

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE AGRONOMIA  
DEPARTAMENTO E INSTITUTO  
DE BOTANICA AGRICOLA



USO DE *Trichoderma* spp. Y *Bacillus* spp. EN EL CONTROL BIOLÓGICO  
DE LA MARCHITEZ VASCULAR DEL TOMATE CAUSADA POR *Fusarium*  
*oxysporum* f.sp *lycopersici* EN LA ZONA AGRÍCOLA DE TUCUTUNEMO,  
ESTADO ARAGUA

ING. AGR. MSc. HELEN YNGBORG PEREZ PIVAT

MARACAY, JULIO 2013

**USO DE *Trichoderma* spp. Y *Bacillus* spp. EN EL CONTROL BIOLÓGICO DE  
LA MARCHITEZ VASCULAR DEL TOMATE CAUSADA POR *Fusarium*  
*oxysporum* f.sp *lycopersici* EN LA ZONA AGRÍCOLA DE TUCUTUNEMO,  
ESTADO ARAGUA**

**ING. AGR. MSc. HELEN YNGBORG PEREZ PIVAT**

**MARACAY, JULIO 2013**

**USO DE *Trichoderma* spp. Y *Bacillus* spp. EN EL CONTROL BIOLÓGICO DE LA MARCHITEZ VASCULAR DEL TOMATE CAUSADA POR *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* EN LA ZONA AGRÍCOLA DE TUCUTUNEMO, ESTADO ARAGUA**

Trabajo presentado ante el Consejo de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela en cumplimiento del requisito exigido por el Reglamento de Ingreso, Ubicación y Ascenso en el Escalafón Universitario para optar a la categoría de ASISTENTE

**ING. AGR. MSc. HELEN YNGBORG PEREZ PIVAT  
TUTORA: DRA. NELLY SANABRIA DE A.**

**MARACAY, JULIO 2013**

## DEDICATORIA

*A la memoria de mis amados abuelos **Joseph Pivat** e **Yngborg Fehlinger** y mi tía **Heidi Pivat**, siempre presentes en mi vida, siendo eterno ejemplo de amor, fe, constancia, dedicación y trabajo...viven en mi corazón para siempre...resplandeciendo su luz cada día, iluminando mis pasos y siendo inspiración constante para alcanzar mis metas.*

*A la memoria del **Prof. Alejandro Rodríguez Landaeta**, gran ejemplo a seguir por su mística de trabajo, dedicación y amor a la Fitopatología y a la memoria de **Luis Salvador Ruíz García**, estudiante dedicado, ejemplo de superación, alegría y nobleza.*

*Siempre serán brillantes estrellas que resplandecerán con su luz en los corazones de quienes los apreciamos...Dios los bendiga en la eternidad.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios y mi Señor Jesucristo por ser siempre mi guía, por estar siempre conmigo y darme fe y esperanza para lograr todas mis metas y ser mejor cada día.

A mi Virgen Milagrosa, por estar conmigo siempre, en todo momento, por darme paz, fuerza, esperanza y fe para seguir adelante y darme la certeza de que con fe todo se puede lograr.

A mi madre, Margarita, por estar siempre a mi lado, por compartir todo conmigo, por sus consejos, apoyo, cariño, amistad y amor incondicional, por ser madre y amiga, por siempre confiar en mí y darme seguridad para lograr mis sueños y metas, como este que hoy se hace realidad y los que aún faltan.

A mi padre, Eduardo, por darme su apoyo y cariño a lo largo de mi vida, por su apoyo en este proyecto que ya hoy es una realidad.

A mi hermana Isis, mi mejor amiga, por su ayuda en los análisis estadísticos de este trabajo y ante todo por entenderme y quererme como soy, por ser mi complemento, por siempre brindarme su apoyo y comprenderme, por ser la mejor hermana del mundo.

A la Universidad Central de Venezuela, la casa que vence las sombras, por ser la casa donde se cumplen los sueños como el que hoy se hace realidad.

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) de la Universidad Central de Venezuela por el financiamiento otorgado para la realización de esta investigación.

A la Profesora Nelly Sanabria de Albarracín, por confiar en mí para la realización de este trabajo, por su constante apoyo y asesoría durante la realización del mismo, por sus valiosos y sabios consejos, por compartir toda su valiosa experiencia y conocimientos, y por brindarme siempre su amistad y cariño. Que Dios la bendiga.

Al Prof. Leonardo Taylhardat, Decano de la Facultad de Agronomía, por brindarme su confianza, aprecio, apoyo y amistad.

A los Profesores Jesús Romero y Lino Lugo, por brindarme su amistad, estima y aprecio.

A los Profesores Luis Subero, Daisy Gaskin y Yonis Hernández, por brindarme su amistad, estima y aprecio, por sus sabias palabras, su apoyo y compartir su experiencia de manera desinteresada. Que Dios los bendiga.

A los Profesores Damelis Jáuregui, Romelia Parra, Nancy Mariño, Lorena Guevara, Marina García, Marlene Lapp, Pedro Torrecilla, Luis Hernández Chong y Mercedes Castro, por brindarme su amistad, aprecio y apoyo.

Al Departamento de Botánica Agrícola, en especial al personal de las Cátedras de Fitopatología y Morfoanatomía Vegetal, por su apoyo y amistad.

A la Sra. Yasmín y Srta. Elida, Secretarías del Dpto. e Instituto de Botánica Agrícola, por su atención y apoyo siempre de manera colaboradora, amable y atenta.

A los pasantes de la Clínica de Enfermedades de Plantas, Rubí Polanco y Félix Manrique y a mi estudiante Nerio Contreras, por el apoyo prestado de manera atenta y colaboradora en la realización de esta investigación.

A mi estudiante Nelson Pizzo, tesista de la Cátedra, por su gran apoyo y colaboración siempre de manera atenta en la realización de esta investigación.

A mis estudiantes, ya hoy colegas, Héctor Martínez, Gíriac Caló, Nelson Pérez, Aura Herrera e Ingrid Neira por su apoyo, amistad y aprecio.

A los productores de toda la zona agrícola del Estado Aragua, por su colaboración siempre atenta y amable en las visitas realizadas para las labores de colección del material vegetal y muestras de suelo empleadas en esta investigación, compartiendo sus conocimientos, inquietudes y experiencias. Dios los bendiga.

A los Profesores Orlando Guenni, William Granada y Sra. Yajaira, por su amable colaboración en la realización de las mediciones de radiación solar del umbráculo empleado en esta investigación. Gracias por su amistad, apoyo y atención siempre cordial y amable.

A la Profesora Jocelyne Ascencio y al Ing. Agr. Jorge Ugarte, por su amable colaboración en el préstamo de una estufa necesaria para esta investigación. Gracias por su amistad, apoyo y atención siempre cordial y amable.

A los Profesores Bernavé Meléndez y Thaís Díaz, de la Facultad de Cs. Veterinarias, UCV Maracay, por su amable colaboración en la donación de agua destilada necesaria para esta investigación. Gracias por su apoyo y atención siempre atenta y cordial.

A la Inv. María Suleima González y al Prof. Francisco Zapata, por compartir sus conocimientos y valiosa experiencia y por su gran calidad humana.  
Al Ing. Agr. Rafael Mejías, por su colaboración y apoyo de manera cordial y atenta.

A las Ing. Agr. Adenis Santander, Georgette Santander y a los Profesores Olivier Rondón y Félix Manrique por su amistad.

Al personal de apoyo de la Cátedra de Fitopatología, María Gabriela García, Norkis, Richard y Maritza, por su atención siempre amable, cordial, atenta y colaboradora.

A la Sra. Yenny, Secretaria del Consejo de Facultad, por su atención siempre amable, cordial, atenta y colaboradora.

A mis estudiantes de pregrado y postgrado, por inspirarme a ser mejor día a día y compartir con ellos siempre todo lo que he aprendido y continuo aprendiendo en este maravilloso mundo de la investigación y docencia en Fitopatología y Morfoanatomía Vegetal.

A todas aquellas personas que, de una u otra forma, hicieron posible esta meta que hoy es una realidad.

