La tasa de crecimiento micelial del patógeno se evaluó en cm/día^{-1} , y se determinó teniendo en cuenta el radio de crecimiento micelial de la colonia fúngica, calculando su magnitud mediante la expresión sugerida por Mead et al. (1993).

$$T.C = (C_f - C_i) / (T_f - T_i)$$

Donde:

C_f: es el crecimiento final.

C_i: es el crecimiento inicial (día uno) expresado en cm.

T_f: es el tiempo final.

T_i: es el tiempo inicial (día uno).

El comportamiento de inhibición mostrado por los antagonistas se agrupó como recomienda Bautista (2000) en:

- Negativo: ausencia de zona de inhibición o un porcentaje menor de 10% y crecimiento normal de la colonia fúngica, de forma similar al control.
- Baja: ausencia de zona de inhibición o con un porcentaje entre 10–39% y con disminución en el crecimiento de la colonia fúngica.
- Media: ausencia de zona de inhibición o un porcentaje entre 40–69% y con disminución en el crecimiento de la colonia fúngica.
- Positivo: presencia de zona de inhibición definida o en un porcentaje entre 70–100%.

Se determinó el tipo de interacción presentada por el biocontrolador *T. harzianum* sobre el patógeno (Tabla 6), con la clasificación adaptada de Badalyan et al. (2004) y Molla et al. (2001):

Tabla. 6

Características de los tipos de interacciones evaluados en enfrentamientos duales entre Trichoderma harzianum y F. oxysporum f. sp. lycopersici.

| Identificación | Descripción |
|----------------|---|
| A | Inhibición en el punto de contacto (el crecimiento de ambos hongos se detiene en el punto de contacto). |
| B | Inhibición a la distancia (el crecimiento se detiene sin contacto micelial) |
| C | Reemplazo (uno de los hongos crece sobre el otro). |
| D | Entremezcla mutua (ninguno de los dos hongos detiene su crecimiento después del punto de contacto). |

Con el fin de evaluar el tipo de interacción a nivel del micelio, se realizaron preparados de la zona de contacto y se observó al microscopio compuesto con aumento de 100X, donde se identificó la interacción de las hifas antagonistas con las del patógeno, así también el modo de acción por micoparasitismo (Guédez et al., 2012). Para ello, bajo condiciones asépticas, con cinta adhesiva se tomaron muestras en 3 puntos cercanos a la zona de interacción entre las colonias (ver Anexo.20). Cada muestra se colocó entre un portaobjeto y un cubre objeto con una gota del colorante azul de metileno. Metodología adaptada de Corallo (2012).

7.1.11 Bioensayo de la efectividad *in vitro*

La efectividad de los biopreparados en la protección de semillas de tomate de la variedad CENTA CUSCATLÁN se evaluó a través de los tratamientos que consistieron en diferentes dosificaciones de los biocontroladores (10^6 y 10^8 esp/ml⁻¹) y una sola dosificación de la cepa FM1 identificada previamente como *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (10^5 esp/ ml⁻¹).

Preparación y cuantificación del inóculo

Los inóculos tanto del patógeno como los bioformulados se obtuvieron a partir de la fórmula: $C1V1 = C2V2$ ajustando la suspensión a las concentraciones establecidas.

Placas con colonias de *Fol* con siete días de crecimiento se recubrieron con 5 ml de ADTE, luego se raspó la superficie de las colonias con un asa estéril y se agitó de forma circular por 25 segundos. A continuación, la suspensión resultante se filtró con gasas estériles para eliminar restos de micelio o medio de cultivo e introdujo en un Erlenmeyer con 100 ml de agua destilada, agregando 0.1 ml de Tween 20 al 0.1%, se homogenizó en vórtex para asegurar el desprendimiento

total de las esporas. La concentración de la suspensión inicial se ajustó en cámara de Neubauer (Covacevich & Consolo, 2014). Una vez la suspensión estuvo libre de impurezas, paso siguiente, se tomó 0.01 ml con una pipeta y colocó en el centro de la cámara de Neubauer; en seguida se cubrió con el cubreobjetos evitando la formación de burbujas y que la gota no se derramará ni se saliera de los campos de conteo. Esto daría un dato erróneo, ya que el excedente arrastraría las esporas (Peña & Páez, 2014) y con la ayuda del microscopio compuesto se ajustó a la suspensión 10^5 esp/ml⁻¹. Mientras que las concentraciones de los antagonistas se obtuvieron de los bioformulados ajustando a las dosis requeridas de 1×10^6 y 10^8 UFC/ml⁻¹ (González-Cárdenas et al., 2005; López, 2011; Müller, 2021; Rodríguez et al., 2005).

Desinfección de las semillas

Las semillas de tomate var. CENTA CUSCATLÁN se clasificaron según tamaño para que todas fueran lo más homogéneas posibles, posteriormente fueron distribuidas al azar en botes de vidrio por cada tratamiento, para la desinfección.

Como primer paso se lavaron las semillas dos veces con agua de chorro, separándolas del líquido con colador de metal mediano, luego se desinfectaron superficialmente sumergiéndolas 3 min. en alcohol 96° a continuación se enjuagaron 1 min. agitando levemente, después se dejaron reposando 2 min. en hipoclorito de sodio al 4% luego se enjuagaron 5 veces con ADE, se filtraron con el colador y colocaron sobre una placa Petri con papel absorbente para su secado dentro de la cámara de flujo laminar (Rodríguez et al., 2008; Salinas-Ventura & Soriano-Bernilla, 2014).

Cebado de semillas con biopolímeros.

Las semillas fueron peletizadas con biopolímeros a base de almidón y goma arábiga al 25% que se prepararon un día antes, adaptando la metodología de los trabajos de Caballero et al. (2016) y Chin et al. (2021, 2022) con ciertas modificaciones. Los ingredientes y sus respectivas cantidades se detallan en los Anexos 21 y 22.

Elaboración del biopolímero con almidón:

Se aplicó 500 ml de recubrimiento con biopolímero (polisacárido), logrando una cobertura homogénea de las semillas.

La elaboración consistió en agregar 15 ml de agua para hidratar 15 g del almidón, evitando la producción de grumos y 8 ml de agua para hidratar 0.45 g de gelatina sin sabor. La cantidad restante de agua (464 ml) se introdujo en un Erlenmeyer y calentó en un hotplate a 50°C. Posterior a esto se procedió a disolver 12.5 ml de glicerina y agitó con un agitador magnético, a 50°C durante

30 min. Luego se agregó la gelatina previamente hidratada y se dejó con agitación constante por 30 min. Por último, se añadió el almidón previamente disuelto, agitando durante 1 hora a 70°C aproximadamente, para iniciar el proceso de gelatinización del almidón, se enfrió a temperatura ambiente para luego conservar en refrigeración a 4 °C. El producto final obtenido fue una solución de moderada viscosidad, con aspecto a gel y de condición blanquecina; que se usó para el encapsulado de las semillas.

Elaboración del biopolímero con goma arábica:

Para elaborar la goma arábica se midió en una probeta 125 ml de goma arábica, paso siguiente se introdujo en un Erlenmeyer, luego se adicionaron 370 ml y los otros 5 ml restantes fueron agregados con gotero Pasteur hasta aforar 500 ml, seguidamente se introdujo un agitador magnético y la disolución se colocó sobre un hotplate hasta la completa disolución durante aproximadamente 45 min. a 50°C, finalmente se almacenó bajo refrigeración por 24 h. Transcurrido el tiempo, se realizaron las suspensiones 10^6 y 10^8 esporas/ml⁻¹ de *Trichoderma harzianum* y *B. subtilis*, se tomaron 6 ml de estas suspensiones para mezclar con los respectivos biopolímeros de almidón y goma arábica elaborados el día anterior e incorporados a temperatura ambiente (Fig.5A-B). Cada tratamiento se independizó utilizando botes de vidrio estériles y rotulando según fuera el caso de la suspensión más el tipo de biopolímero, paso siguiente las semillas de tomate previamente esterilizadas se recubrieron con la mezcla compuesta por los agentes de biocontrol inmersos dentro de cada biopolímero durante 30 min. a la razón siguiente:

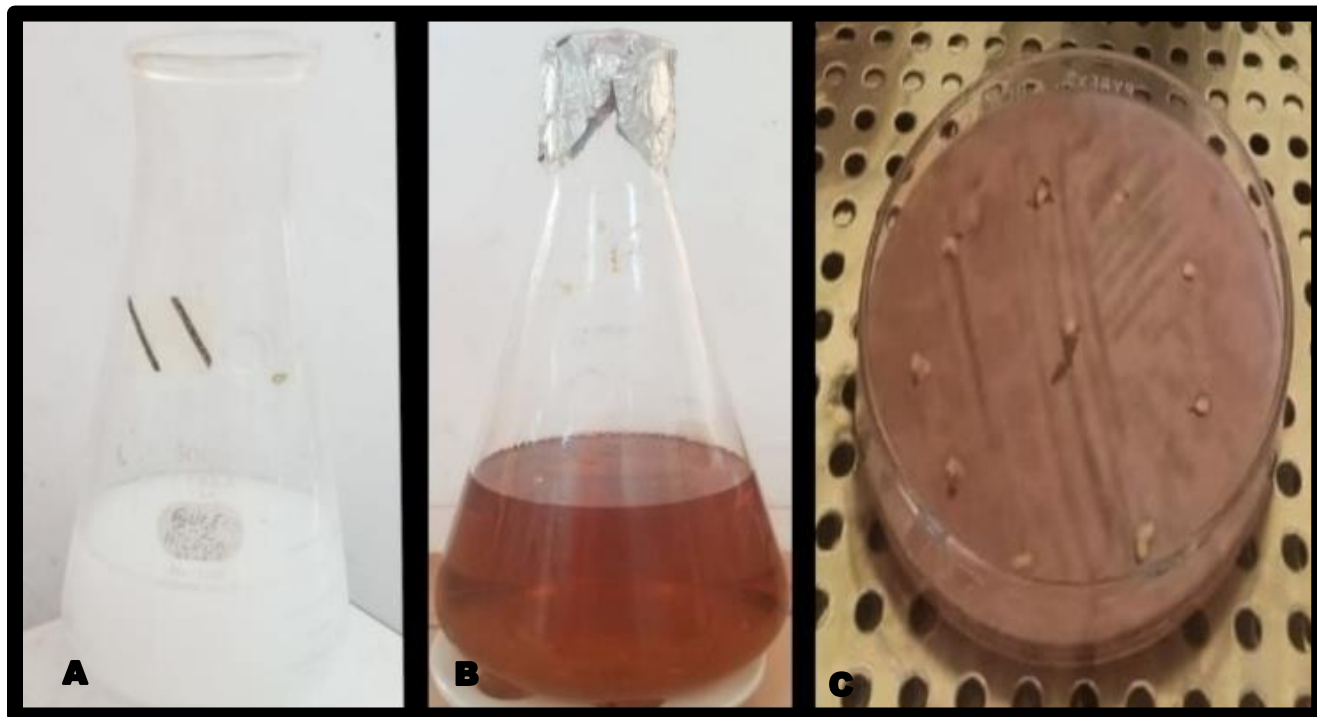
Detalles de los tratamientos

| | | | | | | | |
|------------|-----|----------|----------------|------------------------------|--------|----------------------|---------------------|
| T1 | 100 | semillas | Inoculadas con | Agua Destilada Estéril (ADE) | | | |
| T2 | 100 | semillas | Inoculadas con | ----- | 10^5 | esp/ml ⁻¹ | <i>Fol</i> |
| T3 | 100 | semillas | biocebadas con | almidón | 10^6 | esp/ml ⁻¹ | <i>B. subtilis</i> |
| T4 | 100 | semillas | biocebadas con | goma arábica | 10^6 | esp/ml ⁻¹ | <i>B. subtilis</i> |
| T5 | 100 | semillas | biocebadas con | almidón | 10^6 | esp/ml ⁻¹ | <i>T. harzianum</i> |
| T6 | 100 | semillas | biocebadas con | goma arábica | 10^6 | esp/ml ⁻¹ | <i>T. harzianum</i> |
| T7 | 100 | semillas | biocebadas con | almidón | 10^8 | esp/ml ⁻¹ | <i>B. subtilis</i> |
| T8 | 100 | semillas | biocebadas con | goma arábica | 10^8 | esp/ml ⁻¹ | <i>B. subtilis</i> |
| T9 | 100 | semillas | biocebadas con | almidón | 10^8 | esp/ml ⁻¹ | <i>T. harzianum</i> |
| T10 | 100 | semillas | biocebadas con | goma arábica | 10^8 | esp/ml ⁻¹ | <i>T. harzianum</i> |

Una vez aplicados a las semillas, posteriormente se colectaron con un colador metálico y depositaron en una placa Petri con papel filtro absorbente estéril, dejando secar durante 30 min. en cámara de flujo laminar (ver Anexo.23). Una vez secas se distribuyeron 10 semillas por placa Petri de 9 cm con medio de cultivo PDA previamente inoculado con 10^5 esp/ml⁻¹ de *Fol* (Fig.5C). Se incubaron a temperatura ambiente en oscuridad dentro de una hielera de poliestireno hasta la germinación de las semillas (Müller, 2021). Se aplicó un DCA con tres repeticiones evaluando 100 semillas por cada tratamiento, donde cada replica estuvo conformada por tres unidades experimentales. Considerándose como unidad experimental una caja de Petri. El conteo de las plántulas se realizó todos los días a partir de la siembra hasta el término del día 7 y 15, en donde se obtuvo el porcentaje total de emergencia (ET) considerando como semillas germinadas aquellas en las que hubo protrusión radicular.

Figura. 5

Tratamientos para evaluar la efectividad de los biocontroladores sobre el patógeno en la germinación de semillas de tomate A) Biopolímero de Almidón; B) Biopolímero de Goma Arábica; C) Disposición de las semillas de tomate dentro de la caja Petri.



7.2 FASE DE CAMPO

7.2.1 Bioensayo *in vivo*

Los ensayos *in vivo* se llevaron a cabo en un invernadero ubicado dentro de las instalaciones del CENTA contiguo a la Unidad Planta Sana (Fig.6), para ello se recolectó suelo de una parcela ubicada a las afueras del laboratorio de Parasitología Vegetal. Este suelo se esterilizó en autoclave a 121°C y 15 psi durante 1 h, se midieron los parámetros físico-químicos presentando pH de 6.14, CE= 0.152 mS/cm y T°= 27°C, luego el suelo se dispensó en bandejas de germinación de 200 alveolos y con medida de 53 x 27.5 x 4 cm, las cuales se distribuyeron al azar según correspondiera y se marcaron para identificar cada uno de los tratamientos y posteriormente fueron utilizadas en el montaje del ensayo (Ezziyyani et al., 2004; Osorio & Guerrero, 2020).

Figura. 6

Invernadero utilizado para los ensayos in vivo.



7.2.2 Obtención de los inóculos

El ensayo de campo fue conducido con semillas de tomate de la variedad mejorada CENTA CUSCATLÁN, las cuales se desinfectaron siguiendo el mismo protocolo descrito en los apartados anteriores del bioensayo *in vitro* (Pérez & García, 2019). También se procedió a preparar las respectivas suspensiones de los microorganismos a analizar, para lo cual placas Petri con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) se cubrieron de agua y se rasparon con un asa esterilizada en

llama, luego se filtró con doble gaza estéril y el filtrado obtenido se agitó en vórtex durante un minuto. A continuación, se agregó esta suspensión a un Erlenmeyer con 1 L de ADE y se tomó 0.01 ml con una jeringa estéril, se depositó en cámara de Neubauer y con la ayuda del microscopio compuesto se determinó el número de conidios/ml⁻¹ y mediante dilución se ajustó a las concentraciones requeridas por tratamiento. Para el inóculo de *T. harzianum* y *B. subtilis* se ajustaron con la fórmula: $C1.V1=C2.V2$ hasta obtener las dosis deseadas (Constanza-Corrales et al., 2010; González-Cárdenas et al., 2005).

7.2.3 Inoculación del sustrato y semillas

Suelo estéril se inoculó con *Fol* 10⁵ esporas/ml⁻¹, después de 24 h. se peletizaron las semillas estableciendo por tratamiento de acuerdo a la tabla.7, las semillas con sus respectivos tratamientos se depositaron en frascos de vidrio estéril durante 30 min., tiempo después se filtraron con colador y se depositaron en papel absorbente dejando secar en la cámara de flujo laminar. El testigo sano fueron 100 semillas sembradas en suelo sin inocular asperjadas con agua esterilizada. El testigo enfermo fueron 100 semillas en suelo inoculado con el patógeno 10⁵esp/ml⁻¹. Finalmente se sembraron en las bandejas y llevaron al invernadero a una temperatura promedio de 27°C (Eraso et al., 2014; Figueroa-Rivera et al., 2010; Gonzáles, 2016; Osorio & Guerrero, 2020). Los tratamientos se dispusieron en un arreglo de bloques completos al azar con 5 repeticiones, constituyendo cada bandeja la unidad experimental. Se tomó como criterio de germinación la emergencia total de la plántula con los respectivos cotiledones, y se realizó el conteo diario y se suspendió hasta que el 100% de las semillas ya había germinado (ver Anexo.24).

A los 15 días después de la siembra las plántulas se fertilizaron con una solución nutritiva (30%N, 15%P, 30%K) a razón de 1g/L⁻¹ de ADE. Los riegos se llevaron a cabo cada tercer día, con el fin de mantener la humedad requerida para la germinación y desarrollo de la plántula. El agua de riego presentó los siguientes parámetros de calidad pH=7.7, T° promedio=27°C, TDS=219 ppm, EC=0.415 mS/cm. A los 20 días de germinación las plántulas de tomate se extrajeron de las bandejas y se trasplantaron en bolsas para almácigo de 15x23 cm, se reinoculó el suelo estéril con una nueva suspensión de *Fol* 1x10⁵ esp/ml⁻¹. Los tratamientos fueron 10 los cuales se dispusieron en un DCA con 3 repeticiones, cada repetición estuvo conformada por 10 unidades experimentales siendo cada bolsa la unidad experimental.

El conteo de las plántulas se realizó todos los días a partir de la siembra hasta el término del décimo día, en donde se obtuvo el porcentaje total de emergencia (ET), el cual consistió en

contabilizar cada una de las plántulas emergidas hasta el último día de la evaluación y el resultado se consiguió dividiendo el número total de plántulas emergidas por tratamiento, entre el número total de semillas sembradas multiplicando por cien (García et al., 2016).

$$\%E = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de plantas emergidas}}{\text{N}^{\circ} \text{ de semillas sembradas}} \times 100$$

El índice de velocidad de germinación (IVG) se calculó de acuerdo a la fórmula propuesta por Brown & Mayer (1988):

$$\text{IVG} = \text{P1/T1} + \text{P2/T2} + \dots + \text{Pn/Tn}$$

donde:

P = número de semillas germinadas;

T = tiempo en que germinaron; y

n = día del último control.

El Tiempo Medio de Germinación (TMG) se calculó de acuerdo con García et al. (1982):

$$\text{TMG} = [(\text{x1 d1}) + (\text{x2 d2}) + \dots + (\text{x10 d10})] / \text{X10}$$

donde: x1, x2, x10 son las semillas germinadas en el d 1, 2,...10; d1, d2,... d10 son los días de incubación, y X10 es el número total de semillas germinadas en el día 10 cuando se realizó el conteo final de semillas germinadas.

A los 52 días después de la siembra en bandeja y 31 días después del trasplante, se realizó un muestreo destructivo extrayendo el 50% de plántulas de cada repetición tomando la muestra al azar para las respectivas evaluaciones de las variables fenológicas: longitud del tallo, longitud de la raíz, longitud total de la planta, diámetro del tallo, peso fresco y peso seco total. Al finalizar el ensayo se procedió a medir con una regla graduada las variables de las plantas de tomate para determinar diferencias entre estas. Las raíces se lavaron con agua de chorro para eliminar la tierra, seguidamente las plantas se secaron en un horno a 50 °C por tres días para determinar su peso seco en una balanza analítica A&D Company (Constanza-Corrales et al., 2010).

Tabla. 7

Tratamientos para evaluar la efectividad de los biocontroladores sobre el patógeno en la germinación de semillas de tomate.

| TRATAMIENTO | DESCRIPCIÓN | CONCENTRACION espora/ml ⁻¹ | BIOPOLIMERO | N° DE SEMILLAS |
|-------------|---|--|--------------|-------------------|
| T1 | ADE | - | - | 100 |
| T2 | <i>F. oxysporum</i> f. <i>sp. lycopersici</i> (Fol) | 1 x 10 ⁵ | - | 100 |
| T3 | <i>Bacillus subtilis</i> | 1 x 10 ⁶ | Almidón | 100 |
| T4 | <i>Bacillus subtilis</i> | 1 x 10 ⁶ | Goma arábica | 100 |
| T5 | <i>T. harzianum</i> | 1 x 10 ⁶ | Almidón | 100 |
| T6 | <i>T. harzianum</i> | 1 x 10 ⁶ | Goma arábica | 100 |
| T7 | <i>Bacillus subtilis</i> | 1 x 10 ⁸ | Almidón | 100 |
| T8 | <i>Bacillus subtilis</i> | 1 x 10 ⁸ | Goma arábica | 100 |
| T9 | <i>T. harzianum</i> | 1 x 10 ⁸ | Almidón | 100 |
| T10 | <i>T. harzianum</i> | 1 x 10 ⁸ | Goma arábica | 100 |

7.3 Análisis de Datos

A todos los datos obtenidos se comprobó las premisas de normalidad por el test de Shapiro Wilk o Francia y la homocedasticidad por la prueba de Levene o Barlett y se practicó un Análisis de Varianza de una vía (ANOVA) y cuando existieron diferencias significativas entre los tratamientos las medias se compararon por el método de Tukey para una significancia de $P \leq 0.05$ y 95% intervalo de confianza, usando el Programa Estadístico R-Studio versión 7.1.0.

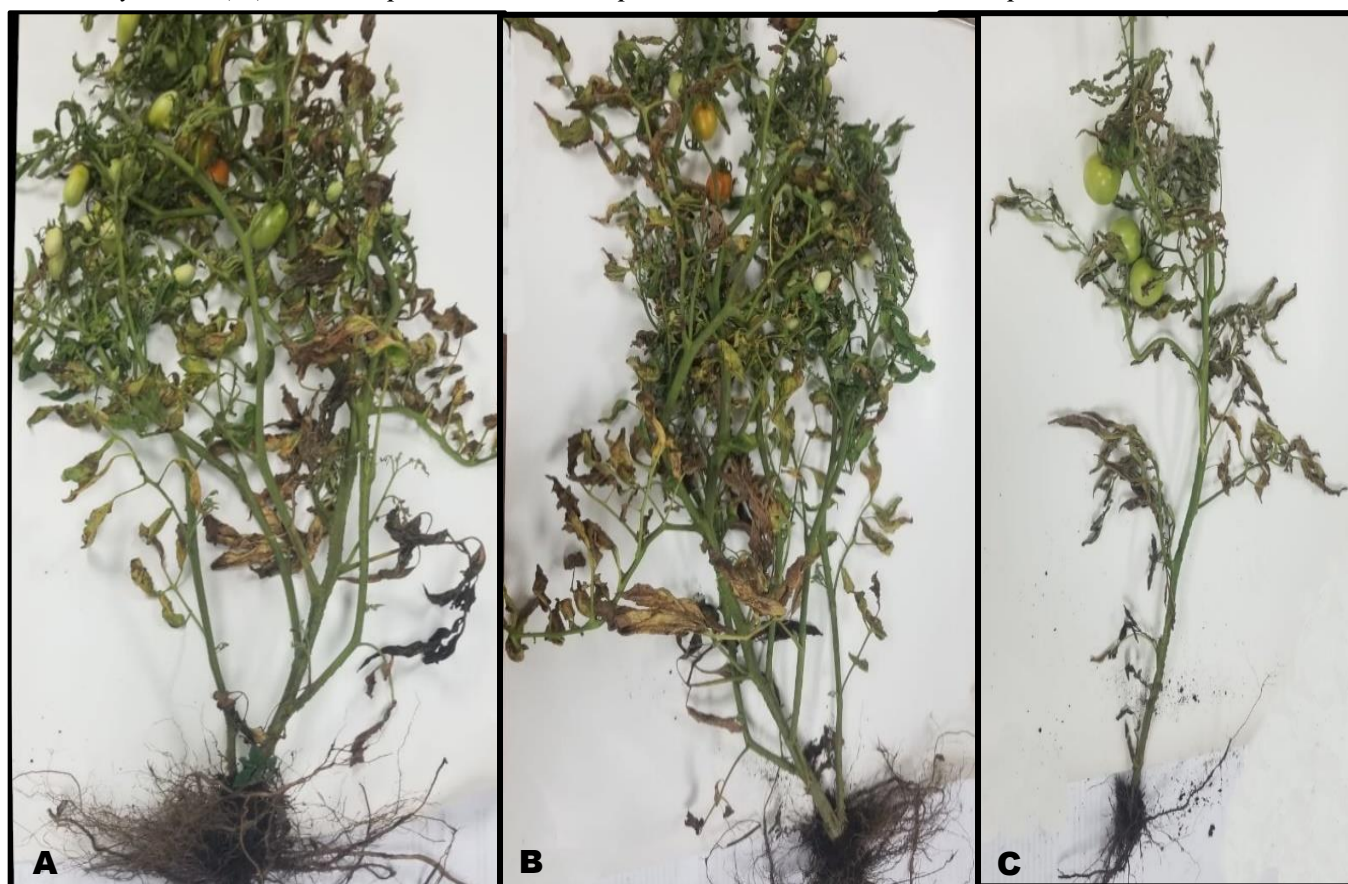
8 RESULTADOS

8.1 Colecta y aislamiento de *Fusarium spp*

Los aislamientos provienen de dos localidades del departamento de La Libertad. En fechas diferentes se obtuvieron muestras de plantas de tomate enfermas, la primera y tercera muestra corresponden a dos parcelas de San Andrés I, y la segunda proviene de Zapotitán, estas parcelas pertenecen al CENTA. Las muestras se colectaron de plantas de tomate var. CENTA CUSCATLÁN en la etapa de post cosecha que a nivel macroscópico presentaron síntomas de fusariosis (Fig.7), los aislados de las muestras se designaron con código FM1, FM2 y FM3.

Figura. 7

Plantas de tomate con síntomas de Fusariosis. (A-B) Muestras de San Andrés I de donde se aisló FM1 y FM3; (C) Muestra proveniente de Zapotitán de donde se aisló la cepa FM2.



8.2 Caracterización morfológica

La caracterización morfológica reveló que el aislado FM1 compartía características típicas de *Fusarium oxysporum*. El cultivo en PDA creció rápidamente a los 7 días de incubación presentó colonias con micelio de color blanco en las primeras etapas de crecimiento tornándose violeta pálido con la esporulación (Fig.8A), micelio delicado y disperso en algunos cultivos mientras que abundante en otros, y producción de micelio aéreo; todas estas cualidades corresponden con las descripciones que están en el Manual de *Fusarium* de Leslie & Summerell (2006).

En la morfología microscópica se observaron las estructuras de propagación con características claves como microconidias ovaladas, sin septos, unicelulares formadas sobre fiálides cortas, macroconidias en forma de hoz compuestas por 4-6 septos con células apicales cortas ligeramente curvas y células basales puntiagudas con forma de gancho, muy abundantes en el medio de cultivo según Nelson et al. (1983), la formación de estas estructuras es común en este tipo de colonias. Formación abundante de clamidosporas intercaladas en las hifas, apareciendo solas o en pares con paredes de aspecto rugoso, se forman en cultivos viejos cuando se agotan los nutrientes en el medio de cultivo siendo una estructura de resistencia del hongo (Fig.8B-F).

Entre los caracteres macroscópicos de los aislados FM2 y FM3 se encuentran como cultivos algodonosos de color blanquecino a marrón con abundante producción de esporodoquios de color crema (Fig.9). A nivel morfológico los cultivos presentaron macroconidias con 3-4 septos muy anchas y robustas formadas sobre esporodoquios largos, con célula apical redonda, pie recto y ligeramente redondeado. Microconidios anchos de forma ovalada con un septo, presentes en el micelio aéreo que es muy abundante. De acuerdo a Barnett & Hunter (2006) y Leslie & Summerell (2006) estos caracteres morfológicos son correspondientes a *Fusarium solani* que es muy común aislarlo en plantas de tomate, basándose en el nicho ecológico y la morfología se suele confundir a *F. solani* con *F. oxysporum*, pero se distinguen por la longitud de las monofiálides y que los microconidios de *F. solani* tienden a ser un poco más anchos, de forma más ovalada y tienen paredes más gruesas.

Figura. 8

Estructuras propagativas de F. oxysporum producidas en medio de cultivo PDA. A) Cultivos color violeta pálido; B-C) macroconidias (40X); D) Fiálides (40X); E) Microconidias (10X) y F) clamidosporas (40X).

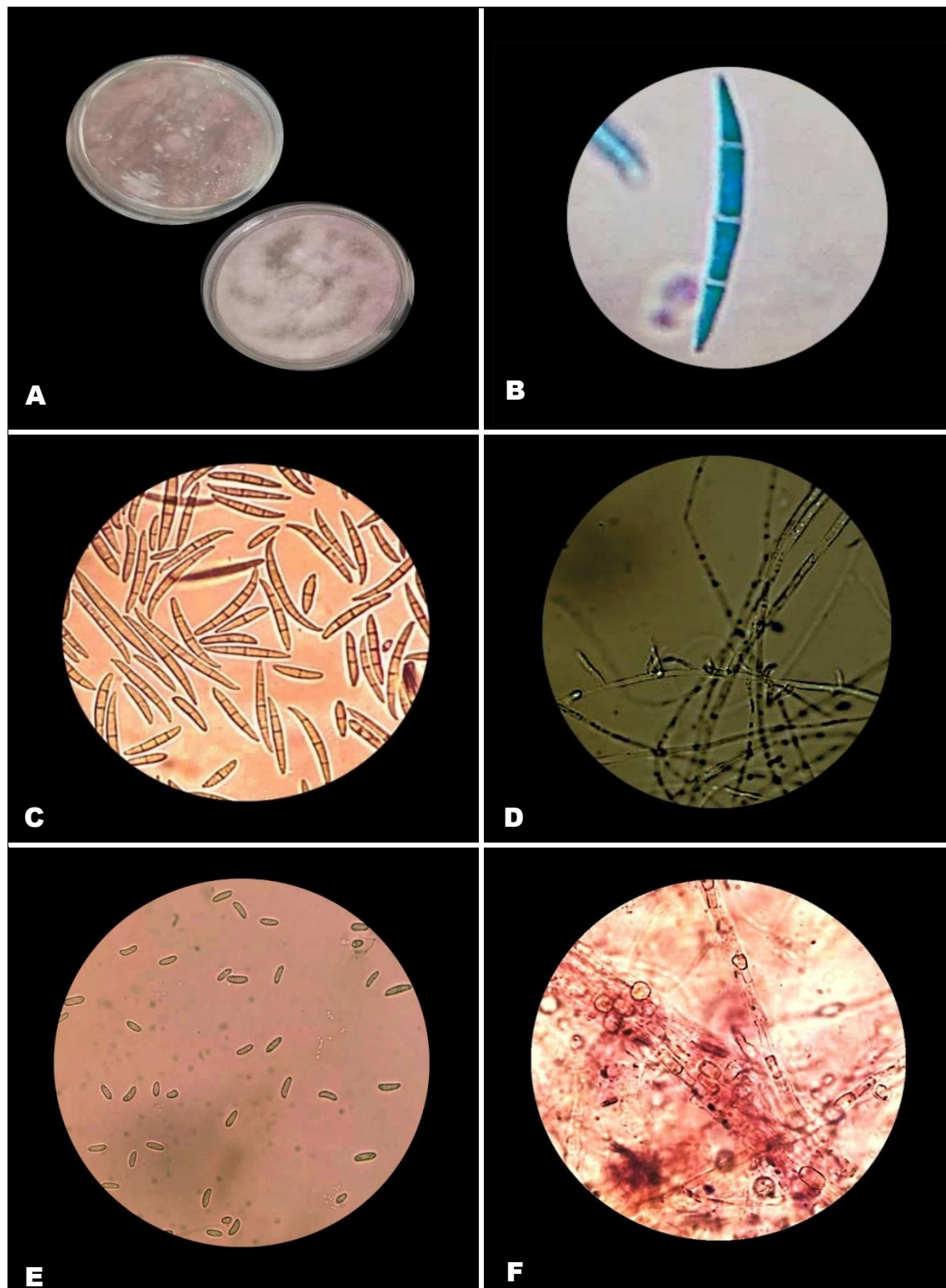
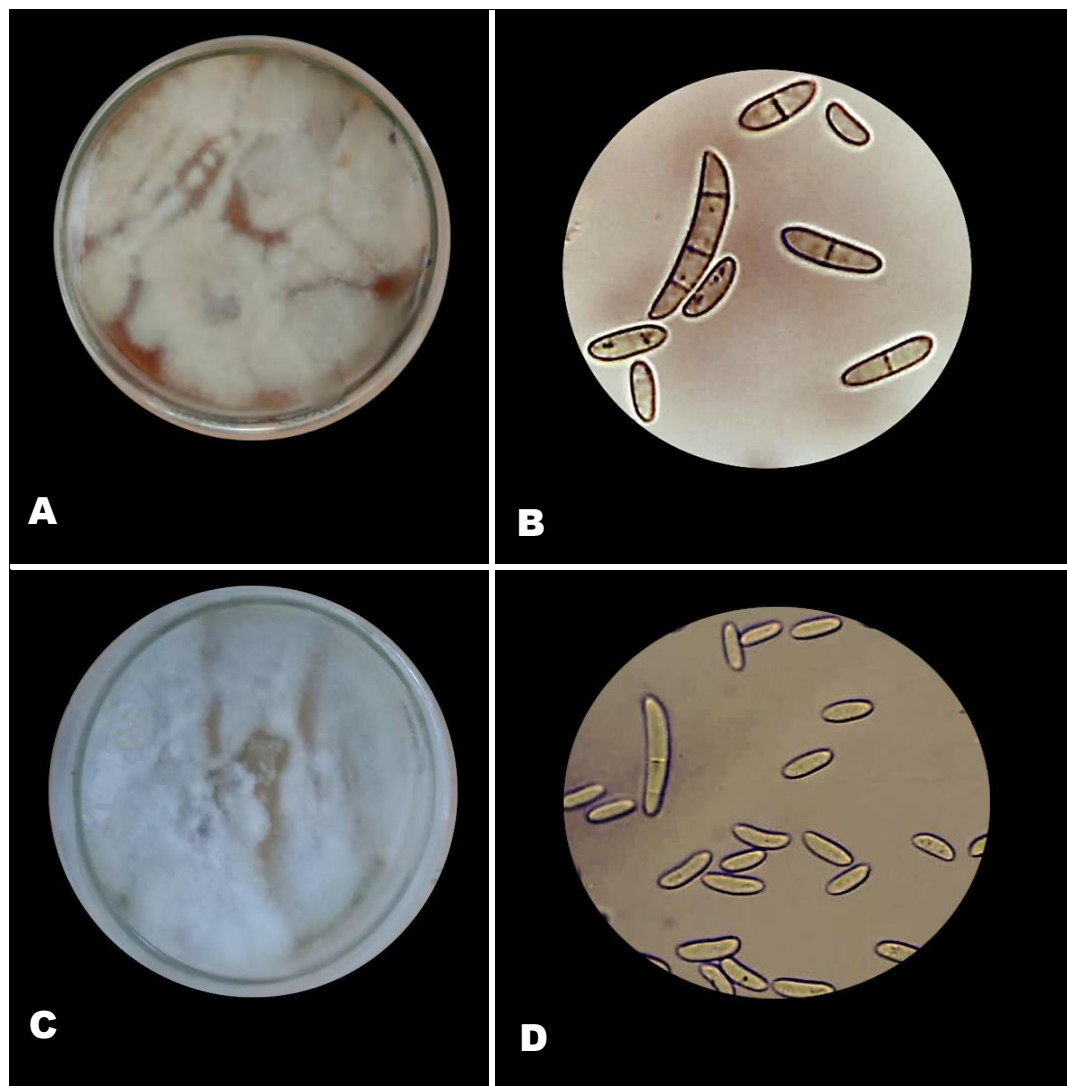


Figura. 9

Estructuras propagativas de Fusarium solani. A) cultivo de la cepa FM2; B) Macroconidias y Microconidias (40X); C) cultivo de la cepa FM3; D) Macroconidias y Microconidias (40X).



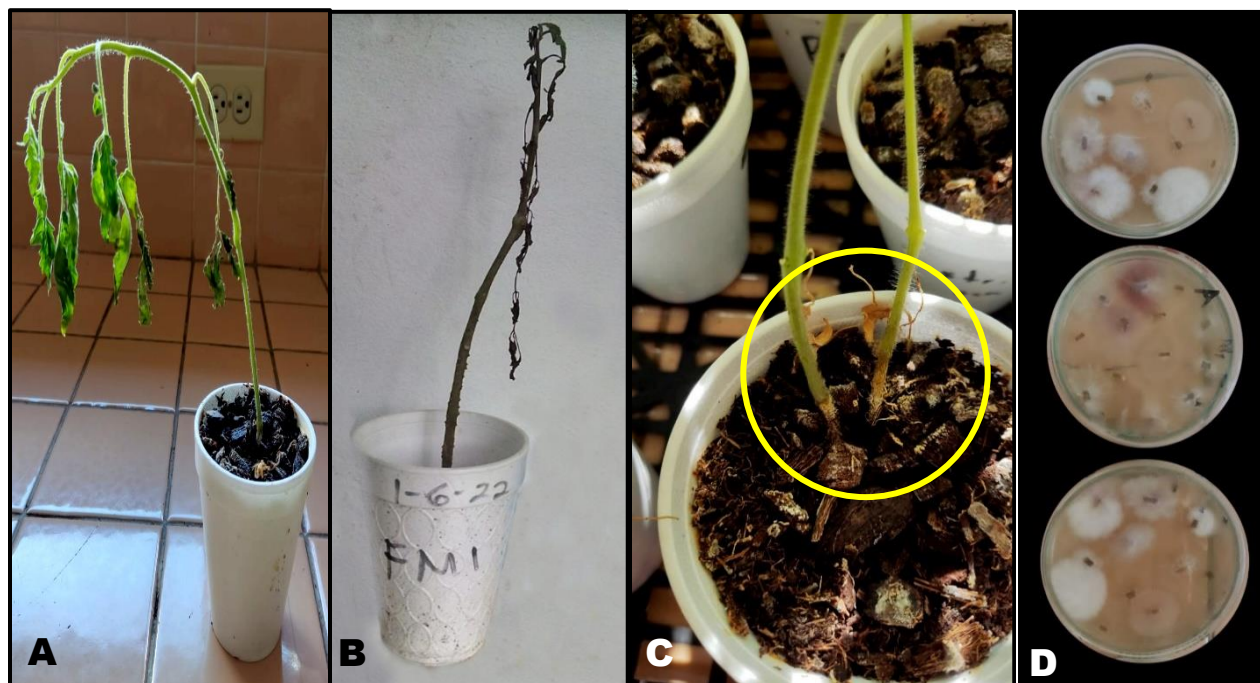
8.3 Pruebas de patogenicidad de aislamientos de *Fusarium spp.*

Para determinar la patogenicidad y posible forma especial de *Fusarium spp.*, los aislamientos se inocularon en plantas de tomate var. CENTA CUSCATLÁN evaluando algunos métodos de inoculación como: inmersión de raíz; aplicación en suspensión al suelo y combinación de ambos tratamientos, las plantas inoculadas con el aislado FM1 mostraron síntomas de marchitez al finalizar 30 ddi (días después de la inoculación) en todos los métodos; por lo que en adelante se empleó la inoculación directa en el suelo por ser menos invasiva ya que no causa stress adicional a la planta y es igualmente eficiente. En la segunda prueba de patogenicidad, FM1 produjo los mismos síntomas de marchitez en donde la planta con el paso de los días presentó hojas inferiores

amarillentas hasta que la marchitez se propagó hacia el ápice y hojas superiores ocasionando una marchitez general, las hojas infectadas se oscurecieron y la base del tallo mostró necrosis de color marrón causando finalmente la muerte de las plántulas a los 45 ddi. En la escala del 1 al 5 de Marlatt et al. (1996) modificada por Gayosso et al. (2021), para estimar la severidad de la enfermedad, las plantas presentaron escala 5 que corresponde a planta muerta. Con los postulados de Koch se confirmó que se trataba del *Fusarium oxysporum* aislado originalmente de la muestra de San Andrés I codificada como FM1 (Fig.10) la sintomatología expresada exclusivamente en las plantas de tomate inoculadas con el aislamiento se puede asociar a la especificidad del hospedero, razón por la cual se define como *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Si bien es cierto que *F. oxysporum* tiene muchas formas especiales pero la forma especial “*lycopersici*”, afecta solo a plantas de tomate susceptibles a la marchitez vascular (Cardona-Piedrahita & Castaño-Zapata, 2019; Córdova-Zapata, 2003). Los aislados FM2 y FM3 no expresaron patogenicidad en ninguno de los ensayos por lo que fueron excluidos de los otros experimentos.