*“Gracias”*  
HELEN YNGEBORG PÉREZ PIVAT

## RESUMEN

El marchitamiento vascular del tomate causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Sacc. constituye una de las enfermedades más importantes y destructivas en grandes áreas cultivadas, ocasionando graves pérdidas. La importancia de controlar este patógeno radica en que el tomate constituye la fuente de sustento de muchos agricultores dedicados a su producción, que requieren de alternativas de control efectivas, cónsonas con el medio ambiente y que no pongan en peligro su salud. Por ello, se planteó una investigación para evaluar el efecto de los biocontroladores *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. sobre el control de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* en tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) bajo condiciones *in vitro* e *in vivo* y sobre el crecimiento del cultivo. Los ensayos de este trabajo se llevaron a cabo tanto en el laboratorio como en el umbráculo de la Clínica de Enfermedades de Plantas de la Cátedra de Fitopatología, Facultad de Agronomía-UCV Maracay. El hongo *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* fue aislado de plantas infectadas con el patógeno colectadas en la zona agrícola de Tucutunemo, estado Aragua e identificado en base a características macroscópicas y microscópicas. Tanto los aislados de *Trichoderma* spp. como de *Bacillus* spp. fueron obtenidos de diferentes muestras de suelo colectadas en siembras hortícolas de diferentes zonas agrícolas del estado Aragua, aplicando en el primer caso la técnica de dilución seriada en placas con medio de cultivo PDA, empleada por Páez y Sanabria (2007), y en el segundo, siguiendo la metodología de Aslim *et al.* (2002) y Sosa-Briceño *et al.* (2004). Para comprobar la capacidad patogénica del aislado de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, se realizó la prueba de patogenicidad. Para seleccionar los aislados más promisorios de ambos biocontroladores, se realizaron cultivos duales, se midió el porcentaje de inhibición de crecimiento (PIC) y el porcentaje de inhibición de la esporulación (PIE), siguiendo las fórmulas de Menten y col. (1976). Las colonias de los aislados fueron caracterizadas macroscópicamente y microscópicamente. Para la evaluación *in vivo*, se emplearon 120 plantas de tomate cv. Río Grande, a razón de 10 plantas por tratamiento. Un día después del trasplante se realizó la inoculación del patógeno en forma de suspensión a una concentración de  $10^6$  conidios/ml. Una vez inoculadas las plantas, fueron sometidas a condiciones de cámara húmeda por 48 horas. El inóculo de *T. koningii* se preparó en forma de suspensión conidial a una concentración de  $10^6$  conidios/ml medida con la Cámara de Neubauer y el inóculo de *Bacillus* spp. se preparó en forma de suspensión ajustando a una concentración de  $10^8$  UFC/ml, con la Escala de McFarland. Los tratamientos aplicados a las plantas fueron: T1 (*Trichoderma* spp. en semillero), T2 (*Trichoderma* spp. en semillero y trasplante), T3 (*Trichoderma* spp. en semillero, trasplante y semanal), T4 (*Bacillus* spp. en semillero), T5 (*Bacillus* spp. en semillero y trasplante), T6 (*Bacillus* spp. en semillero, trasplante y semanal), T7 (*Trichoderma* spp. + *Bacillus* spp. en semillero), T8 (*Trichoderma* spp. + *Bacillus* spp. en semillero y trasplante), T9 (*Trichoderma* spp. + *Bacillus* spp. en semillero, trasplante y semanal), T10 (testigo inoculado), T11 (testigo sin inocular) y T12 (fungicida Carbendazim en semillero, trasplante y semanal). Se evaluó el efecto de ambos biocontroladores evaluando la mortalidad de las plantas (%) y midiendo variables tanto vegetativas como reproductivas. Tanto el ensayo *in vitro* como *in vivo*, fueron realizados bajo un diseño completamente aleatorizado (DCA). El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico Statistix versión 8.0. Para el análisis de varianza, se aplicó la prueba de medias de Tukey, a fin de determinar los mejores tratamientos aplicados. Para aquellas variables que no cumplieron los supuestos básicos, se procedió a realizar un análisis de varianza vía no paramétrica (Kruskal-Wallis). Se aplicó además la prueba de correlación de Spearman. Se obtuvo que el aislado de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* obtenido de la zona productora de tomate de Tucutunemo, estado Aragua muestreada resultó patogénico en tomate cv. Río Grande, ocasionando un 60% de mortalidad de las plantas testigo inoculadas con el mismo. Se obtuvieron 22 aislados de *Trichoderma* spp. y 15 aislados de *Bacillus* spp. de las zonas agrícolas del estado Aragua muestreadas, siendo seleccionados como más promisorios los identificados como MII y PB1, siendo identificados taxonómicamente como *Trichoderma koningii* y *Bacillus* spp., respectivamente. El control del marchitamiento vascular fue más efectivo con los tratamientos 6 y 9, siendo nula la mortalidad de plantas en ambos tratamientos. Las variables vegetativas volumen, peso fresco y peso seco de raíces, peso fresco y peso seco de la parte aérea de las plantas inoculadas con el patógeno, se favorecieron con el tratamiento 6, excepto las variables altura de las plantas y longitud de raíces, mientras que en el caso de las variables reproductivas, el mayor número de frutos se presentó en el tratamiento 6, el mayor rendimiento se obtuvo con el tratamiento 5 y los mayores valores de diámetro y peso de frutos se obtuvieron en el tratamiento 11. Se recomienda el uso de *Bacillus* spp. de forma individual y en conjunto con *T. koningii* para el control del patógeno *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* en el cultivo de tomate cv. Río Grande bajo condiciones de umbráculo, siendo ideal la aplicación de *Bacillus* spp. en los tres momentos de aplicación evaluados: semillero, trasplante y semanal, a fin de proteger adecuadamente el cultivo contra el efecto del patógeno antes mencionados y garantizar una eficiente producción de frutos, de calidad comercial y de mayor aceptabilidad por el consumidor.

**Palabras clave:** *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Trichoderma koningii*, *Bacillus* spp., patogenicidad, control biológico.

## ABSTRACT

Tomato vascular wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Sacc. is one of the most important and destructive diseases in crops, causing serious losses. The importance of controlling this pathogen is that the tomato is the source of livelihood for many farmers, which require effective control alternatives, consonant with the environment and healthy. Therefore, an investigation was proposed to evaluate the effect of biocontrol *Trichoderma* spp. and *Bacillus* spp. on the control *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) under *in vitro* and *in vivo* conditions. This work were carried out both in the laboratory and in the glasshouse in the Clínica de Enfermedades de Plantas, Facultad de Agronomía-UCV Maracay. The fungus *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* was isolated from plants infected with the pathogen collected in the agricultural area of Tucutunemo, Aragua and identified based on macroscopic and microscopic features. Both isolates of *Trichoderma* spp. as *Bacillus* spp. were obtained from different soil samples collected in different horticultural crops of agricultural areas of the state of Aragua, in the first case using the serial dilution technique on plates with PDA medium, used by Paez and Sanabria (2007), and in the second following the methodology of Aslim *et al.* (2002) and Sosa-Briceño *et al.* (2004). The pathogenicity of the isolate of *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* was tested. To select the most promising of the isolated, dual cultures were performed, was measured the percent inhibition of growth (PIC) and the percent inhibition of sporulation (PIE) following the procedure of Menten *et al.* (1976). Colonies of the isolates were characterized macroscopically and microscopically. For the evaluation *in vivo*, was used 120 tomato plants cv. Rio Grande, at 10 plants per treatment. One day after transplantation was performed pathogen inoculation as a suspension at a concentration of  $10^6$  conidia/ml. The inoculated plants were subjected to conditions of moist chamber for 48 hours. The inoculum of *T. koningii* was prepared as conidial suspension at a concentration de  $10^6$  conidia/ml measured with a Neubauer chamber and inoculum of *Bacillus* spp. was prepared as a suspension adjusted to a concentration of  $10^8$  CFU/ml, with the McFarland scale. Treatments applied to plants were: T1 (*Trichoderma* spp. in seeds), T2 (*Trichoderma* spp. in seeds and transplant), T3 (*Trichoderma* spp. in seeds, transplant and weekly), T4 (*Bacillus* spp. in seeds) T5 (*Bacillus* spp. in seeds and transplant), T6 (*Bacillus* spp. in seeds, transplant and weekly), T7 (*Trichoderma* spp. + *Bacillus* spp. in seeds), T8 (*Trichoderma* spp. + *Bacillus* spp. in seeds and transplant), T9 (*Trichoderma* spp. + *Bacillus* spp. in seeds, transplant and weekly), T10 (control inoculated), T11 (control uninoculated) and T12 (fungicide Carbendazim in seeds, transplant and weekly). The effect of both biocontrol was evaluated with the plant mortality (%) and measuring of vegetative and reproductive variables. The assay *in vitro* and the assay *in vivo*, were conducted under a completely randomized design (DCA). Statistical analysis was performed using the statistical package Statistix version 8.0. For analysis of variance, we applied the Tukey test, to determine the best treatments applied. For those variables that did not meet the basic assumptions, we proceeded to an analysis of variance via nonparametric (Kruskal-Wallis). It also applied the Spearman correlation test. The isolate of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* obtained from tomato producing area Tucutunemo, Aragua was pathogenic on tomato cv. Rio Grande, causing 60% mortality of the inoculated control plants. Were obtained 22 isolates of *Trichoderma* spp. and 15 isolates of *Bacillus* spp. agricultural areas sampled Aragua state, selected the isolates MII and PB1, taxonomically identified as *Trichoderma koningii* and *Bacillus* spp., respectively. The vascular wilt control was more effective with treatments 6 and 9, with absent of mortality of plants in both treatments. Vegetative variables as volume, fresh weight and dry weight of roots, fresh weight and dry weight of the aerial part of the plants inoculated with the pathogen, were favored treatment 6 variables except plant height and root length, while in the case of reproductive variables as many fruits are presented in treatment 6, the highest yield was obtained with treatment of 5 and higher values of diameter and weight of fruits obtained in the treatment 11. The use of *Bacillus* spp. individually and together with *T. koningii* is an alternative of control of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato crop cv. Rio Grande under greenhouse conditions, is recommendable the application of *Bacillus* spp. in three application times tested: seeds, transplant and weekly, to adequately protect the crop against pathogenic effect mentioned above and ensure efficient production of fruits, commercial quality and the consumer acceptability.

**Keywords:** *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Trichoderma koningii*, *Bacillus* spp., pathogenicity, biological control.

## TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
<b>PÁGINA DE TÍTULO</b> .....	i
<b>DEDICATORIA</b> .....	iii
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	iv
<b>RESUMEN</b> .....	vi
<b>ABSTRACT</b> .....	vii
<b>TABLA DE CONTENIDO</b> .....	viii
<b>INDICE DE CUADROS</b> .....	x
<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	xi
<b>I.- INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>II.- OBJETIVOS</b> .....	4
<b>III.- REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	6
<b>3.1.- Características del cultivo de tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i> L.)</b> .....	6
3.1.1.- Generalidades.....	6
3.1.2.- Variedades.....	7
3.1.3.- Producción.....	8
<b>3.2.- Marchitez Vascular por <i>Fusarium</i> (<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>)</b> .....	8
3.2.1.- Descripción de la Enfermedad.....	8
3.2.1.1.- Generalidades.....	8
3.2.1.2.- Síntomas.....	9
3.2.1.3.- Organismo Causal.....	9
3.2.1.3.1.- Características.....	9
3.2.1.3.2.- Razas.....	10
3.2.1.3.3.- Ciclo de la Enfermedad, Patogénesis y Epidemiología.....	11
3.2.1.3.4.- Control.....	14
<b>3.3.- El Control Biológico</b> .....	15
3.3.1.- Generalidades.....	15
3.3.2.- El Control Biológico con el uso de <i>Trichoderma</i> spp.....	16
3.3.2.1.- Mecanismo de Acción.....	17
3.3.3.- El Control Biológico con el uso de <i>Bacillus</i> spp.....	19
3.4.- Experiencias de Control Biológico con el uso de <i>Trichoderma</i> spp. y <i>Bacillus</i> spp....	22
<b>IV.- MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	26
<b>4.1.- Ubicación de los Ensayos</b> .....	26
<b>4.2.- Procedencia de las Muestras</b> .....	26
<b>4.3.- Realización de Aislamientos</b> .....	27
4.3.1.- Aislamiento del patógeno.....	27
4.3.2.- Aislamiento de los biocontroladores.....	27
4.3.2.1.- <i>Trichoderma</i> spp.....	27
4.3.2.2.- <i>Bacillus</i> spp.....	28
<b>4.4.- Prueba de Patogenicidad</b> .....	28
4.4.1.- Preparación del inóculo.....	28
4.4.2.- Inoculación y reaislamiento del patógeno.....	29
<b>4.5.- Selección <i>in vitro</i> de aislados promisorios de <i>Trichoderma</i> spp. y <i>Bacillus</i> spp. a partir de cultivos duales</b> .....	29
4.5.1.- <i>Trichoderma</i> spp.....	29
4.5.2.- <i>Bacillus</i> spp.....	29
4.5.3.- Placas Control.....	30

<b>4.6.- Identificación Taxonómica de los aislados más efectivos de <i>Trichoderma spp.</i> y <i>Bacillus spp.</i></b> .....	30
<b>4.7.- Evaluación <i>in vivo</i> de aislados promisorios de <i>Trichoderma spp.</i> y <i>Bacillus spp.</i></b> .....	31
4.7.1.- Material vegetal.....	31
4.7.2.- Preparación del semillero y trasplante.....	31
4.7.3.- Preparación del inóculo de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> e inoculación....	32
4.7.3.1.- Inoculación.....	32
4.7.3.2.- Preparación del inóculo de <i>Trichoderma spp.</i> .....	32
4.7.3.3.- Preparación del inóculo de <i>Bacillus spp.</i> .....	33
<b>4.8.- Efecto Individual y Combinado de los Biocontroladores</b> .....	33
4.8.1.- Efecto de <i>Trichoderma spp.</i> y <i>Bacillus sp.</i> sobre el crecimiento de las plantas de tomate e incidencia de la enfermedad.....	34
<b>4.9.- Diseño de Experimento</b> .....	34
4.9.1.- Análisis estadístico.....	34
<b>V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	35
<b>5.1.- Descripción de Síntomas</b> .....	35
<b>5.2.- Aislamiento, caracterización e identificación del patógeno</b> .....	36
5.2.1.- Características del Patógeno.....	36
5.2.2.- Prueba de Patogenicidad.....	37
<b>5.3.- Selección <i>in vitro</i> de aislados promisorios de <i>Trichoderma spp.</i> y <i>Bacillus spp.</i> a partir de cultivos duales</b> .....	39
5.3.1.- <i>Trichoderma spp.</i> .....	39
5.3.2.- <i>Bacillus spp.</i> .....	43
<b>5.4.- Identificación taxonómica del aislado más efectivo de <i>Trichoderma spp.</i></b> .....	46
5.4.1.- Descripción del biocontrolador.....	46
<b>5.5.- Identificación taxonómica del aislado más efectivo de <i>Bacillus spp.</i></b> .....	48
5.5.1.- Descripción del biocontrolador.....	48
<b>5.6.- Evaluación <i>in vivo</i> de aislados promisorios de <i>Trichoderma spp.</i> y <i>Bacillus spp.</i></b> .....	49
5.6.1.- Efecto de los biocontroladores sobre el control de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> ..	49
5.6.2.- Efecto individual y combinado de los aislamientos más efectivos de <i>Trichoderma spp.</i> y <i>Bacillus sp.</i> sobre el crecimiento de las plantas de tomate.....	53
5.6.2.1.- Evaluación de variables vegetativas.....	53
5.6.2.1.- Evaluación de variables reproductivas.....	68
<b>VI.- CONCLUSIONES</b> .....	76
<b>VII.- RECOMENDACIONES</b> .....	78
<b>VIII.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	79

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Procedencia de las muestras de suelo procesadas .....	26
<b>Cuadro 2.</b> Tratamientos de <i>Trichoderma</i> spp. y <i>Bacillus</i> spp. aplicados a las plantas inoculadas con el patógeno bajo estudio.....	33
<b>Cuadro 3.</b> Porcentajes de inhibición del crecimiento (PIC) y porcentajes de inhibición de la esporulación (PIE) obtenidos del enfrentamiento en cultivos duales de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> y los aislados del género <i>Trichoderma</i> con su respectiva prueba de medias del análisis de varianza de Kruskal-Wallis.....	42
<b>Cuadro 4.</b> Características de los aislados del género <i>Bacillus</i> consideradas para su selección preliminar.....	43
<b>Cuadro 5.</b> Porcentajes de inhibición del crecimiento (PIC) y porcentajes de inhibición de la esporulación (PIE) obtenidos del enfrentamiento en cultivos duales de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> y los aislados del género <i>Bacillus</i> con su respectiva prueba de medias del análisis de varianza de Kruskal-Wallis.....	45
<b>Cuadro 6.</b> Prueba de Medias del Análisis de Varianza de Kruskal-Wallis para las variables de las plantas de tomate inoculadas con <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> y tratadas con los biocontroladores de forma individual y combinada y los demás tratamientos aplicados.....	54
<b>Cuadro 7.</b> Análisis de varianza de Kruskal-Wallis con su respectiva prueba de medias para las variables de los frutos de plantas de tomate ( <i>Lycopersicon esculentum</i> ) cv. Rio Grande inoculadas con <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> y tratadas con los biocontroladores de forma individual y combinada y los demás tratamientos aplicados.....	68
<b>Cuadro 8.</b> Coeficientes de variación para las variables de los frutos de plantas de tomate ( <i>Lycopersicon esculentum</i> ) cv. Rio Grande inoculadas con <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> y tratadas con los biocontroladores de forma individual y combinada y los demás tratamientos aplicados.....	69

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Síntomas de marchitez en las plantas de tomate colectadas.....	35
<b>Figura 2.</b> Características macroscópicas y microscópicas del aislado de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> .....	37
<b>Figura 3.</b> Síntomas en plántulas inoculadas con <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> .....	38
<b>Figura 4.</b> Características macroscópicas y microscópicas del hongo <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> .....	39
<b>Figura 5.</b> Cultivos duales con mayor PIC (%) realizados entre <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> y los aislados del género <i>Trichoderma</i> .....	41
<b>Figura 6.</b> Cultivos duales con mayor PIC (%) realizados entre <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> y los aislados del género <i>Bacillus</i> .....	44
<b>Figura 7.</b> Características macroscópicas y microscópicas del aislado de <i>Trichoderma</i> spp.....	47
<b>Figura 8.</b> Características macroscópicas y microscópicas del aislado de <i>Bacillus</i> spp....	48
<b>Figura 9.</b> Mortalidad (%) de plantas de tomate ( <i>Lycopersicon esculentum</i> ) cv. Rio Grande inoculadas con <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> y tratadas con los biocontroladores de forma individual y combinada y los demás tratamientos aplicados...	49
<b>Figura 10.</b> Síntomas de marchitez en plantas inoculadas.....	50
<b>Figura 11.</b> Altura promedio (cm) de plantas de tomate ( <i>Lycopersicon esculentum</i> ) cv. Rio Grande inoculadas con <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> y tratadas con los biocontroladores de forma individual y combinada y los demás tratamientos aplicados...	55
<b>Figura 12.</b> Longitud promedio de raíces (cm) de plantas de tomate ( <i>Lycopersicon esculentum</i> ) cv. Rio Grande inoculadas con <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> y tratadas con los biocontroladores de forma individual y combinada y los demás tratamientos aplicados.....	57
<b>Figura 13.</b> Sistemas radicales de las plantas de cada tratamiento.....	58
<b>Figura 14.</b> Volumen promedio de raíces (cm <sup>3</sup> ) de plantas de tomate ( <i>Lycopersicon esculentum</i> ) cv. Rio Grande inoculadas con <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> y tratadas con los biocontroladores de forma individual y combinada y los demás tratamientos aplicados.....	59

<b>Figura 15.</b> Peso fresco promedio de raíces (g) de plantas de tomate ( <i>Lycopersicon esculentum</i> ) cv. Rio Grande inoculadas con <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> y tratadas con los biocontroladores de forma individual y combinada y los demás tratamientos aplicados.....	61
<b>Figura 16.</b> Peso seco promedio de raíces (g) de plantas de tomate ( <i>Lycopersicon esculentum</i> ) cv. Rio Grande inoculadas con <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> y tratadas con los biocontroladores de forma individual y combinada y los demás tratamientos aplicados.....	62
<b>Figura 17.</b> Peso fresco promedio de la parte aérea (g) de plantas de tomate ( <i>Lycopersicon esculentum</i> ) cv. Rio Grande inoculadas con <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> y tratadas con los biocontroladores de forma individual y combinada y los demás tratamientos aplicados.....	64
<b>Figura 18.</b> Peso seco promedio de la parte aérea (g) de plantas de tomate ( <i>Lycopersicon esculentum</i> ) cv. Rio Grande inoculadas con <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> y tratadas con los biocontroladores de forma individual y combinada y los demás tratamientos aplicados.....	66
<b>Figura 19.</b> Diámetro promedio de frutos (cm) de plantas de tomate ( <i>Lycopersicon esculentum</i> ) cv. Rio Grande inoculadas con <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> y tratadas con los biocontroladores de forma individual y combinada y los demás tratamientos aplicados.....	70
<b>Figura 20.</b> Peso promedio de frutos (g) de plantas de tomate ( <i>Lycopersicon esculentum</i> ) cv. Rio Grande inoculadas con <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> y tratadas con los biocontroladores de forma individual y combinada y los demás tratamientos aplicados.....	71
<b>Figura 21.</b> Número de frutos promedio por planta de tomate ( <i>Lycopersicon esculentum</i> ) cv. Rio Grande inoculadas con <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> y tratadas con los biocontroladores de forma individual y combinada y los demás tratamientos aplicados...	72
<b>Figura 22.</b> Rendimiento (kg) de plantas de tomate ( <i>Lycopersicon esculentum</i> ) cv. Rio Grande inoculadas con <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> y tratadas con los biocontroladores de forma individual y combinada y los demás tratamientos aplicados...	73

## I. INTRODUCCION

El marchitamiento vascular del tomate causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Sacc. constituye una de las enfermedades más importantes y destructivas en grandes áreas cultivadas, ocasionando graves pérdidas, especialmente en cultivares susceptibles y bajo condiciones ambientales favorables para el patógeno. (Agrios, 2005).

En Venezuela, la mayoría de los suelos agrícolas destinados a la producción de hortalizas, se encuentran altamente contaminados con este patógeno, el cual ha ocasionado reducciones en la producción del cultivo del tomate hasta en un 60%. (Anzola y Román, 1982).

Aunado a lo anterior, la naturaleza saprofítica del patógeno y su gran capacidad de sobrevivencia, ha causado serios daños de importancia económica en las zonas tradicionalmente productoras ubicadas en los estados Aragua, Carabobo, Guárico, Lara y Portuguesa. La importancia de controlar al patógeno *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* radica en que el tomate se destina tanto al consumo fresco como al procesamiento industrial, constituyendo además la fuente de sustento para los agricultores dedicados a su producción, que requieren de alternativas de control cónsonas con el medio ambiente, que no pongan en peligro su salud y que controlen eficientemente los patógenos que afectan sus cultivos. (Pérez-Pivat, 2008).

Tomando en cuenta que los plaguicidas clasificados como extremadamente peligrosos por la Organización Mundial de la Salud (OMS), son de uso frecuente y la importancia de los tomates en la alimentación y los altos niveles de plaguicidas aplicados en el cultivo, particularmente en los países en desarrollo, es relevante la necesidad de la reducción en el uso de estos productos, tanto por la salud y seguridad ocupacional de los agricultores como para la seguridad del consumidor. (Davis y Dinham, 2002).

En base a ello, es importante señalar que 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. Entre los microorganismos más importantes se encuentran las bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* y hongos de los géneros *Gliocladium* y *Trichoderma*, siendo éste último el más utilizado para el control de un grupo importante de patógenos del suelo. (Fernández-Larrea Vega, 2001).

En el caso del tomate, el mismo se encuentra entre los cultivos más afectados por serias enfermedades ocasionadas por hongos del género *Fusarium*, las cuales han sido controladas con microorganismos de los géneros *Trichoderma* y *Bacillus*, ya sea en forma separada o conjunta, además de propiciar altos rendimientos del cultivo en campo. (Morsy *et al*, 2009).