Figura. 10

A-B) Plantas con síntomas de Marchitez vascular; C) Tallo con mancha marrón; D) Reaislamiento del *Fusarium* FM1 en medio de cultivo PDA.



8.4 Identificación de *Fol* mediante PCR (ITS y TEF-1 α)

El análisis realizado por el laboratorio CENEM y la Universidad de Florida consistió en: Extracción de ADN, amplificación por PCR, secuenciación y análisis de identidad del marcador

ITS1-5.8S-ITS2 (ribosomal internal transcribed spacer) para hongos. Para el análisis de identidad de la secuencia de ADN obtenida, se utilizó la base de datos de nucleótidos del NCBI aplicando la herramienta Basic Local Alignment Search Tool para nucleótidos – BLAST@N 2.8.0+ (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine). La amplificación de la región ITS así como el factor de elongación de traducción 1-alfa (TEF-1 α) confirmaron que a nivel molecular el aislamiento FM1 se encuentra dentro de la especie *Fusarium oxysporum* con 100% identidad. La amplificación de pares de bases de las cepas FM2 y FM3 codificaron para *Fusarium solani*; por lo que fueron excluidos de los siguientes experimentos de esta investigación.

8.5 Conservación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Los métodos para la preservación del hongo en ADTE, glicerol al 10%, tubo inclinado y en papel filtro fueron eficientes, ya que al hacer el control de calidad el hongo se desarrolló perfectamente en el medio de cultivo, conservando las características del cultivo inicial.

Respecto a la conservación y reproducción en matrices de arroz; el hongo se diseminó en todo el sustrato invadiendo completamente los granos de arroz tornándolos de color violeta, sin embargo se presentaron algunos inconvenientes dentro de los cuales está el factor tiempo, considerando este método demasiado extenso ya que la cosecha de conidias se realizó hasta los 30 días después de la inoculación que es en promedio lo que se tardó en colonizar por completo los granos y secarse en el papel Kraft; por otra parte no se pudo determinar la concentración del producto resultante, porque solo se cosechó restos de micelio, de modo que el ingrediente activo del hongo se encontró presente dentro del polvo cosechado; porque al hacer la siembra en PDA el cultivo creció con abundante producción de macroconidios. Es muy probable que durante la manipulación del secado, algunos de los granos se contaminaron con los hongos del ambiente pues algunas placas presentaron contaminación, por lo que para preservación de la cepa pura no es recomendable este método, pero sí para mantener activa la virulencia del hongo; ya que en ensayos de patogenicidad se aplicó polvo cosechado proveniente de matrices sin contaminación, a plantas sanas de tomate causando marchitez más rápidamente y de mayor impacto que con una solución obtenida directamente de cultivos en placas Petri, siendo por lo tanto económica y viable esta forma para mantener la virulencia de *Fol* para pruebas de patogenicidad.

8.6 Antagonismo *in vitro*

Los biocontroladores comerciales *B. subtilis* y *T. harzianum* fueron capaces de inhibir el crecimiento radial del fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fig.11). El análisis de

varianza detectó diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$) lo cual indica que hay evidencia estadística para rechazar la Hipótesis nula (Tabla 8). El porcentaje de inhibición (PI) en los tres días de evaluación varió desde 0 en el testigo hasta 65.3%, 70.3% y 72.7 % en *Bacillus subtilis*, siendo éste el mayor porcentaje que en la escala de inhibición de Bautista (2000), se agrupa dentro de antagonismo positivo; mientras que *T. harzianum* varió de 30.4%, 39.7% a 52.9% y se ubica en la escala como antagonismo medio. Así mismo, los PI obtenidos a los 2, 6 y 8 días de enfrentamiento parecen indicar que a medida que avanza el tiempo de enfrentamiento, aumenta la capacidad de biocontrol del antagonista frente al patógeno en referencia (Fig.12).

La comparación de medias para la Tasa de Crecimiento micelial (TC) muestra que *Fol* creció 0.4 cm/día^{-1} , en el tratamiento con *T. harzianum* 0.2 cm/día^{-1} , el menor crecimiento se obtuvo con el tratamiento *B. subtilis* del orden de 0.1 cm/día^{-1} , lo cual concuerda con el mayor porcentaje de inhibición presentado por este microorganismo (Fig.13).

Figura. 11

Inhibición de crecimiento de Fol in vitro. A) Control; B) B. subtilis, la zona clara es el halo de inhibición; C) T. harzianum. La fotografía corresponde a unidades representativas.

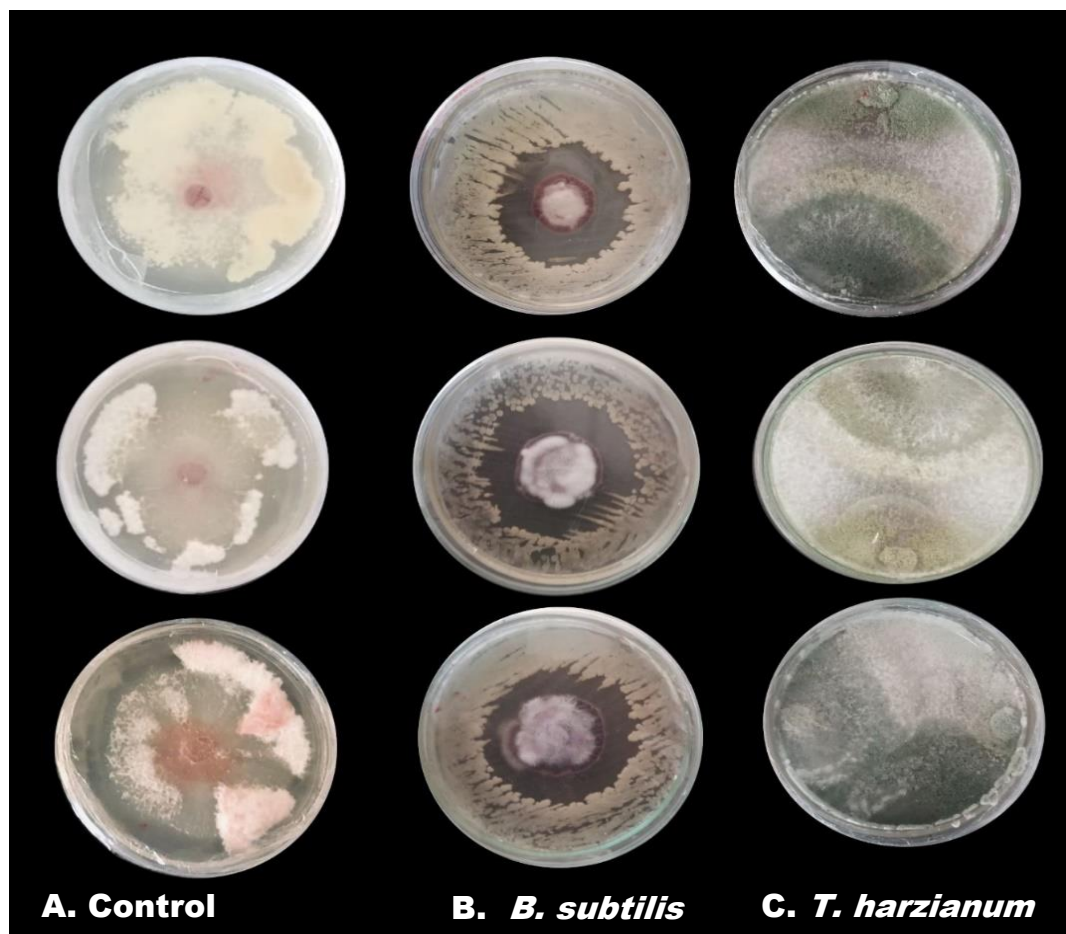


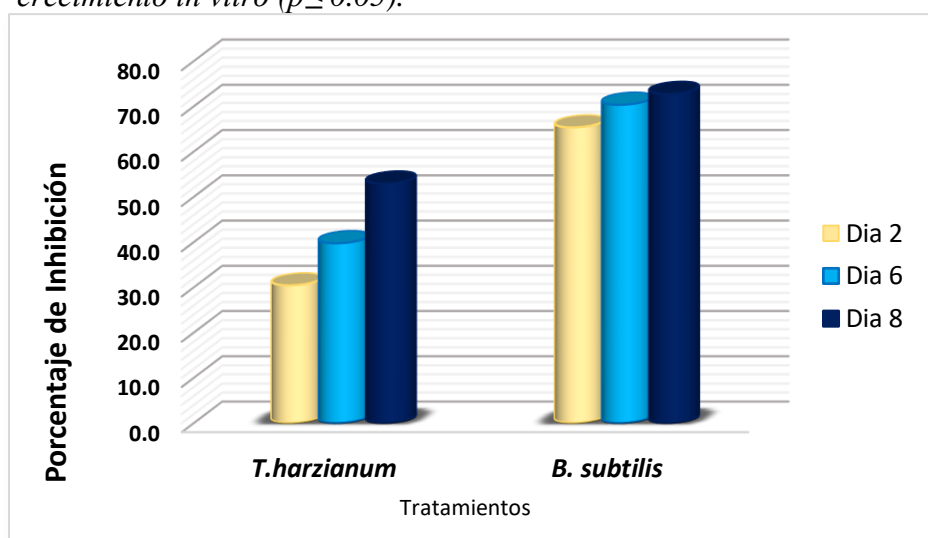
Tabla. 8

Porcentaje de inhibición de *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* sobre *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* ($\alpha = 0.05$; valor de $P = 4 \times 10^{-10}$, $F = 3994$) y Tasa de Crecimiento micelial por día en cm (TC). Medias con la misma literal entre columnas son iguales. Tukey ($P \leq 0.05$).

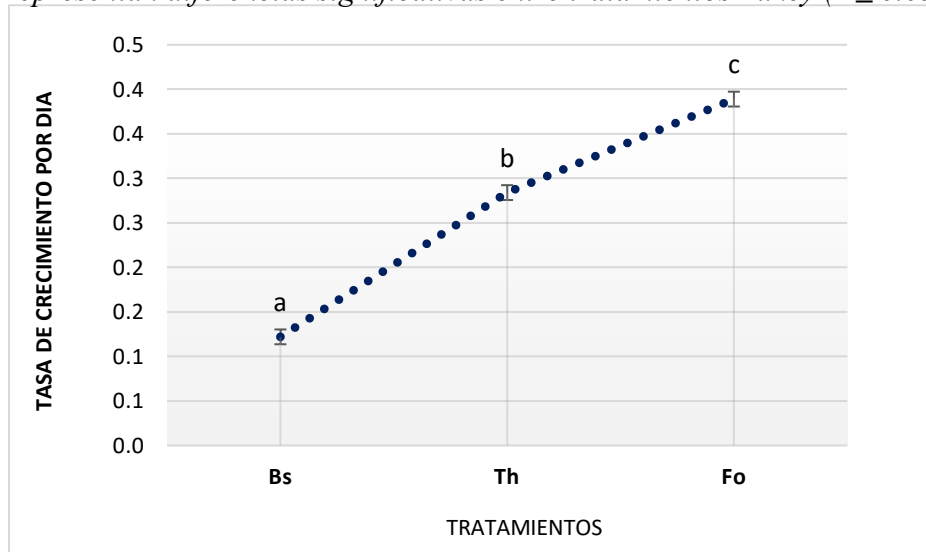
| TRATAMIENTOS | Porcentaje de Inhibición | | | TC |
|--|--------------------------|--------|--------|-------|
| | Día 2 | Día 6 | Día 8 | |
| <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp <i>lycopersici</i> | 0.0 a | 0.0 a | 0.0 a | 0.4 c |
| <i>Trichoderma harzianum</i> | 30.4 b | 39.7 b | 52.9 b | 0.2 b |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 65.3 c | 70.3 c | 72.7 c | 0.1 a |

Figura. 12

Porcentaje de inhibición de *B. subtilis* y *T. harzianum* sobre *Fol* después de 8 días de crecimiento *in vitro* ($p \leq 0.05$).

**Figura. 13**

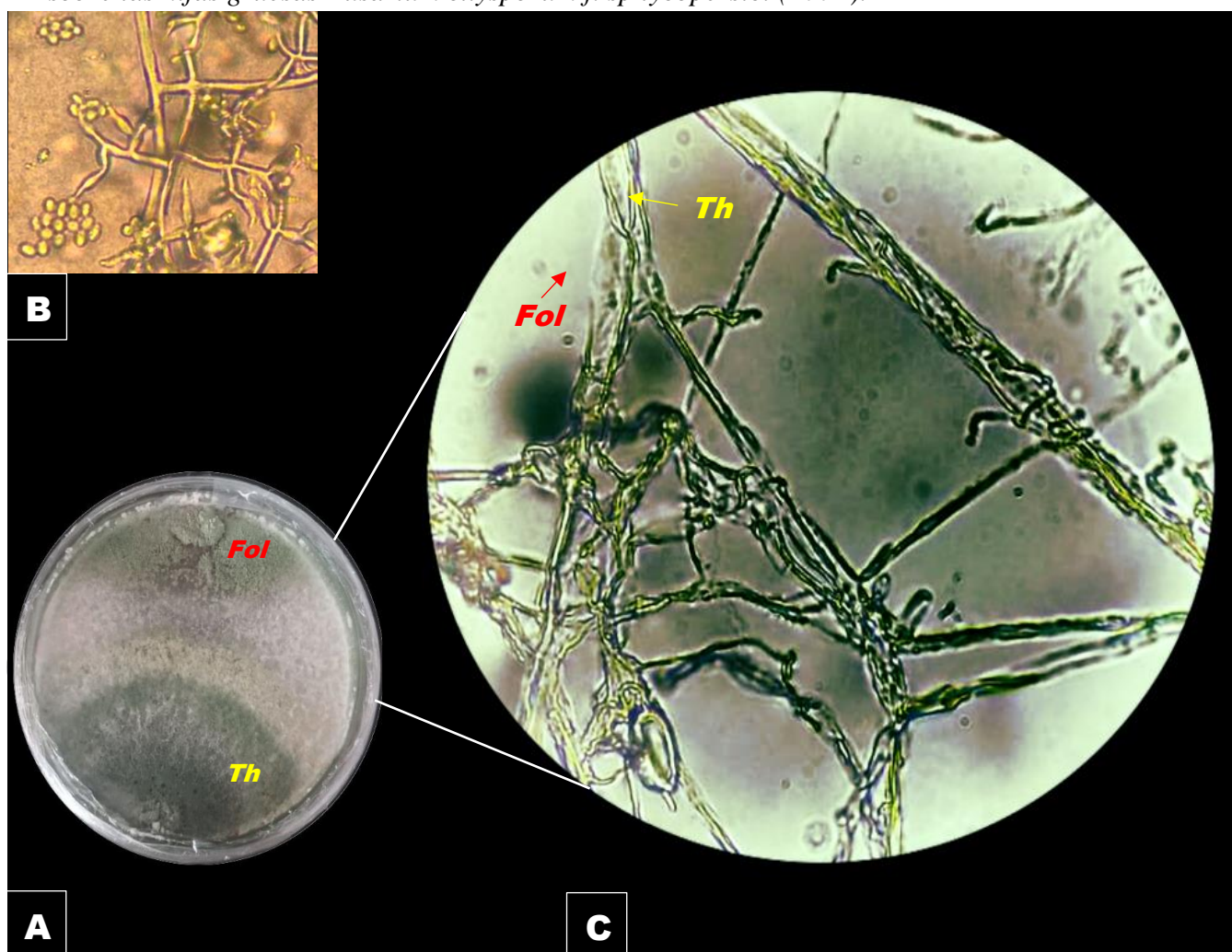
Tasa de crecimiento micelial de *Fol* después de 8 días de crecimiento *in vitro*. Letras diferentes representan diferencias significativas entre tratamientos Tukey ($P \leq 0.05$).



Trichoderma harzianum presentó grado 4 de antagonismo donde las colonias crecieron y esporularon sobre el patógeno *Fol*, en cuanto al tipo interacción descritos por Badalyan et al. (2004) y Molla et al. (2001), predominó el tipo C reemplazo (Fig.14), este se asocia con el rápido crecimiento de las especies de *Trichoderma* y con mecanismos de micoparasitismo y antibiosis, en los cuales principalmente mediante la producción de enzimas líticas, *Trichoderma* sp. tiene la capacidad de usar al patógeno como sustrato de crecimiento, creciendo inicialmente sobre su micelio y finalmente reemplazándolo progresivamente gracias a la degradación de éste (Hoyos-Carvajal et al., 2009). La figura 14.C muestra a *Trichoderma harzianum* micoparasitando las hifas de *Fol*. por enrollamiento y estrangulación.

Figura. 14

Antagonismo de *Trichoderma harzianum*. A) Antagonismo grado 4 y de tipo C reemplazo; B) Esporulación; C) Micoparasitismo. Las hifas de color verde de *T. harzianum* se enrollan sobre las hifas gruesas *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* (100X).



8.7 Bioensayo *in vitro*

Semillas biocebadas con mezcla de biopolímeros Almidón y Goma arábica, así como bioformulados comerciales de *T. harzianum* y *Bacillus subtilis* se evaluaron para determinar la efectividad en ensayos de germinación *in vitro* frente a un aislamiento de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, en semillas de tomate variedad CENTA CUSCATLÁN.

En esta prueba se obtuvieron porcentajes de germinación muy bajos en los tratamientos, lo cual estuvo influenciado porque al sembrar las semillas *in vitro* en conjunto con *Fol* este colonizó completamente la caja de Petri cubriéndola con sus hifas e impidiendo la germinación de las semillas (Fig.15), además las condiciones de incubación fueron poco apropiadas por estar bajo oscuridad y sin control de luz y temperatura en la hielera. En ensayos de germinación *in vitro* las condiciones de incubación deben ser apropiadas para la germinación óptima de semillas de tomate donde no esté en desventaja, pero tampoco el patógeno pues en condiciones naturales normalmente el hongo prevalece en suelos infestados reduciendo la germinación. Una opción podría ser utilizar, un medio con mayor humedad como agar agua en tubos de ensayo (Corallo, 2012) en discos de papel filtro como usualmente se hace (Gorrín et al., 2015; Rodríguez et al., 2008) o según las normas técnicas del ISTA (International Seed Testing Association) en condiciones controladas de humedad, temperatura y luz, para determinar la capacidad germinativa.

Para mejorar las condiciones e inducir la germinación a los 8 días después de la siembra se trasladaron a un cuarto con luz ultravioleta; no obstante, a pesar de las circunstancias hubo diferencias entre algunos tratamientos (Tabla.9). La gráfica (Fig.16) muestra que para el día 7 el menor porcentaje de germinación estuvo en T7 con solo 1% y el mayor porcentaje de germinación 60% lo obtuvo T9 que comparado al tratamiento testigo sano lo superó en 328% ($\alpha= 0.05$; valor de $P=4.5 \times 10^{-5}$, $F= 8.322$).

En el día 15 el número de plantas germinadas disminuyó debido a que algunas plantas murieron por la resequedad del medio, pero con diferencias significativas en algunos tratamientos ($\alpha= 0.05$; valor de $P=5.2 \times 10^{-4}$, $F= 5.813$). En T6 y T7 aumentó el porcentaje de semillas germinadas 23%-24%, aun así, todos los tratamientos son similares entre sus medias a excepción de T2 y T9 con valores opuesto extremos (1%, 48%). Con el tratamiento T9 (*T. harzianum* 10^8 + Almidón) algunas semillas lograron germinar porque el biopolímero de almidón logró conservar la humedad en la semilla y con *T. harzianum* 10^8 esp/ml⁻¹ protegió la semilla de la invasión del

patógeno por los metabolitos secundarios que este tipo de antagonista libera al competir en el medio.

Figura. 15

Interacción de Fol, y los biocontroladores comerciales sobre la germinación de las semillas de tomate. A: Germinación en el tratamiento testigo sano; B: El micelio de Fol colonizó el medio impidiendo la germinación de las semillas de tomate.

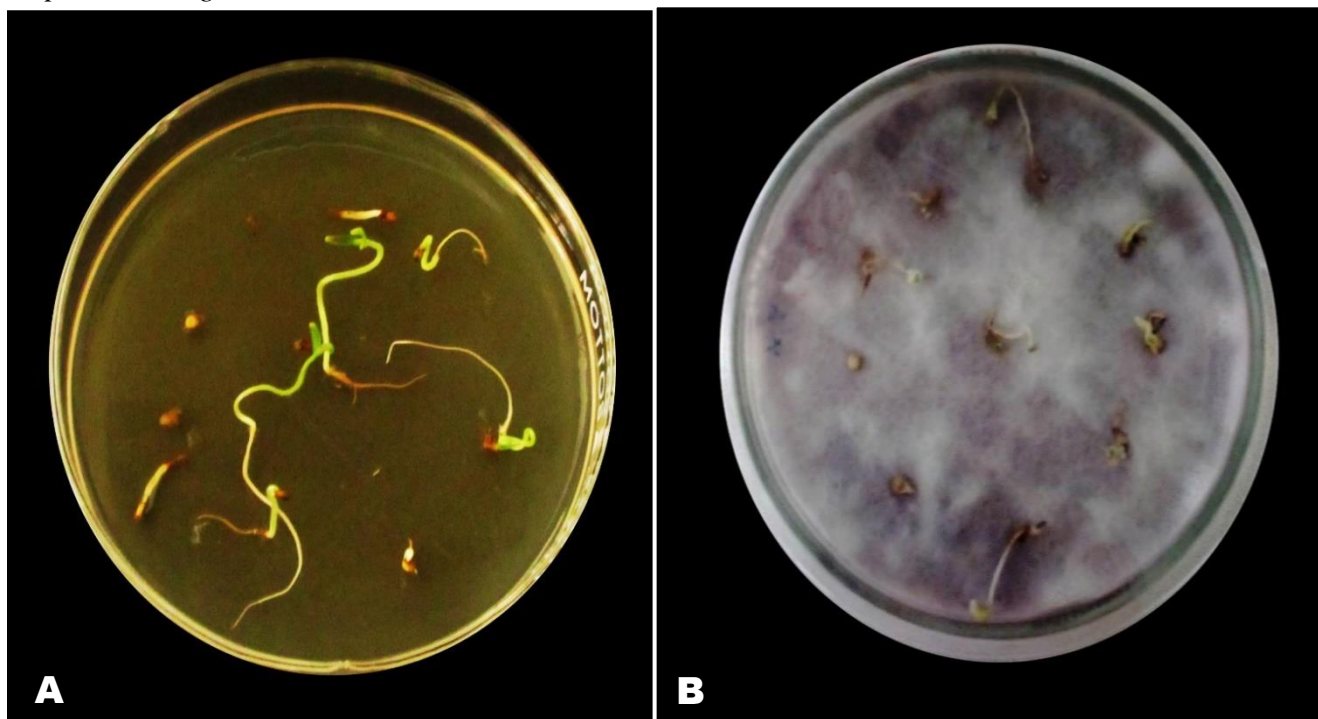


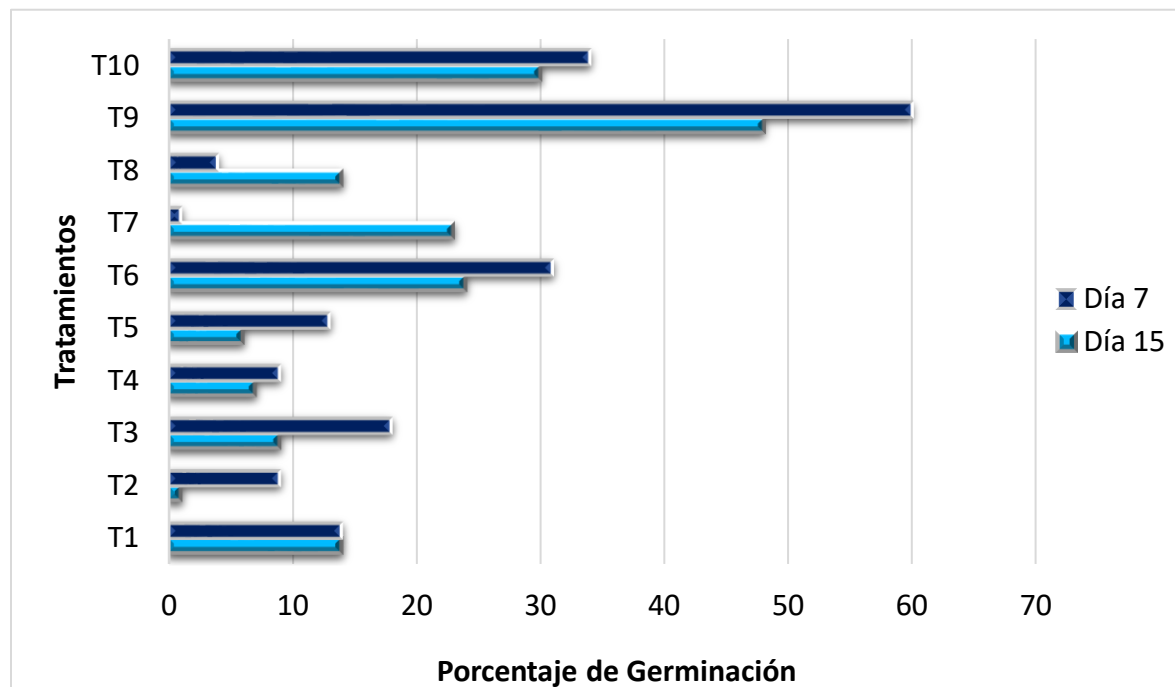
Tabla. 9

Porcentaje de germinación in vitro en semillas de tomate. Evaluación a los 15 días después de la siembra. Letras distintas entre columnas indican diferencias significativas para Tukey ($P \leq 0.05$).

| N° | TRATAMIENTOS (T) Descripción | Día 7 | Día 15 |
|-----|--|--------|--------|
| T1 | Testigo sano | 14 ab | 14 ab |
| T2 | Testigo enfermo | 9 ab | 1 a |
| T3 | <i>Bs</i> 10 ⁶ + Almidón | 18 ab | 9 ab |
| T4 | <i>Bs</i> 10 ⁶ + Goma arábica | 9 ab | 7 ab |
| T5 | <i>Th</i> 10 ⁶ + Almidón | 13 ab | 6 ab |
| T6 | <i>Th</i> 10 ⁶ + Goma arábica | 31 abc | 24 abc |
| T7 | <i>Bs</i> 10 ⁸ + Almidón | 1 a | 23 abc |
| T8 | <i>Bs</i> 10 ⁸ + Goma arábica | 4 ab | 14 ab |
| T9 | <i>Th</i> 10 ⁸ + Almidón | 60 c | 48 c |
| T10 | <i>Th</i> 10 ⁸ + Goma arábica | 34 bc | 30 bc |

Figura. 16

Porcentaje de germinación in vitro de semillas de tomate biocebadas con biocontroladores y biopolímeros. Evaluación a los 7 y 15 días después de la siembra.



8.8 Bioensayo *in vivo*

8.8.1 Germinación *in vivo*

El análisis de varianza mostró efectos significativos entre tratamientos ($P < 0.05$). La prueba de medias de Tukey, indicó que para el día 3 el T8 tuvo un 45% de germinación muy superior a los demás y 125% superior al testigo sano, la menor germinación se produjo en los tratamientos T5 (1%), T9 (0%) y T10 (0%) que no se diferencian de forma estadística. En el día 10 la situación cambia, el mayor porcentaje de germinación lo obtuvo T6 con el 100% los demás tratamientos no difieren, pero con buenos rangos de porcentajes T3 (77%), T4 (82%), T5 (84%), T7 (92%), T8 (91%), T9 (75%), T10 (81%), mientras que el menor se registró en T2 con 35% y T1 con 56%. Estos resultados demuestran que con T8 se alcanza mayor velocidad de germinación, pero T6 favorece un mayor número de semillas germinadas y que la combinación goma arábiga más biocontroladores induce mayores porcentajes de germinación.

Los valores del Índice de Velocidad de Germinación (IVG) fueron mayores en los tratamientos T3 (3.55), T4 (3.45), T5 (3.33), T6 (4.01), T7 (4.43), y T10 (3.43) con respecto a Testigo enfermo (T2) que presenta un IVG muy bajo de 1.69. Con el tratamiento T8 se consigue

un valor alto 5.12, esto demuestra que semillas de tomate var. CENTA CUSCATLÁN inoculadas con *B. subtilis* 10^8 esp/ml⁻¹ más goma arábica (T8) germinan a mayor velocidad con un aumento de 103% en comparación al testigo sano con el IVG de 2.52 que no se diferencia de forma estadística del T2 (Fig.17).

El TMG indica el tiempo requerido para que germine el 50% de las semillas. Los resultados demuestran que los tratamientos T3 (5.43), T4 (6.11), T5 (5.94), T6 (5.87), T7 (5.38), T8 (4.44), T9 (6.21), T10 (6.02) no presentan diferencias significativas entre ellos (Tabla.10) y tampoco hay mucha diferencia respecto al T1 (6.48), únicamente el tratamiento T2 presentó diferencia significativa ($P \leq 0,05$), con el valor más alto 8.49. Lo que podría indicar que semillas infectadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* tardan en germinar y se obtienen promedios bajos de germinación. Aunque T8 no se diferencia respecto al testigo sano, presenta la menor media de 4.44 respecto a todos los tratamientos por lo que se deduce que las semillas germinan en menor tiempo aplicando este tratamiento.

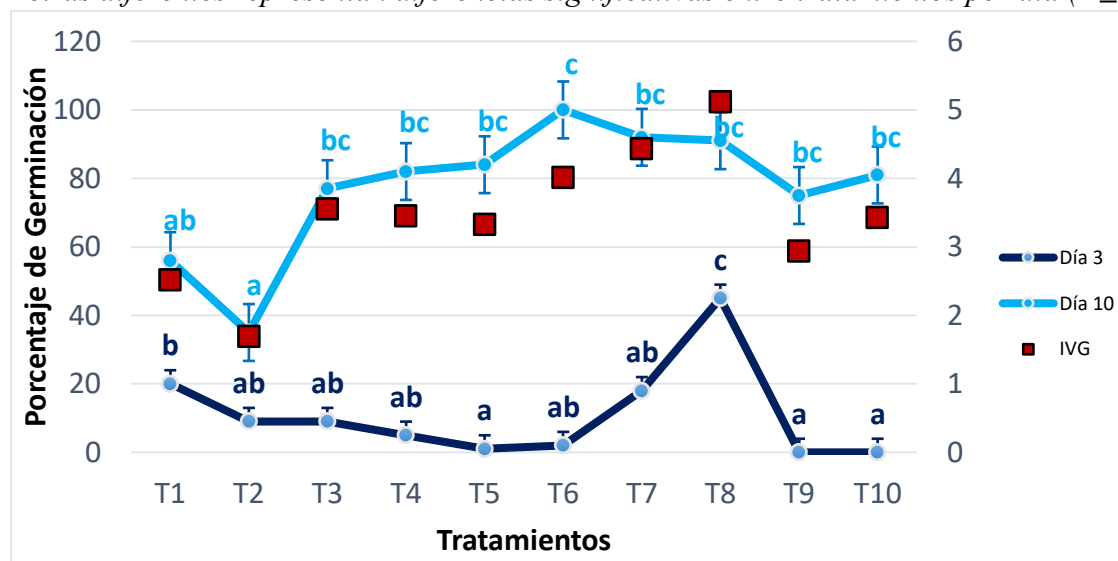
Tabla. 10

Porcentaje de germinación in vivo en semillas de tomate biocebadas con diferentes concentraciones de biocontroladores y biopolímeros. Evaluación a los 10 días después de la siembra. ($\alpha = 0.05$; valor de $p = 6.91 \times 10^{-10}$; $F = 18.3$). Índice de Velocidad de Germinación (IVG), Tiempo Medio de Germinación (TMG). Las letras distintas entre columnas indican diferencias significativas para Tukey ($P \leq 0.05$). Los resultados mostrados corresponden al promedio entre las réplicas.

| N° | TRATAMIENTOS (T) Descripción | Germinación | | | |
|------------|---------------------------------|-------------|--------|----------|------------|
| | | Día 3 | Día 10 | IVG | TMG (días) |
| T1 | Testigo sano | 20 b | 56 ab | 2.52 ab | 6.48 ab |
| T2 | Testigo enfermo | 9 ab | 35 a | 1.69 a | 8.49 b |
| T3 | <i>Bs</i> 10^6 + Almidón | 9 ab | 77 bc | 3.55 abc | 5.43 a |
| T4 | <i>Bs</i> 10^6 + Goma arábica | 5 ab | 82 bc | 3.45 abc | 6.11 a |
| T5 | <i>Th</i> 10^6 + Almidón | 1 a | 84 bc | 3.33 abc | 5.94 a |
| T6 | <i>Th</i> 10^6 + Goma arábica | 2 ab | 100 c | 4.01 bc | 5.87 a |
| T7 | <i>Bs</i> 10^8 + Almidón | 18 ab | 92 bc | 4.43 bc | 5.38 a |
| T8 | <i>Bs</i> 10^8 + Goma arábica | 45 c | 91 bc | 5.12 c | 4.44 a |
| T9 | <i>Th</i> 10^8 + Almidón | 0 a | 75 bc | 2.94 ab | 6.21 a |
| T10 | <i>Th</i> 10^8 + Goma arábica | 0 a | 81 bc | 3.43 abc | 6.02 a |

Figura. 17

Porcentaje de germinación a los 3 y 10 días e Índice de Velocidad de Germinación (IVG). Letras diferentes representan diferencias significativas entre tratamientos por día ($P \leq 0.05$).



Las variables morfométricas de las plantas de tomate se evaluaron a los 52 días después de la siembra para determinar la efectividad técnica de los biocontroladores comerciales *B. subtilis* y *T. harzianum* a 10^6 y 10^8 esp/ml⁻¹ de concentración y en combinación con biopolímeros almidón y goma arábica, para establecer las diferencias entre los tratamientos. En la tabla 11 se muestran los resultados de las variables: diámetro del tallo, longitud de raíz, longitud del tallo, longitud total, peso fresco y peso seco.

Tabla. 11

Medias de las variables biométricas diámetro del tallo, longitud de raíz, longitud de tallo, longitud total, peso fresco y peso seco de plantas de tomate. Medias con la misma literal entre columnas son iguales estadísticamente de acuerdo a Tukey ($P \leq 0.05$)

| N° | TRATAMIENTOS | VARIABLES BIOMÉTRICAS | | | | | |
|-----|--------------------------|-----------------------|--------------------|---------------------|---------------------|-----------------|---------------|
| | Descripción | Diámetro Tallo (cm) | Longitud Raíz (cm) | Longitud Tallo (cm) | Longitud Total (cm) | Peso Fresco (g) | Peso Seco (g) |
| T1 | Testigo sano | 0.41 cde | 6.50 ab | 53.6 ab | 60.9 ab | 10.27 abc | 0.93 ab |
| T2 | Testigo enfermo | 0.39 bcd | 6.38 ab | 56.4 abc | 62.8 ab | 11.49 bcd | 0.89 a |
| T3 | Bs 10^6 + Almidón | 0.44 de | 6.62 ab | 58.5 abcd | 65.1 abc | 11.27 bcd | 1.08 abc |
| T4 | Bs 10^6 + Goma arábica | 0.49 e | 6.25 ab | 62.0 bcd | 68.2 bc | 13.99 de | 1.44 d |
| T5 | Th 10^6 + Almidón | 0.41 cde | 6.75 b | 66.5 d | 73.2 c | 15.30 e | 1.51 d |
| T6 | Th 10^6 + Goma arábica | 0.40 cde | 6.75 b | 63.6 cd | 70.4 bc | 12.88 cde | 1.45 d |
| T7 | Bs 10^8 + Almidón | 0.28 a | 4.88 a | 62.6 cd | 67.5 abc | 7.07 a | 1.26 bcd |
| T8 | Bs 10^8 + Goma arábica | 0.33 abc | 5.88 ab | 52.6 a | 58.5 a | 9.07 ab | 1.37 cd |
| T9 | Th 10^8 + Almidón | 0.30 ab | 6.25 ab | 57.9 abcd | 64.1 abc | 9.02 ab | 1.20 abcd |
| T10 | Th 10^8 + Goma arábica | 0.24 a | 5.12 ab | 64.8 cd | 69.9 bc | 10.05 abc | 1.42 d |

Diámetro del Tallo

El análisis de varianza detectó diferencias altamente significativas (valor-P= 6.91×10^{-10} , F=18.3) entre tratamientos. El mayor diámetro lo consiguió T4 con 0.49 cm, logrando aumentar en un 20% el diámetro en comparación al testigo sano. Los diámetros de menor longitud estuvieron en T7 y T10 con 0.28-0.24 cm respectivamente (Fig.18A).

Longitud de Raíz

La variable fenológica longitud de raíz (LR) varió de 4.88 cm en el T7 a 6.75 cm en T5 y T6, estos último no difieren de forma estadística, pero presentan el valor más alto y un aumento de longitud 3.8% respecto a testigo sano. El análisis de varianza detectó diferencias significativas entre tratamientos (valor-P=0.01, F=3.062). La prueba de Tukey indica que T5 y T6, fueron mejores al incrementar la longitud de raíz y la menor longitud está en T7 los demás tratamientos no difieren estadísticamente (Fig.18B).

Longitud del Tallo

El análisis de varianza determinó diferencias altamente significativas entre tratamientos (valor-P= 3.77×10^{-15} , F=6.60). La prueba de medias indica que T5 (66.5) presentó la mayor longitud del tallo superando un 24% al testigo sano así también T6 (63.6), T7 (62.6) y T10 (64.8) que, aunque tienen medias similares fueron superiores al testigo, no así T8 con el menor valor de 52.6 (Fig.18C).

Longitud Total

En este caso el análisis de varianza detectó diferencias altamente significativas entre tratamientos (valor-P= 2.00×10^{-4} , F=5.42). La prueba de medias indica que T5 (73.2%) presentó la mayor longitud de las plantas de tomate logrando un aumento del 20% más que en comparación al testigo sano (Fig.18D). Ocurre lo opuesto con T8 que presentó el menor valor (58.5), seguido de T1 (60.9) y T2 (62.8).