En este sentido, el control biológico mediante organismos antagónicos representa una valiosa herramienta, no química, para la protección contra fitopatógenos, lo cual ha inducido el interés en los métodos alternativos de control de enfermedades de las plantas, intensificándose las investigaciones conducentes a la detección de microorganismos con potencial como agentes biológicos de control (Guigón y González, 2004).

De igual manera, se consideran a muchos grupos de microorganismos del suelo como potenciales agentes de control biológico, incluyendo a muchas bacterias que suprimen al género *Fusarium*, causante de la marchitez vascular. Entre estas bacterias se encuentran: *Bacillus subtilis*, *Bacillus* sp., *Pseudomonas* spp. y *Streptomyces* spp. (Attitalla *et al*, 2001).

Dada la importancia del patógeno *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* y con el propósito de hacer más eficiente el uso del hongo *Trichoderma* spp. y de la bacteria *Bacillus* spp., surge la necesidad de realizar un estudio cuyo objetivo es evaluar tanto el efecto biocontrolador de ambos antagonistas sobre el control del mencionado patógeno en el cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) bajo condiciones *in vitro* e *in vivo* como sobre el crecimiento del cultivo.

## II. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL:

- ❖ Evaluar el efecto de los biocontroladores *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. sobre el control de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) bajo condiciones *in vitro* e *in vivo* y sobre el crecimiento del cultivo.

### OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- ❖ Obtener el aislado del patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* de la zona productora de tomate de Tucutunemo, estado Aragua muestreada.
- ❖ Obtener aislados promisorios de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. de las zonas agrícolas del estado Aragua muestreadas para el control de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.
- ❖ Seleccionar bajo condiciones *in vitro* los aislados de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. más efectivos para el control de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.
- ❖ Identificar taxonómicamente los aislados de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. más efectivos para el control de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

- ❖ Evaluar bajo condiciones *in vivo* el efecto individual de los aislados más efectivos de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. sobre el hongo patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en tomate.
  
- ❖ Evaluar bajo condiciones *in vivo* el efecto combinado de los aislados más efectivos de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* sp. sobre el hongo patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en tomate.
  
- ❖ Evaluar bajo condiciones *in vivo* el efecto de los aislados más efectivos de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* sp. sobre el crecimiento de las plantas de tomate.

### III. REVISION DE LITERATURA

#### 3.1.- CARACTERÍSTICAS DEL CULTIVO DE TOMATE (*Lycopersicon esculentum* L.)

##### 3.1.1.- GENERALIDADES

El origen del género *Lycopersicon*, de acuerdo a Escalona y col. (2009) se localiza en la región andina que se extiende desde el sur de Colombia al norte de Chile. Probablemente desde allí fue llevado a Centroamérica y México donde se domesticó y ha sido por siglos parte básica de la dieta. Luego, fue llevado por los conquistadores a Europa. Durante el siglo XVI se consumían en México tomates de distintas formas y tamaños e incluso rojos y amarillos y para entonces ya habían sido traídos a España y servían como alimento en España e Italia. En otros países europeos solo se utilizaban en farmacia y así se mantuvieron en Alemania hasta comienzos del siglo XIX. Los españoles y portugueses difundieron el tomate a Oriente Medio y África, y de allí a otros países asiáticos, y de Europa también se difundió a Estados Unidos y Canadá.

Domínguez (2000) citado por Matas (2005) señala que el tomate es una planta autógama, muy ramificada, rastrera y perenne, aunque se cultiva como anual. La raíz es pivotante pero tiende a ser fasciculada cuando la planta proviene de transplante. Todas las partes vegetativas aéreas, junto con los pedúnculos, pedicelos y cáliz florales son densamente pubescentes y glandulares, lo que da a la planta su olor característico. Los tallos son gruesos y angulosos, de color verde. Según el tipo de crecimiento, las plantas pueden ser determinadas o indeterminadas. Las hojas son anchas, planas y pinnatisectas, con 7-11 folíolos. Las inflorescencias, de tipo racimo o cima, tienen un número de flores variable, generalmente de 7 a 12. Las flores son hermafroditas, perfectas, hipoginas y regulares. El cáliz tiene cinco o más sépalos lanceolados y fusionados en la base.

La corola está formada por cinco o más pétalos de color amarillo, lanceolados y fusionados en la base.

De acuerdo a FAO (2006), el fruto de esta Solanácea es una baya, generalmente de color rojo, bi- o multiloculada, que presenta varios tamaños dependiendo de su variedad, con una gruesa placenta en la que se encuentran numerosas semillas recubiertas de una sustancia mucilaginosa. Se destaca además que la cosecha se inicia entre 90 y 120 días después de la siembra y que el cultivo crece en lugares frescos (20-23°C) y una intensidad luminosa alta. En la actualidad el cultivo está difundido por todo el mundo y es una de las hortalizas de mayor consumo.

### **3.1.2.- VARIEDADES**

Peña y Moreno (1997) señalan que a pesar de que en Venezuela el cultivo del tomate ha alcanzado una gran importancia, no se producen materiales adaptados a las condiciones ambientales del país, lo cual obliga la siembra de aquellos seleccionados para otras latitudes. Esta situación impone la realización de evaluaciones periódicas, a fin de conocer cuáles presentan el mejor comportamiento en las diferentes localidades. La evaluación define en gran medida, el rendimiento de la materia prima y la calidad industrial.

Por otra parte, Páez y col. (2000) señalan que uno de los cultivares más empleados en el país, el cultivar Río Grande, presenta crecimiento indeterminado y altos rendimientos; los frutos son tipo perita, de dureza al corte y resistencia al transporte en huacales de madera.

Acotan los autores, que en el caso de este cultivar, las temperaturas elevadas reducen el crecimiento vegetativo e impiden el establecimiento de los frutos.

### **3.1.3.- PRODUCCIÓN**

De acuerdo a FAO (2012), la producción mundial de tomate fue de 159.023.383 Tm para el año 2011. Las cifras de producción han mantenido una tendencia al incremento, desde 108.278.629 Tm en 2001 hasta la cifra mencionada anteriormente. Para el año 2011, FAO (2012) reporta para Venezuela, una producción de 195.854 toneladas.

Acotan además tanto Davis y Dinham (2002) como Escalona y col. (2009) que entre los países con mayor producción de tomates se encuentran China, Estados Unidos, Turquía, Italia, Grecia, España y México, mientras que en América Latina, el tomate es una de las principales plantas hortícolas que se cultivan para la venta. Por otra parte, señalan que los tomates frescos son el ingrediente fundamental en el arte culinario de todo el mundo, y los tomates en conserva se utilizan para hacer sopas, jugos (zumos), salsa de tomate, pasta de tomate y otros productos.

### **3.2.-MARCHITEZ VASCULAR POR *Fusarium* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*)**

#### **3.2.1.- Descripción de la Enfermedad**

##### **3.2.1.1.- Generalidades**

Jones (2001) indica que la fusariosis o marchitez vascular del tomate fue descrita por primera vez por G.E. Masee en Inglaterra en 1895. Es una enfermedad de importancia mundial, siendo descrita en al menos 32 países, y es destructiva en campo. Fravel *et al* (2003) por su parte, indican que todas las razas de *F. oxysporum* son saprofitas y pueden sobrevivir por largos períodos en materia orgánica del suelo y en la rizosfera de muchas especies de plantas.

### 3.2.1.2.- Síntomas

Walker (1971), Watterson (1985) y Jones (2001) coinciden en señalar que las plántulas infectadas alcanzan escaso desarrollo. Las hojas se vuelven flácidas y desarrollan epinastia, además, se tornan amarillentas; es necesario destacar que dichos síntomas suelen afectar sólo a un sector de la planta, y con frecuencia los folíolos a un lado del pecíolo se vuelven amarillos antes que los del otro lado. Este amarillamiento afecta de forma gradual a la mayor parte del follaje. Adicionalmente, el tejido vascular se torna de color castaño oscuro, la base de los tallos afectados se ensanchan y normalmente las plantas se marchitan y mueren.

Tanto Walker (1971) como Agrios (2005) indican que existen tres géneros de hongos que producen marchitamientos vasculares: *Ceratocystis*, *Fusarium* y *Verticillium*. La mayoría de los hongos del género *Fusarium* que producen marchitamientos tanto en flores como en hortalizas anuales y en plantas herbáceas perennes de ornato, pertenecen a la especie *Fusarium oxysporum*. Los marchitamientos vasculares ocurren debido a la presencia y actividad del patógeno en los tejidos vasculares xilémicos de las plantas, en las cuales ocurre pudrición de las raíces, amarillamiento de las hojas, marchitez y necrosamiento de sus bases, lo cual puede producir su muerte.

### 3.2.1.3.- Organismo Causal

#### 3.2.1.3.1.- Características

De acuerdo a NCBI (2011) e Index Fungorum (2008) el hongo *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* pertenece al Reino Fungi, División Ascomycota, Subdivisión Pezizomycotina, Clase Sordiaromycetes, Orden Hypocreales, Familia Nectriaceae. Tal y como señala Jones (2001), los aislamientos de *Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr. f. sp. *lycopersici* ( Sacc ). W.C. Zinder & H.N. Hans. producen micelio entre rosado y blanco, a menudo con un matiz purpúreo, y ralo a

abundante. Los microconidios son abundantes, se generan en fiálides simples emergiendo lateralmente, presentan forma oval-elipsoide, erectas a curvadas, de 5-12 x 2,2-3,5  $\mu\text{m}$ , y carecen de septos.

Acotan Jones (2001) y Leslie y Summerell (2006) que los macroconidios pueden ser escasos o abundantes, se producen en conidióforos ramificados o bien en la superficie de esporodoquios; poseen una pared fina, de tres a cinco septos, y son fusiformes a subulados con ambos extremos puntiagudos. Estos macroconidios, presentan además, una base pedicelada y miden entre 27-46 x 3-5  $\mu\text{m}$  si son triseptados, ó 35-60 x 3-5  $\mu\text{m}$  si tienen cinco septos; siendo las esporas triseptadas las más comunes.

Igualmente señalan que las clamidosporas tienen pared engrosada que puede ser lisa o rugosa, son abundantes y se generan de forma terminal o catenulada. Normalmente aparecen solitarias, pero en ocasiones se forman en pares o en cadenas.

#### **3.2.1.3.2.- Razas**

Se han descrito tres razas fisiológicas de este patógeno. Tanto Bournival *et al* (1991) citado por Lugo (1998) como Jones (2001) coinciden en señalar que la raza 1 es la más ampliamente distribuida, y se ha detectado su presencia en la mayorías de las áreas geográficas del mundo, mientras que la raza 2 fue identificada rápidamente en Estados Unidos y en otros países, incluyendo Australia, Brasil, Gran Bretaña, Israel, México, Marruecos, Países Bajos e Iraq. La raza 3 fue localizada en Brasil en 1966; desde entonces se ha encontrado también en Australia, y en California y Florida (Estados Unidos).

Lugo (1998) indica que en el caso de Venezuela, a pesar de haberse reportado tanto la raza 1 como la raza 2, es ésta última la más común. Por otra parte, Anzola y Román (1982) señalan que la raza 2 se encuentra presente en suelos infestados de la región central del país, mientras que Díaz Polanco y Castro (1977) indican

que en la zona de los Llanos Centro-Occidentales, este hongo causa problemas, sobreviviendo de un año a otro, debido a su actividad saprofitica sobre residuos vegetales.

#### **3.2.1.3.3.- Ciclo de la Enfermedad, Patogénesis y Epidemiología**

Tanto Agrios (2005) como Jones (2001) explican que el patógeno causante de esta enfermedad es un organismo que habita en el suelo y que sobrevive en los restos de plantas infectadas que yacen en el suelo en forma de micelio y en cualquiera de sus formas de esporas, pero lo hace con mayor frecuencia en forma de clamidosporas, sobre todo en las regiones templadas frías.

Se propaga a cortas distancias a través del agua y el equipo agrícola contaminado, y a grandes distancias principalmente en los trasplantes infectados o en el suelo que va en ellos.

Por otra parte, acota Agrios (2005), que cuando las plantas sanas se desarrollan en un suelo contaminado, los tubos germinales de las esporas o el micelio penetran directamente por las puntas de las raíces o entran en estas últimas a través de heridas o a nivel de la zona donde se forman las raíces laterales. El micelio del hongo se propaga intercelularmente a través de la corteza de la raíz y cuando llega a los vasos xilématicos, entra en ellos a través de las punteaduras.

Cuando se encuentra en los vasos, dicho micelio se ramifica y produce microconidios que son desprendidos y llevados hacia la parte superior de la planta en el torrente de fotoasimilados. Los microconidios germinan en el punto donde cesa su movimiento ascendente, el micelio penetra la pared superior del vaso y el hongo produce más microconidios en el siguiente vaso. El micelio del hongo avanza también lateralmente hacia los vasos adyacentes, en los que penetra a través de las punteaduras.

González y col. (2012) indican que este hongo es capaz de secretar enzimas y pequeñas proteínas durante la colonización de los vasos xilemáticos de la planta de tomate. Estas proteínas promueven la colonización del hospedante. De igual forma acotan que se han identificado 11 proteínas de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, las cuales se han denominado proteínas secretadas en el xilema (SIX). 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, *Avr2* (SIX3) es reconocido por *I-2* y *Avr3* (SIX1) es reconocido por *I-3* (2). *Avr2*, *Avr3* 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. *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.

Pareja-Jaime y col. (2008) señalan que existen evidencias de que los hongos pueden producir moléculas que suprimen las respuestas de defensa en las plantas, incluyendo la biosíntesis de fitoalexinas. Un número importante de patógenos de tomate producen enzimas que detoxifican la  $\alpha$ -tomatina, una saponina producida por las plantas de tomate con la habilidad para unirse a los esteroides presentes en las membranas y causar la pérdida de la integridad de la membrana. Una comparación de la resistencia de los aislados de *F. oxysporum* ha indicado que los no patógenos de tomate generalmente son sensibles a la  $\alpha$ -tomatina, mientras que los aislados patogénicos de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* son altamente tolerantes, lo que sugiere que se requiere un nivel umbral de tolerancia a la  $\alpha$ -tomatina para la patogenicidad en tomate. Este hongo produce una tomatinasa (*Tom1*), la cual degrada la  $\alpha$ -tomatina a derivados menos tóxicos.

En este sentido, los autores antes citados llevaron a cabo un estudio en el cual produjeron transformantes que expresaban constitutivamente el gen de *Tom1*, los cuales resultaron en un incremento de los síntomas de la enfermedad. Las plantas de tomate que no poseían el gen presentaron una disminución del proceso de la enfermedad indicando que *Tom1*, a pesar de no ser esencial para la patogenicidad, se requiere para la virulencia completa de *F. oxysporum*.

Señalan además que la actividad tomatinasa total en las cepas que no tenían el gen fue reducida solamente en un 25%, conduciendo a la  $\beta$ 2-tomatina como el principal producto de la hidrólisis de la saponina *in vitro*. El análisis *in silico* del genoma del hongo reveló la existencia de cuatro genes de tomatinasa putativos identificados por tomatinasas de la familia 3 glucosil hidrolasas, que podrían ser las responsables de la actividad tomatinasa remanente en los mutantes de  $\Delta tom1$ . Estos resultados indican que la detoxificación de la  $\alpha$ -tomatina en *F. oxysporum* es realizada por varias tomatinasas, lo que indica la importancia de estas enzimas durante el proceso de infección.

Nogués *et al* (2002), señalan que un número de estrategias de defensa tanto físicas como químicas que son empleadas por las plantas, son ahora conocidas. Estas incluyen la formación de calosa cerca de las células infectadas, la oclusión de los vasos colonizados por acción de geles, gomas y tilosas, además de la síntesis de compuestos tóxicos por parte del hongo.

Jones (2001), señala que los factores que favorecen el desarrollo de la marchitez son, en general, temperatura del suelo y del aire de 28°C, humedad del suelo óptima para el crecimiento vegetal, plantas preadaptadas con bajos niveles de nitrógeno y fósforo, y altos niveles de potasio, bajo pH del suelo, días cortos y baja intensidad de luz. La virulencia del patógeno se ve incrementada por micronutrientes, fósforo y nitrógeno amoniacal, y decrece con el nitrato.

Mencionan Anzola y Román (1982), que la presencia de nematodos, tales como los de la especie *Meloidogyne incognita*, también propicia la entrada del patógeno, los cuales pueden causar respuestas en el huésped tales como la disminución de su resistencia natural. Igualmente, se ha encontrado que el extracto de raíces con nematodos favorece el desarrollo de *Fusarium sp*, por lo que se cree que las actividades desarrolladas por el nemátodo en el sistema radicular causan alteraciones favorables para el desarrollo de esta enfermedad.

#### **3.2.1.3.4.- Control**

Jones (2001) recomienda la utilización de cultivares resistentes para el control de las razas 1 y 2 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Se ha identificado resistencia monogénica a la raza 3, por lo tanto deben utilizarse cultivares con esta resistencia siempre que estén disponibles. Recomienda también este autor, aumentar el pH del suelo a valores de 6.5 – 7.0, así como la utilización de nitrato como fuente de nitrógeno en lugar de nitrógeno amoniacal. Esto retarda significativamente el desarrollo de la enfermedad y da como resultado un incremento de rendimiento que iguala a aquel que se consigue al utilizar fumigantes en un suelo de pH 5.5.

De igual manera, destaca que es de suma importancia evitar la introducción de semillas y plantas infectadas por el hongo, así como la introducción de suelo infestado adherido a maquinaria agrícola en zonas libres del patógeno.

Zavaleta-Mejía (1999) indica que el uso de agroquímicos ha permitido obtener incrementos sustanciales en la producción; no obstante, sus efectos adversos están impactando de manera significativa la sostenibilidad de la agricultura. Esto, tal y como explica la autora, aunado a los problemas de seguridad y salud pública inherentes a la fabricación y uso de agroquímicos, han conducido a la búsqueda y establecimiento de alternativas de manejo de plagas y enfermedades. Así, surge el interés por el control ecológico, el cual puede definirse como cualquier forma de control que reduce la incidencia o severidad de la enfermedad, o incrementa la

producción del cultivo, aun cuando no haya aparentemente un efecto significativo en la reducción de la enfermedad o inóculo, y su impacto nocivo en el ambiente sea mínimo o nulo.

### **3.3.- EL CONTROL BIOLÓGICO**

#### **3.3.1.- Generalidades**

Grondona y col. (1995) explica que el objetivo principal del control biológico es reducir las enfermedades y plagas de las plantas por medio de la consecución de tres objetivos particulares: reducir el inóculo del patógeno a través de medidas que impliquen una supervivencia del mismo más restringida entre las cosechas, una menor producción o liberación de propágulos viables y una menor difusión de los mismos, reducir la infección del hospedador por el patógeno y reducir la severidad del ataque por el patógeno. Igualmente, señala que el control biológico no consiste en destruir a los patógenos sino convivir con ellos, reduciéndolos hasta niveles que no produzcan daño, o en el caso de producirse, que éstos sean mínimos.

Ruíz (2000) citado por Monroy (2009) define el control biológico como la reducción del organismo patógeno o de su actividad patológica, directa o indirectamente, por la acción de uno o más organismos, incluyendo la planta misma. Por otra parte, Arcia (2003) indica que, según los fitopatólogos, la definición de control biológico es: "la reducción de la densidad de inóculo o de la actividad en la producción de enfermedad de un patógeno o parásito en su estado activo o latente, por la acción de uno o más organismos, efectuado naturalmente o a través de la manipulación del ambiente, del huésped o del antagonista, o por la inducción masiva de uno o más antagonistas".

Por lo tanto, la estrategia epidemiológica, al usar productos biológicos, es la de reducir el inóculo inicial, protegiendo, a su vez, el sitio de infección, en lugar de eliminar la población dañina. Es importante resaltar que, además de la actividad antagónica, un buen agente de control debe tener la habilidad de sobrevivir en el hábitat donde es aplicado.

Adicionalmente, una formulación apropiada del producto de biocontrol puede proporcionarle larga vida de anaquel, la capacidad de soportar condiciones adversas e inclusive proveerle con los ingredientes necesarios para inducir su actividad específica.

### **3.3.2.- El Control Biológico con el uso de *Trichoderma* spp.**

De acuerdo a NCBI (2011) e Index Fungorum (2008), los hongos del género *Trichoderma*, los cuales se comportan como antagonistas de muchos hongos fitopatógenos, pertenecen al Reino Fungi, División Ascomycota, Subdivisión Pezizomycotina, Clase Sordiaromycetes, Orden Hypocreales, Familia Hypocreaceae.

Por su parte, Samuels (2006) indica que *Trichoderma* es usualmente considerado un hongo del suelo de vida libre; sin embargo, algunas evidencias sugieren que las especies pertenecientes a este género pueden comportarse como organismos oportunistas, simbioses avirulentos y como parásitos de otros hongos. Señala el autor que la primera proposición de *Trichoderma* como género fue realizada por Persoon en 1794, con base a material colectado en Alemania.

### 3.3.2.1.- Mecanismo de Acción

Grondona y col. (1995) indican que algunos hongos del género *Trichoderma* constituyen un buen sistema de control de enfermedades de interés agronómico cuando se utilizan como agentes de control biológico.

Por otra parte, Harman (2001) señala que entre los mecanismos de acción del antagonista *T. harzianum* se encuentran: micoparasitismo, antibiosis, competición por nutrientes y espacio, desactivación de las enzimas de los patógenos, tolerancia al estrés por parte de la planta, al ayudar al desarrollo del sistema radical, solubilización y absorción de nutrientes orgánicos y resistencia inducida. De éstos, los primeros cuatro mecanismos mencionados tienen acción hongo-fitopatógeno, los otros son indirectos, ya que su acción es elicitar o impulsar mecanismos de defensa fisiológicos y bioquímicos de la planta.