Peso Fresco Total

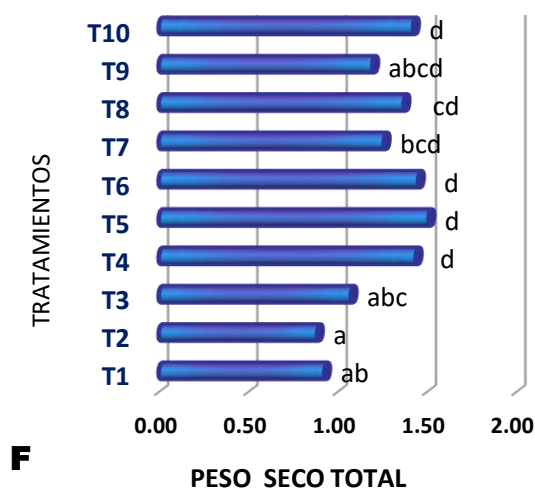
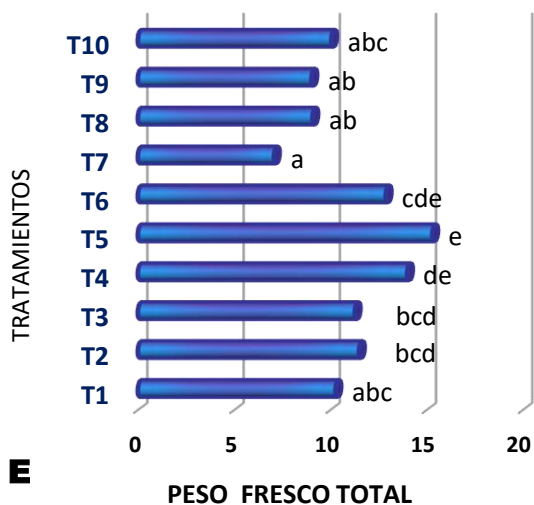
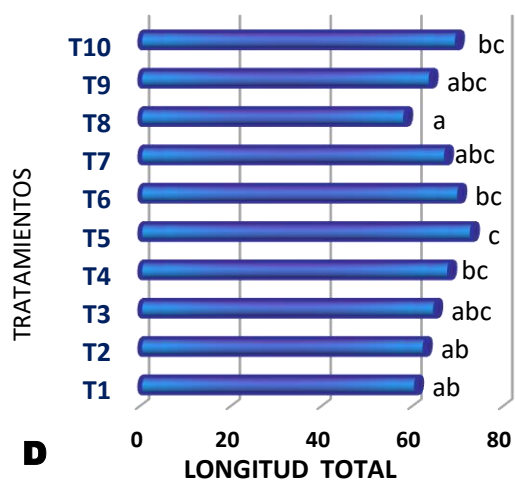
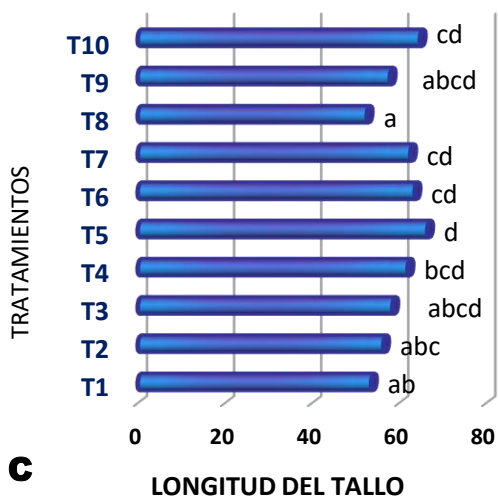
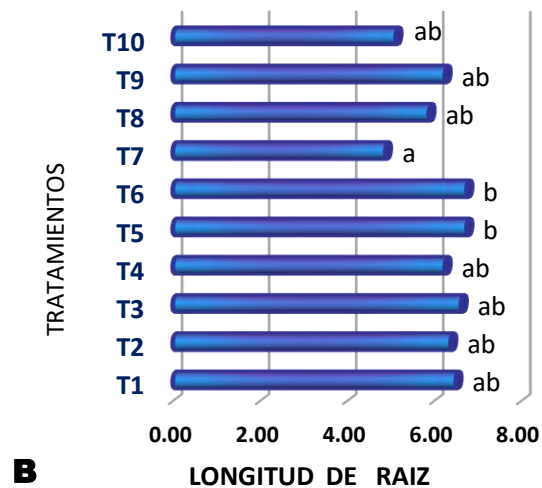
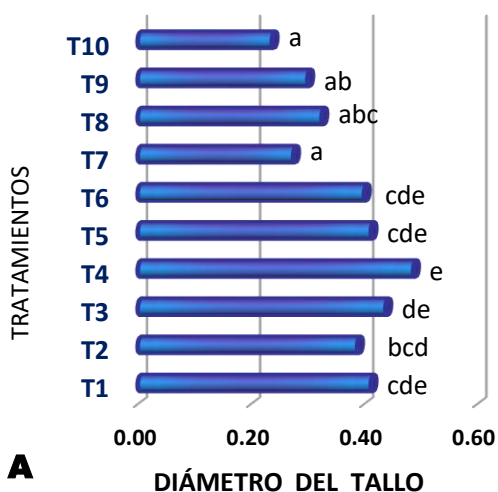
Todos los tratamientos mostraron efecto sobre la variable biométrica peso fresco, la cual varió de 7.07 g en T7 a 15.30 g en T5. El análisis de varianza detectó diferencias altamente significativas entre tratamientos (valor-P= 2.30×10^{-7} , F=11.06). La prueba de medias muestra que T5 estadísticamente tuvo el mayor peso fresco superando en 49% al testigo sano, todo lo contrario, resultó con T7 (7.07), T8 (9.07) y T9 (9.02) al tener el menor peso (Fig.18E).

Peso Seco Total

Todos los tratamientos mostraron efectos sobre la variable biométrica peso seco. la cual varió de 0.89 g en T2 a 1.51g en T5. El análisis de varianza detectó diferencias altamente significativas (P<0.05) entre tratamientos (valor-P= 7.15×10^{-7} , F=9.94). La prueba de Tukey indica que T4 (1.44), T5 (1.51), T6 (1.45) y T10 (1.42) son estadísticamente similares en sus medias, al aumentar el contenido de biomasa en las plantas de tomate (Fig.18F).

Figura. 18

A) Diámetro del tallo; B) Longitud de raíz; C) Longitud del tallo; D) Longitud total; E) Peso fresco; F) Peso seco. Letras distintas indican que existen diferencias significativas ($p=0.05$) entre tratamientos por el test de Tukey.



9 DISCUSIÓN

El tomate es un cultivo de importancia mundial por su alto contenido nutricional y valor alimenticio; sin embargo, es preocupante el bajo rendimiento de la cosecha debido a la marchitez vascular causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. En esta investigación se aislaron especies de *Fusarium* a partir de plantas de tomate con síntomas de marchitez; la capacidad infectiva se determinó practicando los postulados de Koch mediante pruebas de patogenicidad, las cuales evidenciaron que el aislado FM1 coincidió con los síntomas que expresa *Fol*, ya que de esta manera Córdova-Zapata (2003); Jamil et al. (2021); Maurya et al. (2020) y Srivastava et al. (2010) demostraron en sus respectivas investigaciones que los *Fusarium oxysporum* aislados pertenecían a la forma especial “*lycopersici*”. Un factor clave para el desarrollo de la enfermedad en las plantas de tomate es la temperatura de incubación, algunos estudios reportan que la temperatura óptima en el suelo para que *Fol* exprese la virulencia es de 28 °C, hasta un máximo de 33 °C y mínimo de 20 °C (Boix-Ruíz et al., 2015; Clayton, 1923; Ibrahim & Baghdadi, 2003). En este caso la temperatura ambiental promedio de los ensayos fue de 27-30°C, valores adecuados para la expresión de los síntomas de la enfermedad en las plantas de tomate CENTA-CUSCATLÁN.

Mediante la prueba de antagonismo dual se evidenció la eficacia de la cepa comercial *B. subtilis* al reducir la tasa de crecimiento micelial e inhibir 72.7% el crecimiento *in vitro* del patógeno *Fol* a los 8 días de incubación, de igual forma Ramyabharathi et al. (2016), evaluaron la capacidad de *B. subtilis* EPCO16, al inhibir en un 44% el crecimiento micelial de *Fol*, gracias a los antibióticos que la bacteria produce. La habilidad de las especies de *Bacillus* para inhibir a *F. oxysporum* se ha reportado en muchas ocasiones (Jangir et al., 2018; Ramírez-Cariño et al., 2020; Xu et al., 2020; Zhao et al., 2014), como también su capacidad contra múltiples fitopatógenos (Liu et al., 2016; Wang et al., 2003). En este sentido Sotoyama et al. (2016), demostraron que la suspensión y el filtrado de *B. amiloliquefaciens* IUMC7 inhibió la germinación de conidios de *Fol*, esto se correlaciona bien con Boubakri et al. (2015), quienes confirman que las sustancias filtradas de las cepas Bs1 y Bs2 de *B. subtilis* redujeron el crecimiento de *Botrytis cinérea*; mientras que Slama et al. (2019), consideran a *B. halotolerans* un guardián contra la fusariosis en las plantas. Por otro lado se verificó la efectividad de 22 cepas de *B. subtilis* en la inhibición del crecimiento micelial de *F. oxysporum* (en un rango de 17-48%) y de *F. graminearum* (Zhang et al., 2009). Del mismo modo se reportó en Diabankana et al. (2021), que la cepa *B. mojavensis* PS17 ejerció inhibición contra varios patógenos, entre ellos *Fusarium* sp. y *A. pisi*. En Kejela et al. (2017), a

través de ensayos de cultivo dual encontraron que 40 aislamientos de *Pseudomonas* sp. y el aislado PT11 inhibieron en un 72% a *Fusarium oxysporum* mientras que un 70% a *C. gloeosporoides*, situación similar informaron Jangir et al. (2018), cuando el antagonista presentó una alta tasa de inhibición de 79.37 a 87.5%. Para Zhu et al. (2020), las altas tasas de inhibición son directamente proporcionales a una mejor formulación, que se traduce en una mayor densidad celular con la consecuente producción de metabolitos secundarios. Uno de los mecanismos antagónicos empleados por estas bacterias es la liberación de compuestos volátiles, tal como se evidenció en De la Cruz-López et al. (2022); He et al. (2020); Ramírez et al. (2022); Zhang et al. (2020), dentro de los compuestos volátiles está el dimetilsulfóxido, 1-butanol y 3-hidroxi-2-butanona (o acetoína) (Lim et al., 2017), la producción de fitohormonas como el ácido indol-3-acético o los sideróforos que son moléculas que facilitan la absorción de hierro en las plantas (Knežević et al., 2021). Otras de las sustancias producidas son los lipopéptidos que ya han sido extraídos en cultivos de *B. subtilis* (Cossus et al., 2021), La capacidad de inhibir patógenos está relacionada con la habilidad para producir metabolitos secundarios con propiedades antimicrobianas Keswani et al. (2020).

El ensayo de antagonismo *in vitro* evidenció también la capacidad antagónica de *Trichoderma harzianum*, que redujo en un 52.9% el crecimiento de las hifas de *Fol* en cultivo dual, y mostró hiperparasitismo creciendo por encima del micelio del patógeno reemplazándolo progresivamente, con la consecuente degradación de las hifas por la producción de sustancias antifúngicas, aunque la reducción con este tratamiento fue menor; este modo de acción es algo distinto a lo que la cepa *B. subtilis* pudo realizar. Un efecto similar se obtuvo al aislar cepas de *Trichoderma*, siendo el aislado Th-8 (*T. harzianum*) quien presentó una inhibición significativa 53% sobre *Fol*, atribuyendo el efecto inhibitorio a la competencia y/o antibiosis (Maurya et al., 2020), así también Babychan & Simon (2017), encontraron que el crecimiento micelial radial de *Fol in vitro* era inhibido en un 58.4% por el aislado *Trichoderma* MiT-4, mientras que Cubilla-Ríos et al. (2019), obtuvieron inhibición entre 55.6 a 52.8%. Por otra parte Michel-Aceves et al. (2009), evaluaron a *Trichoderma* sp. e indicaron valores de PICR en intervalos de 16.4. a 77.8% para *Fol* y de 13.1 a 94.4% para *S. rolfsii*, estos resultados concuerdan con Carmona (2019), que evaluó elicitores fúngicos en la reducción de la marchitez del tomate. El ensayo de antagonismo *in vitro* con cepas de *Trichoderma* indicó que el producto Tricotec produjo el PICR más alto 56% en comparación a las otras cepas. Por otra parte Badawy & Rabea (2011), evidenciaron una inhibición en las distintas etapas de desarrollo del patógeno; a saber: durante el

crecimiento, esporulación, viabilidad, germinación de esporas y en última instancia la producción de factores de virulencia fúngica. Posteriormente en Bhujbal et al. (2021), los agentes biológicos *Trichoderma* sp. redujeron el crecimiento del patógeno en un 61.49-84.84%, seguido de *B. Subtilis* 79.25% y *P. fluoreces* 62.36%. El efecto hiperparasítico de *Trichoderma* sp. fue notorio cuando invadió el micelio del patógeno en Martínez-Martínez et al. (2020).

En las interacciones antagónicas de *Trichoderma* spp. los mecanismos principales se basan en la competencia por nutrientes y espacio, el micoparasitismo, la antibiosis, secreción de metabolitos secundarios para el crecimiento y defensa vegetal (de Aguiar et al., 2014; Hernández-Melchor et al., 2019; Sandle, 2014; Vargas-Hoyos & Gilchrist-Ramelli, 2015), siendo el micoparasitismo el modo de acción mayormente empleado por estas especies, el cual inicia cuando el antagonista reconoce al hospedante y se une a las hifas mediante apresorios, posteriormente degrada la pared celular mediante la secreción de enzimas, principalmente quitinasas, β -1,3-glucanasas, celulasas, proteasas y fosfatasas (Qualhato et al., 2013), también provocan la retracción de la membrana plasmática y la desorganización del citoplasma e inhiben la germinación de esporas y la elongación del tubo germinativo (Romero-Cortes et al., 2016). La agresividad para micoparasitar y la velocidad de crecimiento que debe ser superior al patógeno, es una cualidad importante para la selección de cepas promisorias de *Trichoderma* (Guédez et al., 2012).

Los resultados de este estudio indican la efectividad del biocebado de semillas con agentes de control biológico más adhesivos para inducir la germinación de semillas de tomate var. CENTA CUSCATLÁN que se encuentran en entornos infectados por *Fol*. Por ejemplo, en el bioensayo *in vitro* el biocebado con *T. harzianum* 10^8 esp/ml⁻¹ y Almidón (T9) estimuló un 60% de la germinación de semillas de tomate. Un resultado distinto fue en el bioensayo *in vivo* ya que T6 que consistió en *T. harzianum* 10^6 esp/ml⁻¹ más Goma Arábica logró que el 100% de semillas germinaran, esto indica que el éxito de la germinación depende del tipo de microorganismo más el biopolímero empleado durante el biocebado, y que concentraciones altas de inóculo no necesariamente mejoran los parámetros; ya que se puede conseguir buenos resultados con concentraciones bajas de producto, tal como ocurrió en el caso de *T. harzianum* 10^6 esp/ml⁻¹ y Almidón (T5) que logró incrementos en las variables fenológicas: diámetro del tallo, largo de raíz, longitud del tallo, longitud total, peso fresco y peso seco. Esto concuerda con la investigación de Pullupaxi (2016), quien evaluó cepas de *Trichoderma lignorum* y *T. harzianum* evidenciando el

biocontrol ejercido por este último en *Fusarium oxysporum* en el cultivo de tomate riñón, pues presentó mejores resultados en cuanto las variables: porcentaje de incidencia, diámetro del tallo, número de flores, altura de la planta y longitud del tallo; también en Srivastava et al. (2010), semillas de tomate impregnadas con *T. harzianum* y *P. fluorescens* (individualmente y en combinación) aplicando el inóculo en polvo (portador) o aglutinante (goma arábica) consiguieron disminuir el tiempo de germinación, aumento en la tasa de germinación y reducción de la incidencia de marchitez por *Fusarium spp.* tanto en maceta y a nivel de campo. El porcentaje de germinación *in vitro* fue altamente efectivo con semillas de okra recubiertas con *T. harzianum* suplementado con 2% de almidón (p/v) como adhesivo y concluye que podría ser una alternativa para reducir las pérdidas por la geminación tardía (Mukhtar, 2008). Por otro lado Moghaddam et al. (2019), mencionan que el biocebado de semillas con *Trichoderma* y *Pseudomonas* incrementó el porcentaje de germinación, tasa de germinación y los índices de vigor en condiciones óptimas y de estrés por sequía. Las inoculaciones con *Trichoderma* y la estimulación de crecimiento e incrementos en la productividad han sido observados en especies como clavel, rábano, tomate, lechuga, maní, frijol, entre otros (Ayyandurai et al., 2021; Gravel et al., 2007; Gupta et al., 2014; Hoyos, 2011). En este sentido, aplicar consorcios microbianos (*Trichoderma harzianum*, *Azospirillum lipoferum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizobium spp.*, *Bacillus spp.*, etc.) beneficiosos mejora las propiedades del suelo, el crecimiento de las plantas y la actividad simbiótica de los microorganismos (Javaid, 2010; Sarkar et al., 2020), la aplicación combinada de *Pseudomonas aeruginosa*, *T. harzianum*, y *Mesorhizobios sp.* usando goma arábica como ligante en semillas, fueron eficaces para promover el crecimiento vegetal y biosíntesis de ácido fenólico en garbanzos infectados con el patógeno *Sclerotium rolfsii* en comparación a la inoculación individual y control sin inocular (Singh et al., 2014). Del mismo modo al recubrir semillas de tomate con consorcios formulados a base de *Trichoderma parareesei* + *Pseudomonas fluorescens* + *Bacillus subtilis* + *Azotobacter chroococcum* se redujo de forma significativa la incidencia de la marchitez causada por *Ralstonia solanacerarum* y condujo a mayor rendimiento de fruto (Nath et al., 2016).

Trichoderma sp. es un hongo ampliamente utilizado para el recubrimiento de semillas por sus múltiples beneficios para controlar agentes patógenos como *Fusarium spp.* (Babychan & Simon, 2017; Sivan et al., 1987; Sivan & Chet, 1986) en condiciones de invernadero y campo. Es importante recalcar que son capaces de aumentar el crecimiento temprano y la vegetación de

plántulas en condiciones óptimas y bajo estrés, reduciendo la producción de etileno derivada de la reducción del precursor del ácido 1-aminociclopropano 1-carboxílico (Fazeli-Nasab et al., 2022; Fazeli-Nasab & Sayyed, 2019) y la producción de auxinas (Contreras-Cornejo et al., 2009). Es conocido que los agentes de biocontrol activan la resistencia sistémica inducida (ISR) en plantas infectadas, fortaleciendo el sistema inmunitario para resistir las enfermedades (Abdelrahman et al., 2016), esto se logra al liberar metabolitos secundarios (Keswani et al., 2016). La producción de metabolitos secundarios mediada por este agente, juega un papel crucial en la fisiología vegetal, por ejemplo *Trichoderma* sp. estimula el crecimiento de las plantas por la síntesis de Ácido Indol Acético y giberelinas (AIA, GA3), disminuye el nivel de etileno cuando coloniza la raíz (Harman, 2011; López-Bucio et al., 2015; Paramanandham et al., 2017; Prasad et al., 2020). El mecanismo directo por el cual promueve el crecimiento de las raíces, tallos y área foliar en plantas de tomate es a través de la inducción en los niveles de AIA y GA3 (Cai et al., 2015; Olowe et al., 2022), induce el crecimiento temprano en las plantas (Eltlbany et al., 2019) e incrementa la germinación de semillas de tomate y produce ácido harzianico (Vinale et al., 2013). La mejora en el crecimiento y rendimiento también está influenciada por la producción de sustancia antifúngicas como Trichodermina (Balode, 2010), endoquitinasas, β -glucosidasa, α -1,3-glucanasa (Monteiro et al., 2011). Este microorganismo tiene la capacidad de entrar en las raíces de las plantas y vivir como endófito; esto mejora aspectos como el peso fresco y seco de las plantas de tomate (Kleifeld & Chet, 1992) y facilita la absorción de nutrientes de la planta huésped (Chaudhary & Shukla, 2018; Iqbal & Mukhtar, 2020; Li et al., 2018) lo cual se logra cuando *T. harzianum* suprime la patogenicidad de *Fol* por lo que la planta puede absorber sin ningún problema los nutrientes. La acción del patógeno se restringe al producir fenol que conduce a la lignificación-suberización (Abd-El-Khair et al., 2019; Abo-Elyousr et al., 2008), así también la resistencia sistémica puede aumentar con un cambio en el pH del citoplasma de la célula vegetal hospedante, por el aumento en el contenido fenólico, lo que inhibe el desarrollo de patógenos (Benhamou et al., 2000).

El biocebado con *Bacillus subtilis* 10^8 esp/ml⁻¹ más goma arábica como aglutinante (T8), mejoró la germinación de semillas de tomate CENTA CUSCATLÁN reduciendo el tiempo de germinación y la velocidad de germinación fue superior. Así también se evidenció la eficacia de esta bacteria al mejorar la germinación y vigor de plántulas de berenjena, algodón, pepino (Podile & Dube, 1988), okra (El-Mohamedy, 2004), guisante (El-Mohamedy & Abd

El-Baky, 2008), sorgo (Prathibha & Siddalingeshwara, 2013), mijo perla (Saxena et al., 2013) y tomate (Bellishree et al., 2014). En otro estudio el recubrimiento de semillas de tomate con *B. subtilis* 10^5 ml⁻¹ suplementado con goma arábica al 3% favoreció los parámetros de crecimiento, inhibió *in vitro* a *R. solani*, redujo la pudrición de la raíz, e indujo la expresión de genes relacionados con la defensa en la planta (Rashad et al., 2022), situación similar ocurrió cuando se probó un producto de *Bacillus subtilis* y aplicó como microcápsulas en plantas de tomate previamente infectadas con *F. oxysporum* evidenciando la capacidad antagonista de la bacteria, promoción del crecimiento vegetal y reducción de la severidad del patógeno en pruebas *in vivo* e *in vitro* (Valencia, 2018). Mejores resultados en porcentaje de germinación, velocidad de germinación, longitud total de plántula, longitud de brotes menos características anormales en plántulas de lechuga se obtuvieron con semillas cebadas con 0.4% *B. subtilis* durante 12 h (Kangsopa et al., 2021). La inoculación de *B. subtilis* 10^4 en dos variedades de trigo aumentó la tolerancia al estrés por sequía inducida, disminuyó el impacto negativo en la germinación y crecimiento de los cultivares, indujo un aumento en los niveles de clorofila fotosintética (Chl) a, Chl b y carotenoides (Car) en las hojas, promovió la elongación y acumulación de biomasa, tanto en condiciones normales como de sequía en el trigo del cv. E70 (Lastochkina et al., 2020). En el estudio de Jalapathi et al. (2018), semillas de berenjena biocebadadas con *Bacillus subtilis* 8% durante 6 h, presentaron un mejor desempeño al aumentar la velocidad y porcentaje de germinación, longitud del brote, longitud de raíz, índice de vigor, producción de biomasa y aumento en la población de biocontrol. Cuatro cepas de *Bacillus* 10^8 cel/ml⁻¹ fueron probadas en cultivos de maíz, tomate y zanahoria las cuales mostraron un efecto estimulador de la germinación de las semillas de maíz, presentando mayor porcentaje e índice de germinación y vigor; destacando las cepas RM5, RC9 y RC15, pero en tomate y zanahoria los resultados fueron variables (Rojas-Badía et al., 2020). Bajo condiciones de salinidad, el biocebado mejoró el porcentaje de germinación de semillas y el crecimiento de rábano y trigo (Lastochkina et al., 2017; Lutts et al., 2016).

Bacillus subtilis es una rizobacteria que promueve el crecimiento, germinación y desarrollo de las plantas, es cosmopolita, por lo que se encuentra en las raíces y suelo sin causar daño, por el contrario la presencia de este microorganismo beneficia mucho a las plantas, por ello Gómez-Molina et al. (2017), proponen la aplicación como inóculo en cultivos como alternativa para disminuir el uso de fertilizantes, presentan potencialidades para ser utilizados como

promotores de la germinación y sus capacidades fisiológicas (Araujo et al., 2012). Un aspecto interesante es que promueve el crecimiento en plantas de tomate incluso si están infectadas con patógeno, esto de acuerdo a lo informado por Gohil et al. (2022), pues la aplicación de *B. subtilis* estimuló el crecimiento en plantas de maní. Se ha informado que el compuesto promotor del crecimiento es la producción del compuesto bioactivo 2,3-butanodiol (Wu et al., 2019). Así también esta bacteria produce alrededor de 200 antibióticos con estructuras y potencialidades variables, y que los modos de acción incluye competencia por el espacio y/o los nutrientes además de la antibiosis, a través de la producción de un conjunto diverso de antifúngicos volátiles y no volátiles y/o enzimas antifúngicas (Fadiji & Babalola, 2020; Sansinenea & Ortiz, 2011), gracias a esto y a la producción de fitohormonas, la inducción en la resistencia sistémica y tolerancia a estrés se logra la estimulación en el crecimiento a través de la disponibilidad mejorada de los macro/microelementos (fijación de nitrógeno, solubilización de fosfato, secuestro de hierro) (Egamberdieva et al., 2017; Lastochkina et al., 2019; Singh et al., 2015).

10 CONCLUSIONES

- Se aisló una cepa infectiva de marchitez vascular en plantas de tomate var. CENTA CUSCATLÁN identificada molecularmente y mediante pruebas de patogenicidad como *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.
- *Bacillus subtilis* presentó mayor porcentaje de inhibición sobre *Fol* (65.3, 70.3 y 72.7%), a los 2, 6 y 8 días de enfrentamiento, por el contrario, *Trichoderma harzianum* tuvo menor antagonismo *in vitro* (30.4, 39.7 y 52.9%) a los 2, 6 y 8 días de evaluación.
- Los biocontroladores y biopolímeros fueron efectivos para la germinación de semillas de tomate var. CENTA CUSCATLÁN. Un 60% de germinación *in vitro* se logró en T9 (*T. harzianum* 10^8 esp/ml⁻¹ + Almidón) y el 100% de la germinación *in vivo* con T6 (*T. harzianum* 10^6 esp/ml⁻¹ + Goma arábica). Las variables largo de raíz, largo del tallo, longitud total, peso fresco y peso seco aumentaron con el tratamiento T5 (*T. harzianum* 10^6 esp/ml⁻¹ + Almidón) y T4 (*B. subtilis* 10^6 esp/ml⁻¹ + Goma arábica) favoreció incremento en el diámetro del tallo.

11 RECOMENDACIONES

- Aislar cepas nativas de *T. harzianum* y *B. subtilis* del suelo o raíces para evaluar el antagonismo presentado sobre *Fol* en comparación a las cepas comerciales de los biopreparados empleados en este trabajo.
- Biocebar semillas de tomate var. CENTA CUSCATLÁN con *T. harzianum* 10^6 esp/ml⁻¹ más Goma arábica (T6), para obtener mayores porcentajes de germinación, lo cual también contribuirá al control de *Fol* y a la reducción de la incidencia de la marchitez vascular.
- Aplicar biocebado a semillas de tomate var. CENTA CUSCATLÁN con *T. harzianum* 10^6 esp/ml⁻¹ más Almidón (T5) para lograr mejores parámetros de crecimiento en el cultivo de tomate.
- Determinar la efectividad de los biopreparados para la reducción de la marchitez vascular causada por *Fol* en plantas de tomate CENTA CUSCATLÁN en condiciones de campo.
- Realizar ensayos sobre el efecto producido por los factores concentración, tiempo de biocebado, tipo de biopolímero y biocontrolador en la germinación de semillas y rendimiento del cultivo de tomate.
- Continuar con estudios enfocados en el biocebado de semillas para una agricultura integral y sostenible ante los requerimientos exigentes del ambiente.

12 REFERENCIAS

- Abd-El-Khair, H., Elshahawy, I. E., & Haggag, H. E. K. (2019). Field application of *Trichoderma* spp. Combined with thiophanate-methyl for controlling *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* in dry bean. *Bulletin of the National Research Centre*, 43(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0062-5>
- Abdelrahman, M., Abdel-Motaal, F., El-Sayed, M., Jogaiah, S., Shigyo, M., Ito, S., & Tran, L.-S. P. (2016). Dissection of *Trichoderma longibrachiatum*-induced defense in onion (*Allium cepa* L.) against *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Cepa* by target metabolite profiling. *Plant Science*, 246, 128-138. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.02.008>
- Abo-Elyousr, K. A. M., Hussein, M. A. M., Allam, A. D. A., & Hassan, M. A. H. (2008). Enhanced Onion Resistance against *Stemphylium* leaf blight disease, caused by *stemphylium vesicarium*, by di-potassium phosphate and benzothiadiazole treatments. *The Plant Pathology Journal*, 4(2), 171-177.
- Accinelli, C., Abbas, H. K., Little, N. S., Kotowicz, J. K., & Shier, W. T. (2018a). Biological control of aflatoxin production in corn using non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* administered as a bioplastic-based seed coating. *Crop Protection*, 107, 87-92. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.02.004>
- Accinelli, C., Abbas, H. K., & Shier, W. T. (2018b). A bioplastic-based seed coating improves seedling growth and reduces production of coated seed dust. *Journal of Crop Improvement*, 32(3), 318-330. <https://doi.org/10.1080/15427528.2018.1425792>
- Acosta-Ovallos, A. K. A. (2019). *Evaluación de técnicas de conservación para microorganismos de importancia en microbiología industrial en el Cepario de la Universidad de Santander* [Tesis de Grado]. Universidad de Santander.
- Adhikary, S., Naskar, M., & BISWAS, B. (2021). Seed priming -one small step for farmer, one giant leap for food security: I application and exploration. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 10, 409-412. <https://doi.org/10.22271/phyto.2021.v10.i1f.13340>
- Agrios, G. N. (1996). *Fitopatología* (2^a). Limusa.
- Agrios, G. N. (1997). *Plant Pathology* (4th ed.). Academic Press.
- Agrios, G. N. (2005). *Fitopatología* (2^a). LIMUSA.
- Ajourri, A., Asgedom, H., & Becker, M. (2004). Seed priming enhances germination and seedling growth of barley under conditions of P and Zn deficiency. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 167(5), 630-636. <https://doi.org/10.1002/jpln.200420425>
- Alcazar-Esquinas, J. T. (1981). *Genetics Resources of Tomatoes and Wild Relatives*. International Board for Plant Genetic Resources.
- Alexander, L. J., & Hoover, M. M. (1955). Disease resistance in wild species of tomato. *Ohio Agricultural Experiment Station, Research Bulletin* 752, 76.
- Alexander, L. J., & Tucker, C. M. (1945). Physiological specialization in the tomato wilt fungus *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Lycopersici*. *Journal of Agricultura Research*, 70(9), 303-313.
- Altomare, C., Norvell, W. A., Björkman, T., & Harman, G. E. (1999). Solubilization of Phosphates and Micronutrients by the Plant-Growth-Promoting and Biocontrol Fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(7), 2926-2933. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.7.2926-2933.1999>
- Amaral, D. O. J. do, Lima, M. M. de A., Resende, L. V., & Silva, M. V. da. (2008). Differential gene expression, induced by salicylic acid and *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Lycopersici*

- infection, in tomato. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43(8), 1017-1023. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2008000800010>
- Amutha, M. (2017). Establishment of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin as an Endophyte in Cotton. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(6), 2506-2513. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.606.298>
- Ángel, D. I. (2006). *Evaluación de técnicas de conservación para hongos filamentosos y levaduriformes en el cepario de la Pontificia Universidad Javeriana* [Tesis de Grado]. Pontificia Universidad Javeriana.
- Antoun, H. (2013). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. En *Brenner's Encyclopedia of Genetics* (pp. 353-355). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.01169-4>
- Aperce, C. (2008). *Interaction of Bacillus spp. And Salmonella enterica serovar typhimurium in immune/inflammatory signaling from swine intestinal epithelial cells* [Master of Science]. Kansas State University.
- Araujo, F. F. D., Souza, E. C., Guerreiro, R. T., Ma, L., & Guaberto, C. (2012). Diversity and growth-promoting activities of *Bacillus* sp. In maize. *Revista Caatinga*, 25(1), 1-7.
- Arbeláez-Torres, G. (2000). Algunos aspectos de los hongos del genero *Fusarium* y de la especie *Fusarium oxysporum*. *Agronomía Colombiana*, 17(1-3), 11-16.
- Ariza, Y., & Sánchez, L. (2012). Determinación de metabolitos secundarios a partir de *Bacillus subtilis* efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. *Nova*, 10(18), 149-155.
- Armstrong, G. M., & Armstrong, Joanne. K. (1981). Formae speciales and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. En *Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy* (Nelson, P.E., Tousson, T.A., Cook, R.J). Pennsylvania State University Press, University Park, London.
- Arreaza, J. M. (2001). Evaluación de azoxystrobin en el control de la candelilla temprana (*Alternaria solani*) en el cultivo de tomate. *Rev. Fac. Agron.*, 11.
- Arvayo-Ortiz, R. M., Esqueda, M., Acedo-Felix, E., Sánchez, A., & Gutiérrez, A. (2011). Morphological Variability and Races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *Ciceris* Associated with Chickpea (*Cicer arietinum*) Crops. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 6(1), 114-121. <https://doi.org/10.3844/ajabssp.2011.114.121>
- Ascencio-Álvarez, A., López-Benítez, A., Borrego-Escalante, F., Rodríguez-Herrera, A., Flores-Olivas, A., & Jiménez-Díaz, F. (2008). Marchitez Vascular del Tomate: II. Herencia de la Resistencia a la Raza 3 de *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen en Tres Especies del Género *Lycopersicon*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 26(2), 4.
- Ayer, W. A., & Adams, P. B. (1981). Microparasitism and Its Application to Biological Control of Plant Diseases. *Sec Ref.* 117, 91-93.
- Ayyandurai, M., Akila, R., Manonmani, K., Theradimani, M., & Vellaikumar, S. (2021). Phytostimulation and growth promotion activities of *Trichoderma* spp. On groundnut (*Arachis hypogaea* L.) crop. *Journal of Applied and Natural Science*, 13(4), 1172-1179. <https://doi.org/10.31018/jans.v13i4.2936>
- Babychan, M., & Simon, S. (2017). Efficacy of *Trichoderma* spp. Against *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Lycopersici*. (FOL) infecting pre-and post-seedling of tomato. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(4), 616-619.
- Badalyan, S. M., Innocenti, G., & Garibyan, N. G. (2004). Interactions between xylophilic mushrooms and mycoparasitic fungi in dual-culture experiments. *Phytopathologia Mediterranea*, 43(1), 44-48.

- Badawy, M. E. I., & Rabea, E. I. (2011). A Biopolymer Chitosan and Its Derivatives as Promising Antimicrobial Agents against Plant Pathogens and Their Applications in Crop Protection. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 1-29. <https://doi.org/10.1155/2011/460381>
- Báez-Valdez, E. P., Carrillo-Fasio, J. A., Báez, M. A., García-Estrada, R. S., Valdez-Torre, J. B., & Contreras-Martínez, R. (2010). Del Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) en Condiciones de MallaSombra. *Revista mexicana de fitopatología*, 28(2), 111-122.
- Bai, Y. M., Pan, B., Charles, T. C., & Smith, D. L. (2002). Co-inoculation dose and root zone temperature for plant growth promoting rhizobacteria on soybean *Glycine max* (L.) Merr grown in soilless media. *Soil Biology & Biochemistry*, 34, 1953-1957.
- Bale, J. S., van Lenteren, J. C., & Bigler, F. (2008). Biological control and sustainable food production. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1492), 761-776. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2182>
- Balode, A. (2010). Effect of trichodermin, biological product against Botrytis in horticultural crops. *Acta Horticulturae*, 877, 1583-1588. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.877.218>
- Barnett, H. L., & Hunter, B. B. (1998). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi* (4th ed.). The American Phytopathological Society.
- Barnett, H. L., & Hunter, B. B. (2006). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi* (4th ed.). The American Phytopathological Society Press.
- Barsuto-Cadena, M. G., Vásquez-Arista, M., Font-San Ambrosio, M. I., & García-Jiménez, J. (2006). Estudio de la actividad in vitro de *Bacillus subtilis* frente a los hongos patógenos de fresón *Fusarium verticilloides* y *Rhizoctonia solani*. *Resúmenes del VII Congreso SEAE de Agricultura y Alimentación Ecológica*, 9.
- Bashan, Y., de-Bashan, L. E., & Donald, L. S. (2010). How the Plant Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum* Promotes Plant Growth—A Critical Assessment. En *Advances in Agronomy* (Vol. 108, pp. 77-136). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(10\)08002-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(10)08002-8)
- Bautista, G. (2000). *Determinación de la asociación y antagonismo contra R. solani de aislamientos nativos de Pseudomonas fluorescens en un cultivo de papa Solanum phuroja en condiciones de invernadero* [Maestría de ínter facultades en Microbiología]. Universidad Nacional de Colombia.
- Bawa, I. (2016). Management Strategies Of Fusarium Wilt Disease Of Tomato Incited By *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Lycopersici* (Sacc.): A Review. *International Journal of Advanced Academic Research*, 2(5), 11.
- Beckers, G. J. M., Jaskiewicz, M., Liu, Y., Underwood, W. R., He, S. Y., Zhang, S., & Conrath, U. (2009). Mitogen-Activated Protein Kinases 3 and 6 Are Required for Full Priming of Stress Responses in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 21(3), 944-953. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.062158>
- Beever, R. E., & Bollard, E. G. (1970). The Nature of the Stimulation of Fungal Growth by Potato Extract. *Journal of General Microbiology*, 60(2), 273-279. <https://doi.org/10.1099/00221287-60-2-273>
- Behie, S. W., & Bidochka, M. J. (2014). Nutrient transfer in plant–fungal symbioses. *Trends in Plant Science*, 19(11), 734-740. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.06.007>
- Behie, S. W., Zelisko, P. M., & Bidochka, M. J. (2012). Endophytic Insect-Parasitic Fungi Translocate Nitrogen Directly from Insects to Plants. *Science*, 336(6088), 1576-1577. <https://doi.org/10.1126/science.1222289>

- Bélanger, R. R., Dufour, N., Caron, J., & Benhamou, N. (1995). Chronological Events Associated with the Antagonistic Properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea*: Indirect Evidence for Sequential Role of Antibiosis and Parasitism. *Biocontrol Science and Technology*, 5(1), 41-54. <https://doi.org/10.1080/09583159550040006>
- Bellishree, K., Girija, G., Ramachandra, Y. L., Archana, S. R., & Chetana, B. S. (2014). Effect of plant growth promoting rhizobacteria (pgpr) on germination, seedling growth and yield of tomato. *International Journal of Recent Scientific Research*, 5(8), 1437-1443.
- Beltrán-Acosta, Camilo R., & Garcés de Granada, E. (2005). Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp., con potencial biocontrolador de *Rhizoctonia solani* Kühn., en papa bajo condiciones de casa de malla. *Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología*, 10, 1-6.
- Benhamou, N., Gagné, S., Le Quére, D., & Dehbi, L. (2000). Bacterial-Mediated Induced Resistance in Cucumber: Beneficial Effect of the Endophytic Bacterium *Serratia plymuthica* on the Protection Against Infection by *Pythium ultimum*. *Phytopathology*, 90(1), 45-56. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.1.45>
- Benítez, T., Rincón, Ana. M., Limón, M. carmen, & Codón, A. C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7, 249-260.
- Bernal, A., Andreu, C., & Moya, M. (2004). *Utilización de Trichoderma spp. Como alternativa ecológica para el control de Fusarium oxysporum sp. Cubense (EF Smith) Snyder & Hans. Cuba*. <http://www.virtualcentr.org/es/enlBTJ%20Tallr/bernalalezander.html>
- Bernal, G., Illanes, A., & Ciampi, L. (2002). Isolation and partial purification of a metabolite from a mutant strain of *Bacillus* sp. With antibiotic activity against plant pathogenic agents. *Electron. J. Biotechnol. [online]*, 5, 7-8.
- Bhargava, Y. R. (1995). Pleiotropic Effect of Seed Pelleting in Controlling Seed Borne Fungal Disease in Brassica oleraceae var. Capitata. *Seed Pathology and Microbiology*, 6, 36.
- Bhujbal, M., Gawade, R., Bachkar, D., Deokar, C., & Daingade, N. (2021). In vitro efficacy of different biological agents against *Fusarium oxysporum* f.sp. *Lycopersici* causing wilt of tomato. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 9(1), 486-489.
- Blancard, D., Marchoux, G., Laterrot, H., & Candresse, T. (2011). *Enfermedades del tomate: Identificar, conocer, controlar*. Mundi-Prensa. <https://library.biblioboard.com/content/15c30315-060e-437f-a7c8-2c2e6b12ae9f>
- Bohn, G. W., & Tucker, C. M. (1940). Studies on *Fusarium* wilt of the Tomato. I immunity in *Lycopersicon pimpinellifolium* Mill. And its inheritance in hybrids. *Research Bulletin. Missouri Agricultural Experiment Station*, 311.
- Boix-Ruiz, A., Gálvez-Patón, L., de Cara-García, M., Palmero-Llamas, D., Camacho-Ferre, F., & Tello-Marquina, J. C. (2015). Comparison of analytical techniques used to identify tomato-pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Phytoparasitica*, 43(4), 471-483. <https://doi.org/10.1007/s12600-014-0444-z>
- Booth, C. (1971). *The genus Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute Kew, Surrey UK.
- Borman, A. M., Szekely, A., Campbell, C. K., & Johnson, E. M. (2006). Evaluation of the Viability of Pathogenic Filamentous Fungi after Prolonged Storage in Sterile Water and Review of Recent Published Studies on Storage Methods. *Mycopathologia*, 161(6), 361-368. <https://doi.org/10.1007/s11046-006-0023-z>
- Bosland, P. W., Prohens, J., & Rodríguez-Burruezo (Eds.). (2010). An American in Spain. En *Avances in genetics and breeding of capsicum and eggplant proceedings of the XIVth EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum & Eggplant, 30 August-1*