Al respecto, Grondona y col. (1995) señalan que los agentes de control biológico, entre ellos *Trichoderma*, pueden actuar a través de diferentes mecanismos, siendo los más comunes los descritos a continuación:

**Competición:** Se entiende por competición el desigual comportamiento de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, cuando la utilización de éste por uno de ellos reduce la cantidad disponible para los demás. La competición por exclusión es un buen mecanismo de control biológico, siendo la más común por nutrientes, oxígeno, espacio físico y luz.

**Antibiosis:** Se define como la inhibición del crecimiento de un microorganismo por sustancias producidas y liberadas por otro microorganismo.

**Parasitismo:** El parasitismo consiste en la utilización del patógeno como alimento por su antagonista. Generalmente, se ven implicadas enzimas extracelulares. La forma más común es el **micoparasitismo**, en el que el patógeno es un hongo. Las enzimas más frecuentes que participan en el micoparasitismo son quitinasas, celulasas, beta-1,3-glucanasas y proteasas que lisan la pared de las hifas, conidios

y esclerocios, al ser atraídas por medio de lectinas producidas por el propio patógeno, ayudando a la penetración dentro del hongo hospedador.

Igualmente, acotan Grondona *et al* (1995), que *Trichoderma* es el hongo que con mayor frecuencia se viene utilizando como agente de control biológico. Es un hongo anamórfico, que posee una serie de características que lo hacen especialmente interesante para este tipo de actividad: es ubicuo, fácil de aislar y cultivar, produce una gran cantidad de esporas, crece rápidamente en muchos sustratos, no afecta a las plantas y animales, actúa como micoparásito, compite bien por el alimento y por el espacio, produce antibióticos y tiene una amplia gama de patógenos susceptibles de ser controlados.

Stefanova *et al* (1999) señalan que entre los hongos utilizados para el biocontrol de patógenos fúngicos del suelo, varias especies de *Trichoderma* han sido merecedoras de una mayor atención, su actividad resulta en una combinación de micoparasitismo y producción de metabolitos. Indica además que el biocontrol actualmente ocupa un lugar importante dentro de las prácticas de manejo de enfermedades de las plantas causadas por los patógenos fúngicos del suelo, principalmente de los géneros *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Pythium*, *Phytophthora* y *Fusarium*, entre otros, destacando que las especies de *Trichoderma* poseen buenas posibilidades en este sentido como hiperparásitos competitivos que producen metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas, a los que se les atribuyen los cambios estructurales a nivel celular, tales como vacuolación, granulación, desintegración del citoplasma y lisis celular.

Harman *et al* (2004) señalan que varios estudios han arrojado que la colonización de las raíces por aislamientos de *Trichoderma* incrementan los niveles de las enzimas relacionadas con la defensa en las plantas, incluyendo varias peroxidases, quitinasas y  $\beta$ -1,3 glucanasas.

De La Cruz *et al* (1992) explican que se ha encontrado un gran número de aislamientos de este hongo, que excretan enzimas hidrolíticas, tales como quitinasas, proteasas y  $\beta$ -glucanasas en el medio que crecen, en presencia de laminarina, quitina, o paredes celulares del hongo fitopatógeno. Estas observaciones, teniendo presente a la quitina y glucanos como componentes estructurales de las paredes celulares de los hongos, sugieren que las hidrolasas producidas por *Trichoderma* se encuentran involucradas en la actividad micoparasítica.

### **3.3.3.- El Control Biológico con el uso de *Bacillus* spp.**

Fernández-Larrea Vega (2001) señala que las bacterias del género *Bacillus* son consideradas las más eficaces para controlar enfermedades de las raíces. Dada la diversidad genética en el género *Bacillus*, tanto en el suelo como en la rizósfera, se considera a estos microorganismos como colonizadores eficaces. Estas bacterias se han evaluado para el control de enfermedades fúngicas, determinándose que las aplicaciones de *Bacillus subtilis* tienen un efecto similar al de los fungicidas comerciales.

En cuanto a la taxonomía del género *Bacillus*, de acuerdo a Fritze (2004), estas bacterias se ubican en el Dominio *Bacteria*, División *Firmicutes*, Clase *Bacilli*, Orden *Bacillales*, Familia *Bacillaceae*.

Tanto Madigan *et al.* (2012) como Venegas y col.. (2005) indican que *Bacillus* es un género de bacterias en forma de bastón y Gram positivas. Son aerobios estrictos o anaerobios facultativos. En condiciones estresantes forman una endospora de situación central, que deforma la estructura de la célula. Dicha forma esporulada es resistente a las altas temperaturas y a los desinfectantes químicos corrientes, además, puede permanecer en dormancia por largos períodos y resistir condiciones desfavorables; de hecho, varias especies de *Bacillus* producen metabolitos antimicrobianos, algunos de los cuales son termoestables.

Carrillo (2003) citado por Möller-Holtkamp (2009) explica que la producción de endosporas por *B. subtilis* ocurre al finalizar la fase exponencial de crecimiento, destruyendo posibles agentes que interfieren en el normal desarrollo de éstos microorganismos. Asociado a la esporulación, la producción de un gran número de metabolitos secundarios o antibióticos son producidos por la bacteria perturbando el metabolismo de especies enemigas, al punto que mueran o sean incapaces de reproducirse.

Sosa y col . (2005) explican que se ha demostrado que las bacterias del género *Bacillus* presentan un gran potencial como antagonistas, principalmente por la gran cantidad de enzimas líticas, antibióticos y otras sustancias con actividad biocida, que son capaces de producir efectos de control sobre varias especies de organismos fitopatógenos.

Calvo *et al.* (2010) indican que los metabolitos secundarios producidos por ciertas especies y aislamientos de *Bacillus* poseen actividad antibacterial y antifúngica. Aunado a ello, la capacidad de formar endosporas les confiere una alta estabilidad como biofungicidas o biofertilizantes.

De acuerdo a Todar (2012), estas bacterias generalmente, se encuentran en el suelo formando parte de la rizósfera de las plantas, comportándose como colonizadores eficaces, debido a que son productoras de sustancias, tales como: hormonas, antibióticos y metabolitos termoestables que le proporcionan la capacidad de conquistar determinados ambientes agrícolas y, por ende, impiden el establecimiento de microorganismos patógenos

Weller (1988) citado por Möller-Holtkamp (2009) señala que la mayoría de las especies de *Bacillus* dan positivo a la prueba de la catalasa y son saprófitas. Viven

en el suelo, agua del mar y ríos, aparte de alimentos que contaminan con su presencia. Generalmente son móviles, con flagelos peritricos.

Según Butt *et al.* (1999) citado por Ragazzo-Sánchez y col. (2011) esta bacteria es capaz de lograr el antagonismo por diversos mecanismos tales como: competencia por nutrientes en la rizósfera en lo que respecta a la utilización de carbohidratos y nitrógeno, exclusión, en la que el antagonista debe ser más rápido que el patógeno al momento de colonizar la rizósfera, colonización de la bacteria en el patógeno o liberación de componentes celulares durante el crecimiento (protegiendo su nicho, inhibiendo el crecimiento de los competidores y utilizando la misma fuente nutricional), antibiosis mediante la inhibición de un microorganismo por parte de otro. Además, esta bacteria ha demostrado inducir la resistencia sistemática natural de la planta contra patógenos bacterianos y fúngicos.

Aslim *et al.* (2002) indican que algunas especies de *Streptomyces*, *Bacillus* y *Penicillium* han sido continuamente estudiados dada su capacidad de producir antibióticos, siendo éstos organismos los más efectivos como biocontroladores, convirtiéndose por ello en los preferidos para la producción comercial. Específicamente en el caso del género *Bacillus*, se ha determinado además que estas bacterias habitantes del suelo, presentan la habilidad de desintegrar proteínas, es decir, actividad proteolítica.

Casado y Fernández (1998) acotan que algunas cepas de *Bacillus* son capaces de actuar sobre un medio de cultivo contentivo de fósforo bajo formas inorgánicas, transformando fósforo no asimilable en asimilable.

Bochow *et al.* (2001) explican que estudios sobre el modo de acción de *Bacillus* han demostrado que la misma presenta mecanismos que inducen respuestas hormonales en la planta, activados por la producción de metabolitos bacterianos exógenicos que actúan como precursores de auxinas o inductores de la síntesis de las mismas.

### 3.4.- EXPERIENCIAS DE CONTROL BIOLÓGICO CON EL USO DE *Trichoderma* spp. Y *Bacillus* spp.

Paredes-Escalante y col. (2008) indican que en México, se llevó a cabo una investigación donde se determinó la actividad antagonista *in vitro* de aislamientos de microorganismos obtenidos de la rizosfera de plantas de garbanzo contra el complejo de hongos formado por *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii* y *Rhizoctonia solani*.

Las cepas nativas que mostraron el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de los patógenos fueron seleccionadas e identificadas como *Trichoderma lignorum* T. *harzianum*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens*, las cuales fueron evaluadas en campo. Las cuatro cepas y una cepa comercial de *T. harzianum* (T-22) fueron combinadas con *Glomus intraradices*, y su efectividad para controlar el mencionado complejo se comparó contra un testigo absoluto. Los tratamientos se aplicaron a la semilla previo a la siembra y se evaluó la severidad de la enfermedad cada 15 días y la colonización de raíces por los antagonistas a los 45 días. Estos tratamientos presentaron una reducción de la severidad de la enfermedad mayor al 50%.

En el caso de bacterias como *Bacillus subtilis*, Srobárová *et al.* (2009) indican que la misma ha sido utilizada no sólo como biocontrolador, sino también como un potencial indicador de la producción de metabolitos secundarios tóxicos, especialmente el ácido fusárico, producido por algunas especies de *Fusarium* como *F. oxysporum*, *F. solani* y *F. moniliforme*. De hecho, con respecto a *B. subtilis*, Fernández-Larrea Vega (2001) acota que se ha estudiado la liberación de compuestos con propiedades antifúngicas como la subtilina y otros antibióticos de la familia de las Iturinas. Estas últimas son polipéptidos que actúan sobre la pared celular de los hongos.

En algunos países tal y como señala Zavaleta-Mejía (1999), se tienen ya disponibles a nivel comercial microorganismos antagonistas para controlar algunas enfermedades bióticas de las plantas cultivadas. Sin embargo, se hace necesario continuar las investigaciones sobre control biológico de fitopatógenos mediante el uso de estos microorganismos.