- September 2010, Valencia, Spain (pp. 21-29). Editorial de la Universitat Politècnica de València.
- Bost, S. C. (2001). First Report of *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Lycopersici* Race 3 on Tomato in Tennessee. *Plant Disease*, 85(7), 802-802.
- Boubakri, H., Hadj-Brahim, A., Schmitt, C., Soustre-Gacougnolle, I., & Mliki, A. (2015). Biocontrol potential of chenodeoxycholic acid (CDCA) and endophytic *Bacillus subtilis* strains against the most destructive grapevine pathogens. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 43(4), 261-274. <https://doi.org/10.1080/01140671.2015.1049620>
- Bray-Speth, E., Lee, Y. N., & He, S. Y. (2007). Pathogen virulence factors as molecular probes of basic plant cellular functions. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(6), 580-586. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.08.003>
- Brian, P. W., Curtis, P. J., Hemming, H. G., & McGowan, J. C. (1946). The production of viridin by pigment-forming strains of *Trichoderma viride*. *Annals of Applied Biology*, 33(2), 190-200. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1946.tb06297.x>
- Brimner, T. A., & Boland, G. J. (2003). A review of the non-target effects of fungi used to biologically control plant diseases. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 100(1), 3-16. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(03\)00200-7](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(03)00200-7)
- Britania Laboratorios. (2015). *Nutritivo Agar*. Britania. https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a28446b169d8.pdf
- Bron, S., Meima, R., Van Dijl, J., Wipat, A., & Hardwood, C. (1999). Molecular Biology and Genetics of *Bacillus* species. En *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology* (2nd ed., pp. 392-416). American Society for Microbiology (ASM) Press.
- Brookie, K. L., Best, G. I., & Conner, T. S. (2018). Intake of Raw Fruits and Vegetables Is Associated With Better Mental Health Than Intake of Processed Fruits and Vegetables. *Frontiers in Psychology*, 9(487), 1-14. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2018.00487>
- Brown, R. F., & Mayer, D. G. (1988). Representing cumulative germination.1. A critical analysis of single—Value germination indices. *Annals of Botany*, 61(2), 117-125. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a087534>
- Burgess, L. W., & Trimboli, D. (1986). Characterization and Distribution of *Fusarium nygamai*, sp. Nov. *Mycologia*, 78(2), 223. <https://doi.org/10.2307/3793167>
- Caballero, W. A., Senés, P. J., & Toumanián, A. G. (2016). “Evaluación de la capacidad biocontroladora de *Trichoderma atroviride* en el cultivo de garbanzo (*Cicer arietinum* L.)” [Tesis Ingeniería]. Universidad Nacional de Córdoba.
- CABI. (2019). *Datasheet report for Bacillus subtilis*. Invasive Species Compendium Detailed coverage of invasive species threatening livelihoods and the environment worldwide. <https://www.cabi.org/isc/datasheetreport/93011>
- CABI. (2021a). *Datasheet report for Fusarium oxysporum f.sp. Lycopersici (Fusarium wilt of tomato)*. Invasive Species Compendium. <https://www.cabi.org/isc/datasheetreport/24660>
- CABI. (2021b). *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. [Distribution map]. *Distribution Maps of Plant Diseases*, No. October. <https://doi.org/10.1079/DMPD/20113314317>
- Cai, F., Chen, W., Wei, Z., Pang, G., Li, R., Ran, W., & Shen, Q. (2015). Colonization of *Trichoderma harzianum* strain SQR-T037 on tomato roots and its relationship to plant growth, nutrient availability and soil microflora. *Plant and Soil*, 388(1-2), 337-350. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2326-z>

- Cai, G., Rosewich, L., Schneider, R. W., Klister, H. C., Davis, R. M., Elias, K. S., & Miyao, E. M. (2003). Origin of race 3 of *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Lycopersici* at a single site in California. *Phytopathology. Ecology and Population Biology*, 93(8), 1014-1022.
- Caicedo, S. E., & Chacón, J. A. (2017). *Pruebas bajo invernadero de cepas de Bacillus subtilis como agente de biocontrol de Alternaria spp. En Brassica oleracea var italica y técnicas de conservación de cepas* [Tesis Ingeniería]. Universidad Politécnica Salesiana.
- Camero, J., & Linares, M. F. (2013). *Implementación de un protocolo para la conservación de hongos filamentosos con potencial biotecnológico de la colección del laboratorio de química microbiológica de la Pontificia Universidad Javeriana* [Tesis de Grado]. Pontificia Universidad Javeriana.
- Campbell, R. (1989). *Biological Control of Microbial Plant Pathogens*. Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511608612>
- Cárdenas, J. A. V. (2010). *CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA Y PRODUCCIÓN DE Trichoderma harzianum Y Trichoderma viride EN CULTIVO ARTESANAL* [Tesis de Grado, Potinfia Universidad Javeriana]. <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8662/tesis615.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Cardona, Andrés. O. (2018). *Antioquia y Norte de Santander son los departamentos líderes en la producción de tomate* [S.A.S Editorial La República]. Agronegocios. <http://www.agronegocios.co/agricultura/cuales-son-las-regiones-que-mas-producen-tomate-2728689>
- Cardona-Piedrahita, L. F., & Castaño-Zapata, J. (2019). Comparación de métodos de inoculación de *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Lycopersici* (Sacc.) Snyder & Hansen, causante del marchitamiento vascular del tomate. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 43(167), 227. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.854>
- Carmona, S. L. (2019). *Identificación de un aislamiento de Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici y respuesta fisiológica en tomate durante la infección frente a dos elicitores fúngicos* [Tesis Maestría]. Universidad Nacional de Colombia.
- Carreras-Villaseñor, N., Sánchez-Arreguín, J. A., & Herrera-Estrella, A. H. (2012). Trichoderma: Sensing the environment for survival and dispersal. *Microbiology*, 158(1), 3-16. <https://doi.org/10.1099/mic.0.052688-0>
- Carrillo-Fasio, J. A., Montoya-Rodríguez, T. de J., Saúl, R., Cruz-Ortega, J. E., Márquez-Zequera, I., & Sañudo-Barajas, J. (2003). Razas de *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Lycopersici* Snyder y Hansen, en Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en el Valle de Culiacán, Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(2), 123-127.
- Carrión, Á. R. R. (2014). uso de microorganismos antagonistas y sustancias naturales como una alternativa ecológica en el control de enfermedades en cultivos. *Centro de Biotecnología*, 6(5), 34-43.
- Castellanos, L., Gonzáles, M., Santana, T., & Irimia, I. (1995). *Generalización de la producción y uso de Trichoderma spp. Para el control de enfermedades*. 26.
- Castillo-Reyes, F., Hernández-Castillo, F. D., Gallegos-Morales, G., & Flores-Olivas, A. (2015). Efectividad in vitro de *Bacillus* y polifenoles de plantas nativas de México sobre *Rhizoctonia-Solani**. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6(3), 549-562.
- [CCB] Cámara de Comercio de Bogotá. (2015). *Manual: Tomate*. Núcleo Ambiental S.A.S. <https://www.ccb.org.co/content/download/13926/176638/file/Tomate.pdf>

- [CENTA] Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal "Enrique Álvarez Córdova. (2018). Manual de Organización y Funciones. En *Laboratorio de Parasitología Vegetal* (p. 37). CENTA. <http://centa.gob.sv/docs/normativa/MANUAL%20DE%20ORGANIZACION%20Y%20FUNCIONES%202018.pdf>
- Cervera, S. (2011). *Prácticas de microbiología* (2ª. ed). Universidad de la Rioja.
- Cestoni, F., De Jovel, G., & Urquilla, A. (2006). *Perfil de negocios de tomate cherry o cereza hacia el mercado de los Estados Unidos*. Perfil de negocios de tomate cherry o cereza hacia el mercado de los Estados Unidos
- Chatterjee, N., Sarkar, D., Sankar, A., Pal, S., Singh, H. B., Singh, R. K., Bohra, J. S., & Rakshit, A. (2018). On-farm seed priming interventions in agronomic crops. *Acta Agriculturae Slovenica*, 111(3), Article 3. <https://doi.org/10.14720/aas.2018.111.3.19>
- Chaudhary, T., & Shukla, P. (2018). Bioinoculant capability enhancement through metabolomics and systems biology approaches. *Briefings in Functional Genomics*, 18(3), 159-168. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elz011>
- Chaverri, P., Castlebury, L. A., Samuels, G. J., & Geiser, D. M. (2003). Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum/Hypocrea lixii* complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 27(2), 302-313. [https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(02\)00400-1](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(02)00400-1)
- Chaverri, P., & Samuels, G. J. (2002). *Hypocrea lixii*, the teleomorph of *Trichoderma harzianum*. *Mycological Progress*, 1(3), 283-286. <https://doi.org/10.1007/s11557-006-0025-8>
- Chemelli, D. O., Dankers, H. A., & Crosier, B. (1992). First report of *Fusarium oxysporum* f.sp. *Lycopersici* race 3 on tomato in Northwest Florida and Georgia. *Plant Disease*, 76, 861. <https://doi.org/10.1094/PD-76-0861D>
- Chin, J. M., Lim, Y. Y., & Ting, A. S. Y. (2021). Biopolymers for biopriming of Brassica rapa seeds: A study on coating efficacy, bioagent viability and seed germination. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 20(3), 198-207. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2021.01.006>
- Chin, J. M., Lim, Y. Y., & Ting, A. S. Y. (2022). Biopriming *Pseudomonas fluorescens* to vegetable seeds with biopolymers to promote coating efficacy, seed germination and disease suppression. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, S1658077X22000224. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2022.02.002>
- Chisholm, S. T., Coaker, G., Day, B., & Staskawicz, B. J. (2006). Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. *Cell*, 124(4), 803-814. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.008>
- Chowdappa, P., Mohan Kumar, S. P., Jyothi Lakshmi, M., & Upreti, K. K. (2013). Growth stimulation and induction of systemic resistance in tomato against early and late blight by *Bacillus subtilis* OTPB1 or *Trichoderma harzianum* OTPB3. *Biological Control*, 65(1), 109-117. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.11.009>
- Ciampi, L., & Silva, S. (1991). Perspectivas para el Control Biológico de *Botrytis cinerea* en Frambueso. *Revista Aconex*, 31, 5-10.
- Clayton, E. E. (1923). The Relation of Temperature to the *Fusarium* Wilt of the Tomato. *American Journal of Botany*, 10(2), 71-88. <https://doi.org/10.2307/2435575>
- Collaguazo, L. A., & Tenorio, S. M. (2018). *ELABORACIÓN DE BIOPREPARADOS A BASE DE Bacillus sp. PARA CONTROLAR Alternaria spp. EN EL CULTIVO DE Brassica oleracea var. Italica* [Tesis Ingeniería]. Universidad Politécnica Salesiana.

- Companiononi, B. C., Domínguez Arizmendi, G., & García Velasco, R. (2019). Trichoderma: Su potencial en el desarrollo sostenible de la agricultura. *Biotecnología Vegetal*, 19(4), 237-248.
- Constanza-Corrales, L., Consuelo Sánchez, L., Cuervo Andrade PhD, J. L., Bautista, D., Gonzáles, Lady, & Guevara, M. (2010). Evaluación del efecto biocontrolador de *Bacillus* spp., frente a *Fusarium* spp., bajo condiciones de invernadero en *Rosmarinus officinalis* L. *Nova*, 8(13), 63. <https://doi.org/10.22490/24629448.440>
- Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Cortés-Penagos, C., & López-Bucio, J. (2009). *Trichoderma virens*, a Plant Beneficial Fungus, Enhances Biomass Production and Promotes Lateral Root Growth through an Auxin-Dependent Mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 149(3), 1579-1592. <https://doi.org/10.1104/pp.108.130369>
- Cook, R. J., & Kenneth, F. B. (1983). *The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens*. The American Phytopathological Society.
- Corallo, B. (2012). *Selección de cepas de Trichoderma sp. Antagonistas del patógeno de sorgo* [Tesis de Grado, Universidad de la República (Uruguay)]. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/1392/1/uy24-16049.pdf>
- Córdova, I. M. (2003). *Biocontrol de Fusarium oxysporum f. Sp. Lycopersici por Trichozam® (Trichoderma harzianum) y Mycoral® (micorriza vesículo arbuscular) en el cultivo de tomate* [Tesis de Grado]. Universidad Zamorano.
- Córdova-Zapata, I.M. (2003). *Biocontrol de Fusarium oxysporum f. Sp. Lycopersici por Trichozam® (Trichoderma harzianum) y Mycoral® (micorriza vesículo arbuscular) en el cultivo de tomate* [Tesis de Grado]. Universidad Zamorano.
- Corrales, L. C., Caycedo Lozano, L., Gómez Méndez, M. A., Ramos Rojas, S. J., & Rodríguez Torres, J. N. (2017). *Bacillus* spp: Una alternativa para la promoción vegetal por dos caminos enzimáticos. *Nova*, 15(27), 45. <https://doi.org/10.22490/24629448.1958>
- Correa, F. (1997). *Principales enfermedades del arroz. MIP en arroz. Manejo integrado de plagas. Artrópodos, enfermedades y malezas* (pp. 123-141). Fundación Polar Venezuela, Fedearroz Colombia, FLAR, CIAT.
- Cossus, L., Roux-Dalvai, F., Kelly, I., Nguyen, T. T. A., Antoun, H., Droit, A., & Tweddell, R. J. (2021). Interactions with plant pathogens influence lipopeptides production and antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* strain PTB185. *Biological Control*, 154, 104497. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104497>
- Covacevich, F., & Consolo, F. (2014). *Herramientas para el estudio y manipulación de Hongos Micorrízicos Arbusculares y Trichoderma* (1^a). Universidad Nacional de Mar del Plata.
- Cruz, L. C. (2007). *Estandarización del proceso de producción masiva del hongo Trichoderma koningii Th003 mediante fermentación bifásica a escala piloto* [Tesis de Grado, Pontificia Universidad Javeriana]. <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8237/tesis23.pdf?sequence=1>
- Cubilla-Ríos, A. A., Ruíz-Díaz-Mendoza, D. D., Romero-Rodríguez, M. C., Flores-Giubi, M. E., & Barúa-Chamorro, J. E. (2019). Antibiosis de proteínas y metabolitos en especies de *Trichoderma* contra aislamientos paraguayos de *Macrophomina phaseolina*. *Agronomía Mesoamericana*, 30(1), 63-77. <https://doi.org/10.15517/am.v30i1.34423>
- Das, B. K., Nidhi, R. G. N., Roy, P., Muduli, A. K., Swain, P., Mishra, S. S., & Jayasankar, P. (2014). Antagonistic activity of cellular components of *Bacillus subtilis* AN11 against bacterial pathogens. *International Journal Of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(5), 795-809.

- Davis, R. M., Kimble, K. A., & Farrar, J. J. (1988). A Third Race of *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Lycopersici* Identified in California. *Plant Disease*, 72, 453.
- Dawar, S., Hayat, S., Anis, & Zaki, M. J. (2008). Effect of seed coating material in the efficacy of microbial antagonists for the control of root rot fungi on okra and sunflower. *Pak. J. Bot.*, 40(3), 1629-1278.
- de Aguiar, R. A., da Cunha, M. G., & Lobo Junior, M. (2014). Management of white mold in processing tomatoes by *Trichoderma* spp. And chemical fungicides applied by drip irrigation. *Biological Control*, 74, 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.03.009>
- De la Cruz-López, N., Cruz-López, L., Holguin-Meléndez, F., Guillén-Navarro, G. K., & Huerta-Palacios, G. (2022). Volatile organic compounds produced by cacao endophytic bacteria and their inhibitory activity on *Moniliophthora roreri*. *Current Microbiology*. *Current Microbiology*, 79(2), 35. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02696-2>
- Debbi, A., Bouregghda, H., Monte, E., & Hermosa, R. (2018). Distribution and Genetic Variability of *Fusarium oxysporum* Associated with Tomato Diseases in Algeria and a Biocontrol Strategy with Indigenous *Trichoderma* spp. *Frontiers in Microbiology*, 9, 282. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00282>
- Degenkolb, T., Gräfenhan, T., Nirenberg, H. I., Gams, W., & Brückner, H. (2006). *Trichoderma brevicompactum* Complex: Rich Source of Novel and Recurrent Plant-Protective Polypeptide Antibiotics (Peptaibiotics). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(19), 7047-7061. <https://doi.org/10.1021/jf060788q>
- Dennis, C., & Webster, J. (1971). Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: I. Production of non-volatile antibiotics. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 57(1), 25-39.
- Deshpande, M. V. (1999). Mycopesticide Production by Fermentation: Potential and Challenges. *Critical Reviews in Microbiology*, 25(3), 229-243. <https://doi.org/10.1080/10408419991299220>
- Devika, O. S., Singh, S., Sarkar, D., Barnwal, P., Suman, J., & Rakshit, A. (2021). Seed Priming: A Potential Supplement in Integrated Resource Management Under Fragile Intensive Ecosystems. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 654001. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.654001>
- Di Pietro, A., García-MacEira, F. I., Mègelecz, E., & Roncero, M. I. (2001). A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. *Molecular Microbiology*, 39(5), 1140-1152.
- Diabankana, R. G. C., Afordoanyi, D. M., Safin, R. I., Nizamov, R. M., Karimova, L. Z., & Validov, S. Z. (2021). Antifungal Properties, Abiotic Stress Resistance, and Biocontrol Ability of *Bacillus mojavensis* PS17. *Current Microbiology*, 78(8), 3124-3132. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02578-7>
- Díaz, T., & Hernández, D. A. (2003). Comportamiento de la germinación de las semillas tratadas con cloro (Cl). *Instituto de Investigaciones Hortícolas Liliana Dimitrova*, 63-66.
- Dickinson, C. H., & Lucas, J. A. (1987). *Patología vegetal y patógenos de plantas* (1°). Limusa.
- Dixon, G. R., & Tilston, E. L. (2010). Soil-Borne Pathogens and Their Interactions with the Soil Environment. En G. R. Dixon & E. L. Tilston (Eds.), *Soil Microbiology and Sustainable Crop Production*. Dixon, G.R.; Tilston, E.L (pp. 197-271). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-90-481-9479-7_6
- Domsh, K., Gams, W., & Anderson, T. (1980). *Compendium of soil fungi* (Vol. 1-1 y 2). Academic Press.

- Druzhinina, I. S., Kopchinskiy, A. G., & Kubicek, C. P. (2006). The first 100 Trichoderma species characterized by molecular data. *Mycoscience*, 47(2), 55-64. <https://doi.org/10.1007/S10267-006-0279-7>
- Druzhinina, I. S., Kubicek, C. P., Komon-Zelazowska, M., Belayneh Mulaw, T., & Bissett, J. (2010). The Trichoderma harzianum demon: Complex speciation history resulting in coexistence of hypothetical biological species, recent agamospecies and numerous relict lineages. *BMC Evolutionary Biology*, 10(1), 94. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-94>
- Duarte, Y., Echeverría, A., & Martínez, B. (2016). Identificación y caracterización de aislamientos de Fusarium spp. Presentes en garbanzo (Cicer arietinum L.) en Cuba. *Rev. Protección Veg.*, 31(3), 173-183.
- Dugan, F. M. (2006). *The Identification of Fungi: An Illustrated Introduction With Keys, Glossary, And Guide to Literature* (Spi Edición). The American Phytopathological Society.
- Durman, S., Menéndez, A., & Godeas, A. (2003). Evaluación de Trichoderma spp. Como antagonista de Rhizoctonia solani in vitro y como biocontrolador del damping off de plantas de tomate en invernadero. *Revista Argentina de Microbiología*, 31(1), 13-18.
- Earl, A. M., Losick, R., & Kolter, R. (2008). Ecology and genomics of Bacillus subtilis. *Trends in Microbiology*, 16(6), 269-275. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.03.004>
- Egamberdieva, D., Wirth, S. J., Alqarawi, A. A., Abd_Allah, E. F., & Hashem, A. (2017). Phytohormones and Beneficial Microbes: Essential Components for Plants to Balance Stress and Fitness. *Frontiers in Microbiology*, 8(2104), 1-14. <https://doi.org/doi:10.3389/fmicb.2017.02104>
- Ehteshamul-Haque, S., Sultana, V., Ara, J., & Athar, M. (2007). Cultivar response against root-infecting fungi and efficacy of Pseudomonas aeruginosa in controlling soybean root rot. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 141(1), 51-55. <https://doi.org/10.1080/11263500601153529>
- Elias, R., Arcos, O., & Arbeláez, G. (1993). Estudio del antagonismo de algunas especies de Trichoderma aisladas de suelos colombianos en el control de Fusarium oxysporum y Rhizoctonia solani. *Agron Colomb*, 10, 52-61.
- El-Mohamedy, R. S. R. (2004). Bio-priming of okra seeds to control damping off and root rot diseases. *Annals of Agricultural Science*, 49, 339-356.
- El-Mohamedy, R. S. R., & Abd El-Baky, M. M. (2008). Evaluation of different types of seed treatment on control of root rot disease, improvement growth and yield quality of pea plant in Nobarria province. *Research Journal of Agriculture and Biological Science*, 4(6), 611-622.
- Elósegui, O. (2006). *Metodos artesanales de Producción de Bioplaguicidas a partir de Hongos Entomopatógenos y Antagonistas*. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV).
- Eltlbany, N., Baklawa, M., Ding, G.-C., Nassal, D., Weber, N., Kandeler, E., Neumann, G., Ludwig, U., van Overbeek, L., & Smalla, K. (2019). Enhanced tomato plant growth in soil under reduced P supply through microbial inoculants and microbiome shifts. *FEMS Microbiology Ecology*, 95(9), fiz124. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiz124>
- Enespa, & Dwivedi, S. K. (2014). Effectiveness of some Antagonistic fungi and botanicals against Fusarium solani and Fusarium oxysporum f. Sp. Lycopersici infecting brinjal and tomato plants. *Asian Journal of Plant Pathology*, 8(1), 8-25. <https://doi.org/10.3923/ajppaj.2014.18.25>

- Enríquez-Acosta, E. A. (2019). *Caracterización de aislamientos de Fusarium spp de plantas de tomate (Solanum lycopersicum L) en la finca el Carrizal – México*. [Tesis Ingeniería]. UNIVERSIDAD DE GRANMA.
- Eraso, C., Acosta Rodríguez, J., Salazar González, C., & Betancourth García, C. (2014). Evaluación de cepas de Trichoderma spp. Para el manejo del amarillamiento de arveja causado por Fusarium oxysporum. *Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria*, 15(2), 237-249.
- Escobar, H., & Lee, R. (2009). *Manual de producción de tomate bajo invernadero (2ª)*. Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. https://www.utadeo.edu.co/sites/tadeo/files/node/wysiwyg/pub_29_-_manual_produccion_de_tomate.pdf
- Eshbaugh, H. W. (2012). *The taxonomy of the genus Capsicum*. (V. Russo, Ed.). CABI. <https://doi.org/10.1079/9781845937676.0014>
- Esterbauer, H., Steiner, W., Labudova, I., Hermann, A., & Hayn, M. (1991). Production of Trichoderma cellulase in laboratory and pilot scale. *Bioresource Technology*, 36(1), 51-65. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(91\)90099-6](https://doi.org/10.1016/0960-8524(91)90099-6)
- European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General. (2000). *Opinion of the scientific committee on animal nutrition on the safety of use of Bacillus species in animal nutrition*.
- Ezziyyani, M., Pérez Sánchez, C., Sid Ahmed, A., Requena, M. E., & Candela, M. E. (2004). Trichoderma harzianum como biofungicida para el biocontrol de Phytophthora capsici en plantas de pimiento (Capsicum annum L.). *Anales de Biología*, 26, 35-45.
- Ezziyyani, M., Sánchez, C. P., Requena, M. E., Rubio, L., & Candela, M. E. (2004). Biocontrol por Streptomyces rochei –Ziyani–, de la podredumbre del pimiento (Capsicum annum L.) causada por Phytophthora capsici. *Anales de Biología*, 26, 69-78.
- Fadiji, A. E., & Babalola, O. O. (2020). Elucidating Mechanisms of Endophytes Used in Plant Protection and Other Bioactivities With Multifunctional Prospects. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 467.
- [FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2019). *El estado mundial de la agricultura y la alimentación. Progresos en la lucha contra la pérdida y el desperdicio de alimentos*. FOOD & AGRICULTURE ORG.
- [FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2013). *FAOSTAT Statistical Databases*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponible en <http://faostat.fao.org/>.
- FAOSTAT. (2017). *Statistical Databases*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>
- Farooq, M., Usman, M., Nadeem, F., Rehman, H. ur, Wahid, A., Basra, S. M. A., & Siddique, K. H. M. (2019). Seed priming in field crops: Potential benefits, adoption and challenges. *Crop and Pasture Science*, 70(9), 731-771. <https://doi.org/10.1071/CP18604>
- Farr, David. F., Bills, Gerald. F., Chamuris, George. P., & Rossman, Amy. Y. (1989). *Fungi on plants and plant products in the United States*. (First). Amer Phytopathological Society;
- Fassihiani, A. (2000). *Symptomless Carriers of the Causal Agent of Tomato Wilt Pathogen*. 2, 27-32.
- Fazeli-Nasab, B., & Sayyed, R. Z. (2019). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria and Salinity Stress: A Journey into the Soil. En R. Z. Sayyed, N. K. Aurora, & M. Reddy (Eds.), *Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Sustainable Stress Management*. *Microorganisms for*

- Sustainability* (Vol. 12). Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-6536-2_2
- Fazeli-Nasab, B., Sayyed, R. Z., Mojahed, L. S., Rahmani, A. F., Ghafari, M., Antonius, S., & Sukamto. (2022). Biofilm production: A strategic mechanism for survival of microbes under stress conditions. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 42, 102337. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102337>
- Fernández, C. M., Díaz, L. A., Illnait, M. T., Aragonés, C., Martínez, G., & Perurena, M. R. (2012). Conservación de cultivos fúngicos de alto riesgo de *Histoplasma* y *Cryptococcus*. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 64(1), 49-54.
- Fernández-Larrea, O. (2001). Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado de Plagas*, 62, 9 6-1 0 0.
- Fernández-Larrea, O. V. (1997). *Microorganismos en el control fitosanitario en Cuba: Tecnologías de producción. III Encuentro Nacional de Agricultura Orgánica-ACAO*, Universidad Central de Las Villas.
- Fernando, B., Catara, V., Prohens, J., Yusen, S., Nigro, S., Hetforth, J., & Hamón, C. (2020). *BRESOV - Breeding for Resilient, Efficient and Sustainable Organic Vegetable production. D4.1*, 50.
- Figueroa-Rivera, M. G., Rodríguez-Guerra, R., Zulema, B., González-Chavira, M. M., & Pons-Hernández, J. L. (2010). Caracterización de Especies de *Fusarium* Asociadas a la Pudrición de Raíz de Maíz en Guanajuato, México. *Revista mexicana de fitopatología*, 28(2), 11.
- Finch, A. N., & Finch, H. C. (1971). *Los hongos comunes que atacan cultivos en América Latina* (Vol. 17). CEIBA.
- [FIRA] Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura. (2017). *Panorama Agroalimentario. Dirección de Investigación y evaluación económica y sectorial*. 25.
- Flor, H. H. (1956). The Complementary Genic Systems in Flax and Flax Rust. En *Advances in Genetics* (Vol. 8, pp. 29-54). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0065-2660\(08\)60498-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2660(08)60498-8)
- Fourie, G. (2011). Current status of the taxonomic position of *Fusarium oxysporum* formae specialis cubense within the *Fusarium oxysporum* complex. *Infection, Genetics and Evolution*, 11, 533-542. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.01.012>
- Fravel, D. R. (2005). Commercialization and Implementation of Biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*, 43(1), 337-359. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.032904.092924>
- French, E. R., & Hebert, T. T. (1980). *Métodos de investigación fitopatológica*. IICA.
- Friedl, M. A., & Druzhinina, I. S. (2012). Taxon-specific metagenomics of *Trichoderma* reveals a narrow community of opportunistic species that regulate each other's development. *Microbiology*, 158(1), 69-83. <https://doi.org/10.1099/mic.0.052555-0>
- Funes-Aguilar, F., & Monzote, M. (2006). Sistemas agroecológicos y su papel en los países del Tercer Mundo. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 10(3), 5-28.
- Gams, W., & Bissett, J. (1998). Morphology and identification of *Trichoderma*. En *Trichoderma and Gliocladium* (Kubicek and G. E. Harman, Vol. 1, pp. 3-34). Taylor & Francis Ltd.
- García, C., Ruíz, C. A., Palmero, D., García, M., Díaz, M., Camacho, F., & Tello, J. C. (2012). Comportamiento de patrones de tomate frente a la patogenicidad de *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Radicis-lycopersici*. *Horticultura*, 318-320.
- García, J. I., Ruíz, N. A., Lira, R. H., Vera, I., & Méndez, B. (2016). *Técnicas Para Evaluar Germinación, Vigor y Calidad Fisiológica de Semillas Sometidas a Dosis de Nanopartículas*. 129-140.

- García, J., Monteith, L., & Squire, G. R. (1982). Time, Temperature and Germination of Pearl Millet (*Pennisetum typhoides* S. & H.). *Journal of Experimental Botany*, 33(133), 288-296.
- García, L., Scherer, C., & Rodríguez, R. (1991). Supercooled liquids and glasses. *Science for all digital library. Physics. Economic Culture*.
- García, M. D., & Uruburu, F. (2000). *Conservación de cepas microbianas*. SEM 30: 12-16, celular.
- García, R., & Durán, M. A. (2006). Producción de biomasa de *Trichoderma harzianum* por fermentación líquida. *Fitosanidad*, 10(4), 1562-3009.
- García, R., Riera, R., & Zambrano, C. (2006). Desarrollo de un fungicida biológico a base de una cepa del hongo *Trichoderma harzianum* proveniente de la región andina venezolana. *Fitosanidad*, 10(2), 115-121.
- Gayosso, O., Chávez-Aguilar, G., López-Benítez, A., Marroquín-Morales, J. Á., López-Aguilar, K., & Hidalgo-Ramos, D. M. (2021). Evaluación de la respuesta de diferentes genotipos de tomate a *Fusarium oxysporum* raza 3. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 12(3), 409-420. <https://doi.org/10.29312/remexca.v12i3.2284>
- Gohil, R. B., Raval, V. H., Panchal, R. R., & Rajput, K. N. (2022). Plant Growth-Promoting Activity of *Bacillus* sp. PG-8 Isolated From Fermented Panchagavya and Its Effect on the Growth of *Arachis hypogea*. *Frontiers in Agronomy*, 4, 1-13.
- Goldman, E., & Green, L. H. (Eds.). (2009). *Practical handbook of microbiology* (2nd ed). CRC Press.
- Gómez, H., Zapata, A., Torres, E., & Tenorio, M. (2014). *Producción de hongos entomopatógenos*. Servicio Nacional de Sanidad Agraria.
- Gomez, M. (2013). Género *Bacillus* spp., *FAVET-UFRGS*, 49.
- Gómez-Molina, S., Krieger, S., Curti, R., Herrando, C., & Aldana, A. (2017). Evaluación in vitro del efecto promotor del crecimiento en plántulas de chía. *Agrotecnia*, 25, 29. <https://doi.org/10.30972/agr.0252457>
- González, A. de la C. (2016). *Optimización del método de empleo del biopreparado cepa A-53 de Trichoderma harzianum Rifai, para el control de Phytophthora nicotianae Breda Haan, en el cultivo del tabaco* [Tesis de Diploma]. Universidad de La Habana.
- González, M. M., Torres, I., & Guzmán, H. (2002). Patógenos involucrados en la marchitez del chile. *Proceedings of the 16th International Pepper Conference, Tampico, Tamaulipas, México, 10-12 November*, 1-3.
- González-Cárdenas, J. C., Maruri-García, J. M., & González-Acosta, A. (2005). Evaluación de diferentes concentraciones de *Trichoderma* spp. Contra *Fusarium oxysporum* agente causal de la pudrición de plántulas en papaya (*Carica papaya* L.) en Tuxpan, Veracruz, México. *Revista UDO Agrícola*, 5(1), 45-47.
- González-Zamora, A., Sierra-Campos, E., Pérez-Morales, R., Vázquez-Vázquez, C., Gallegos-Robles, M. A., López-Martínez, J. D., & García-Hernández, J. L. (2015). Measurement of Capsaicinoids in Chiltepin Hot Pepper: A Comparison Study between Spectrophotometric Method and High Performance Liquid Chromatography Analysis. *Journal of Chemistry*, 2015, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2015/709150>
- Gorini, F. (2018). *Guía completa del cultivo del tomate*. DE VECCHI.
- Gorrín, L., Siverio, F., Perera, S., Tascón, C., & Ríos, D. (2015). aplicación de *Bacillus subtilis* en el control de hongos presentes en semilla de cebolla. evaluación de su efecto en plántulas de vivero y en cultivo. *Universidad de la Laguna. AgroCabildo de Tenerife*, 28.
- Grattidge, R., & O'Brien, R. G. (1982). Occurrence of a third race of *Fusarium* wilt of tomatoes in Queensland. *Plant Disease*, 66(2), 165-166.

- Gravel, V., Antoun, H., & Tweddell, R. J. (2007). Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biology and Biochemistry*, 39(8), 1968-1977. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.02.015>
- Guédez, C., Cañizalez, L., Castillo, C., & Olivar, R. (2012). Evaluación in vitro de aislamientos de *Trichoderma harzianum* para el control de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 32, 44-49.
- Guerrero, Z. V. (2016). *Manual de Laboratorio. Microbiología General*. Universidad de El Salvador.
- Gupta, K. K., & Rana, D. (2017). Evaluation of Antagonistic Activities of *Bacillus* Spp. Against Certain Bacteria of Medical Importance. *Archives of Agriculture and Environmental Science*, 2(4), 353-356. <https://doi.org/10.26832/24566632.2017.020419>
- Gupta, V.K., Schmoll, M., Herrera-Estrella, A., Upadhyay, R. S., Druzhinina, I., & Tuohy, María. G. (2014). *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2012-0-00434-6>
- Gutiérrez, L. (2016). *Caracterización de cepas de Bacillus sp y Bacterias ácido lácticas con actividad probiótica en el tracto digestivo de Tilapia roja (Oreochromis sp) como potencial consorcio para procesos de microencapsulación* [Tesis Doctoral]. Universidad Nacional de Colombia.
- Hamdache, A., Lamarti, A., Aleu, J., & Collado, I. G. (2011). Non-peptide Metabolites from the Genus *Bacillus*. *Journal of Natural Products*, 74(4), 893-899. <https://doi.org/10.1021/np100853e>
- Hamid, B., Zaman, M., Farooq, S., Fatima, S., Sayyed, R. Z., Baba, Z. A., Sheikh, T. A., Reddy, M. S., El Enshasy, H., Gafur, A., & Suriani, N. L. (2021). Bacterial Plant Biostimulants: A Sustainable Way towards Improving Growth, Productivity, and Health of Crops. *Sustainability*, 13(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/su13052856>
- Harman, G. (1996). *Trichoderma for Biocontrol of Plant Pathogens: From Basic Research to Commercialized Products*. Cornell AgriTech Serves the Agriculture and Food Industries by Conducting Extensive Food and Agricultural Research, Education and Outreach Programming on Specialty Crops. <https://cals.cornell.edu/cornell-agritech>
- Harman, G. (2001). *Trichoderma spp., including T. harzianum, T. viride, T. koningii, T. hamatum and other spp. Deuteromycetes, Moniliales (asexual classification system)* [Cornell University College of Agriculture and Life Sciences]. Biological Control. <https://biocontrol.entomology.cornell.edu/pathogens/trichoderma.php>
- Harman, G. (2003). *Trichoderma harzianum, T. viridis, T. koningii, T. hamatum (Deuteromycetes: Moniliales)*. <http://www.ibun.unal.edu.co/r2r7e.html>
- Harman, G. E. (1990). *The Rhizosphere* (pp. 259-280). New York: Wiley and Sons.
- Harman, G. E. (2000). Myths and dogmas of control. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum*. *Plant Disease*, 84(4), 377-393. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.4.377>
- Harman, G. E. (2006). Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*®, 96(2), 190-194. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0190>
- Harman, G. E. (2011). Multifunctional fungal plant symbionts: New tools to enhance plant growth and productivity. *New Phytologist*, 189(3), 647-649. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03614.x>

- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). Trichoderma species—Opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2(1), 43-56. <https://doi.org/10.1038/nrmicro797>
- He, C.N., Ye, W.Q., Zhu, Y.Y., & Zhou, W.W. (2020). Antifungal Activity of Volatile Organic Compounds Produced by *Bacillus methylotrophicus* and *Bacillus thuringiensis* against Five Common Spoilage Fungi on Loquats. *Molecules*, 25(15), 3360. <https://doi.org/10.3390/molecules25153360>
- Henson, R. (2015). Analysis of Variance (ANOVA). *Brain Mapping: An Encyclopedic Reference. Academic Press: Elsevier.*, 1, 477-481.
- Hermosa, M. R., Grondona, I., Iturriaga, E. A., Diaz-Minguez, J. M., Castro, C., Monte, E., & Garcia-Acha, I. (2000). Molecular Characterization and Identification of Biocontrol Isolates of *Trichoderma* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 1890-1898. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.5.1890-1898.2000>
- Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I., & Monte, E. (2012). Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology*, 158(1), 17-25. <https://doi.org/10.1099/mic.0.052274-0>
- Hernández, D., & Loaiza, A. E. (2014). *Selección de un método para la conservación y preservación de actinomicetos aislados del suelo del jardín botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira* [Tesis de Grado, Universidad Tecnológica de Pereira]. <https://repositorio.utp.edu.co/server/api/core/bitstreams/b5ba3fac-1181-4b60-bb0f-045c6cf44b54/content>
- Hernández, J. M., Perera, Santiago. D., Siverio de la Rosa, F., & Tascón, C. (2012). Estudio preliminar de tratamientos de desinfección de semilla de variedades locales de cebolla de Tenerife. *Cabildo de Tenerife, Gobierno de Canarias*, 15.
- Hernández, R., López, A., Borrego, F., Espinoza, J., Sánchez, D., Maldonado, I., & López, L. (2014). Razas de *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Lycopersici* en predios tomateros en San Luis Potosí* Races of *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Lycopersici* in tomato farmlands in San Luis Potosí. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5(7), 1169-1178.
- Hernández-Amasifuen, A. D., Pineda-Lázaro, A. J., & Noriega-Córdova, H. W. (2019). Aislamiento e identificación de *Fusarium oxysporum* obtenidos de zonas productoras de “ají paprika” *Capsicum annum* L. (Solanaceae) en el distrito de Barranca, Perú. *Arnaldoa*, 26(2), 689-698.
- Hernández-Melchor, D. J., Ferrera-Cerrato, R., & Alarcón, A. (2019). *Trichoderma*: Importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. *Chilean journal of agricultural & animal sciences, ahead*, 0-0. <https://doi.org/10.4067/S0719-38902019005000205>
- Hjeljord, L., & Tronsmo, A. (1998). *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: An overview. In: *Trichoderma & Gliocladium* (Gary E. Harman, C. P. Kubicek, Vol. 2, p. 131-151). Taylor & Francis. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov> <http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>
- Horbach, R., Navarro-Quesada, A. R., Knogge, W., & Deising, H. B. (2011). When and how to kill a plant cell: Infection strategies of plant pathogenic fungi. *Journal of Plant Physiology*, 168(1), 51-62. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.06.014>
- Horinouchi, H., Watanabe, H., Taguchi, Y., Muslim, A., & Hyakumachi, M. (2011). Biological control of *Fusarium* wilt of tomato with *Fusarium equiseti* GF191 in both rock wool and soil systems. *BioControl*, 56(6), 915-923. <https://doi.org/10.1007/s10526-011-9369-3>

- Hossain, M. M., Hossain, N., Sultana, F., Islam, S. M., Islam, M. S., & Bhuiyan, M. K. A. (2013). Integrated management of Fusarium wilt of chickpea (*Cicer arietinum* L.) caused by *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Ciceris* with microbial antagonist, botanical extract and fungicide. *African Journal of Biotechnology*, 12(29), 4699-4706. <https://doi.org/10.5897/AJB2013.12503>
- Houterman, P. M., Cornelissen, B. J. C., & Rep, M. (2008). Suppression of Plant Resistance Gene-Based Immunity by a Fungal Effector. *PLoS Pathogens*, 4(5), e1000061. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000061>
- Houterman, P. M., Ma, L., van Ooijen, G., de Vroomen, M. J., Cornelissen, B. J. C., Takken, F. L. W., & Rep, M. (2009). The effector protein Avr2 of the xylem-colonizing fungus *Fusarium oxysporum* activates the tomato resistance protein I-2 intracellularly. *The Plant Journal*, 58(6), 970-978. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03838.x>
- Houterman, P. M., Speijer, D., Dekker, H. L., De Koster, C. G., Cornelissen, B. J. C., & Rep, M. (2007). The mixed xylem sap proteome of *Fusarium oxysporum*-infected tomato plants. *Molecular Plant Pathology*, 8(2), 215-221. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00384.x>
- Howell, C. R. (2003). Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. *Plant Disease*, 87(1), 4-10. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.1.4>
- Hoyos, L. (2011). *Enfermedades de plantas: Control biológico*. Universidad Estatal de Colombia.
- Hoyos-Carvajal, L., Chaparro, P., Abramsky, M., & Chet, I. (2008). *Evaluación de aislamientos de Trichoderma spp. Contra Rhizoctonia solani y Sclerotium rolfsii bajo condiciones in vitro y de invernadero*. 26(3), 451-458,.
- Hoyos-Carvajal, L., Orduz, S., & Bissett, J. (2009). Genetic and metabolic biodiversity of *Trichoderma* from Colombia and adjacent neotropic regions. *Fungal Genetics and Biology*, 46(9), 615-631. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.04.006>
- Ibrahim, A. M. A., & Baghdadi, A. M. (2003). *Investigations on Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici the causal agent of tomato wilt (Lycopersicon esculentum Mill)* [Degree Thesis]. University of Khartoum.
- Ibrahim, E. A. (2016). Seed priming to alleviate salinity stress in germinating seeds. *Journal of Plant Physiology*, 192, 38-46. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.12.011>
- Igiehon, N. O., & Babalola, O. O. (2018). Rhizosphere Microbiome Modulators: Contributions of Nitrogen Fixing Bacteria towards Sustainable Agriculture. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(4), 574. <https://doi.org/10.3390/ijerph15040574>
- Inami, K., Kashiwa, T., Kawabe, M., Onokubo-Okabe, A., Ishikawa, N., Pérez, E. R., Hozumi, T., Caballero, L. A., de Baldarrago, F. C., Roco, M. J., Madadi, K. A., Peever, T. L., Teraoka, T., Kodama, M., & Arie, T. (2014). The Tomato Wilt Fungus *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Lycopersici* shares Common Ancestors with Nonpathogenic *F. oxysporum* isolated from Wild Tomatoes in the Peruvian Andes. *Microbes and Environments*, 29(2), 200-210. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME13184>
- Inami, K., Yoshioka-Akiyama, C., Morita, Y., Yamasaki, M., Teraoka, T., & Arie, T. (2012). A Genetic Mechanism for Emergence of Races in *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Lycopersici*: Inactivation of Avirulence Gene AVR1 by Transposon Insertion. *PLOS ONE*, 7(8), 1-10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044101>

- InfoAgro. (2018). *Agroinformación- EL CULTIVO DEL PIMIENTO. 1ª parte*. [Ciencias Agronómicas]. <https://www.infoagro.com/hortalizas/pimiento.htm>
- InfoAgro System S.L. (2016). *EL CULTIVO DEL TOMATE (1ª parte)* [Ciencia y Tecnología]. infoAgro.com. <https://www.infoagro.com/hortalizas/tomate.htm>
- [INTA] Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. (2014). *Manejo Integrado de Plagas Cultivo del Tomate guía MIP (1ª)*. <http://www.inta.gov.ni/biblioteca/images/pdf/guias/GUIA%20MIP%20tomate%202014.pdf>
- Iqbal, U., & Mukhtar, T. (2020). Evaluation of Biocontrol Potential of Seven Indigenous Trichoderma Species against Charcoal Rot Causing Fungus, *Macrophomina phaseolina*. *Gesunde Pflanzen*, 72(2), 195-202. <https://doi.org/10.1007/s10343-020-00501-x>
- ITIS. (2021). *Standard Report Page: Solanum lycopersicum*. Integrated Taxonomic Information System (ITIS). https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=521671#null
- Ivanova, E., Vysotskii, M., Svetashev, V., Nedashkovskaya, O., Gordshkova, N., Mikhailov, V., Yumoto, N., Shigeri, Y., Taguchi, T., & Yoshikawa, S. (1999). Characterization of Bacillus strains of marine origin. *Internatl Microbiol*, 2, 267-271.
- Jaklitsch, W. M. (2009). European species of Hypocrea Part I. The green-spored species. *Studies in Mycology*, 63, 1-91. <https://doi.org/10.3114/sim.2009.63.01>
- Jaklitsch, W. M., Kubicek, C. P., & Druzhinina, I. S. (2008). Three European species of Hypocrea with reddish brown stromata and green ascospores. *Mycologia*, 100(5), 796-815. <https://doi.org/10.3852/08-039>
- Jaklitsch, W. M., Samuels, G. J., Dodd, S. L., Lu, B.-S., & Druzhinina, I. S. (2006). Hypocrea rufa/Trichoderma viride: A reassessment, and description of five closely related species with and without warted conidia. *Studies in Mycology*, 56, 135-177. <https://doi.org/10.3114/sim.2006.56.04>
- Jalapathi, E., Lakshimi, S., Sujatha, K., & Kalpana, K. (2018). Biopriming with Bacillus subtilis to improve physiological performance of brinjal (Solanum melongena L.) cv CO 2 seeds. *Research Journal of Agricultural Sciences*, 9(4), 826-829,. <https://doi.org/5070-0604-2018-182>
- Jambhulkar, P. P., Sharma, P., & Yadav, R. (2016). Delivery Systems for Introduction of Microbial Inoculants in the Field. En D. P. Singh, H. B. Singh, & R. Prabha (Eds.), *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity: Vol. 2: Functional Applications* (pp. 199-218). Springer India. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2644-4_13
- Jamil, A., Musheer, N., & Kumar, M. (2021). Evaluation of biocontrol agents for management of wilt disease of tomato incited by *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Lycopersici*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 54(19-20), 1722-1737. <https://doi.org/10.1080/03235408.2021.1938353>
- Jangir, M., Pathak, R., Sharma, S., & Sharma, S. (2018). Biocontrol mechanisms of Bacillus sp., isolated from tomato rhizosphere, against *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Lycopersici*. *Biological Control*, 123, 60-70. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.04.018>
- Javaid, A. (2010). Beneficial Microorganisms for Sustainable Agriculture. En E. Lichtfouse (Ed.), *Genetic Engineering, Biofertilisation, Soil Quality and Organic Farming* (Vol. 4, pp. 347-369.). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-90-481-8741-6_12

- Jayaraman, D., Gilroy, S., & Ané, J.-M. (2014). Staying in touch: Mechanical signals in plant–microbe interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 20, 104-109. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.05.003>
- Jiménez, C. (2004). *Formulación y momento de aplicación de Trichoderma harzianum Rifai, para el control de Fusarium oxysporum f. Sp. Lycopersici (Sacc) Snyder & Hansen causante de la marchitez en tomate en el estado Aragua*. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela Maracay.
- Jiménez, C., de Albarracín, N. S., Altuna, G., & Alcano, N. (2011). Efecto de Trichoderma harzianum (Rifai) sobre el crecimiento de plantas de tomate (Lycopersicon esculentum L.). *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, 28, 1-10.
- Jiménez, C., & Sanabria, N. (2008). Población final de Trichoderma harzianum en el control de la marchitez vascular en tomate causado por F. oxysporum. F. Sp. Lycopersici. *Fitopatología Venezolana*, 21, 29-30.
- John, R. P., Tyagi, R. D., Brar, S. K., & Prévost, D. (2010). Development of emulsion from rhizobial fermented starch industry wastewater for application as Medicago sativa seed coat. *Engineering in Life Sciences*, 10(3), 248-256. <https://doi.org/10.1002/elsc.201000002>
- Johnson, R., & Puthur, J. T. (2021). Seed priming as a cost effective technique for developing plants with cross tolerance to salinity stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 162, 247-257. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.02.034>
- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323-329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Jones, J. P. (1991). Fusarium wilt. En *Compendium of Tomato Diseases*. J. B. Jones et al. (pp. 15-16). APS Press (The American Pathological Society Press).
- Jones, J. P., Stall, R. E., & Zitter, T. A. (2001). *Plagas y enfermedades del tomate*. Mundi-Prensa.
- Joshi, R. (2018). A review of Fusarium oxysporum on its plant interaction and industrial use. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 6(3b), 112-115. <https://doi.org/10.22271/plants.2018.v6.i3b.07>
- Kangsopa, J., Jeephet, P., & Chantain, S. (2021). Seed priming with Bacillus subtilis on germination and seedlings growth of lettuce (Lactuca sativa). *Rajamangala University of Technology Srivijaya Research Journal*, 13(2), 393-407.
- Kant, P., Reinprecht, Y., Martin, C. J., Islam, R., & Pauls, K. P. (2011). Disease Resistance/Pathology/Fusarium. En *Comprehensive Biotechnology*. Moo-Young M. (2.^a ed., pp. 729-743). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00263-4>
- Karanasios, E., Tsiropoulos, N. G., & Karpouzas, D. G. (2012). On-farm biopurification systems for the depuration of pesticide wastewaters: Recent biotechnological advances and future perspectives. *Biodegradation*, 23(6), 787-802. <https://doi.org/10.1007/s10532-012-9571-8>
- Katan, T., Shlevin, E., & Katan, J. (1997). Sporulation of Fusarium oxysporum f. Sp. Lycopersici on Stem Surfaces of Tomato Plants and Aerial Dissemination of Inoculum. *Phytopathology*, 87(7), 712-719. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1997.87.7.712>
- Kejela, T., Thakkar, V. R., & Patel, R. R. (2017). A novel strain of Pseudomonas inhibits Colletotrichum gloeosporioides and Fusarium oxysporum infections and promotes germination of coffee. *Rhizosphere*, 4, 9-15. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2017.05.002>
- Keswani, C., Bisen, K., Singh, V., Sarma, B. K., & Singh, H. B. (2016). Formulation technology of biocontrol agents: Present status and future prospects. En N. Arora, S. Mehnaz, & R. Balestrini (Eds.), *Bioformulations: For Sustainable Agriculture* (pp. 35-52). Springer, New Delhi. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2779-3_2

- Keswani, C., Singh, H. B., García-Estrada, C., Caradus, J., He, Y.-W., Mezaache-Aichour, S., Glare, T. R., Borriss, R., & Sansinenea, E. (2020). Antimicrobial secondary metabolites from agriculturally important bacteria as next-generation pesticides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *104*(3), 1013-1034. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10300-8>
- Khan, A. Z., Khalil, S., Khan, A., Marwat, K., & Afzal, A. (2008). The role of seed priming in semi-arid area for mung bean phenology and yield. *Pakistan Journal of Botany*, *40*, 2471-2480.
- Khusro, A., Preetam Raj, J., & Panicker, S. G. (2014). Study on antagonistic activity of a novel bacterial isolate under mild stress condition of certain antimicrobial agents. *European Journal of Experiment Biology*, *4*(4), 26-30.
- Kleifeld, O., & Chet, I. (1992). *Trichoderma harzianum*?interaction with plants and effect on growth response. *Plant and Soil*, *144*(2), 267-272. <https://doi.org/10.1007/BF00012884>
- Kloepper, J. W., & Ryu, C.-M. (2006). Bacterial Endophytes as Elicitors of Induced Systemic Resistance. En B. J. E. Schulz, C. J. C. Boyle, & T. N. Sieber (Eds.), *Microbial Root Endophytes* (Vol. 9, pp. 33-52). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/3-540-33526-9_3
- Knežević, M. M., Stajković-Srbinović, O. S., Assel, M., Milić, M. D., Mihajlovski, K. R., Delić, D. I., & Buntić, A. V. (2021). The ability of a new strain of *Bacillus pseudomycoides* to improve the germination of alfalfa seeds in the presence of fungal infection or chromium. *Rhizosphere*, *18*, 100353. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2021.100353>
- Kokalis-Burelle, N., Kloepper, J. W., & Reddy, M. S. (2006). Plant growth-promoting rhizobacteria as transplant amendments and their effects on indigenous rhizosphere microorganisms. *Applied Soil Ecology*, *31*(1-2), 91-100. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2005.03.007>
- Kranz, J. (1982). *Enfermedades de los cultivos tropicales. Deuteromycotina*. (Primera edición). Paul Parey. Berlin & Hamburgo. p. 213-214.
- Kubicek, C. P., Komon-Zelazowska, M., & Druzhinina, I. S. (2008). Fungal genus *Hypocrea/Trichoderma*: From barcodes to biodiversity. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, *9*(10), 753-763. <https://doi.org/10.1631/jzus.B0860015>
- Kuhls, K., Lieckfeldt, E., Samuels, G. J., Kovacs, W., Meyer, W., Petrini, O., Gams, W., Borner, T., & Kubicek, C. P. (1996). Molecular evidence that the asexual industrial fungus *Trichoderma reesei* is a clonal derivative of the ascomycete *Hypocrea jecorina*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*(15), 7755-7760. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.15.7755>
- Kuta, F. A., Nimzing, L., & Orka'A, P. (2009). Screening of *Bacillus* Species with Potentials of Antibiotics Production. *Applied Medical Informatics*, *24*(1-2), 42-46.
- Kwak, M.-J., Kong, H. G., Choi, K., Kwon, S.-K., Song, J. Y., Lee, J., Lee, P. A., Choi, S. Y., Seo, M., Lee, H. J., Jung, E. J., Park, H., Roy, N., Kim, H., Lee, M. M., Rubin, E. M., Lee, S.-W., & Kim, J. F. (2018). Rhizosphere microbiome structure alters to enable wilt resistance in tomato. *Nature Biotechnology*, *36*(11), 1100-1109. <https://doi.org/10.1038/nbt.4232>
- Kyei-Boahen, S., Slinkard, A. E., & Walley, F. L. (2001). Rhizobial survival and nodulation of chickpea as influenced by fungicide seed treatment. *Canadian Journal of Microbiology*, *47*(6), 585-589. <https://doi.org/10.1139/w01-038>
- Laloo, R., Ramchuran, S., Ramduth, D., Görgens, J., & Gardiner, N. (2007). Isolation and selection of *Bacillus* spp. as potential biological agents for enhancement of water quality

- in culture of ornamental fish: Isolation and selection of *Bacillus* spp. as potential biological agents. *Journal of Applied Microbiology*, 103(5), 1471-1479. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03360.x>
- Larín, M. A., Díaz, L. A., & de Serrano, R. F. (2018). *Cultivo de tomate (Lycopersicon esculentum)*. Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal «Enrique Álvarez Córdova».
- Larkin, R. P., & Fravel, D. R. (1998). Efficacy of Various Fungal and Bacterial Biocontrol Organisms for Control of Fusarium Wilt of Tomato. *Plant Disease*, 82(9), 1022-1028. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.9.1022>
- Larone, D. H. (1995). *Medically Important Fungi: A Guide to Identification* (3rd ed.). ASM Press.
- Larralde-Corona, C. P., Santiago-Mena, M. R., Sifuentes-Rincón, A. M., Rodríguez-Luna, I. C., Rodríguez-Pérez, M. A., Shirai, K., & Narváez-Zapata, J. A. (2008). Biocontrol potential and polyphasic characterization of novel native *Trichoderma* strains against *Macrophomina phaseolina* isolated from sorghum and common bean. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80(1), 167-177. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1532-0>
- Lastochkina, O., Aliniaiefard, S., Seifikalhor, M., Yuldashev, R., Pusenkova, L., & Garipova, S. (2019). Plant Growth-Promoting Bacteria: Biotic Strategy to Cope with Abiotic Stresses in Wheat. En M. Hasanuzzaman, K. Nahar, & Md. A. Hossain (Eds.), *Wheat Production in Changing Environments: Responses, Adaptation and Tolerance* (pp. 579-614). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-13-6883-7_23
- Lastochkina, O., Garshina, D., Ivanov, S., Yuldashev, R., Khafizova, R., Allagulova, C., Fedorova, K., Avalbaev, A., Maslennikova, D., & Bosacchi, M. (2020). Seed Priming with Endophytic *Bacillus subtilis* Modulates Physiological Responses of Two Different *Triticum aestivum* L. Cultivars under Drought Stress. *Plants*, 9(12), 1810. <https://doi.org/10.3390/plants9121810>
- Lastochkina, O., Pusenkova, L., Yuldashev, R., Babaev, M., Garipova, S., Blagova, D., Khairullin, R., & Aliniaiefard, S. (2017). Effects of *Bacillus subtilis* on some physiological and biochemical parameters of *Triticum aestivum* L. (wheat) under salinity. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB*, 121, 80-88. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.10.020>
- Layton, C., Maldonado, E., Monroy, L., Corrales Ramírez MSC, L. C., & Sánchez Leal MSC, L. C. (2011). *Bacillus* spp.; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. *Nova*, 9(16), 177. <https://doi.org/10.22490/24629448.501>
- Lazzaretti, E., Menten, J. O., & Bettiol, W. (1994). *Bacillus subtilis* antagonicos aos principais patógenos associados a sementes de Feijao e Trigo. *Fitopatología Venezolana*, 7(2), 42-46.
- Lecault, V., Patel, N., & Thibault, J. (2009). An image analysis technique to estimate the cell density and biomass concentration of *Trichoderma reesei*. *Letters in Applied Microbiology*, 48(4), 402-407. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02544.x>
- León, H. M., & Arosemena, M. (1980). *El Cultivo del Tomate para Consumo Fresco en el Valle de Culiacán*. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícola, Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos.
- Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual* (First). Blackwell Publishing.

- Li, Y.-T., Hwang, S.-G., Huang, Y.-M., & Huang, C.-H. (2018). Effects of *Trichoderma asperellum* on nutrient uptake and Fusarium wilt of tomato. *Crop Protection*, *110*, 275-282. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.03.021>
- Lieckfeldt, E., Samuels, G. J., Nirenberg, H. I., & Petrini, O. (1999). A Morphological and Molecular Perspective of *Trichoderma viride*: Is It One or Two Species? *Applied and Environmental Microbiology*, *65*(6), 2418-2428. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.6.2418-2428.1999>
- Lievens, B., Houterman, P. M., & Rep, M. (2009). Ejectorgene screening allows unambiguous identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* races and discrimination from other formae speciales. *FEMS Microbiology Letters*, *300*(2), 201-215. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01783.x>
- Lim, S. M., Yoon, M.-Y., Choi, G. J., Choi, Y. H., Jang, K. S., Shin, T. S., Park, H. W., Yu, N. H., Kim, Y. H., & Kim, J.-C. (2017). Diffusible and Volatile Antifungal Compounds Produced by an Antagonistic *Bacillus velezensis* G341 against Various Phytopathogenic Fungi. *The Plant Pathology Journal*, *33*(5), 488-498. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.04.2017.0073>
- Lin, W., & Salveit, M. (2012). Peppers: Botany, production and uses. En *Greenhouse production*. (V, pp. 57-71). Russo.
- Lin, W., Zhi-huai, L., & He-rong, L. (2006). Effects of Peptide in the Fermentation Liquid of *Trichoderma harzianum* on Nodule Microstructure and Function of Cowpea. *Acta Laser Biology Sinica*. <https://www.semanticscholar.org/paper/Effects-of-Peptide-in-the-Fermentation-Liquid-of-on-Lin-Zhi-huai/28901dfc42e55e77b8eacce9fdea9ec151e062ba>
- Lisboa-Minguzzi, M. A. (2003). *Efectividad de Bacillus subtilis y de una cepa nativa de Trichoderma harzianum sobre la incidencia y severidad de (Botrytis cinerea) en Vid vinífera* [Tesis Ingeniería]. Universidad de Talca.
- Liu, N., Xu, S., Yao, X., Zhang, G., Mao, W., Hu, Q., Feng, Z., & Gong, Y. (2016). Studies on the Control of Ascochyta Blight in Field Peas (*Pisum sativum* L.) Caused by *Ascochyta pinodes* in Zhejiang Province, China. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 1-13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00481>
- López, A. I. S., & Pazos, V. (2005). Aislamiento y selección de bacterias pertenecientes al género *Bacillus* con potencialidades para el control biológico en semilleros de tabaco. *Centro Agrícola*, *32*(3), 25-29.
- López, M. C. (2011). *Efecto antagónico de Bacillus spp. De la rizosfera de plantas del semidesierto Chihuahuense sobre hongos fitopatógenos de suelo y su efecto en el desarrollo del tomate (Solanum lycopersicum L.)* [Ingeniería en Agrobiología]. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
- López-Bucio, J., Pelagio-Flores, R., & Herrera-Estrella, A. (2015a). *Trichoderma* as biostimulant: Exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. *Scientia Horticulturae*, *196*, 109-123. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.08.043>
- López-Granados, G., Fernández-Pavía, S. P., Cárdenas-Navarro, R., & Sánchez-Yáñez, J. M. (2005). Antagonismo microbiano contra bacterias activadoras de núcleos de hielo: *Pantoea agglomerans* y *Pseudomonas syringae* Van Hall. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, *XI*(1), 105-111. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2003.01.007>
- López-Marín, L. M. (2017). *Manual técnico del cultivo de tomate (Solanum Lycopersicum)*. Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA).
- López-Mondejar, R., Bernal-Vicente, A., Ros, M., Tittarelli, F., Canali, S., Intrigliolo, F., & Pascual, J. A. (2010). Utilization of citrus compost-based growing media amended with

- Trichoderma harzianum T-78 in Cucumis melo L. seedling production. *Bioresource Technology*, 101(10), 3718-3723. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.102>
- López-Mondéjar, R., Ros, M., & Pascual, J. A. (2011). Mycoparasitism-related genes expression of Trichoderma harzianum isolates to evaluate their efficacy as biological control agent. *Biological Control*, 56(1), 59-66. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.10.003>
- Lopisso, D. T., Kühlmann, V., & Siebold, M. (2017). Potential of soil-derived fungal biocontrol agents applied as a soil amendment and a seed coating to control Verticillium wilt of sugar beet. *Biocontrol Science and Technology*, 27(9), 1019-1037. <https://doi.org/10.1080/09583157.2017.1357800>
- Lugo, Z. C., & Sanabria, N. H. (2001). Características culturales y patogénicas en aislamientos de Fusarium oxysporum f.sp. Lycopersici procedentes de plantaciones comerciales de tomate. *Agronomía tropical*, 51(4), 519-530.
- Lugo, Z., Díaz-Pérez, A., & Albarracín, N. (2001). Diversidad genética en aislamientos de dos razas de F. oxysporum. *Fitopatología Venezolana*, 14(2), 26-30.
- Lutts, S., Benincasa, P., Wojtyla, L., S, S. K., Pace, R., Lechowska, K., Quinet, M., Garnczarska, M., Lutts, S., Benincasa, P., Wojtyla, L., S, S. K., Pace, R., Lechowska, K., Quinet, M., & Garnczarska, M. (2016). Seed Priming: New Comprehensive Approaches for an Old Empirical Technique. En *New Challenges in Seed Biology—Basic and Translational Research Driving Seed Technology*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/64420>
- MacFaddin, J. (2004). *Pruebas Bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica* (3ª ed.). Médica Panamericana.
- Madigan, Michael. T., Martinko, John. M., Bender, Kelly. S., Hucley, Daniel. H., & Stahl, David. A. (2015). *Brock. Biología de los Microorganismos* (14a ed.). PEARSON.
- [MAG] Ministerio de Agricultura y Ganadería. (2007). *Caracterización Agro cadena de Tomate*. Dirección Regional Central Occidental, Grecia. <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/E70-9892.pdf>
- [MAG] Ministerio de Agricultura y Ganadería. (2016). *Anuario de Estadísticas Agropecuarias 2015-2016* (p. 87). Ministerio de Agricultura y Ganadería - MAG Dirección General de Economía Agropecuaria.
- [MAG] Ministerio de Agricultura y Ganadería. (2022). *Anuario de Estadísticas Agropecuarias 2021-2022 El Salvador* (p. 77). Ministerio de Agricultura y Ganadería - MAG Dirección General de Economía Agropecuaria. <https://www.mag.gob.sv/anuarios-de-estadisticas-agropecuarias/>
- Malmierca, M. G., Barua, J., McCormick, S. P., Izquierdo-Bueno, I., Cardoza, R. E., Alexander, N. J., Hermosa, R., Collado, I. G., Monte, E., & Gutiérrez, S. (2015). Novel aspinolide production by Trichoderma arundinaceum with a potential role in Botrytis cinerea antagonistic activity and plant defence priming. *Environmental Microbiology*, 17(4), 1103-1118. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12514>
- Manrique, L. M. (2018). *Nueva esperanza para volver a exportar tomate colombiano* [Ciencia y Tecnología]. UN Periódico Digital. <https://unperiodico.unal.edu.co/pages/detail/nueva-esperanza-para-volver-a-exportar-tomate-colombiano/>
- Marasas, W. F. O., Nelson, P. E., & Toussoun, T. A. (1984). *Toxigenic Fusarium Species: Identity and Mycotoxicology*. Pennsylvania State University.
- Markets and Markets. (2018). *Market reports biological seed treatment market*. <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/nanophotonics-advanced-technologies-and-global-market-125.html>

- Marlatt, M. L., Correll, J. C., Kaufmann, P., & Cooper, P. E. (1996). Two genetically distinct populations of *Fusarium oxysporum*. F. Sp. *Lycopersici* race 3 in the United States. *Plant Disease*, 80(12), 1336-1342.
- [MARN] Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2022). *Resumen climatológico anual 2021 (Datos preliminares)*. <https://www.snet.gob.sv/ver/meteorologia/clima/resumen+climatologico+anual/>
- Marthandan, V., Geetha, R., Kumutha, K., Renganathan, V. G., Karthikeyan, A., & Ramalingam, J. (2020). Seed Priming: A Feasible Strategy to Enhance Drought Tolerance in Crop Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 8258. <https://doi.org/10.3390/ijms21218258>
- Martin, P. A. W., & Travers, R. S. (1989). Worldwide Abundance and Distribution of *Bacillus thuringiensis* Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(10), 2437-2442. <https://doi.org/10.1128/aem.55.10.2437-2442.1989>
- Martínez, A., & Meza, M. (2003). *ANOVA o ANAVA para diseños totalmente aleatorizados y ANOVA para diseños de bloques aleatorizados*. Corporación universitaria Remington Estadística Probabilística. <https://mariaestelaseveriche.files.wordpress.com/2013/03/anova-o-anava-para-disec3b1os-totalmente-aleatorizados-y-anova-para-disenos-de-bloques-aleatorizados.pdf>
- Martínez, B., Infante, D., & Peteira, B. (2015). Taxonomía polifásica y variabilidad en el género *Trichoderma*. *Revista Protección Vegetal*, 30, 11-25.
- Martínez, B., Infante, D., & Reyes, Y. (2013). *Trichoderma* spp. Y su función en el control de plagas en los cultivos. *Rev. Protección Veg*, 28(1), 1-11.
- Martínez, B., Reyes, Y., Infante, D., González, E., & Baños, H. (2008). Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp. Candidatos a biofungicida. *Revista Protección Vegetal*, 23(2), 118-125.
- Martínez, E., & Pérez, L. (2015). Incidencia de enfermedades fúngicas en plantaciones de cacao de las provincias orientales de Cuba. *Rev. Protección Veg*, 30(2), 87-96.
- Martínez-Martínez, T. O., Guerrero-Aguilar, B. Z., Pecina-Quintero, V., Rivas-Valencia, P., González-Pérez, E., & Angeles-Núñez, J. G. (2020). Antagonismo de *Trichoderma harzianum* contra la fusariosis del garbanzo y su efecto biofertilizante. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11(5), 1135-1147. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i5.2325>
- Martínez-Scott, M. M. (2016). Evaluación de aislados nativos de *Trichoderma* sp para el control de hongos fitopatógenos del suelo en tomate. *Revista de Ciencias Naturales y Agropecuarias*, 3(6), 32-42.
- Mateos, R., Jiménez, A., Román, P., Romojaro, F., Bacarizo, S., Leterrier, M., Gómez, M., Sevilla, F., del Río, L., Corpas, F., & Palma, J. (2013). Antioxidant Systems from Pepper (*Capsicum annuum* L.): Involvement in the Response to Temperature Changes in Ripe Fruits. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(5), 9556-9580. <https://doi.org/10.3390/ijms14059556>
- Mathivanan, N., Prabavathy, V. R., & Vijayanandraj, V. R. (2005). Application of Talc Formulations of *Pseudomonas fluorescens* Migula and *Trichoderma viride* Pers. Ex S.F. Gray Decrease the Sheath Blight Disease and Enhance the Plant Growth and Yield in Rice. *Journal of Phytopathology*, 153(11-12), 697-701. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2005.01042.x>

- Maurya, S., Rai, D., Dubey, S., Kumar, P. M., & Prajapati, S. (2020). In vitro bioefficacy of *Trichoderma harzianum* and chitosan compound against *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Lycopersici*. *Indian Journal of Plant Protection*, 48(4), 447-450.
- McGovern, R. J. (2015). Management of tomato diseases caused by *Fusarium oxysporum*. *Crop Protection*, 73, 78-92. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.02.021>
- McGovern, R. J., & Datnoff, L. E. (1992). *Fusarium* crown and root rot of tomato: Reevaluation of management strategies. En *Vavrina, C.S.* (pp. 75-82). Fla. Tom. Instit. Proc., Vegetable Crops Special Series, SS HOS 1 University of Florida-IFAS.
- McGrath, D. J., Gillespie, D., & Vawdrey, L. (1987). Inheritance of resistance to *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Lycopersici* races 2 and 3 in *Lycopersicon pennellii*. *Crop Pasture Sci*, 38(4), 729-733.
- Mead, G. C., Hudson, W. R., & Hinton, M. H. (1993). Microbiological survey of five poultry processing plants in the UK. *British Poultry Science*, 34(3), 497-503. <https://doi.org/10.1080/00071669308417605>
- Meadows, M. P., Ellis, D. J., Butt, J., Jarrett, P., & Burges, H. D. (1992). Distribution, Frequency, and Diversity of *Bacillus thuringiensis* in an Animal Feed Mill. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(4), 1344-1350. <https://doi.org/10.1128/aem.58.4.1344-1350.1992>
- Meena, S. K., Rakshit, A., Singh, H. B., & Meena, V. S. (2017). Effect of nitrogen levels and seed bio-priming on root infection, growth and yield attributes of wheat in varied soil type. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 12, 172-178. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.10.006>
- Melo, O. O., López, L. A., & Melo, S. E. (2020). *Diseño de Experimentos Métodos y Aplicaciones* (2.^a ed.). Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ciencias. <https://doi.org/10.36385/FCBOG-4-0>
- Mendes, R., Kruijt, M., de Bruijn, I., Dekkers, E., van der Voort, M., Schneider, J. H. M., Piceno, Y. M., DeSantis, T. Z., Andersen, G. L., Bakker, P. A. H. M., & Raaijmakers, J. M. (2011). Deciphering the Rhizosphere Microbiome for Disease-Suppressive Bacteria. *Science*, 332(6033), 1097-1100. <https://doi.org/10.1126/science.1203980>
- Méndez, G. (2011). *Caracterización de la fauna microbiológica del suelo en sistemas de producción biointensiva, Chiquirí, Panamá*. Instituto Tecnológico de Costa Rica.
- Méndez Úbeda, J. M. (2018). *Desarrollo a nivel de laboratorio de un bioplaguicida a base de Bacillus subtilis, para el control de hongos fitopatógenos en cultivos de interés agrícola* [Tesis Maestría]. Universidad Nacional de Ingeniería.
- Méndez-Úbeda, J. M., Flores Hernández, M. S., & Páramo-Aguilera, L. A. (2017). Aislamiento e identificación de *Bacillus subtilis* y evaluación del antagonismo In Vitro frente hongos fitopatógenos. *Nexo Revista Científica*, 30(2), 96. <https://doi.org/10.5377/nexo.v30i2.5530>
- Meneses, R., Yanis, A. G., García, A., Antigua, G., Gómez, J., Correa, F., & Calvert, L. (2008). *Guía para el trabajo de campo en el manejo integrado de plagas del arroz* (4^a). Instituto de Investigaciones del Arroz (IIA). Fondo Latinoamericano para Arroz de Riego (FLAR) Sancti Spíritus.
- MERCK, Kg. M. (2017). Potato Dextrose Agar. *Darmstadt, Germany*, 1.10130.0500, 3.
- Michael-Aceves, A. C., Reyes-De la Cruz, A. R., Otero-Sánchez, M. A., Rebolledo-Domínguez, O. R., & Lezama-Gutiérrez, R. (2005). Potencial antagónico de *Trichoderma* spp. Sobre *Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr. F. Sp. *Lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen y *Sclerotium rolfsii* (Sacc.) in vitro e invernadero. *Revista mexicana de fitopatología*, 23(3), 286-293.

- Michel-Aceves, A. C., Otero-Sánchez, M. A., Solano-Pascacio, Leticia. Y., Ariza-Flores, R., Barrios-Ayala, A., & Rebolledo-Martínez, A. (2009). Biocontrol in vitro con *Trichoderma* spp. De *Fusarium subglutinans* (Wollenweb. Y Reinking) Nelson, Toussoun y Marasas y *F. oxysporum* Schlecht., Agentes Causales de la «Escoba de Bruja» del Mango (*Mangifera indica* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 27(1), 18-26.
- Michielse, C. B., & Rep, M. (2009). Pathogen profile Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology*, 10(3), 311-324. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00538.x>
- MICSA, & Salvagro, S. A. de C. V. (2021). *Rikoderma* [Sitio web]. Nuestros productos: Rikoderma. <http://salvagro.com/micsa/>
- Milián, G., Rondón, A. J., Pérez, M., Samaniego, L. M., Riaño, J., Bocourt, R., Ranilla, M. J., Carro, D., & Rodríguez, M. (2014). Aislamiento e identificación de cepas de *Bacillus* spp. En diferentes ecosistemas con fines probióticos. Su utilización en animales. *Revista cubana de Ciencia Agrícola*, 48(4), 347-351.
- Miller, S. A., Rowe, R. C., & Riedel, R. M. (1996). “*Fusarium* and *Verticillium* Wilts of Tomato, Potato, Pepper, and Eggplant”. *The Ohio State University Extension Ohio USA*, 1-3.
- Moghaddam, M. H., Moradi, A., Salehi, A., & Rezaei, R. (2019). The effect of various biological treatments on germination and some seedling indices of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) under drought stress. *Iranian Journal of Seed Science and Technology*, 7(2). <https://doi.org/10.22034/ijssst.2019.110904.1100>
- Molla, A. H., Fakhru'l-Razi, A., Abd-Aziz, S., Hanafi, M. M., & Alam, Z. (2001). In-vitro compatibility evaluation of fungal mixed culture for bioconversion of domestic wastewater sludge. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(9), 849-856. <https://doi.org/10.1023/a:1013844306960> 10.1023/a:1013844306960
- Monardes, H., Alvarado, P., Escalona, V., Urbina, C., & Martin, A. (2009). *Manual de cultivo de tomate (Lycopersicon esculentum Mill.)*. Universidad de Chile. http://www.hortyfresco.uchile.cl/docs/manuales_innova/Manual_cultivo_tomate.pdf
- Monteiro, S., Grondona, L. M., Llobell, I., & Monte, A. (2011). In vitro antifungal activity of *Trichoderma harzianum*, *T. longibrachiatum*, *T. asperellum* and *T. atroviride* against *Botrytis cinerea* to strawberry. *Bull OILB/SROP*, 25, 253-256.
- Montesinos, E., Badosa, Bonaterra, A., Peñalver, R., & López, M. (2008). Aplicación de la biotecnología al control biológico de bacterias y hongos fitopatógenos. En *Pallás V, Escobar C, Rodríguez P, Marcos JF (eds). Herramientas biotecnológicas en Fitopatología* (pp. 345-368). Ediciones Mundi-Prensa.
- Morales, A. (1997). Botrytis en vides. *Chile Hortofrutícola*, 45, 13-16.
- Morán Quintero, N. R. M. (2007). *Evaluación de cuatro cepas de Trichoderma harzianum para el control de Rhizoctonia solani en plántulas de pepino (Cucumis sativa)* [Tesis Ingeniería]. Universidad Zamorano.
- Moretti, A. (2009). Taxonomy of *Fusarium* genus: A continuous fight between lumpers and splitters. *Zbornik Matice Srpske Za Prirodne Nauke*, 117, 7-13. <https://doi.org/10.2298/ZMSPN0917007M>
- Morton, O., Hirsch, P., & Kerry, B. (2004). Infection of plant-parasitic nematodes by nematophagous fungi – a review of the application of molecular biology to understand infection processes and to improve biological control. *Nematology*, 6(2), 161-170. <https://doi.org/10.1163/1568541041218004>

- Mukhtar, I. (2008). Influence of Trichoderma species on seed germination in okra. *Mycopath*, 6(1 & 2), 47-50.
- Müller, Román. G. (2021). *Trichoderma harzianum* como herramienta en el manejo integrado de enfermedades de tomate [Magister Scientiae, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales]. <https://doi.org/10.35537/10915/129788>
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2006). *Microbiología Médica*. Elsevier : Mosby.
- Nath, B. C., Bora, L. C., Kataki, L., Talukdar, K., Sharma, P., Dutta, J., & Khan, P. (2016). Plant Growth Promoting Microbes, their Compatibility Analysis and Utility in Biointensive Management of Bacterial Wilt of Tomato. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(6), 1007-1016. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2016.506.107>
- Nawrocka, J., & Małolepsza, U. (2013). Diversity in plant systemic resistance induced by Trichoderma. *Biological Control*, 67(2), 149-156. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.07.005>
- Nelson, P. E. (1981). Life cycle and epidemiology of Fusarium oxysporum. En *Fungal Wilt Diseases of Plants* (pp. 51-80). Academic Press.
- Nelson, P. E., Juba, J. H., Ross, P. F., & Rice, L. G. (1994). Fumonisin Production by Fusanum Species on Solid Substrates. 77(2), 522-525. <https://doi.org/10.1093/jaoac/77.2.522>
- Nelson, P. E., & Ploetz, R. C. (1990). Taxonomy of fungi in the genus Fusarium with emphasis on Fusarium oxysporum. En *Fusarium wilt of banana* (pp. 27-35). American Phytopathological Society Press. St. Paul.
- Nelson, P. E., Toussoun, T. A., & Marasas, W. F. O. (1983). *Fusarium species. An illustrated manual for identification*. Pennsylvania: The Pennsylvania State University Press.
- Nuzzo, A., Satpute, A., Albrecht, U., & Strauss, S. L. (2020). Impact of Soil Microbial Amendments on Tomato Rhizosphere Microbiome and Plant Growth in Field Soil. *Microbial Ecology*, 80(2), 398-409. <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01497-7>
- O'Callaghan, M. (2016). Microbial inoculation of seed for improved crop performance: Issues and opportunities. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(13), 5729-5746. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7590-9>
- Ocares, Y., & Castro, J. F. (2020). *Preservación de microorganismos por congelación* (pp. 119-134). (INIA) Instituto de Investigaciones Agropecuarias. <https://biblioteca.inia.cl/bitstream/handle/123456789/6945/NR42413.pdf?sequence=12&isAllowed=y>
- Oliveira, R. S., Rocha, I., Ma, Y., Vosátka, M., & Freitas, H. (2016). Seed coating with arbuscular mycorrhizal fungi as an ecotechnological approach for sustainable agricultural production of common wheat (Triticum aestivum L.). *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*, 79(7), 329-337. <https://doi.org/10.1080/15287394.2016.1153448>
- Olowe, O. M., Nicola, L., Asemoloye, M. D., Akanmu, A. O., & Babalola, O. O. (2022). Trichoderma: Potential bio-resource for the management of tomato root rot diseases in Africa. *Microbiological Research*, 257, 126978. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.126978>
- Ongena, M., & Jacques, P. (2008). Bacillus lipopeptides: Versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, 16(3), 115-125. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>
- Osman, J. (2008). *Antagonismo In Vitro de cepas nativas y de colección (ATCC) de Bacillus subtilis frente a Erwinia caratovora Y Rhizoctonia solani* [Tesis de Grado]. Universidad Austral de Chile.