En un estudio realizado por Guillén y col. (2006), con la finalidad de conocer el potencial de biocontrol en campo de cuatro aislamientos de *Bacillus* sp. y la mezcla de los mismos, sobre los patógenos causantes de pudriciones de la raíz (*Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora capsici*) así como su efecto sobre el desarrollo y rendimiento del cultivo de pimentón (*Capsicum annuum* L.), se encontró que con la aplicación de las bacterias se incrementó en 20% la altura de las plantas y se redujo en 80% la incidencia de las mencionadas pudriciones. Las especies de bacterias identificadas como promisorias fueron: *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* y *B. subtilis*.

En una investigación similar, Fernández-Herrera y col. (2007) demostró que *Trichoderma harzianum*, pese a no evitar la infección causada por *F. oxysporum* y *P. capsici*, protegió en un 100% las plantas de tomate 'Río Grande' contra el hongo *Rhizoctonia solani*. En otro caso, Pérez-Pivat (2008) encontró que *T. harzianum* aplicado en concentraciones de  $10^2$ ,  $10^4$  y  $10^6$  UFC/ml en semillero, transplante y semanal evitó totalmente la mortalidad de las plantas.

Por otra parte, en estudios realizados en China, tanto Zongzheng *et al.* (2009) como Xin *et al.* (2009), demostraron el efecto antifúngico de la bacteria *Bacillus subtilis* (denominada SY1) en condiciones *in vitro*, actuando contra *Phytophthora parasitica*, *Alternaria solani*, *Pythium aphanidermatum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Verticillium dahlia*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *melongenae*, *Botrytis cinerea*, y *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, manifestándose como esterilización o inhibición, y en algunos casos, produciendo cambios morfológicos

en los hongos patógenos. De igual manera, Zongzheng *et al.* (2009) demostraron que la bacteria favorece tanto el desarrollo radical y el crecimiento del embrión como la actividad de enzimas antioxidantes y protectoras en plántulas.

El uso de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp., tal y como señalan Turky *et al.* (2005), no sólo obedece a su efecto biocontrolador, sino que además han sido considerados como agentes que propician la producción de raíces y la colonización del suelo por parte de éstas, tal y como ha sido estudiado en tomate, además de probar que la aplicación de los mismos reduce la infección causada por *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*.

En relación al efecto de *Trichoderma* sobre las raíces, Hibar *et al.* (2007) indican que en estudios realizados empleando plantas infectadas con *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* y tratadas con el biocontrolador se encontró que éste es capaz de colonizar todo el sistema radical, incluyendo la epidermis y la endodermis, mientras que el patógeno induce la desorganización celular, incluyendo la alteración del citoplasma y la ruptura de la pared celular.

Ziedan (2006) acota que en cultivos como el maní (*Arachys hipogaea*), ha sido viable el control de enfermedades causadas por patógenos que afectan seriamente al cultivo a nivel de las raíces, tales como *Aspergillus niger* y *Fusarium oxysporum* en las raíces, con la aplicación de *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens*, estimulando las reacciones de defensa de las plantas.

Killian *et al.* (2000) indican que es importante señalar que se han venido estudiando los distintos mecanismos de acción de *Bacillus* spp., característica que lo sitúa como un eficiente biocontrolador, sin embargo, la mayor parte de estos mecanismos han tenido un efecto curativo al realizar la aplicación en las fases

tempranas de desarrollo tanto de la planta como de la enfermedad, por lo que se ha recomendado su aplicación al iniciar el cultivo. De igual manera, se ha determinado que un número importante de metabolitos de la bacteria, así como algunos lipopolisacáridos y enzimas, inducen resistencia en las plantas tratadas.

Abeyasinghe (2007) explica que se ha demostrado que para el control de enfermedades causadas por hongos del género *Fusarium*, tal y como es el caso de *F. solani* f. sp. *phaseoli*, es conveniente la aplicación de *B. subtilis* y *T. harzianum* a la semilla, dado que ambos biocontroladores protegen a la misma y promueven un mayor crecimiento de raíces.

Calvo *et al.* (2010) señalan que en estudios realizados a partir de aislamientos del género *Bacillus* procedente de papa, se logró la reducción del crecimiento de *Rhizoctonia solani* entre 69 y 91% y la inhibición del crecimiento de *Fusarium solani* entre 56 y 86%. Además, se encontró que la mayoría de los aislamientos de la bacteria produjeron ácido indolacético.

## IV. MATERIALES Y METODOS

### 4.1.- UBICACIÓN DE LOS ENSAYOS

Los ensayos de este trabajo se llevaron a cabo tanto en el laboratorio como en el umbráculo de la Clínica de Enfermedades de Plantas de la Cátedra de Fitopatología, Departamento de Botánica Agrícola de la Facultad de Agronomía-UCV Maracay.

La temperatura promedio (°C) en el umbráculo fue de 32°C a las 9:00 a.m. y de 39°C a las 3:00 p.m., mientras que la humedad relativa promedio fue de 82% a las 9:00 a.m. y de 71% a las 3:00 p.m. La radiación solar promedio absorbida en el umbráculo fue de 193.5 micromoles/m<sup>2</sup>/segundo.

### 4.2.- PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS

Las muestras vegetales procesadas fueron colectadas en la zona agrícola de Tucutunemo, estado Aragua. Las muestras de suelo empleadas fueron colectadas en siembras hortícolas de diferentes zonas agrícolas del estado Aragua. (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Procedencia de las muestras de suelo procesadas.**

MUESTRA	PROCEDENCIA	MUESTRA	PROCEDENCIA
LM	La Majada	PBLP2	Barbacoas
TT1	Tucutunemo	PB1	Barbacoas
TT3	Tucutunemo	PB2	Barbacoas
CT1	Tucutunemo	PB3	Barbacoas
RT1	Tucutunemo	PLH1	Palo Negro
VT	Tucutunemo	PLH2	Palo Negro
TM	Tucutunemo	PLL1	Palo Negro
PMII	Múcura II	BSM	Santa María
BMII	Múcura II	SM1	Santa María
AMII	Múcura II	SM2	Santa María
YMII	Múcura II	RP	Ruiz Pineda
RMII	Múcura II	TD	Tacarigua
PIMII	Múcura II	SJ	Tasajera

### **4.3.- REALIZACIÓN DE AISLAMIENTOS.**

**4.3.1.- Aislamiento del patógeno:** El hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* fue aislado de plantas infectadas con el patógeno, específicamente de tallos y raíces con síntomas característicos. Se tomaron secciones de los mismos, se lavaron con agua corriente y se desinfectaron con Hipoclorito de Sodio al 1% por 2 minutos. Posteriormente fueron enjuagados con agua destilada estéril (ADE) para retirar el exceso de hipoclorito y secados con papel absorbente. Se procedió a realizar cortes de 5 mm<sup>2</sup>, los cuales fueron dispuestos en forma de cruz en placas con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA). Una vez obtenidas las colonias del patógeno, las mismas fueron purificadas en medio PDA y repicadas en tubos con agar inclinado para su preservación e identificación.

El aislado del patógeno fue identificado tanto con base en las características de las colonias como de las estructuras observadas microscópicamente, utilizando las claves de Booth (1977) y Leslie y Summerell (2006).

### **4.3.2.- Aislamiento de los biocontroladores**

**4.3.2.1.- *Trichoderma* spp:** El hongo biocontrolador fue aislado de las diferentes muestras de suelo colectadas, mediante la técnica de dilución seriada en placas con medio de cultivo PDA, empleada por Páez y Sanabria (2007).

Para ello, se tomó 10 g de cada muestra de suelo y se diluyó en 90 ml de agua destilada estéril en tubos de ensayo. A partir de estas soluciones madres, se tomó 1 ml de sobrenadante con una pipeta estéril y se vertió a un nuevo tubo conteniendo 9 ml de agua destilada estéril, continuando de la misma forma hasta las concentraciones de 10<sup>-5</sup> y 10<sup>-6</sup>.

Posteriormente, se sembraron las placas con medio de cultivo PDA con 100  $\mu$ l de cada dilución. Una vez obtenidas las colonias del biocontrolador, se purificaron en placas con el mismo medio de cultivo para evaluar su crecimiento y se conservaron en tubos de agar inclinado para su identificación.

**4.3.2.2.- *Bacillus* spp:** La bacteria biocontroladora fue aislada de diferentes muestras de suelo colectadas, siguiendo la metodología de Aslim *et al.* (2002) y Sosa-Briceño *et al.* (2004), para lo cual se suspendió 10 g de cada muestra de suelo en 90 ml de ADE y se agitó vigorosamente por 2 minutos. Luego, las muestras se colocaron en baño de María a 80°C por 20 minutos para eliminar los microorganismos no formadores de esporas. Una vez transcurrido este tiempo, se realizaron diluciones seriadas de cada muestra en agua destilada estéril, desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$ , sembrando las diluciones de  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  en placas de petri con medio agar nutritivo (AN). Estas placas fueron incubadas a temperatura de 28°C por 24-48 horas. Obtenidas las cepas de la bacteria, las mismas fueron purificadas en placas petri y repicadas en tubos con agar nutritivo inclinado para su preservación e identificación.

#### **4.4.- PRUEBA DE PATOGENICIDAD**

Para comprobar la capacidad patogénica del aislado de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, se realizó la prueba de patogenicidad, empleando para ello 15 plántulas de tomate cv. Río Grande, 10 de las cuales fueron inoculadas con el patógeno y 5 fueron empleadas como testigos.

**4.4.1.- Preparación del inóculo:** El inóculo fue preparado tomando aislamientos puros del hongo, cultivados por siete días a temperaturas entre 28-30°C en placas de petri con medio PDA. Se agregaron 20 ml de ADE y con un bisturí estéril se raspó suavemente la superficie de la colonia, a fin de separar el micelio y los conidios del hongo, luego con ayuda de la Cámara de Neubauer se ajustó la concentración de la suspensión a  $10^6$  conidios/ml para inocular las plantas.

**4.4.2.- Inoculación y reisolamiento del patógeno:** La inoculación de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* se realizó siguiendo la metodología señalada por Reyes (1997). Se inocularon las plántulas de 20 días de edad, ocasionando heridas en las raíces de los cepellones y sumergiendo los mismos en el inóculo por 30 minutos, a fin de facilitar la penetración del hongo en la planta.

Posteriormente, fueron trasplantadas en bolsas negras de 3 kg de capacidad conteniendo sustrato esterilizado compuesto por turba, arena y suelo en proporción 1:1:1. Las plantas testigos se sumergieron en ADE. Una vez inoculadas las plantas, fueron sometidas a condiciones de cámara húmeda por 48 horas. Se observaron diariamente y se realizó el reisolamiento del patógeno de las plantas que presentaron síntomas.

#### **4.5.- SELECCIÓN *in vitro* DE AISLADOS PROMISORIOS DE *Trichoderma* spp. Y *Bacillus* spp. A PARTIR DE CULTIVOS DUALES**

**4.5.1.- *Trichoderma* spp:** A fin de seleccionar los aislados más promisorios de *Trichoderma* spp. para el control de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, se realizaron cultivos duales, colocando un disco de 0.5 cm de diámetro tanto de la colonia del antagonista como de la colonia del patógeno, enfrentados en placas con medio PDA.