- Osorio, B. S., & Guerrero, G. A. T. (2020). *Evaluación de planes de manejo de Fusarium oxysporum f. Sp en plantas de tomate, bajo condiciones controladas* [Tesis de Grado]. Universidad Nacional Abierta y a Distancia - UNAD.
- Ostertagová, E., & Ostertag, O. (2013). Methodology and Application of One-way ANOVA. *American Journal of Mechanical Engineering*, 1(7), 256-261. <https://doi.org/10.12691/ajme-1-7-21>
- Ousley, M. A., Lynch, J. M., & Whipps, J. M. (1993). Effect of Trichoderma on Plant Growth: A Balance Between Inhibition and Growth Promotion. *Microbial Ecology*, 26, 277-285.
- Páez, O. (2006). *Uso agrícola de Trichoderma*. <http://www.soil-fertility.com/trichoderma/espagnol/index.shtml>
- Pandey, A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13, 81-84.
- Panthee, D., & Chen, F. (2010). Genomics of Fungal Disease Resistance in Tomato. *Current Genomics*, 11(1), 30-39. <https://doi.org/10.2174/138920210790217927>
- Papavizas, G. C. (1985). Trichoderma and Gliocladium: Biology, Ecology, and Potential for Biocontrol. *Ann. Rev. Phytopathol*, 23, 23-54.
- Papavizas, G. C., & Lumsden, R. D. (1980). Biological Control of Soilborne Fungal Propagules. *Annual Review of Phytopathology*, 18(1), 389-413. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.18.090180.002133>
- Papavizas, G., Lewis, J., & Abd-El Moity, T. (1982). Evaluation of new biotypes of Trichoderma harzianum for tolerance to benomyl and enhanced biocontrol capabilities. *Phytopathology*, 72(1), 126-132. <https://doi.org/10.1094/phyto-72-126>.
- Paramanandham, P., Rajkumari, J., Pattnaik, S., & Busi, S. (2017). Biocontrol potential against Fusarium oxysporum f. Sp. Lycopersici and Alternaria solani and tomato plant growth due to plant growth-promoting rhizobacteria. *International Journal of Vegetable Science*, 23(4), 294-303. <https://doi.org/10.1080/19315260.2016.1271850>
- Pardo-Cardona, V. M. (1995). *Hongos fitopatógenos de Colombia*. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ciencias.
- Parets, S. E. (2002). *Evaluación agronómica de la coinoculación de micorrizas arbusculares, Rhizobium phaseoli y Trichoderma harzianum en el cultivo de frijol común (Phaseolus vulgaris L.)* [Tesis en opción al grado de Máster en Ciencias Agrícolas]. Universidad Agraria de La Habana.
- Parra, S. L., Pérez, M. M., Bernal, M., Suárez, Z., & Montoya, D. (2006). Implementación y evaluación de dos métodos de conservación y generación de la base de datos del banco de cepas y genes del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN). *NOVA*, 4(5), 1-116.
- Pedrini, S., Merritt, D. J., Stevens, J., & Dixon, K. (2017). Seed Coating: Science or Marketing Spin? *Trends in Plant Science*, 22(2), 106-116. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.11.002>
- Peerson, C. H. (1794). En *Disposita methodica fungorum* (Vol. 1, pp. 81-128). Römer's Neues Mag Bot.
- Peña, R. R., & Páez, J. E. (2014). *Guía para el cálculo de la concentración de inóculo*. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. <https://virtual.uptc.edu.co/ova/fito/archivo/guia1.pdf>
- Pérez, A. A., Muñoz, J. O., Zumelsu, G., Blengini, M. C., & Arregui, G. O. (2013). Utilización de Trichoderma spp. Como Agente Biocontrolador de Enfermedades Fúngicas y Promotor de

- Crecimiento Vegetal. Nexo Agropecuario de la Facultad de Ciencias Agropecuarias. *UNC*, 1(1), 17.
- Pérez, D., & García, P. (2019). Identificación del agente causal del marchitamiento en *Caesalpinia spinosa* “tara” y el efecto antagónico del aislado de *Bacillus* spp. Y *Trichoderma* sp. *Ecología Aplicada*, 18(1), 51. <https://doi.org/10.21704/rea.v18i1.1306>
- Perniola, O. S., Staltari, S., Chorzempa, S. E., & Gassó, M. M. A. (2014). Control biológico de *Fusarium graminearum*: Utilización de *Trichoderma* spp. Y biofumigación con parte aérea de *Brassica juncea*. *Rev. FCA UNCUYO*, 46(X), XXX-XXX.
- Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P., & van der Putten, W. H. (2013). Going back to the roots: The microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), Article 11. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3109>
- Piatkin, K. (1968). *Microbiología*. MIR.
- Pineda-Insuasti, J. A., Benavides-Sotelo, E. N., Duarte, A. S., Burgos-Rada, C. A., Soto-Arroyave, C. P., Pineda, C. A., Fierro-Ramos, F. J., Mora-Muñoz, E. S., & Álvarez-Ramos, S. E. (2017). Producción de biopreparados de *Trichoderma* spp: Una revisión. *Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar Cuba*, 51(1), 47-52.
- Pinzón, Y. A., Bustamante, S. L., & Buitrago, G. (2009). Evaluación de métodos para la conservación de hongos fitopatógenos del ñame (*Dioscorea* sp). *Revista colombiana de biotecnología*, 11(2), 8-18.
- Plett, J. M., Daguerre, Y., Wittulsky, S., Vayssieres, A., Deveau, A., Melton, S. J., Kohler, A., Morrell-Falvey, J. L., Brun, A., Veneault-Fourrey, C., & Martin, F. (2014). Effector MiSSP7 of the mutualistic fungus *Laccaria bicolor* stabilizes the *Populus* JAZ6 protein and represses jasmonic acid (JA) responsive genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(22), 8299-8304. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322671111>
- Podile, A. R., & Dube, H. C. (1988). Plant growth promoting activity of *Bacillus subtilis* AF1. *Current Science*, 57(4), 183-186.
- Podile, A. R., & Prakash, A. P. (1996). Lysis and biological control of *Aspergillus niger* by *Bacillus subtilis* AF 1. *Canadian Journal of Microbiology*, 42(6), 533-538. <https://doi.org/10.1139/m96-072>
- Potot, S. (2010). *Metabolic and Morphogenetic Engineering of Bacillus subtilis: Biotechnology for Industry* [Doctoral Thesis]. New University of Lisbon.
- Prasad, R. D., Chandrika, K. S. V. P., & Godbole, V. (2020). A novel chitosan biopolymer based *Trichoderma* delivery system: Storage stability, persistence and bio efficacy against seed and soil borne diseases of oilseed crops. *Microbiological Research*, 237, 126487. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126487>
- Prathibha, K. S., & Siddalingeshwara, K. G. (2013). Effect of plant growth promoting *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* as Rhizobacteria on seed quality of sorghum. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*, 2(3), 11-18.
- Priest, F. G., Goodfellow, M., & Todd, C. (1988). A Numerical Classification of the Genus *Bacillus*. *Microbiology*, 134(7), 1847-1882. <https://doi.org/10.1099/00221287-134-7-1847>
- Pullupaxi, M. E. (2016). *Evaluación de Trichoderma para el control de Fusarium oxysporum en el cultivo de tomate riñón (Lycopersicon esculentum)* [Tesis de Grado]. Universidad Técnica de Ambato.
- Punja, Z. K., & Utkhede, R. S. (2003). Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. *Trends in Biotechnology*, 21(9), 400-407. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(03\)00193-8](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(03)00193-8)

- Qualhato, T. F., Lopes, F. A. C., Steindorff, A. S., Brandão, R. S., Jesuino, R. S. A., & Ulhoa, C. J. (2013). Mycoparasitism studies of Trichoderma species against three phytopathogenic fungi: Evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology Letters*, 35(9), 1461-1468. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1225-3>
- Quistián, H. (2014, octubre 30). Microbiología: Número más probable (NMP). *Microbiología*. <http://microbiologia3bequipo5.blogspot.com/2014/10/numero-mas-probable-nmp.html>
- Rafiq, A., Khan, S. A., Akbar, A., Shafi, M., Ali, I., Rehman, F. U., Rashid, R., Shakoor, G., & Anwar, M. (2018). ISOLATION AND IDENTIFICATION OF ANTIBIOTIC PRODUCING MICROORGANISMS FROM SOIL. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 9(3), 1002-1011.
- Raj, S. N., Shetty, N., & Shetty, H. (2004). Seed bio-priming with Pseudomonas fluorescens isolates enhances growth of pearl millet plants and induces resistance against downy mildew. *International Journal of Pest Management*, 50(1), 41-48. <https://doi.org/10.1080/09670870310001626365>
- Rajendra-Prasad, S., Kamble, U. R., Sripathy, K. V., Udaya Bhaskar, K., & Singh, D. P. (2016). Seed Bio-priming for Biotic and Abiotic Stress Management. En D. P. Singh, H. B. Singh, & R. Prabha (Eds.), *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity: Vol. 1: Research Perspectives* (pp. 211-228). Springer India. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2647-5_12
- Ramírez, V., Martínez, J., Bustillos-Cristales, M. del R., Catañeda-Antonio, D., Munive, J., & Baez, A. (2022). Bacillus cereus MH778713 elicits tomato plant protection against Fusarium oxysporum. *Journal of Applied Microbiology*, 132(1), 470-482. <https://doi.org/10.1111/jam.15179>
- Ramírez-Cariño, H. F., Guadarrama-Mendoza, P. C., Sánchez-López, V., Cuervo-Parra, J. A., Ramírez-Reyes, T., Dunlap, C. A., & Valadez-Blanco, R. (2020). Biocontrol of Alternaria alternata and Fusarium oxysporum by Trichoderma asperelloides and Bacillus paralicheniformis in tomato plants. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 113(9), 1247-1261. <https://doi.org/10.1007/s10482-020-01433-2>
- Ramyabharathi, S., Meena, B., & Raguchander, T. (2012). Induction of chitinase and β -1,3-glucanase PR proteins in tomato through liquid formulated Bacillus subtilis EPCO 16 against Fusarium wilt. *Journal of Today's Biological Sciences : Research & Review*, 1(1), 50-60.
- Ramyabharathi, S., Rajendran, L., Karthikeyan, G., & Raguchander, T. (2016). Liquid formulation of endophytic Bacillus and its standardization for the management of Fusarium wilt in tomato. *Bangladesh Journal of Botany*, 45(2), 283-290.
- Rao, A. V., Ray, M. R., & Rao, L. G. (2006). Lycopen. En *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 51, pp. 99-164). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(06\)51002-2](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(06)51002-2)
- Rashad, Younes. M., Abdalla, Sara. A., & Sleem, Mohamed. M. (2022). Endophytic Bacillus subtilis SR22 Triggers Defense Responses in Tomato against Rhizoctonia Root Rot. *Plants*, 11(15), 2051. <https://doi.org/10.3390/plants11152051>
- Reino, J. L., Guerrero, R. F., Hernández-Galán, R., & Collado, I. G. (2007). Secondary metabolites from species of the biocontrol agent Trichoderma. *Phytochemistry Reviews*, 7(1), 89-123. <https://doi.org/10.1007/s11101-006-9032-2>
- Reis, A., Giordano, L. B., Lopes, C. A., & Boiteux, L. S. (2004). Novel sources of multiple resistance to three races of Fusarium oxysporum f. Sp. Lycopersici in Lycopersicon

- germplasm. *Cropp Breeding and Applied Biotechnology*, 4(4), 495-502. <https://doi.org/10.12702/1984-7033.v04n04a19>
- Retana, K., Ramírez-Coché, J. A., Castro, O., & Blanco-Meneses, M. (2018). Caracterización morfológica y molecular de *Fusarium oxysporum* f.sp. Apii asociado a la marchitez del apio en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 42(1). <https://doi.org/10.15517/rac.v42i1.32199>
- Rey, M., Llobell, A., Monte, E., Scala, F., & Lorito, M. (2004). 9—Genomics of *Trichoderma*. En *Applied Mycology and Biotechnology* (pp. 225-248). <https://www.sciencedirect.com/bookseries/applied-mycology-and-biotechnology>
- Reyes, O., & Lázaro, A. (2015). *TEXTO BASICO DE MICRIOBIOLOGIA II* (1 ed.). Universidad Nacional Agraria.
- Reyes-Zambrano, S. J., Lecona-Guzmán, C. A., Gutiérrez-Miceli, F. A., Santana-Buzzy, N., Islas-Flores, I., Tzec-Simá, M., Barredo-Pool, F. A., Ruiz-Lau, N., & Ávila-Miranda, M. E. (2020). Microscopía electrónica de barrido y análisis enzimático en *Agave americana* durante la infección con *Fusarium oxysporum*. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 38(3). <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2005-3>
- Rhaman, M. S., Imran, S., Rauf, F., Khatun, M., Baskin, C. C., Murata, Y., & Hasanuzzaman, M. (2020). Seed Priming with Phytohormones: An Effective Approach for the Mitigation of Abiotic Stress. *Plants*, 10(1), 37. <https://doi.org/10.3390/plants10010037>
- Rick, C. M. (1986). *Germplasm Resources in the Wild Tomato Species*. (Symposium on Tomato Production on Arid Land. Abstract ISHS. Acta Horticulturae 190.). University of California.
- Rifai, M. A. (1969). A revision of the genus *Trichoderma*. En *Mycological Papers* (Vol. 116, pp. 1-56). CMI, Assoc. Appl. Biologists, Kew, Suevey, Inglaterra.
- Rivero, D. (2008). Identificación y control in vitro con quitosana y *Trichoderma* spp. De hongos que causan el manchado del grano en arroz (*Oryza sativa* L.). *Rev. Protección Veg*, 23(1), 67.
- Robledo D'Angelo, O. (2016). Enfermedad de marchitamiento fúngico en plántulas de lechuga: Un modelo didáctico-experimental para la enseñanza de los postulados de Koch. *Revista Eureka sobre enseñanza y divulgación de las ciencias.*, 13(3), 680-685. https://doi.org/10.25267/Rev_Eureka_ensen_divulg_cienc.2016.v13.i3.12
- Robles, L., Leyva, S. G., Cruz, A., Nieto, D., & Tovar, J. M. (2017). *Fusarium oxysporum* Schldl. Y *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. Causantes de la marchitez de plántulas de *Pinus* spp. En vivero. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 7(36), 25-36. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v7i36.57>
- Rocha, I., Ma, Y., Carvalho, M. F., Magalhães, C., Janoušková, M., Vosátka, M., Freitas, H., & Oliveira, R. S. (2019a). Seed coating with inocula of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria for nutritional enhancement of maize under different fertilisation regimes. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 65(1), 31-43. <https://doi.org/10.1080/03650340.2018.1479061>
- Rocha, I., Ma, Y., Souza-Alonso, P., Vosátka, M., Freitas, H., & Oliveira, R. S. (2019b). Seed Coating: A Tool for Delivering Beneficial Microbes to Agricultural Crops. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1357. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01357>
- Rocha, I., Ma, Y., Vosátka, M., Freitas, H., & Oliveira, R. S. (2019c). Growth and nutrition of cowpea (*Vigna unguiculata*) under water deficit as influenced by microbial inoculation via

- seed coating. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 205(5), 447-459. <https://doi.org/10.1111/jac.12335>
- Rodríguez, M. G., González, L. C., Fernández, M. R., & Pérez, G. (2008). Evaluación de cepas de *Trichoderma* spp. Contra patógenos en semillas de frijol, lechuga, girasol y arroz. *Centro Agrícola*, 35(1), 11-15.
- Rodríguez, M., González, L., Fernández, M., & González, G. (2005). Efectividad de *Trichoderma* spp. Para el control de hongos patógenos de la semilla y el suelo en el cultivo del frijol. *FITOSANIDAD*, 9(1), 37-41.
- Rodríguez, V. J. R. (2002). *Efecto antagónico y biocontrolador de algunos microorganismos saprofitos contra Rhizoctonia solani un fitopatógeno causante del (damping off) en plantas de tomate* [Tesis de Maestría]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Rojas, A. (2011). *Conceptos y práctica de microbiología general*. Universidad Nacional de Colombia. <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/8391/albertorojastrivino.2011.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Rojas, M. M., Tejera, B., Larrea, J. A., & Heydrich, P. M. (2011). *Aislamiento y caracterización de cepas de Bacillus asociadas al cultivo del arroz (Oryza sativa L.)*. 10.
- Rojas-Badía, M. M., Bello-González, M. A., Ríos-Rocafull, Y., Lugo-Moya, D., & Rodríguez Sánchez, J. (2020). Utilización de cepas de *Bacillus* como promotores de crecimiento en hortalizas comerciales. *Acta Agronómica*, 69(1), 54-60. <https://doi.org/10.15446/acag.v69n1.79606>
- Rojas-Badía, M. M., Sánchez-Castro, D., Rosales-Perdomo, K., & Lugo-Moya, D. (2017). *Antagonismo de Bacillus frente a hongos fitopatógenos de cultivos hortícolas*. 32(2), 9.
- Romero-Arenas, O., Amaro Leal, J. L., Damian Huato, M. Á., Valencia de Ita, M. D. los A., Rivera Tapia, J. A., & Huerta Lara, M. (2017). Biopreparados de *Trichoderma* spp. Para el control biológico de *Phytophthora capsici* en el cultivo de tomate de Puebla, México. *Informacion Tecnica Economica Agraria*, 113(4), 313-324. <https://doi.org/10.12706/itea.2017.019>
- Romero-Arenas, O., Lara, M. H., Huato, M. A. D., Hernández, F. D., & Victoria, D. A. A. (2009). Características de *Trichoderma harzianum*, como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles. *Revista Colombiana de Biotecnología*, XI(2), 143-151.
- Romero-Cortes, T., López-Pérez, P. A., Ramírez-Lepe, M., & Cuervo-Parra, J. A. (2016). Modelado cinético del micoparasitismo por *Trichoderma harzianum* contra *Cladosporium cladosporioides* aislado de frutos de cacao (*Theobroma cacao*). *Chilean journal of agricultural & animal sciences*, 32(1), 32-45. <https://doi.org/10.4067/S0719-38902016000100004>
- Romo, J., & Ávila, C. (2000). *Trichoderma* spp. Como agente de control biológico (parte I) (p. 2). Avances Agropecuarios. Órgano Informativo del departamento de agricultura y ganadería de la Universidad de Sonora. www.chapingo.mx/dicifo/.../don-juan-macias-bonificacio2206.pdf
- Rosero, G. A. (2008). *Evaluación de cuatro cepas de Trichoderma sp. Y sus combinaciones para el control de Fusarium sp. En sandía (Citrullus lanatus)* [Tesis de Grado]. Universidad Zamorano.
- Rouphael, Y., Colla, G., Graziani, G., Ritieni, A., Cardarelli, M., & De Pascale, S. (2017). Phenolic composition, antioxidant activity and mineral profile in two seed-propagated artichoke cultivars as affected by microbial inoculants and planting time. *Food Chemistry*, 234, 10-19. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.175>

- Ruíz-García, C. (2005). *Bacillus axarquiensis* sp. Nov. And *Bacillus malacitensis* sp. Nov., isolated from river-mouth sediments in southern Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(3), 1279-1285. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.63567-0>
- Ruiz-Sánchez, E., Mejía-Bautista, M. Á., Cristóbal-Alejo, J., Valencia-Botín, A., & Reyes-Ramírez, A. (2014). Actividad antagonica de filtrados de *Bacillus subtilis* contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5(7), 1325. <https://doi.org/10.29312/remexca.v5i7.877>
- [SAGARPA] Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (2005). *Análisis Agropecuario del Tomate*. (p. 9) [Boletín Informativo]. SAGARPA.
- Salcido, N. (2013). *Biosíntesis y actividad de bacteriocinas producidas por cepas mexicanas de Bacillus thuringiensis con potencial aplicación como bioconservadores en alimentos* [Tesis Doctoral]. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Salinas-Ventura, R., & Soriano-Bernilla, B. (2014). Efecto de *Trichoderma viride* y *Bradyrhizobium yuanmingense* en el crecimiento de *Capsicum Annuum* en condiciones de laboratorio. *REBIOLEST*, 2(2), 13.
- Samaniego-Fernández, L. M., Harouna, M., Corbea, O., Rondón-Castillo, A. J., & Iacres-Espinosa, I. (2018). Aislamiento, identificación y evaluación de cepas autóctonas de *Trichoderma* spp. Antagonistas de patógenos del suelo. *Revista de Protección Vegetal*, 33(3), 11.
- Samota, M. K., Sasi, M., Awana, M., Yadav, O. P., Amitha Mithra, S. V., Tyagi, A., Kumar, S., & Singh, A. (2017). Elicitor-Induced Biochemical and Molecular Manifestations to Improve Drought Tolerance in Rice (*Oryza sativa* L.) through Seed-Priming. *Frontiers in Plant Science*, 8, 934.
- Samuels, G. J. (1996). *Trichoderma*: A review of biology and systematics of the genus. *Mycological Research*, 100(8), 923-935. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(96\)80043-8](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(96)80043-8)
- Samuels, G. J., Dodd, S. L., Lu, B.S., Petrini, O., Schroers, H.J., & Druzhinina, I. S. (2006). The *Trichoderma koningii* aggregate species. *Studies in Mycology*, 56, 67-133. <https://doi.org/10.3114/sim.2006.56.03>
- Samuels, G. J., Ismaiel, A., Bon, M.-C., De Respini, S., & Petrini, O. (2010). *Trichoderma asperellum* sensu lato consists of two cryptic species. *Mycologia*, 102(4), 944-966. <https://doi.org/10.3852/09-243>
- Samuels, G. J., Lieckfeldt, E., & Nirenberg, H. I. (1999). *Trichoderma asperellum*, a new species with warted conidia, and redescription of *T. viride*. *Sydowia*, 51(1), 71-88.
- Sánchez, A. D., Barrera, V., Reybet, G., & Sosa, C. (2015). Biocontrol con *Trichoderma* spp. De *Fusarium oxysporum* causal del “mal de almácigos” en pre y post emergencia en cebolla. *Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata*, 114(1), 61-70.
- Sánchez, M. (2004). *Microbiología de suelos. Técnicas, métodos y medios de cultivo*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Sandle, T. (2014). *Trichoderma*. En C. A. Batt & M. L. Tortorello (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology* (2 nd, pp. 644-646).
- Sandoval, I., Neyra, M., García, D., López, M., & Mendoza, I. (1995). *Trichoderma: Biocontrol de hongos fitopatógenos en el cultivo del tomate en hidropónico*. 61.
- Sandoval, M. C., & Belesansky, C. (2020). Producción artesanal del hongo antagonico *Trichoderma Persoon* en sustrato sólido. *Revista de Divulgación Técnica Agropecuaria, Agroindustrial y Ambiental. Facultad de Ciencias Agrarias*, 7(3), 55-64.

- Sanogo, S., & Ji, P. (2012). Integrated management of Phytophthoracapsici on solanaceous and cucurbitaceous crops: Current status, gaps in knowledge and research needs. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 34(4), 479-492. <https://doi.org/10.1080/07060661.2012.732117>
- Sansinenea, E., & Ortiz, A. (2011). Secondary metabolites of soil Bacillus spp. *Biotechnology Letters*, 33(8), 1523-1538. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0617-5>
- Santiago, E., Guerrero, D., Vilchis, R., Martínez, J., Trejo, L., & Leyva, S. (2017). Efectividad in vitro de fungicidas biológicos, químicos y alternativos contra Botrytis cinerea (Pers.) de fresa (Fragaria x ananassa Duch.). *Universidad Autónoma Chapingo, Depto. de Preparatoria Agrícola*, 7.
- Sarkar, D., Chattopadhyay, A., Singh, S., Devika, O. S., Pal, S., Parihar, M., Pal, S., Singh, Harikesh. B., & Rakshit, A. (2020). Modulation of Microbiome Through Seed Bio-priming. En C. Manoharachary, H. B. Singh, & A. Varma (Eds.), *Trichoderma: Agricultural Applications and Beyond. Soil Biology* (Vol. 61, pp. 209-218). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-54758-5_10. https://doi.org/10.1007/978-3-030-54758-5_10
- Sarkar, D., Sankar, A., Devika, O. S., Singh, S., Shikha, Parihar, M., Rakshit, A., Sayyed, R. Z., Gafur, A., Ansari, M. J., Danish, S., Fahad, S., & Datta, R. (2021). Optimizing nutrient use efficiency, productivity, energetics, and economics of red cabbage following mineral fertilization and biopriming with compatible rhizosphere microbes. *Scientific Reports*, 11(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95092-6>
- Saxena, A., Raj, N., Sarosh, B. R., Kini, R. K., & Shetty, H. S. (2013). Rhizobacteria mediated growth enhancement in pearl millet. *Indian Journal of Science Research*, 4, 41-44.
- Schirawski, J., & Perlin, M. (2018). Plant–Microbe Interaction 2017—The Good, the Bad and the Diverse. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(5), 6. <https://doi.org/10.3390/ijms19051374>
- Schoch, C. L., Ciuffo, S., Domrachev, M., Hotton, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, D., Mcveigh, R., O'Neill, K., Robbertse, B., Sharma, S., Soussov, V., Sullivan, J. P., Sun, L., Turner, S., & Karsch-Mizrachi, I. (2020). NCBI Taxonomy: A comprehensive update on curation, resources and tools. *Database*, 2020, baaa062. <https://doi.org/10.1093/database/baaa062>
- Scott, J. W., Agrama, H. A., & Jones, J. P. (2004). RFLP-based Analysis of Recombination among Resistance Genes to Fusarium Wilt Races 1, 2, and 3 in Tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 129(3), 394-400. <https://doi.org/10.21273/JASHS.129.3.0394>
- Shahrajabian, M. H., Chaski, C., Polyzos, N., & Petropoulos, S. A. (2021). Biostimulants Application: A Low Input Cropping Management Tool for Sustainable Farming of Vegetables. *Biomolecules*, 11(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/biom11050698>
- Sharif, M., Yazdani, M., Almas, Z., Ghias, W., Qureshi, R., Zakki, S., Ansari, F., & Qazi, H. M. (2016). Bacillus Species Found Antagonistic against Bacteria Isolated from Currency Notes in Local Circulation. *Biomedical Letters*, 2(2), 86-90.
- Shinde, V. A., More, S. M., & Patil, R. B. (2015). Screening and Isolation of Antibiotic Producing Bacillus Species Antagonistic to Fungal Pathogens. *International Journal Of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(11), 73-78.
- Singh, A., Jain, A., Sarma, B. K., Upadhyay, R. S., & Singh, H. B. (2014). Rhizosphere competent microbial consortium mediates rapid changes in phenolic profiles in chickpea during

- Sclerotium rolfsii infection. *Microbiological Research*, 169(5-6), 353-360. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.014>
- Singh, R. P., Jha, P., & Jha, P. N. (2015). The plant-growth-promoting bacterium *Klebsiella* sp. SBP-8 confers induced systemic tolerance in wheat (*Triticum aestivum*) under salt stress. *Journal of Plant Physiology*, 184, 57-67. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.07.002>
- Sivan, A., & Chet, I. (1986). Biological Control of *Fusarium* spp. In Cotton, Wheat and Muskmelon by *Trichoderma harzianum*. *Journal of Phytopathology*, 116(1), 39-47. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1986.tb00892.x>
- Sivan, A., Ucko, O., & Chet, I. (1987). Biological control of *Fusarium* crown rot of tomato by *Trichoderma harzianum* under field conditions. *Plant Disease*, 71(7), 587-592. <https://doi.org/10.1094/PD-71-0587>
- Sivasithamparam, K., & Ghisalberti, E. (1998). Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. En C. P. Kubicek, & G. E. Harman (Eds.), *Trichoderma and Gliocladium* (Vol. 1, pp. 139-191). Taylor & Francis.
- Sivila, N., & Álvarez, S. (2013). *Tecnologías agroecológicas para la agricultura familiar. Producción artesanal de Trichoderma* (1ª). Universidad Nacional de Jujuy. Universitaria de Jujuy. Facultad de Ciencias Agrarias.
- Slama, H. B., Cherif-Silini, H., Chenari Bouket, A., Qader, M., Silini, A., Yahiaoui, B., Alenezi, F. N., Luptakova, L., Triki, M. A., Vallat, A., Oszako, T., Rateb, M. E., & Belbahri, L. (2019). Screening for *Fusarium* Antagonistic Bacteria From Contrasting Niches Designated the Endophyte *Bacillus halotolerans* as Plant Warden Against *Fusarium*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 3236. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03236>
- Smith, S. N. (2007). An Overview of Ecological and Habitat Aspects in the Genus *Fusarium* with Special Emphasis on the Soil- Borne Pathogenic Forms. *Plant Pathology Bulletin*, 16, 97-120.
- Snyder, W. C., & Hansen, H. N. (1940). The species concept in *Fusarium*. *American Journal of Botany*, 27(2), 64-67. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1940.tb14217.x>
- Sosa, A. I., Álvarez-Rivera, V. P., Borgen-Marín, G., González-García, M., & Ponce-Grijuela, E. (2011). Evaluación del método de conservación en papel filtro de dos cepas de *Bacillus subtilis* Cohn, mediante la actividad antagónica frente a *Rhizoctonia solani*. *Fitosanidad*, 15(1), 45-49.
- Sotoyama, K., Akutsu, K., & Nakajima, M. (2016). Biological control of *Fusarium* wilt by *Bacillus amyloliquefaciens* IUMC7 isolated from mushroom compost. *Journal of General Plant Pathology*, 82(2), 105-109. <https://doi.org/10.1007/s10327-015-0641-8>
- Srinivas, C., Nirmala Devi, D., Narasimha Murthy, K., Mohan, C. D., Lakshmeesha, T. R., Singh, B., Kalagatur, N. K., Niranjana, S. R., Hashem, A., Alqarawi, A. A., Tabassum, B., Abd_Allah, E. F., Chandra Nayaka, S., & Srivastava, R. K. (2019). *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* causal agent of vascular wilt disease of tomato: Biology to diversity— A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(7), 1315-1324. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.06.002>
- Srivastava, R., Khalid, A., Singh, U. S., & Sharma, A. K. (2010). Evaluation of arbuscular mycorrhizal fungus, fluorescent *Pseudomonas* and *Trichoderma harzianum* formulation against *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Lycopersici* for the management of tomato wilt. *Biological Control*, 53(1), 24-31. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.11.012>

- Stall, R. E. (1961). Development of Fusarium wilt on resistant varieties of tomato caused by a strain different from race 1 isolates of *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Lycopersici*. *Plant Disease*, 45, 12-15.
- Stefanova, M. (1995). *Producción y aplicación de Trichoderma spp como antagonista de hongos fitopatógenos*. <http://www.aguascalientes.gob.mx>. Ciudad de La Habana, Cuba.
- Stefanova, M. (1997). Biopreparados de Trichoderma: Una forma de lucha efectiva contra patógenos fúngicos del suelo. *Agricultura Orgánica*, (2-3), 22-24.
- Stefanova, M. (2003). Producción y aplicación de Trichoderma spp. Como antagonista de hongos fitopatógenos. *INISAV*, La Habana, Cuba.
- Stefanova, M. (2007). Introducción y eficacia técnica del biocontrol de fitopatógenos con Trichoderma spp. En Cuba. *Fitosanidad*, 11(3), 75-79.
- Stefanova, M., Leiva, A., Larrinaga, L., & Coronado, M. F. (1999). Actividad metabólica de cepas de Trichoderma spp. Para el control de hongos fitopatógenos del suelo. *Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia*, 16, 509-516.
- Stefanova, M., Muíño, B., Martínez, L., Cruz, R., & Díaz, Y. (1995). *Efectividad de Trichoderma sp. Sobre Phytophthora nicotianae Breda de Haan var nicotianae en el cultivo de tabaco* [Informe Técnico de Investigación]. INISAV.
- Stocco, M. C. (2014). *Control biológico de Mycosphaerella graminicola, patógeno de trigo, con cepas de Trichoderma harzianum caracterizadas por su morfología, fisiología, actividad enzimática y molecular* [Tesis de Doctorado, Universidad Nacional de La Plata]. <http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar/id/20140603001352>
- Stoppacher, N., Kluger, B., Zeilinger, S., Krska, R., & Schuhmacher, R. (2010). Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus Trichoderma atroviride by HS-SPME-GC-MS. *Journal of Microbiological Methods*, 81(2), 187-193. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.03.011>
- Stringlis, I. A., Zhang, H., Pieterse, C. M. J., Bolton, M. D., & de Jonge, R. (2018). Microbial small molecules – weapons of plant subversion. *Natural Product Reports*, 35(5), 410-433. <https://doi.org/10.1039/C7NP00062F>
- Summerell, B. A., Salleh, B., & Leslie, J. F. (2003). A Utilitarian Approach to Fusarium Identification. *Plant Disease*, 87(2), 117-128. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.2.117>
- Sutton, D. A., Fothergill, A. W., & Rinaldi, M. G. (1998). *Guide to Clinically Significant Fungi*. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Tariq, A. L., Sudha, S., & Reyaz, A. L. (2016). Isolation and Screening of Bacillus Species from Sediments and Application in Bioremediation. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(6), 916-924. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2016.506.099>
- Tejera-Hernández, B. (2011). Potencialidades del género Bacillus en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC.*, 42(3), 131-138.
- Torome, T. K. (2015). *Isolation and characterization of antibiotic producing thermophilic Bacillus in selected hot- springs along lake Bogoria, Kenya* [Master of science]. Kenyatta University.
- Torres-De la Cruz, M., Ortiz-García, C. F., Bautista-Muñoz, C., Ramírez-Pool, J. A., Ávalos-Contreras, N., Cappello-García, S., & De la Cruz-Pérez, A. (2015). Diversidad de Trichoderma en el agroecosistema cacao del estado de Tabasco, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 86(4), 947-961. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2015.07.012>

- Tortora, G., Funke, B., & Case, C. (2007). *Introducción a la microbiología* (9ª edición). Médica Panamericana.
- Toussoun, T. A., & Nelson, P. E. (1975). VARIATION AND SPECIATION IN THE FUSARIA 1. *Annual Review of Phytopathology*, 13, 71-82. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.13.090175.000443>
- Trappe, J. M., Molina, R., Luoma, D. L., Cázares, E., Pilz, D., Smith, J. E., Castellano, M. A., Miller, E. L., & Trappe, M. J. (2009). Diversity, Ecology, and conservation of Truffle fungi in forest of the Pacific Northwest. *United States Department of Agriculture*, 202.
- Troya, C., & Vaca-Granda, L. (2014). Protocolo para la reproducción de cepas nativas de *Trichoderma* spp. En laboratorios artesanales. *Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca, Proyecto De Innovación Tecnológica Participativa Y Productividad Agrícola PITPPA*, 42.
- Unda, F., Agüero, J., Fariñas, M. C., & Martínez-Martínez, L. (2011). Identificación de hongos de importancia clínica mediante técnicas moleculares. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(4), 282-285. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2010.12.011>
- Valencia, C. S. (2018). *Ensayo bajo condiciones de invernadero de un producto de Bacillus sp. En plantas de tomate (Solanum lycopersicum)* [Tesis de Grado]. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.
- Valenzuela-Ureta, J. G., Lawn, D. A., Heisey, R. F., & Zamudio-Guzman, V. (1996). First Report of Fusarium Wilt Race 3, Caused by *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Lycopersici*, of Tomato in Mexico. *Plant Disease*, 80(1), 105. <https://doi.org/10.1094/PD-80-0105A>
- Vallejo, F. A. (1999). *Mejoramiento Genético y Producción de Tomate en Colombia*. Universidad Nacional de Colombia.
- Vanderzant, C., & Splittstoesser, D. F. (1992). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* (4th ed.). American Public Health Association.
- Vargas-Hoyos, H. A., & Gilchrist-Ramelli, E. (2015). Producción de enzimas hidrolíticas y actividad antagónica de *Trichoderma asperellum* sobre dos cepas de *Fusarium* aisladas de cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum*). *Revista Mexicana de Micología*, 42, 9-16.
- Vásquez, J. A. V. (2010). *Caracterización y producción de Trichoderma harzianum y Trichoderma viride en cultivo artesanal* [Tesis de Grado, Pontificia Universidad Javeriana]. <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8662/tesis615.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Vásquez, L. M., & Castaño, J. (2017). Manejo integrado de la marchitez vascular del tomate [*Fusarium oxysporum* f. Sp. *Lycopersici* (SACC.) W.C. Snyder & H.N. Hansen]: Una revisión. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 20(2), 363-374.
- Velasco, E., Nieto, Á., & Navarro, E. (2011). *Cultivo del tomate en hidroponía e invernadero* (3ª). BBA.
- Vera-Guzmán, A. M., Chávez-Servia, J. L., Carrillo-Rodríguez, J. C., & López, M. G. (2011). (*Capsicum annuum* L. and *C. pubescens* Ruiz & Pav.) FROM OAXACA,. *CHILEAN JOURNAL OF AGRICULTURAL RESEARCH*, 71(4), 578-585.
- Verma, M., Brar, S. K., Tyagi, R. D., Surampalli, R. Y., & Valéro, J. R. (2007). Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal*, 37(1), 1-20. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.05.012>
- Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255, 571-586.

- Villegas, M. A. (2005). *Trichoderma pers. Características generales y su potencial biológico en la agricultura sostenible. / Orius Biotech / Soluciones para la producción agropecuaria sostenible.* ORIUS BIOTECH USA. [https://www.oriusbiotech.com/escrito?nom=Trichoderma_pers._Caracter%C3%ADsticas_generales_y_su_potencial_biol%C3%B3gico_en_la_agricultura_sostenible.](https://www.oriusbiotech.com/escrito?nom=Trichoderma_pers._Caracter%C3%ADsticas_generales_y_su_potencial_biol%C3%B3gico_en_la_agricultura_sostenible)
- Vinale, F., Nigro, M., Sivasithamparam, K., Flematti, G., Ghisalberti, E. L., Ruocco, M., Varlese, R., Marra, R., Lanzuise, S., Eid, A., Woo, S. L., & Lorito, M. (2013). Harzianic acid: A novel siderophore from *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiology Letters*, 347(2), 123-129. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12231>
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., & Lorito, M. (2008). *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(1), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.07.002>
- Vinod, A. S., & More, S. M. (2013). Isolation, Identification and Characterization of *Bacillus* species from Lonar lake for production of Cyclodextrin Glycosyltransferase. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2(12), 14-23.
- Virgen, C. G., García, J., & Espinoza, J. L. (1990). Control Biológico del marchitamiento de la sandía causada por *Fusarium oxysporum* f sp. Niveum con inoculación de *Bacillus subtilis* en semilla. *Universidad Autónoma de Aguascalientes*, 21.
- Vos, P., Garrity, G., Dorothy, J., Krieg, N., Ludwig, W., Rainey, F., Schleifer, K.-H., & Whitman, W. (2001). *Bergey's manual of systematic bacteriology* (2nd ed, Vol. 3). Springer.
- Wainwright, M. (1992). *An Introduction to fungal Biotechnology* (1.^a ed.). Wiley.
- Wan, Q. (2013). *Structure and Assembly of Bacillus Spore Proteins* [Doctoral Thesis]. University of Sheffield.
- Wang, H., Hwang, S. F., Chang, K. F., Turnbull, G. D., & Howard, R. J. (2003). *Suppression of important pea diseases by bacterial antagonists.* 48(4), 447-460. <https://doi.org/10.1023/A:1024794809751>
- Ward, O. P. (1991). *Biotecnología de la fermentación.* Acribia, Editorial, S.A.
- Weindling, R. (1934). Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. *Phytopathology*, 24(11), 1153-1179.
- Weindling, R., & Emerson, O. H. (1936). The isolation of a toxic substance from the culture filtrates of *Trichoderma*. *Phytopathology*, 26, 1068-1070.
- Whipps, J. M., & Lumsden, R. D. (2001). Commercial use of fungi as plant disease biological control agents: Status and prospects. En Butt T, Jackson C, Magan N (eds). *Fungi as biocontrol agents: Progress, problems and potential.* (pp. 9-22). CABI Publishing.
- Williams, P. H. (1981). *Fusarium Yellows. Screening crucifers for multiple disease resistance* (P. H. Williams, Ed.; p. 124-129). University of Wisconsin, Madison.
- Woo, S. L., & Lorito, M. (2007). Exploiting the interactions between fungal antagonists, pathogens and the plant for biocontrol. En M. Vurro & J. Gressel (Eds.), *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management* (pp. 107-130). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5799-1_6
- Woo, S. L., Scala, F., Ruocco, M., & Lorito, M. (2006). The Molecular Biology of the Interactions Between *Trichoderma* spp., Phytopathogenic Fungi, and Plants. *Phytopathology*®, 96(2), 181-185. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0181>
- Wu, Y., Zhou, J., Li, C., & Ma, Y. (2019). Antifungal and plant growth promotion activity of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens*. *MicrobiologyOpen*, 8, e00813. <https://doi.org/10.1002/mbo3.813>

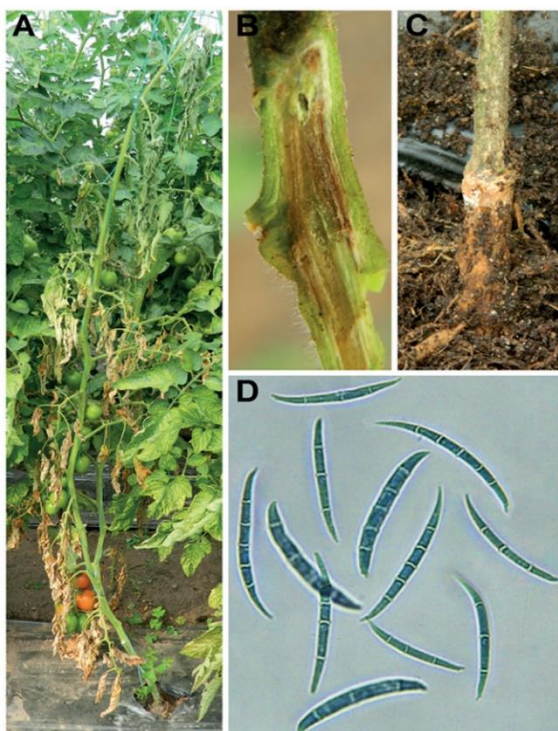
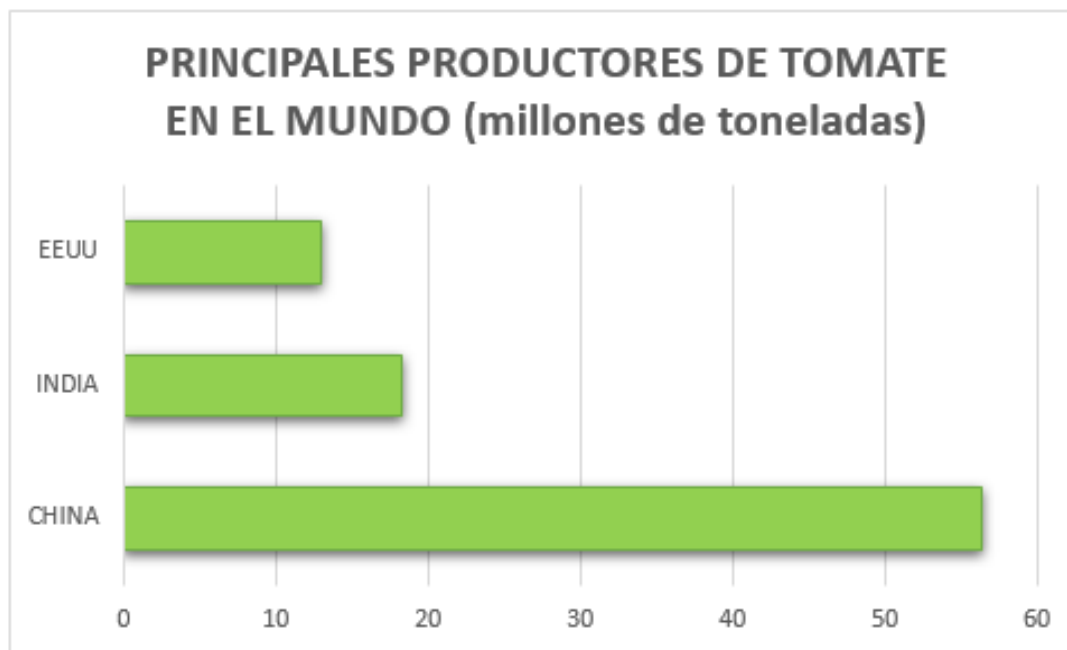
- Xu, W., Wang, K., Wang, H., Liu, Z., Shi, Y., Gao, Z., & Wang, Z. (2020). Evaluation of the biocontrol potential of *Bacillus* sp. WB against *Fusarium oxysporum* f. Sp. Niveum. *Biological Control*, *147*, 104288. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104288>
- Yadeta, K. A., & Thomma, B. P. H. (2013). The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. *Frontiers in Plant Science*, *4*(97), 1-12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00097>
- 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*(3), 1061-1070. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.3.1061-1070.1999>
- Yedidia, I., Srivastva, A. K., Kapulnik, Y., & Chet, I. (2001). Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant and Soil*, *35*, 235-242.
- Zambrano, J. (2005). *Conferencia sobre historia del uso de control biológico en Venezuela*. Curso sobre control biológico de plagas, Trujillo.
- Zaquinaula, M. H. (2018). "RAZAS DE *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Lycopersici* AISLADAS DE TOMATE (*Solanum lycopersicum*) PROVENIENTE DE COSTA CENTRAL DEL PERÚ" [Tesis de Grado Magister Scientiae, Universidad Nacional Agraria La Molina]. <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/3513/huarhua-zaquinaula-medali-heidi.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Zeigler, D., & Perkins, J. (2008). The Genus *Bacillus*. En E. Goldman & L. Green (Eds.), *Practical Handbook of Microbiology, Second Edition* (2nd. ed., pp. 309-337). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420009330.ch24>
- Zhang, D., Yu, S., Yang, Y., Zhang, J., Zhao, D., Pan, Y., Fan, S., Yang, Z., & Zhu, J. (2020). Antifungal Effects of Volatiles Produced by *Bacillus subtilis* Against *Alternaria solani* in Potato. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 1196. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01196>
- Zhang, J. X., Xue, A. G., & Tambong, J. T. (2009). Evaluation of Seed and Soil Treatments with Novel *Bacillus subtilis* Strains for Control of Soybean Root Rot Caused by *Fusarium oxysporum* and *F. graminearum*. *Plant Disease*, *93*(12), 1317-1323. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-12-1317>
- Zhao, Y., Selvaraj, J. N., Xing, F., Zhou, L., Wang, Y., Song, H., Tan, X., Sun, L., Sangare, L., Folly, Y. M. E., & Liu, Y. (2014). Antagonistic Action of *Bacillus subtilis* Strain SG6 on *Fusarium graminearum*. *PLoS ONE*, *9*(3), e92486. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092486>
- Zhu, J., Tan, T., Shen, A., Yang, X., Yu, Y., Gao, C., Li, Z., Cheng, Y., Chen, J., Guo, L., Sun, X., Yan, Z., Li, J., & Zeng, L. (2020). Biocontrol potential of *Bacillus subtilis* IBFCBF-4 against *Fusarium* wilt of watermelon. *Journal of Plant Pathology*, *102*(2), 433-441. <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00457-6>

13 ANEXOS

Anexo.1.

Países líderes mundiales de producción de tomate equivalente a toneladas.

Fuente: Cardona 2018.



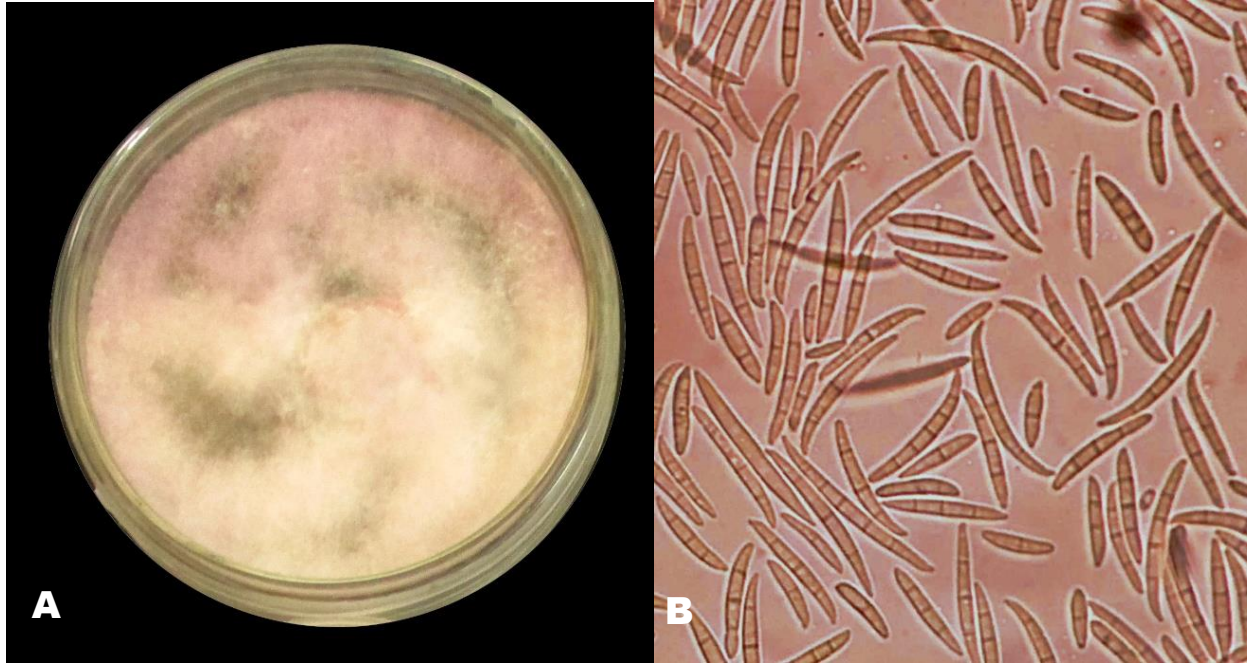
Anexo.2.

*A. Síntoma del marchitamiento vascular causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en una planta de tomate. B. Síntoma en detalle de la obstrucción del xilema. C. Síntoma detallado de la enfermedad en la base de una planta de tomate. D. Macroconidios de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Fuente: Vásquez & Castaño 2017.*

Anexo.3.

Características culturales y morfológicas de Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici.

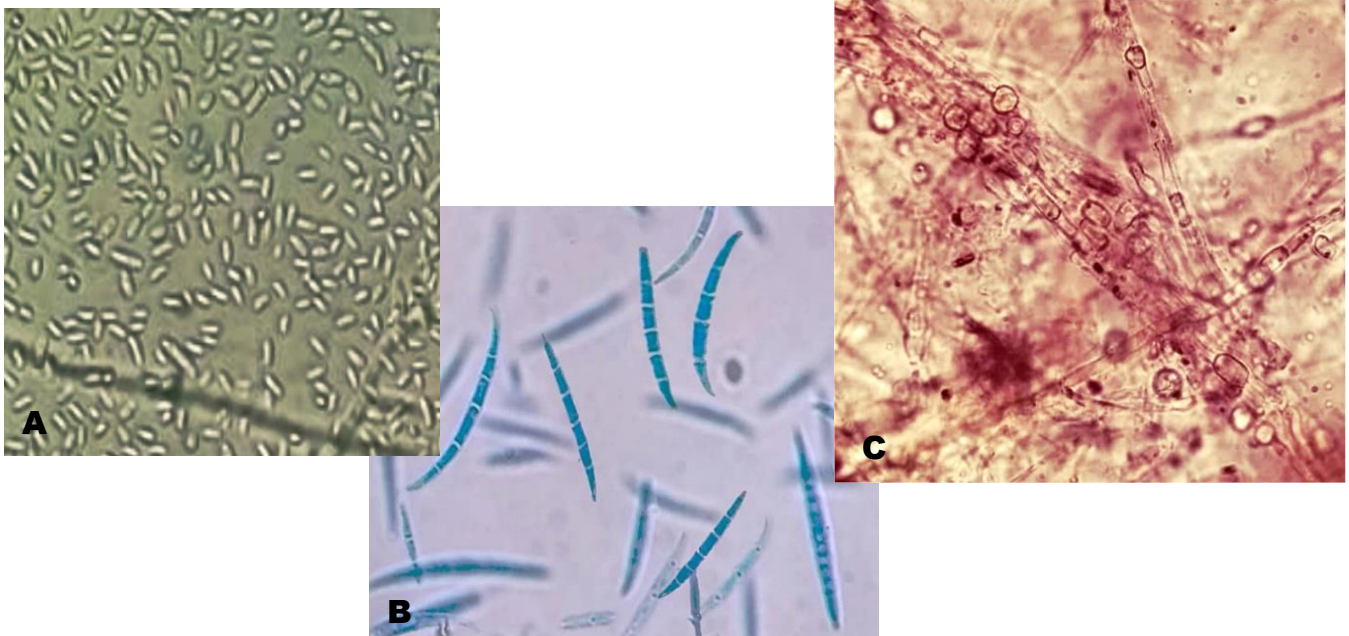
A. Colonia de *Fusarium oxysporum* en PDA. **B.** Vista microscópica de macroconidios abundantes, comúnmente septados (40X).



Anexo.4.

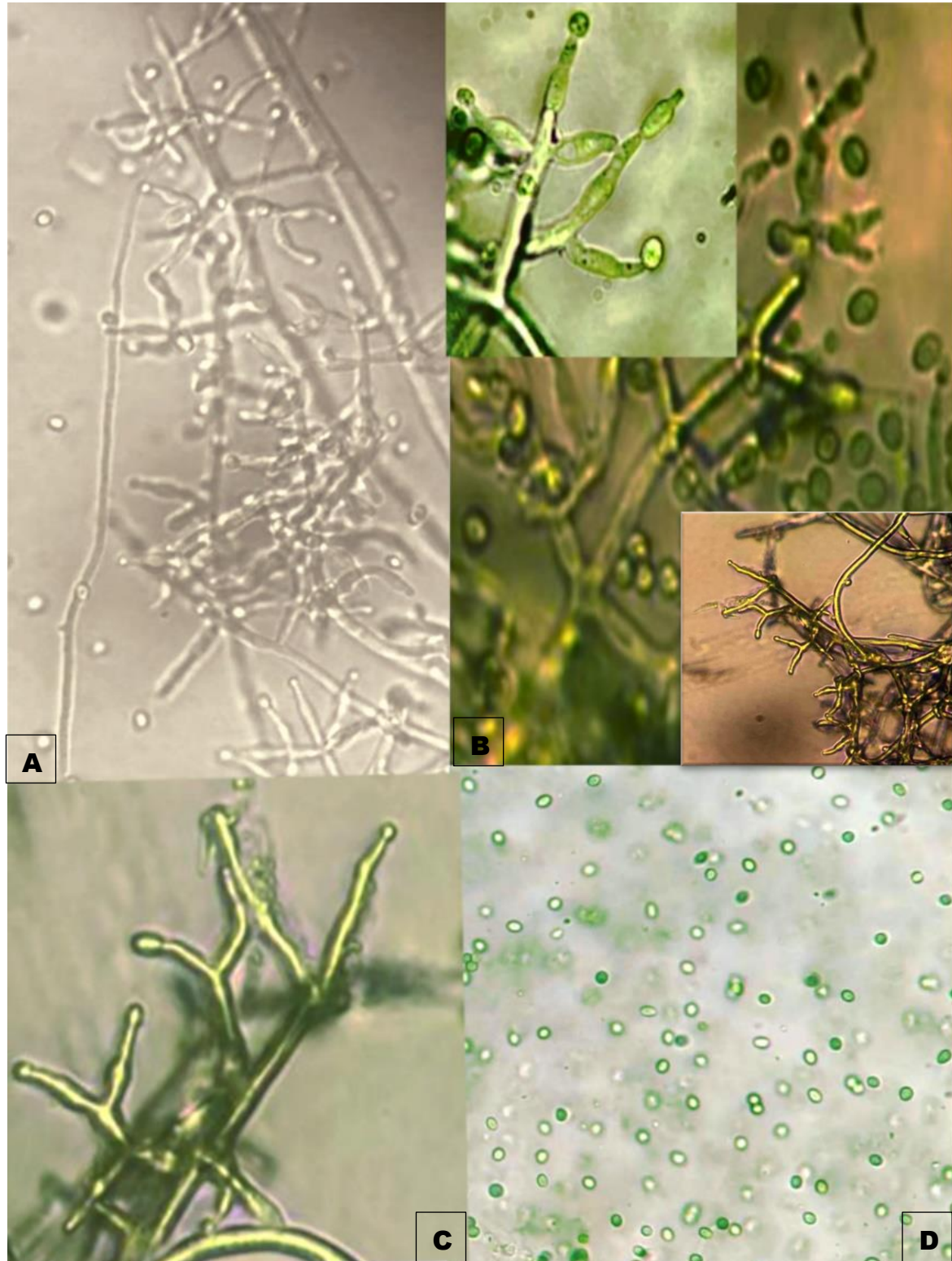
Esporas asexuales de Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici. **A.** Microconidios de *Fol. a* (10X).

B. Macroconidios (40X). **C.** Clamidosporas a 40X.



Anexo.5.

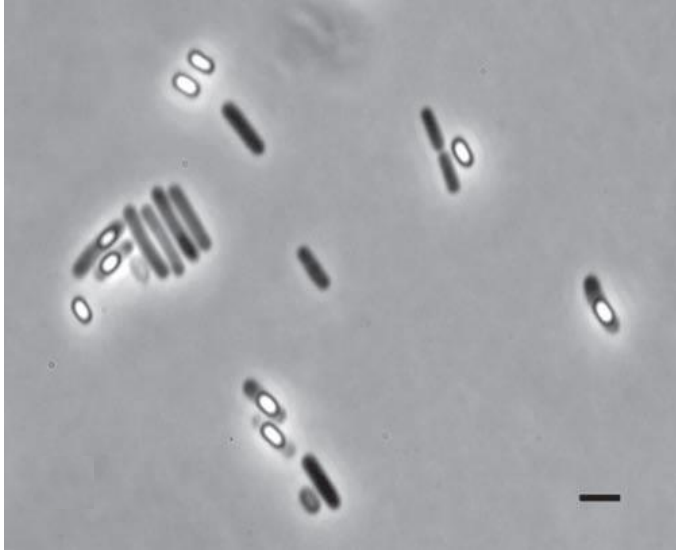
Descripción de T. harzianum (Rifai). A-B. Conidióforos de forma piramidal. C-D. Fiálides y conidios. Resolución 100X y 10X



Anexo.6.

A. *Bacillus subtilis*: esporas elipsoidales, centrales, paracentrales y subterminales.

Fuente: Vos et al. 2001. **B.** Cultivo en agar nutriente.



Anexo.7.

Medio Agar Nutriente. Adaptado de Britania Laboratorios 2015.

| FÓRMULA (en gramos por litro) | |
|--------------------------------------|------|
| Pluripeptona..... | 5.. |
| Extracto de carne..... | 3.0. |
| Cloruro de sodio..... | 8.0. |
| Agar..... | 15.. |
| pH final: 7.3 ± 0.2 | |

Anexo.8.

Medio Papa Dextrosa Agar. Adaptado de MERCK 2017.

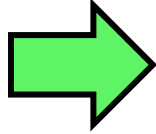
| | |
|---|--------|
| Infusión de Papa (Infusion para 200 g de papas) | 4 g/L |
| D(+)-Glucosa (=Dextrosa) | 20 g/L |
| Agar-Agar | 15 g/L |

Anexo.9.

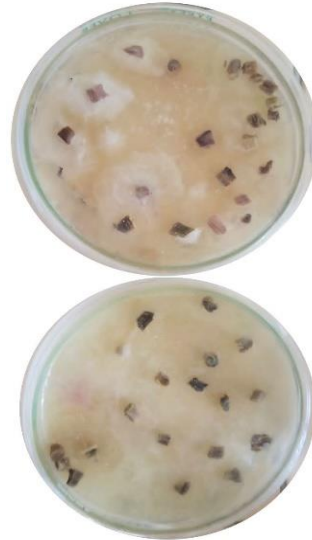
Aislamiento de Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici



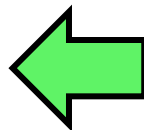
Colecta de las muestras de plantas de tomate CENTA CUSCATLÁN



Selección de zonas con manchas marrones o parduzcas del tallo y raíz



Siembra en PDA y desarrollo de colonias fúngicas de color blanco algodónoso



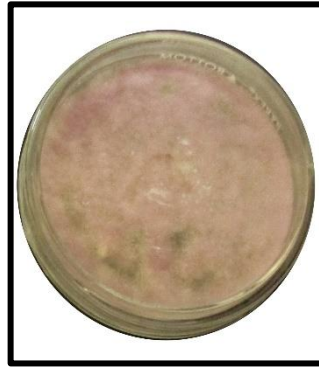
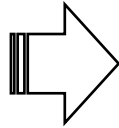
Identificación de los caracteres morfológicos en microscopio de campo claro

Anexo. 10.

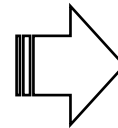
Postulados de Koch con la prueba de patogenicidad



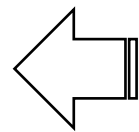
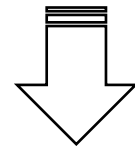
Presencia del patógeno en la planta hospedante.



Aislamiento del patógeno en cultivo axénico



Al inocularse en plantas sanas de tomate causó la enfermedad inicial.



Reaislamiento del patógeno presentando las mismas características del aislamiento original.

Anexo. 11.

Prueba de patogenicidad inicial



Inoculación y establecimiento de los tratamientos



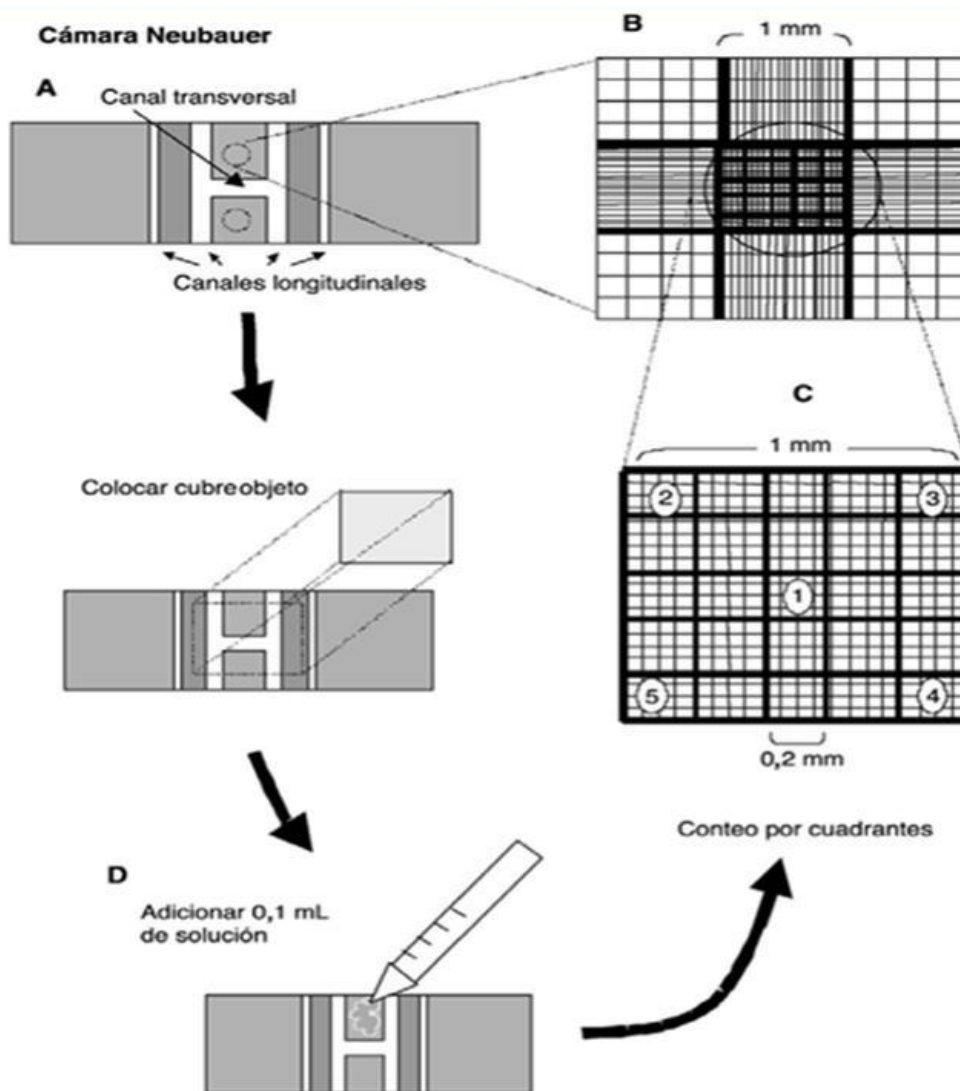
Caracterización morfológica de los macroconidios con forma de canoa y tabique



Anexo.12.

Preparación y recuento de células en cámara de Neubauer. **A.** Estas cámaras ocupan un volumen específico (10-15 μL) y presentan una cuadrícula que consta de un cuadrado central de 1 mm de lado, dividido en 25 cuadrados. **B.** Cada uno de ellos a su vez, se encuentran divididos en 16 cuadrados más pequeños para permitir el conteo. La cámara se cubre en su superficie por un cubreobjetos de vidrio. **C.** El espacio entre el portaobjetos y el cubreobjetos es de 0,02 mm. La rejilla tiene un área total de 1 mm^2 y un volumen total de 0,02 mm. **D.** Se introduce la suspensión bajo el cubreobjetos, usando una pipeta y con la ayuda del microscopio compuesto se determina el número de UFC/ml. El conteo se repite por lo menos seis veces y se saca un promedio. Este promedio de células contenidas en dicho volumen se expresa por ml de muestra.

Fuente: Covacevich & Consolo 2014.



Anexo.13.*Tabla de contingencia del grado de patogenicidad*

Fecha inicio: _____

Fecha final: _____

Hora inicio: _____

Hora final: _____

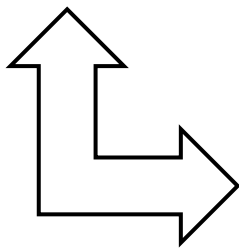
| Escala de Severidad | Control T1 | FM1 T2 | FM2 T3 | FM3 T4 |
|---|-----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 1: Plantas sin síntomas | X | | X | X |
| 2: Planta con clorosis leve en las hojas inferiores | | | | |
| 3: Clorosis moderada | | | | |
| 4: Clorosis severa | | X | | |
| 5: Planta muerta | | X | | |

Anexo.14.

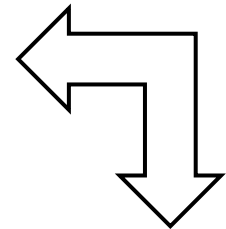
Conservación y reproducción de Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici en arroz



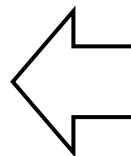
Matrices de arroz inoculadas con *Fol* en frascos de vidrio



Cosecha del hongo:
Pulverización del sustrato



Conservación del ingrediente activo del hongo en tubo Falcon



Tamizaje con tamiz de 600 µm mediante frotación manual

Anexo.15.

Identificación molecular de *Fusarium oxysporum* en el laboratorio CENEM, empresa MICSA

CÓDIGO 10.C-IF-FTP-001 V1, muestras 22-037
Guatemala, 13 de junio de 2022

Ing.
Karen Corado
Presente

A continuación, se describe el resultado obtenido para los análisis realizados a la(s) muestra(s) enviada(s) al laboratorio:

| Tipo de muestra | Análisis realizado* | Código de muestra | Aislamiento microbiológico | Resultado identificación molecular* |
|----------------------------------|--------------------------|-------------------|---|--|
| Aislado fúngico en caja de petri | Identificación molecular | 22-037 | A partir del cultivo en caja de Petri, se re-aislaron 2 variantes de <i>Fusarium</i> sp. macroscópicamente diferentes (Aislado "a" y aislado "b"). Véase Figuras 1 y 2. | Aislado "a": <i>Fusarium oxysporum</i> , 100% identidad. |
| | | | | Aislado "b": No identificado |

*Los resultados presentados corresponden al proceso descrito a continuación:

El análisis consistió en: Extracción de ADN, amplificación por PCR, secuenciación y análisis de identidad del marcador ITS1-5.8S-ITS2 (ribosomal internal transcribed spacer) para hongos. Para el análisis de identidad de la secuencia de ADN obtenida, se utilizó la base de datos de nucleótidos del NCBI utilizando la herramienta Basic Local Alignment Search Tool para nucleótidos – BLAST[®]N 2.8.0+ (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine); excluyendo muestras no cultivadas/ambientales, optimizada para secuencias altamente similares (megablast).

Consideración importante: El resultado antes descrito corresponde únicamente a la muestra recibida en el laboratorio; el resultado no concluye que todo el lote en mención tiene las mismas características.

Esperamos haber atendido su requerimiento a la altura de sus expectativas. Si tiene alguna duda o consulta, por favor comuníquese con nosotros.



Lic. Eduardo Arrivillaga
Técnico
Servicios Microbiológicos



Lic. María Fernanda Lainfiesta
Coordinación
Servicios Microbiológicos



Lic. Elena Dardón Fresse
Jefatura
CENEM

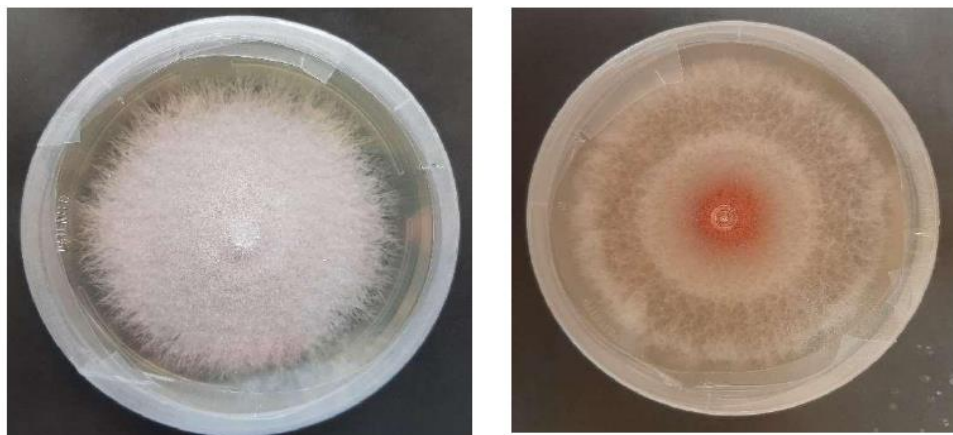


Figura 1. Cultivo en medio PDA (agar papa dextrosa) : Izquierda – Aislado “a”, derecha – Aislado “b”.

Anexo.16.

Resultados de la identificación molecular de la Universidad de Florida

BLASTn

Los cebadores utilizados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) incluyeron ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') para ITS (White et al., 1990), y EF1 (5'-ATGGGTAAGGAGGACAAGAC- 3') y EF2 (5'-GGAAGTACCAGTCATCATGTT-3') para TEF (O'Donnell et al., 1998). Los tamaños de amplicón de FM1 ITS y TEF fueron 538 pb y 688 pb, respectivamente. Los productos se purificaron utilizando exonucleasa I y fosfatasa alcalina de camarón para eliminar el exceso de cebadores y dNTP antes de la secuenciación de Sanger. La comparación de la secuencia de TEF obtenida del aislado FM1 con la base de datos del NCBI mostró una identidad del 99,85 % y una cobertura de consultas del 99-100 % con respecto a la secuencia de TEF de los aislados dentro del complejo de especies de *F. oxysporum*. Mientras que una comparación de la secuencia ITS de FM1 mostró una cobertura de consulta del 100 % para aislamientos del complejo de especies de *F. fujikuroi*, pero un mayor porcentaje de identidad (99,41 %) para aislamientos del complejo de especies de *F. oxysporum*. El valor E de los resultados proporcionados para TEF e ITS fue 0, lo que indica una coincidencia exacta con los resultados consultados. Los resultados del análisis filogenético de las dos secuencias con resultados consultados de la base de datos Genbank ilustran aún más los resultados.

TEF and ITS sequences of FM1:

>FM1_TEF_consensus_sequence

GGAGGACAAGACTCACCTTAACGTCGTCGTCATCGGCCACGTCGACTCTGCAGTCGA
CCACTGTGAGTACTCTCCTCGACAATGAGCATATCTGCCATCGTCAATCCCGACCAA
GACCTGGCGGGGTATTTCTCAAAGTCAACATACTGACATCGTTTCACAGACCGGTCA
CTTGATCTACCAGTGCGGTGGTATCGACAAGCGAACCATCGAGAAGTTCGAGAAGG
TTAGTCACTTTCCCTTCAATCGCGCGTCCTTTGCCATCGATTTCCCCTACGACTCGA
AACGTGCCCGCTACCCCGCTCGAGACCAAAAATTTTGCAATATGACCGTAATTTTTT
TGGTGGGGCACTTACCCCGCCACTTGAGCGAAGGGAGCGTTTGCCCTCTTACCATTC
TCACAACCTCAATGAGTGCGTCGTCACGTGTCAAGCAGTCACTAACCATTCAACAAT
AGGAAGCCGCTGAGCTCGGTAAGGGTTCCTTCAAGTACGCCTGGGTTCCTTGACAAGC
TCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTTCGAGA
CTCCTCGCTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTTCATTCTACTTCT
CTTCGTACTAACATATCACTCAGACGCTCCCGGTCACCGTGATTTTCATCAAGAACAT
GA

>FM1_ITS_consensus_sequence

Las secuencias del aislado FM1 codifican para Fusarium oxysporum

TATGCTTAAGTTCAGCGGGTATTCCTACCTGATCCGAGGTCAACATTCAGAAGTTGG
GGTTTAACGGCGTGGCCGCGACGATTACCAGTAACGAGGGTTTTACTACTACGCTAT
GGAAGCTCGACGTGACCGCCAATCAATTTGAGGAACGCGAATTAACGCGAGTCCCA
ACACCAAGCTGTGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAA
TACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTC
ACATTACTTATCGCATTTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTT
GTTGAAAGTTTTGATTTATTTATGGTTTTACTCAGAAGTTACATATAGAAACAGAGTT
TAGGGGTCTCTGGCGGGCCGTCCCGTTTTACCGGGAGCGGGCTGATCCGCCGAGGC
AACAAGTGGTATGTTACAGGGGTTTTGGGAGTTGTAAACTCGGTAATGATCCCTCCG
CTGGTTCACCAACGGAGACCTTGTT

Resultados Blastn de la secuencia TEF

Job Title **FM1_TEF_consensus_sequence**
 RID [VTMHKZAD016](#) Search expires on 01-11 09:49 am [Download All](#)
 Program BLASTN [Citation](#)
 Database nt [See details](#)
 Query ID Icl|Query_30441
 Description FM1_TEF_consensus_sequence
 Molecule type dna
 Query Length 688
 Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

Filter Results

Organism only top 20 will appear exclude
 Type common name, binomial, taxid or group name
 + [Add organism](#)

Percent Identity to E value to Query Coverage to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions [Graphic Summary](#) [Alignments](#) [Taxonomy](#)

Sequences producing significant alignments [Download](#) Select columns Show 100

select all 0 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [MSA Viewer](#)

| Description | Scientific Name | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Acc. Len | Accession |
|--|------------------------------------|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------|----------------------------|
| <input type="checkbox"/> Fusarium oxysporum partial tef1a gene for translation elongation factor 1.alpha | Fusarium oxyspo... | 1256 | 1256 | 99% | 0.0 | 99.85% | 686 | LS420068.1 |
| <input type="checkbox"/> Fusarium oxysporum isolate SAT77 translation elongation factor 1a gene, partial sequence | Fusarium oxyspo... | 1254 | 1254 | 99% | 0.0 | 99.85% | 684 | DQ465933.1 |
| <input type="checkbox"/> Fusarium oxysporum isolate F87-Kr19 translation elongation factor 1.alpha (tef1.alpha) gene, partial cds | Fusarium oxyspo... | 1262 | 1262 | 100% | 0.0 | 99.71% | 714 | KF574856.1 |
| <input type="checkbox"/> Fusarium oxysporum f.sp. asparagi isolate MA_FOA24 translation elongation factor 1.alpha (tef1) gene, partial cds | Fusarium oxyspo... | 1256 | 1256 | 99% | 0.0 | 99.71% | 687 | MT568946.1 |
| <input type="checkbox"/> Fusarium oxysporum isolate MA_FOA19 translation elongation factor 1.alpha (tef1) gene, partial cds | Fusarium oxyspo... | 1256 | 1256 | 99% | 0.0 | 99.71% | 687 | MT568943.1 |
| <input type="checkbox"/> Fusarium oxysporum f.sp. fragariae strain 16C-30KFsa translation elongation factor 1.alpha gene, partial cds | Fusarium oxyspo... | 1254 | 1254 | 99% | 0.0 | 99.71% | 687 | KJ776746.1 |
| <input type="checkbox"/> Fusarium oxysporum f.sp. fragariae strain 18-13KFsa translation elongation factor 1.alpha gene, partial cds | Fusarium oxyspo... | 1254 | 1254 | 99% | 0.0 | 99.71% | 693 | KJ776745.1 |
| <input type="checkbox"/> Fusarium oxysporum f.sp. fragariae strain 23C-12KFsa translation elongation factor 1.alpha gene, partial cds | Fusarium oxyspo... | 1254 | 1254 | 99% | 0.0 | 99.71% | 689 | KJ776744.1 |
| <input type="checkbox"/> Fusarium oxysporum f.sp. asparagi isolate GR_FOA8 translation elongation factor 1.alpha (tef1) gene, partial cds | Fusarium oxyspo... | 1254 | 1254 | 99% | 0.0 | 99.71% | 693 | MT305185.1 |
| <input type="checkbox"/> Fusarium oxysporum strain NRRL 44900 translation elongation factor 1.alpha (EF1-a) gene, partial cds | Fusarium oxyspo... | 1253 | 1253 | 99% | 0.0 | 99.71% | 685 | GU170541.1 |
| <input type="checkbox"/> Fusarium oxysporum isolate DET-45 translation elongation factor 1.alpha (tef1) gene, partial cds | Fusarium oxyspo... | 1256 | 1256 | 100% | 0.0 | 99.57% | 713 | MN223435.1 |
| <input type="checkbox"/> Fusarium oxysporum isolate ER3 translation elongation factor 1.alpha gene, partial cds | Fusarium oxyspo... | 1256 | 1256 | 100% | 0.0 | 99.57% | 1001 | MK172058.1 |
| <input type="checkbox"/> Fusarium oxysporum f.sp. cubense isolate CAV2611 translation elongation factor 1.alpha (tef1) gene, partial cds | Fusarium oxyspo... | 1256 | 1256 | 100% | 0.0 | 99.57% | 699 | KX365400.1 |
| <input type="checkbox"/> Fusarium oxysporum isolate EKT 01 translation elongation factor 1.alpha (TEF1) gene, partial cds | Fusarium oxyspo... | 1256 | 1256 | 100% | 0.0 | 99.57% | 703 | KU985430.1 |

Resultados Blastn de la secuencia ITS (*F. foetens* y *F. inflexum* pertenecen al complejo de especies de *F. oxysporum*)

Job Title **FM1_ITS_consensus_sequence**
 RID [VTMGYHUD013](#) Search expires on 01-11 09:49 am [Download All](#)
 Program BLASTN [Citation](#)
 Database rRNA_typestrains/ITS_RefSeq_Fungi [See details](#)
 Query ID Icl|Query_25813
 Description FM1_ITS_consensus_sequence
 Molecule type dna
 Query Length 538
 Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

Filter Results

Organism only top 20 will appear exclude
 Type common name, binomial, taxid or group name
 + [Add organism](#)

Percent Identity to E value to Query Coverage to

[Filter](#) [Reset](#)

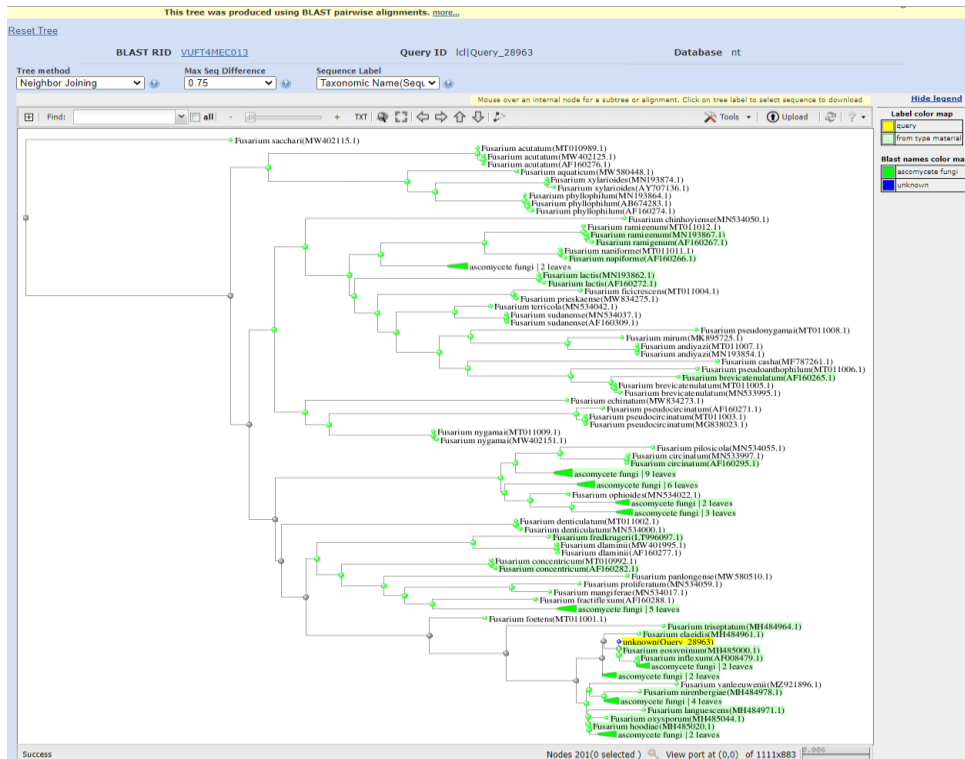
Descriptions [Graphic Summary](#) [Alignments](#) [Taxonomy](#)

Sequences producing significant alignments [Download](#) Select columns Show 100

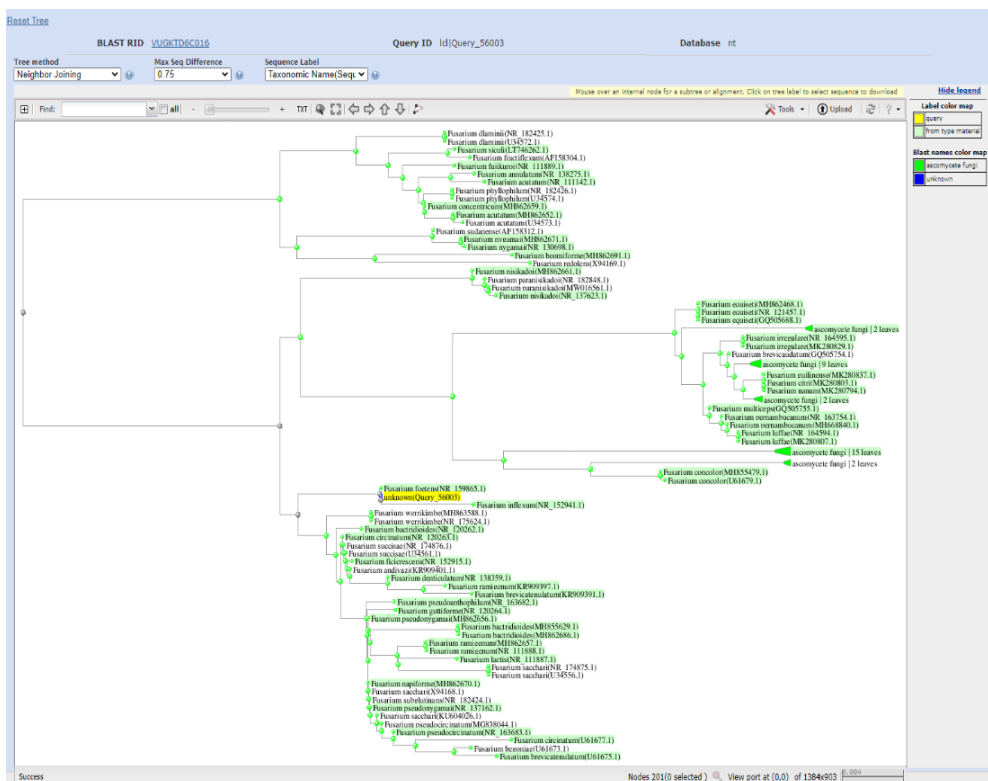
select all 100 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [MSA Viewer](#)

| Description | Scientific Name | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Acc. Len | Accession |
|--|--|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------|-----------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> Fusarium foetens CBS 110286 ITS region, from TYPE material | Fusarium foetens | 918 | 918 | 93% | 0.0 | 99.41% | 511 | NR_159865.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Fusarium inflexum NRRL 20433 ITS region, from TYPE material | Fusarium inflexum | 939 | 939 | 96% | 0.0 | 99.23% | 521 | NR_152941.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Fusarium circinatum CBS 405.97 ITS region, from TYPE material | Fusarium circinatum | 963 | 963 | 100% | 0.0 | 98.89% | 560 | NR_120263.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Fusarium succisa NRRL 13613 ITS region, from TYPE material | Fusarium succisa | 929 | 929 | 96% | 0.0 | 98.85% | 522 | NR_174876.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Fusarium bactridioides CBS 100057 ITS region, from TYPE material | Fusarium bactridioides | 957 | 957 | 100% | 0.0 | 98.70% | 557 | NR_120262.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Fusarium pseudonygamal NRRL 13592 ITS region, from TYPE material | Fusarium pseudonygamal | 924 | 924 | 96% | 0.0 | 98.66% | 522 | NR_137162.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Fusarium denticulatum CBS 407.97 ITS region, from TYPE material | Fusarium denticulatum | 789 | 789 | 82% | 0.0 | 98.65% | 444 | NR_138359.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Fusarium pseudocircinatum CBS 449.97 ITS region, from TYPE material | Fusarium pseudocircinatum | 887 | 887 | 92% | 0.0 | 98.61% | 502 | NR_163683.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Fusarium ficicrescens CBS 125178 ITS region, from TYPE material | Fusarium ficicrescens | 743 | 743 | 77% | 0.0 | 98.57% | 421 | NR_152915.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Fusarium pseudoanthophilum CBS 414.97 ITS region, from TYPE material | Fusarium pseudoanthophilum | 952 | 952 | 100% | 0.0 | 98.52% | 557 | NR_163682.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Fusarium guttiforme CBS 409.97 ITS region, from TYPE material | Fusarium guttiforme | 952 | 952 | 100% | 0.0 | 98.52% | 555 | NR_120264.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Fusarium begoniae CBS 452.97 ITS region, from TYPE material | Fusarium begoniae | 946 | 946 | 100% | 0.0 | 98.33% | 556 | NR_111864.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Fusarium ramigenum NRRL 25208 ITS region, from TYPE material | Fusarium ramigenum | 913 | 913 | 96% | 0.0 | 98.28% | 522 | NR_111888.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Fusarium lactis NRRL 25200 ITS region, from TYPE material | Fusarium lactis | 907 | 907 | 96% | 0.0 | 98.08% | 522 | NR_111887.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Fusarium werrikimbe CBS 125535 ITS region, from TYPE material | Fusarium werrikimbe | 937 | 937 | 100% | 0.0 | 97.97% | 550 | NR_175624.1 |

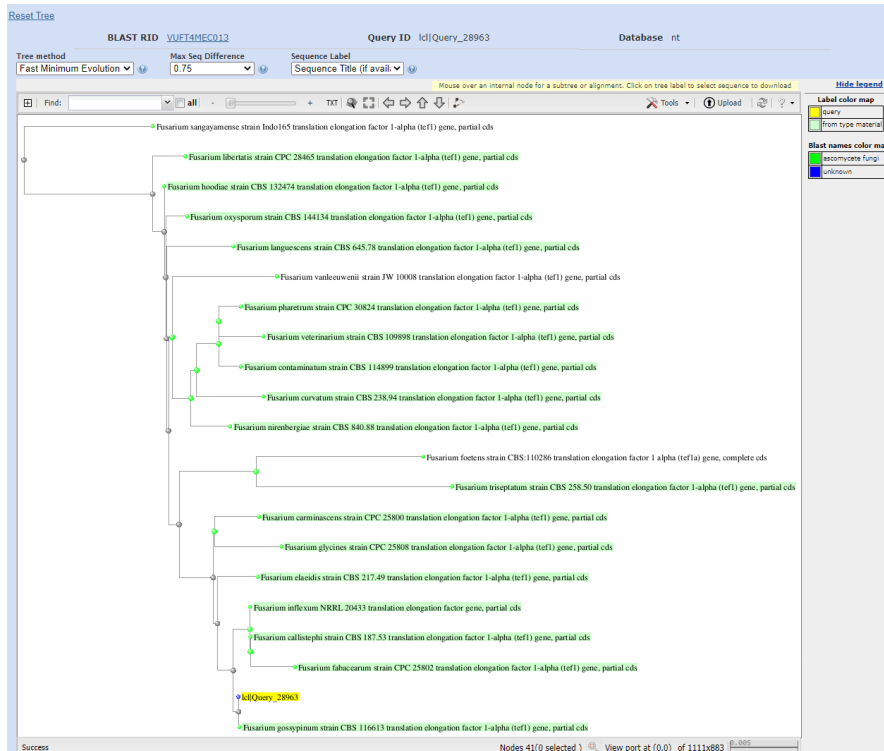
Árbol filogenético basado en las principales secuencias TEF recuperadas durante una consulta de la base de datos Genbank:



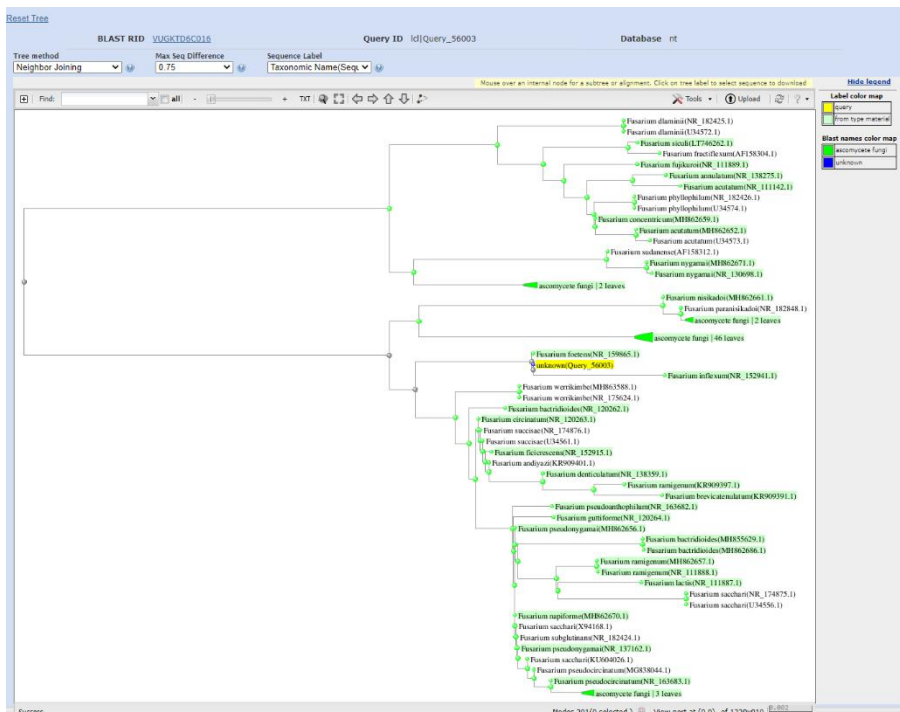
Árbol filogenético basado en las principales secuencias ITS recuperadas durante una consulta de la base de datos Genbank:



Árbol filogenético basado en las principales secuencias de TEF recuperadas durante una consulta de la base de datos Genbank, pero limitado a secuencias del complejo de especies de *Fusarium oxysporum* (taxid: 171631):



Árbol filogenético basado en las principales secuencias ITS recuperadas durante una consulta de la base de datos Genbank, pero limitándose solo a las secuencias de la secta *Fusarium Setofusarium* (taxid:5506):



Anexo.17.

Resultados de la identificación molecular de FM2 y FM3

>FM2_ITS_consensus_sequence

La secuencia de la cepa FM2 codifica para *Fusarium solani*

```
MTCCGGAGSKGGGRTGTYTTANGRCGYGGYCRGCCGCWCWCSAGCTGCGAGGTGT
TAGCTACTACACAATGGAAGCTGCGGCGGGACCGCCACTGTATTTGGGGGACGKCG
TTGTGACCGCAGGSGGCTTCCGCMGATCCCCAMCGCCAGGCCCGGGGRCMTSAGGG
WWGTAAWGRCGCTCGAACAGGCATGCACGCCAGAATACTGGCRGGCRAAKGWG
CGTTCAAAGATTCKATGATTCACTGAATTCTGCAATTCAATTACTTATCGCATTTCGC
TGCKTTCTTCATCGAYGCCAGASCCAAGAGATCCGTWGTWGAAAGWWWMMATTT
ATTGCTKGTTTACTSAGAAGAAACATTATAGAAACAGAGCTAGKKGGTCTCTGGCG
GGGGCGGCCCGTGTCACGGGCGYGTCTGTWCCCGCMGAGGCACGTTAT
```

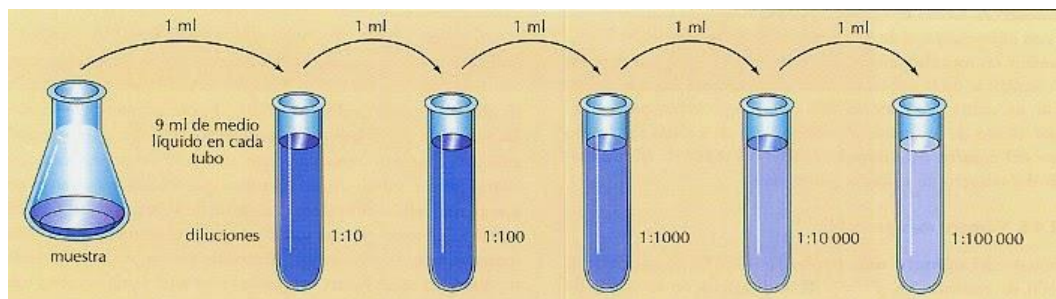
>FM3_ITS_consensus_sequence

La secuencia del aislado FM3 codifica para *Fusarium solani*

```
GATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATTCCTACCTGATTCGAGGTCAACATTCAGAAGTT
GGGTGTTTTACGGCGTGGCCGCGCCGCTCTCCAGTTGCGAGGTGTTAGCTACTACGC
AATGGAAGCTGCGGCGGGACCGCCACTGTATTTGGGGGACGGCGTTGTGCCCGCAG
GGGGCTTCCGCCGATCCCCAACGCCAGGCCCGGGGGCCTGAGGGTTGTAATGACGC
TCGAACAGGCATGCCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCG
ATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATC
GATGCCAGAGCCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAATTTATTTGCTTGTTTACTCA
GAAGAAACATTATAGAAACAGAGTTAGGGGGTCTCTGGCGGGGGCGGCCCGTGTT
ACGGGGCCGTCTGTTCCCGCCGAGGCAACGTTATAGGTATGTTACAGGGTTGATGA
GTTGTATAACTCGGTAATGATCCCTCCGCTGGTTCACCAACGGAG
```

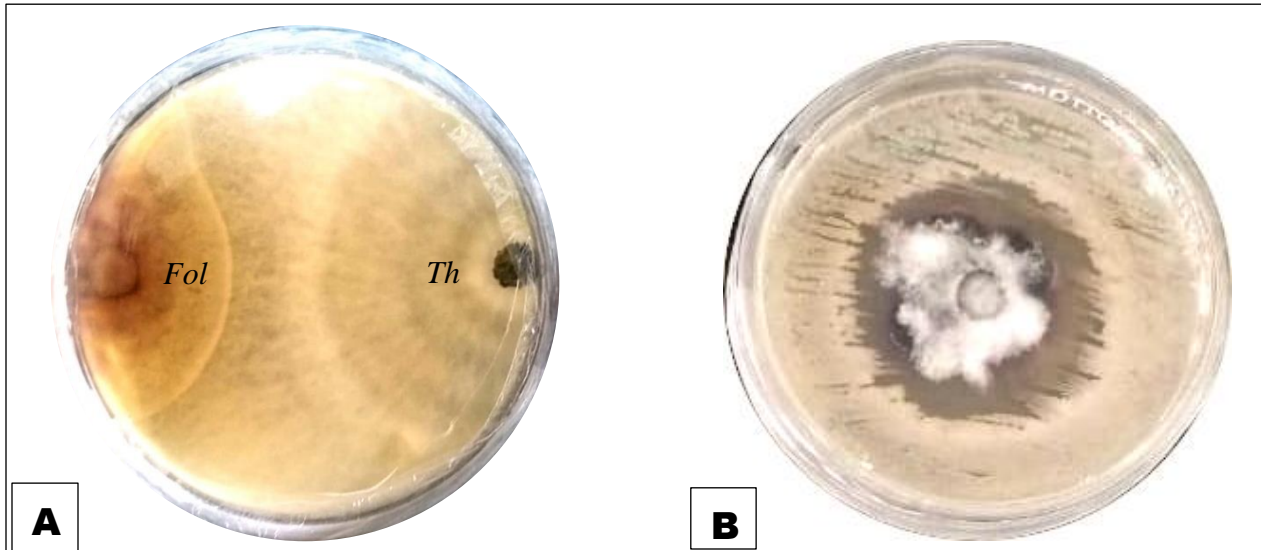
Anexo.18.

Preparación de diluciones decimales en tubos de ensayo. Adaptado de Quistián 2014.



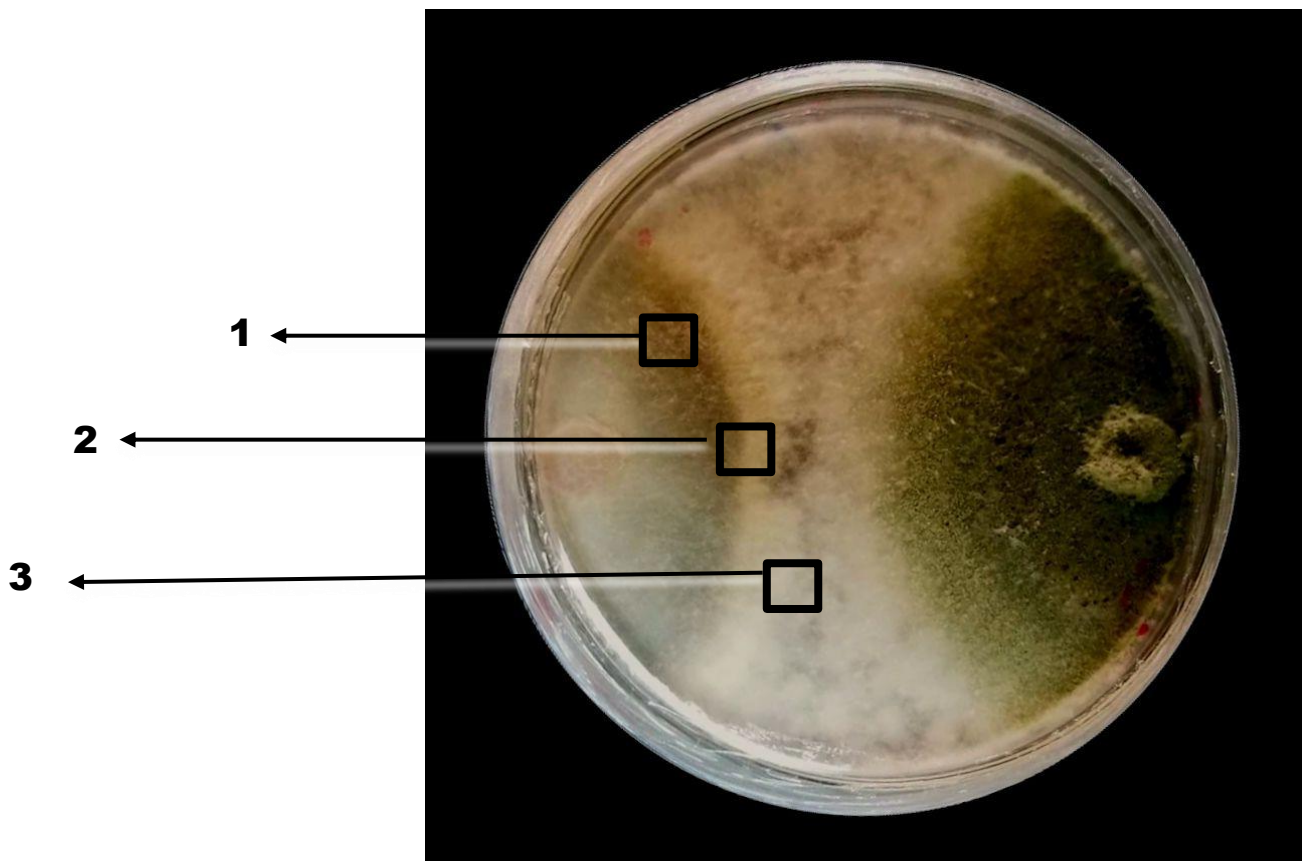
Anexo.19.

Antagonismo dual de los biopreparados sobre Fol. A. confrontación dual entre Trichoderma harzianum y el fitopatógeno en uno de los extremos de la placa. B. Estrias en toda la placa con la bacteria Bacillus subtilis y en medio el disco con Fol.



Anexo.20.

Puntos de la zona de interacción entre los hongos.



Anexo.21.

Materiales para la elaboración del biopolímero. Modificado de Caballero et al. 2016

| Materiales | Cantidad |
|--------------------|-----------------|
| Agua | 500 ml |
| Almidón | 15 g |
| Glicerina | 12.5 g |
| Gelatina sin sabor | 0.45 g |

Anexo.22.

Preparación del biopolímero goma arábica al 25%.

Hacer los respectivos cálculos teniendo en cuenta que la cantidad de soluto en un disolvente es posible expresarlo en forma cuantitativa en varias formas como por ejemplo el porcentaje en masa, el cual se obtiene con la siguiente fórmula:

$$\% \frac{p}{v} = \frac{\text{masa de soluto}}{\text{volumen de disolución}} \times 100\%$$

En este caso se van a preparar 500 ml de goma arábica a una concentración de 25%

Datos:

% en p/v = 25%

masa de disolución = 500 ml

$$25\% = \frac{g \text{ de soluto}}{20 \text{ mL}} \times 100\%$$

Al despejar la fórmula se obtiene:

$$g \text{ de soluto} = \frac{25\% \text{ g/ml}}{100\%} \times 500 \text{ ml} = 125 \text{ g}$$

Anexo.23.

Aplicación de los bioformulados y biopolímeros a semillas de tomate CC



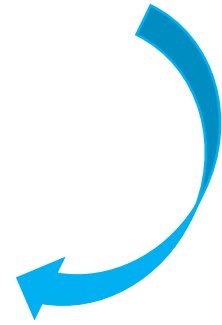
Elaboración de biopolímeros



Semillas de tomate var. CENTA CUSCATLÁN



Desinfección de las semillas de tomate



Bioformulados *B. subtilis* y *T. harzianum* en polvo hidrosoluble 10^6 y 10^8 esp/ml⁻¹



Dispensación de semillas en placas Petri (Bioensayo *in vitro*)

Anexo.24.

Bioensayo in vivo en bandejas de germinación



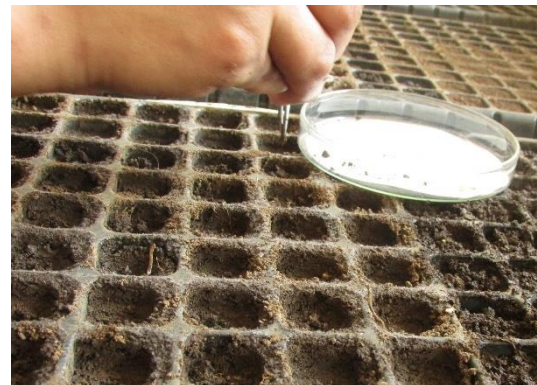
Inoculación del suelo con la suspensión de *Fol* 10^5 esp/ml⁻¹



Semillas biocebadas con la mezcla de biopolímeros y biocontrolador



Germinación de las semillas en las bandejas



Siembra de semillas por tratamiento



Trasplante en bolsas



Anexo 25.

Lista de símbolos y abreviaturas

| Símbolo: | Término |
|----------------------|-----------------------------|
| °C | Grados Celsius |
| C.E | Conductividad Eléctrica |
| cm | Centímetros |
| cm/día ⁻¹ | Centímetros por día |
| Con/ml ⁻¹ | Conidios por mililitro |
| Esp/ml ⁻¹ | Esporas por mililitro |
| <i>et al.</i> | <i>et alii</i> (y otros) |
| g | Gramo |
| h | Horas |
| ha | Hectáreas |
| Km | Kilómetro |
| kg | Kilogramo |
| mS/cm | mili Siemens por centímetro |
| min | Minutos |
| ml | Mililitro |
| μ m | Micrómetros |
| mz | Manzanas |
| pH | Potencial de Hidrógeno |
| qq | Quintales |
| PPM | Partes Por Millón |
| s | Segundos |
| T1 | Tratamiento 1 |
| T° | Temperatura |

| Abreviatura | Término |
|--------------------|--|
| Al | Almidón |
| ANOVA | Análisis de la Varianza |
| ADE | Agua Destilada Esterilizada |
| ADTE | Agua Destilada Tres Veces Esterilizada |
| AMPc | Adenosín Monofosfato Cíclico |
| BAFEs | Bacterias Formadoras de Endospora |
| BCA | Agentes de Control Biológico |
| <i>Bs</i> | <i>Bacillus subtilis</i> |
| CABI | Centre for Agricultural Bioscience International |
| CCB | Cámara de Comercio de Bogotá |

| | |
|------------|--|
| CENTA | Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal “Enrique Álvarez Córdova |
| DCA | Diseño Completamente al Azar |
| DBCA | Diseño de Bloques Completos al Azar |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico |
| DNAr | Ácido Desoxirribonucleico ribosomal |
| EM | Microorganismos Eficientes |
| FAO | Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación |
| FIRA | Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura |
| <i>Fo</i> | <i>Fusarium oxysporum</i> |
| <i>Fol</i> | <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> |
| Ga | Goma arábica |
| INTA | Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria |
| IPGRI | International Plant Genetic Resources Institute |
| ISR | Resistencia Sistemática Inducida |
| ITIS | Integrated Taxonomic Information System |
| MAG | Ministerio de Agricultura y Ganadería |
| msnm | metros sobre el nivel del mar |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information |
| NPK | Nitrógeno-Fósforo-Potasio |
| PCR | Reacción en Cadena de la Polimerasa |
| PI | Porcentaje de Inhibición |
| PICR | Porcentaje de Inhibición de Crecimiento Radial |
| PGPM | Microorganismos promotores del crecimiento vegetal |
| PGPR | Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal |
| ROS | Especies Reactivas del Oxígeno |
| SAGARPA | Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación |
| UE | Unidades Experimentales |
| SIX | Proteínas Secretadas en el Xilema |
| PDA | Papa Dextrosa Agar |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| TDS | Sólidos Totales Disueltos |
| <i>Th</i> | <i>Trichoderma harzianum</i> |
| UV | Ultravioleta |

Anexo.26

Glosario

A

Ácaros: Son animales diminutos con un tamaño que va de 0.1 mm a 3 cm de longitud. Pertenecen a la clase Arachnida, y viven tanto en medios terrestres como acuáticos.

Ácidos grasos: Son los componentes orgánicos (pequeñas moléculas que se unen para formar largas cadenas) de los lípidos que proporcionan energía al cuerpo y permiten el desarrollo de tejidos.

Ácidos nucleicos: Constituyen el material genético de los organismos y son necesarios para el almacenamiento y la expresión de la información genética.

Aeróbios: Organismos que pueden vivir o desarrollarse en presencia de oxígeno

Agroecosistemas: Es cualquier tipo de ecosistema modificado y gestionado por los seres humanos con el objetivo de obtener alimentos, fibras y otros materiales de origen biótico.

Agroindustria: Es la actividad económica que se dedica a la producción, industrialización y comercialización de productos agropecuarios, forestales y otros recursos naturales biológicos.

Anaerobios: Son microorganismos que son capaces de sobrevivir y multiplicarse en ambientes que no tienen oxígeno.

Anamorfo: Constituyen un ensamblaje artificial de los estados asexuales de hongos ascomicetos y basidiomicetos. En sentido estricto, se definen como los hongos que carecen de estructuras sexuales y que producen esporas asexuales.

Antagonista: Es la interacción que provoca que una sustancia o un organismo no puedan realizar una actividad al estar en contacto con otro.

Antibiosis: Involucra la producción de metabolitos secundarios (volátiles o difusibles) que inhiben el crecimiento del otro hongo pudiendo provocar la muerte del mismo.

Anticancerígenas: Relacionado con la prevención o el retraso de la aparición del cáncer.

Antifúngico: Sustancia que tiene la capacidad de evitar el crecimiento de algunos tipos de hongos o incluso de provocar su muerte.

Autógamas: Consistente en la unión de dos gametos de sexo distinto formados en un mismo individuo.

B

Bacteria: Son organismos procariotas unicelulares, que se encuentran en casi todas las partes de la tierra. Son vitales para los ecosistemas del planeta. Algunas especies pueden vivir en condiciones realmente extremas de temperatura y presión.

Biodiversidad: Es la variabilidad de organismos vivos de cualquier fuente, incluidos, entre otros, los ecosistemas terrestres y marinos y otros sistemas acuáticos, y los complejos ecológicos de los

que forman parte; comprende la diversidad dentro de cada especie, entre las especies y de los ecosistemas.

Biocebado: Es un proceso de tratamiento biológico de semillas que combina la hidratación de semillas y la inoculación con microbios benéficos para lograr la protección de semillas contra patógenos transmitidos por el suelo mejorando la germinación, el establecimiento de plántulas y el crecimiento vegetativo.

Biocontroladores: Son productos, de origen biológico, que actúan como antagonistas frente a microorganismos patógenos que producen daño en los cultivos. Este tiene la característica de no dejar residuos, y no ser perjudiciales para la salud humana, como tampoco para el medio ambiente.

Biofumigación: Es una técnica que permite utilizar la materia orgánica así como los productos de su descomposición en el control de patógenos presentes en el suelo.

Biomasa: Cantidad total de materia viva presente en un organismo, comunidad o ecosistema.

Biopolímero: Son compuestos sintetizados por los seres vivos y cumplen funciones biológicas (como el caso de las proteínas, ácidos nucleicos), estructurales (polisacáridos) y de defensa o mantenimiento de la actividad acuosa (biopelículas).

Biopreparados: Son sustancias y mezclas de origen vegetal, animal o mineral presentes en la naturaleza que tienen propiedades nutritivas para las plantas o repelentes y atrayentes de insectos para la prevención y control de plagas y/o enfermedades.

Biorregulador: Son aquellos que en su formulación contienen moléculas protagónicas para la expresión o inhibición de un cierto proceso, estas moléculas generalmente son fitohormonas (idénticos a los compuestos naturales) o bien compuestos de efecto tipo hormona.

Biotipo: Referido a aquellas cepas que poseen características morfológicas representativas de su especie, es decir, la forma típica que puede considerarse modelo de su especie, variedad o raza.

C

Células conidiógenas o Fiálides: Célula terminal del conidióforo y productora de conidios, en forma de botella que se une por su base en la métula y la cual constituye el soporte de los conidios.

Cepas: Es un conjunto de microorganismos, que comparten rasgos comunes, como por ejemplo, su virulencia, su expansión, sus mutaciones o su resistencia hacia algún agente, por ejemplo un antibiótico.

Clamidospora: Es un tipo de espora de paredes gruesas de varias clases de los hongos.

Clima cálido: Es muy estable en cuanto a temperatura se refiere, ya que no tiene grandes variaciones durante el año como en zonas cercanas a la línea ecuatorial.

Clima templado: Sus temperaturas promedio rondan los 15 °C y sus precipitaciones se sitúan entre los quinientos y los mil milímetros al año.

Colonia: Agrupación de bacterias originadas a partir de una bacteria madre que se establecen y extienden por determinado medio.

Conidias: Son esporas asexuales, no móviles de un hongo.

Conidiogénesis: Proceso de formación de esporas asexuales.

Contaminación: Es aquella que se produce por los diferentes macroorganismos o agentes contaminantes biológicos patógenos que descomponen la materia, la calidad del aire, agua y suelo.

Control biológico: Consiste en el uso de uno o más organismos benéficos (enemigos naturales) para reducir la densidad de otro ser vivo, una planta o animal que causa daño al hombre (plagas)

Cosmopolita: Se aplica a los organismos que pueden hallarse en cualquier región del mundo, pero solo en condiciones propicias para su hábitat, sin que implique que ocupe todos y cada uno de los rincones de estas regiones.

D

Dampig off o Ahogamiento del tallo: Enfermedad que ataca a las semillas y a las plántulas emergentes, causada por *Fusarium spp*, *Pythium spp*, y *Rhizoctonia spp*. se presenta por condiciones de alta humedad y mal drenaje del sustrato.

E

Endófitos: Microorganismos que pasan la mayor parte o todo su ciclo de vida colonizando los tejidos de la planta hospedera, sin causar daño evidente.

Esporodoquios: Cuerpo fructífero constituido por un racimo de conidióforos entretejidos que forman una masa de hifas.

Espora: célula generativa que reproduce nuevos individuos sin necesidad de fusionarse.

Espululación: Es el mecanismo de reproducción asexual a través de esporas y endosporas.

Enzimas: Es un catalizador biológico. Es una proteína que acelera la velocidad de una reacción química específica en la célula. La enzima no se destruye durante la reacción y se utiliza una y otra vez.

F

Fitopatógeno: Microorganismo, que genera enfermedades en las plantas a través de disturbios en el metabolismo celular, al secretar enzimas, toxinas, fitorreguladores y otras sustancias y, además, absorbiendo nutrientes de la célula para su propio crecimiento.

Fol: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) (Sacc.) Snyder y Hansen, hongo causante de la marchitez vascular en plantas de tomate.

Foliolo: Pinna o cada una de las piezas separadas en que a veces se encuentra dividido el limbo de una hoja.

Fusariosis: Infección superficial, diseminada y localmente invasiva de las especies patógenas del hongo *Fusarium*, que a menudo se encuentra en el suelo y en el agua.

Fungicidas: Sustancias que se emplean para eliminar o impedir el crecimiento de hongos y mohos perjudiciales para las plantas.

G

Genes: Son secciones de ADN (ácido desoxirribonucleico) que están presentes dentro de la célula, funcionan como almacenes de información genética, síntesis de proteínas entre otras sustancias.

Germinación: Es el proceso mediante el cual una semilla se desarrolla hasta convertirse en una nueva planta.

H

Herbáceas: Se caracterizan por carecer de un tallo leñoso, su estructura principal, en cambio, es flexible y tierna. Se conoce como plantas herbáceas anuales o plantas de temporada a aquellas cuya germinación y florecimiento se produce en el mismo año de la muerte.

Hidroponía: Es un sistema de producción en el cual las raíces de las plantas no se encuentran establecidas en el suelo, sino en un sustrato o en la misma solución nutritiva utilizada.

Hifa: Filamento microscópico pluricelular del micobionte que unido con otros filamentos forma el cuerpo vegetativo de los hongos llamado micelio.

Hiperparasitismo: Se emplea para designar la asociación biológica en la cual un parásito a su vez se encuentra parasitado por otro.

Hiperparásito: Organismo parásito que vive sobre un hospedero y que a su vez parasita a otra especie. Los hiperparasitoides son a menudo obligados, es decir que se desarrollan necesariamente a partir de un parasitoide. Pero, pueden también ser facultativos, cuando su desarrollo tiene lugar tanto sobre una especie parasitoide como sobre una especie libre.

Homogéneo: Significa igual, uniforme, semejante.

Hongos: Son organismos eucariontes y, como tales, poseen una organización celular muy compleja, así como células nucleadas y orgánulos rodeados por membrana.

Hongo antagonista: Organismo heterótrofo (falta de fotosíntesis) que posee células quitinizadas normalmente no móviles y que se caracteriza por su escasa toxicidad sobre otros organismos del ambiente, por su actitud para ser tratado industrialmente y ser comercializado como un insecticida

Hospedero: Se llama huésped, hospedador u hospedante a aquel organismo que alberga a otro en su interior o lo porta sobre sí, ya sea un parásito, un comensal o un mutualista.

Hortalizas: Son vegetales comestibles cuyo cultivo se realiza en huertas, por lo general, el concepto de hortaliza incluye las legumbres y las verduras, dejando fuera los cereales y las frutas.

I

Incubación: Es el proceso de cultivar celular microbianas en un entorno controlado (incubadora) de temperatura, humedad y luz, con el fin de promover su crecimiento y desarrollo.

Inhibición: Suspensión transitoria de la actividad de un órgano o del organismo mediante la acción de un estímulo.

Insectos: Son animales invertebrados del filo de los artrópodos.

Inermes: Se refiere a plantas desprovistas de púas o espinas.

Inóculo: Mezcla de propágulos, micelio o esporas de un hongo capaz de colonizar una raíz o un sustrato.

Inoculación: Transferencia de un patógeno a otro medio, a una planta hospedante o a un órgano de ella.

L

Latente: Reposo o de desarrollo suspendido, pero capaz de volverse activo en condiciones favorables.

Lisis de la célula: Se refiere al deterioro de una célula debido a una lesión en su membrana plasmática (exterior).

M

MICSA: Empresa de Guatemala productora e importadora de insumos para el manejo integrado de plagas y enfermedades de los cultivos.

Micosis: Enfermedad infecciosa producida por hongos microscópicos que pueden afectar cualquier organismo.

Micoparásito: Hongo que parasita a otro hongo.

Micoparasitismo: Simbiosis antagónica entre organismos, en el que generalmente están implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasas, celulasas, y que se corresponden con la composición y estructura de las paredes celulares de los hongos parasitados.

Monocultivo: Se refiere a las plantaciones de gran extensión con el cultivo de una sola especie, con los mismos patrones, resultando en una similitud genética, utilizando los mismos métodos de cultivo para toda la plantación (control de pestes, fertilización y alta estandarización de la producción).

Mórfosis: Cambio de forma durante el desarrollo de un organismo.

Moho Gris: Se presenta cuando existe una humedad relativa superior al 90%, ocasionando daños a las flores, frutos y el tallo causando manchas de color gris.

N

Necrosis: Cambios morfológicos que siguen a la muerte celular en el tejido vivo, derivados en gran parte de la acción degradativa progresiva de las enzimas sobre las células mortalmente lesionadas.

P

Parasitismo: Es un tipo de simbiosis, una estrecha relación en la cual uno de los participantes, el parásito, depende del otro, el huésped, (también llamado hospedante, hospedador o anfitrión) y obtiene algún beneficio.

Patógeno: Son agentes infecciosos que pueden provocar enfermedades a su huésped. Este término se emplea normalmente para describir microorganismos como los virus, bacterias y hongos, entre otros.

Peletizado: Proceso en el que se aplican polvos o líquidos cuidadosamente seleccionados, para formar una cáscara o cobertura alrededor de la semilla.

pH: Medida del grado de acidez o alcalinidad de una sustancia o una solución.

Plaguicida: Es una combinación de sustancias que se emplea para eliminar las plagas.

Pulpa: Parte comestible de la fruta (carnosa) que ha sido separada de la cascara y semillas por procedimientos ya sea manuales o industriales.

R

Rizobacteria: Es un tipo de bacteria que coloniza las raíces de algunas plantas en una relación simbiótica beneficiosa para ambas partes (mutualismo).

S

Saprofito: Se alimenta de materias orgánicas en descomposición.

Simbiosis: Es la asociación o interacción que se establece entre dos o más organismos vivos.

Sustrato: Está vinculado a la superficie en la que vive un individuo, que está formada tanto por factores bióticos como abióticos.

T

Temperatura: Es una magnitud que mide el nivel térmico o el calor que un cuerpo posee. Toda sustancia en determinado estado de agregación (sólido, líquido o gas), está constituida por moléculas que se encuentran en continuo movimiento.

Termófilo: Organismo adaptado a temperaturas altas, como las que se alcanzan en aguas termales y géiseres, en fuentes hidrotermales submarinas, y en las tuberías domésticas de agua caliente.

Teleomorfo: Estructura reproductiva, de un hongo, resultado de la plasmogamia, con nueva combinación nuclear (reproducción sexual).

U

Ubicuo: Habilidad que tiene un organismo que le permite estar en todos lados, al mismo tiempo.

Unidad formadora de colonia (UFC): Célula bacteriana viva y aislada que en las condiciones adecuadas da lugar a la producción de una colonia de bacterias.

V

Virulencia: El grado de patogenicidad de un agente infeccioso. Implica invasión y toxigenicidad.

Virus: Fragmentos cortos de ADN o ARN (genoma) y que está rodeado por una cubierta de proteína o cápside y, en algunos casos, por una envoltura lipoproteica.

X

Xilema: Es un tejido conductor de agua y minerales disueltos, desde la raíz hasta el resto de la planta. También proporciona sostén.