Es necesario señalar que estos cultivos duales se realizaron tanto contra los aislados del género *Trichoderma* obtenidos del procesamiento de las muestras de suelo colectadas como contra cuatro aislados de la colección de la Clínica de Enfermedades de Plantas, identificados como FTSCO5, 6141, 6143 y 6146.

**4.5.2.- *Bacillus* spp:** Para seleccionar los aislados más promisorios de *Bacillus* spp. para el control de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, se realizaron cultivos duales,

colocando un disco de 0.5 cm de papel filtro previamente esterilizado y embebido en una solución del aislado bacteriano a una concentración de  $10^8$  UFC/ml y un disco del patógeno enfrentados en placas con medio PDA.

**4.5.3.- Placas Control:** Se colocó un disco del hongo patógeno de 0.5 cm de diámetro en el centro de las placas con medio PDA. Todas las placas fueron incubadas a 28°C. En todos los casos, se midió el porcentaje de inhibición de crecimiento (PIC) y el porcentaje de inhibición de la esporulación (PIE), de acuerdo a las fórmulas de Menten y col. (1976):

**Porcentaje de inhibición de crecimiento:**

$$\text{PIC} = \frac{(\text{crec. del testigo} - \text{crec. del tratamiento})}{(\text{Crecimiento del testigo})} \times 100$$

**Porcentaje de inhibición de esporulación:**

$$\text{PIE} = \frac{(\text{esporulación del testigo} - \text{esporulación del tratamiento})}{(\text{Esporulación del testigo})} \times 100$$

#### **4.6.- IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LOS AISLADOS MÁS EFECTIVOS DE *Trichoderma spp.* Y *Bacillus spp.***

Las colonias de los aislados fueron caracterizadas macroscópicamente y se realizó además la observación de las estructuras microscópicas. En el caso de *Trichoderma spp.* se caracterizaron tanto las colonias en cuanto a su crecimiento, tipo de micelio, color (anverso y reverso de la placa) y esporulación, como las estructuras observadas microscópicamente en cuanto a características del micelio, medición de conidióforos, conidios y clamidosporas, presencia o ausencia de fiálides, procediendo a su identificación con la ayuda de la clave de Samuels *et al.* (2013).

En el caso de *Bacillus spp.* se observó la forma de la colonia, color, borde, relieve y superficie y se aplicaron las pruebas respectivas para la identificación del género

tales como catalasa, prueba de KOH al 3% y la prueba de Schaeffer-Fulton (doble tinción con verde malaquita 5% y safranina acuosa 0.5%) para la observación de la forma de la bacteria y la presencia de endosporas.

Para aplicar la prueba de Schaeffer-Fulton, se siguió el procedimiento reseñado por Schaad *et al.* (2001) y Ragazzo-Sánchez y col. (2012), empleando cultivos bacterianos de 48 horas de crecimiento. Para ello, en un portaobjeto, se resuspendió una ansada de la colonia bacteriana en una gota del colorante verde malaquita al 5% y se dejó secar durante 10 minutos. Se lavó con abundante agua para retirar el exceso de colorante. Posteriormente se colocó una gota de safranina acuosa al 0.5% por 15 segundos y se lavó con abundante agua. Se dejó secar la preparación y se colocó una gota de aceite de inmersión sobre la misma y se observó al microscopio con aumento 100X, para constatar la presencia y morfología de las endosporas.

#### **4.7.- EVALUACIÓN *in vivo* DE AISLADOS PROMISORIOS DE *Trichoderma* spp. Y *Bacillus* spp.**

**4.7.1.- Material vegetal:** Se emplearon 120 plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) cv. Río Grande, a razón de 10 plantas por tratamiento.

**4.7.2.- Preparación del semillero y trasplante:** Se plantaron semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) cv. Río Grande en tres bandejas de siembra de 128 celdas cada una con sustrato esterilizado compuesto por turba, arena y suelo en proporción 1:1:1.

Luego de 30 días se procedió a realizar el trasplante de las plántulas en condiciones de umbráculo, empleando bolsas negras de polietileno de 5 kg con sustrato esterilizado compuesto por turba, arena y suelo en proporción 1:1:1.

Un día después del trasplante se procedió a realizar la inoculación del patógeno. Las plantas se regaron diariamente, aplicando fertirrigación 2 a 3 veces por semana. Una vez que las plantas alcanzaron la etapa reproductiva, se aplicó además fertilización foliar con carbonato de calcio a razón de 1g/l, 3 veces por semana de forma interdiaria.

**4.7.3.- Preparación del inóculo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* e inoculación:** El inóculo se preparó a partir de aislamientos puros del hongo, cultivados por siete días a temperaturas entre 28-30°C en placas de petri con medio PDA. Se agregaron 20 ml de ADE y con un bisturí estéril se raspó suavemente la superficie de la colonia, a fin de separar el micelio y los conidios del hongo, esta suspensión se filtró en gasa estéril y luego con ayuda de la Cámara de Neubauer, se ajustó la concentración de la suspensión a  $10^6$  conidios/ml para inocular las plantas.

**4.7.3.1.- Inoculación:** La inoculación de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* se realizó ocasionando heridas en las raíces de los cepellones y sumergiendo los mismos en el inóculo por 30 minutos, a fin de facilitar la penetración del hongo en la planta. Una vez inoculadas las plantas, las mismas fueron sometidas a condiciones de cámara húmeda por 48 horas.

**4.7.3.2.- Preparación del inóculo de *Trichoderma* spp:** El inóculo se preparó en forma de suspensión conidial, a partir de aislados puros del hongo, cultivados por tres días a temperaturas entre 28-30°C en placas de petri con medio PDA. Se agregaron 20 ml de ADE y con un bisturí estéril se raspó suavemente la superficie de la colonia, a fin de separar el micelio y los conidios del hongo, esta suspensión se filtró en gasa estéril y luego con ayuda de la Cámara de Neubauer, se ajustó la concentración de la suspensión a  $10^6$  conidios/ml.

**4.7.3.3.- Preparación del inóculo de *Bacillus* spp:** El inóculo se preparó en forma de suspensión a partir de aislamientos puros de la bacteria, cultivados por tres días a temperaturas entre 28-30°C en placas de petri con medio PDA. Se agregaron 20 ml de ADE y con un bisturí estéril se raspó suavemente la superficie de la colonia. Esta suspensión se filtró en gasa estéril y luego se ajustó a una concentración de  $10^8$  UFC/ml, con la ayuda de la Escala de McFarland.

**4.8.- EFECTO INDIVIDUAL Y COMBINADO DE LOS BIOCONTROLADORES:** De las 120 plantas empleadas en el ensayo, a 90 se les aplicaron los tratamientos correspondientes y 30 se emplearon como testigos (un testigo inoculado sin aplicación de los biocontroladores, un testigo sin inocular y un testigo inoculado con aplicación de fungicida). (**Cuadro 2**).

**Cuadro 2. Tratamientos de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. aplicados a las plantas inoculadas con el patógeno bajo estudio.**

TRATAMIENTO	DESCRIPCIÓN
T <sub>1</sub>	Plantas tratadas con <i>Trichoderma</i> spp. en semillero.
T <sub>2</sub>	Plantas tratadas con <i>Trichoderma</i> spp. en semillero y trasplante.
T <sub>3</sub>	Plantas tratadas con <i>Trichoderma</i> spp. en semillero, trasplante y semanal.
T <sub>4</sub>	Plantas tratadas con <i>Bacillus</i> spp. en semillero.
T <sub>5</sub>	Plantas tratadas con <i>Bacillus</i> spp. en semillero y trasplante.
T <sub>6</sub>	Plantas tratadas con <i>Bacillus</i> spp. en semillero, trasplante y semanal.
T <sub>7</sub>	Plantas tratadas con <i>Trichoderma</i> spp. + <i>Bacillus</i> spp. en semillero.
T <sub>8</sub>	Plantas tratadas con <i>Trichoderma</i> spp. + <i>Bacillus</i> spp. en semillero y trasplante.
T <sub>9</sub>	Plantas tratadas con <i>Trichoderma</i> spp. + <i>Bacillus</i> spp. en semillero, trasplante y semanal.
T <sub>10</sub> (Testigo 1)	Testigo inoculado
T <sub>11</sub> (Testigo 2)	Testigo sin inocular
T <sub>12</sub> (Testigo 3)	Plantas tratadas con fungicida (Carbendazim) en semillero, trasplante y semanal.

#### **4.8.1.- Efecto de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* sp. sobre el crecimiento de las plantas de tomate e incidencia de la enfermedad.**

En este ensayo, se evaluó simultáneamente el efecto de ambos biocontroladores sobre el crecimiento de las plantas y la incidencia de la enfermedad. Para ello se realizó un seguimiento del desarrollo de las plantas de tomate, mediante la observación de los síntomas manifestados por las plantas para cada uno de los tratamientos aplicados y se evaluó la mortalidad de las plantas (%).

Se midieron las siguientes variables: altura de la planta (cm), longitud de las raíces (cm), volumen de raíces (cm<sup>3</sup>), peso fresco de raíces (g), peso seco de raíces (g), peso fresco de parte aérea (g), peso seco de parte aérea (g), rendimiento (kg), número de frutos por planta, peso individual del fruto (g) y diámetro (cm) de cada fruto. Para la obtención del peso seco, las partes a secar contenidas en bolsas de papel, se colocaron en estufa a 60°C por 24 horas.

#### **4.9.- DISEÑO DE EXPERIMENTO**

El ensayo *in vitro* se realizó bajo un diseño completamente aleatorizado (DCA), mientras que el ensayo *in vivo* se llevó a cabo bajo un diseño completamente aleatorizado (DCA), con 10 repeticiones por tratamiento.

##### **4.9.1.- Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico Statistix versión 8.0. Para el análisis de varianza, se aplicó la prueba de medias de Tukey, a fin de determinar los mejores tratamientos aplicados. Para aquellas variables que no cumplieron los supuestos básicos, se procedió a realizar un análisis de varianza vía no paramétrica (Kruskal-Wallis). Se aplicó además la prueba de correlación de Spearman para las variables analizadas.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**5.1.- DESCRIPCIÓN DE SÍNTOMAS:** Las plantas de tomate de las cuales fue aislado el patógeno, presentaban síntomas de marchitez en la parte aérea, con amarillamiento y necrosis en las hojas. En la base de los tallos se observó la proliferación de abundantes raíces adventicias y al realizar un corte longitudinal de los mismos, se evidenció la existencia de necrosis vascular de color pardo rojizo, la cual se extendía hacia la parte apical de la planta de acuerdo con la severidad de la enfermedad. También se observó síntomas de pudrición y coloración rojiza en las raíces de las plantas afectadas. Los síntomas coinciden con los descritos por Walker (1971) y Agrios (2005) para la marchitez vascular en tomate causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **(Figura 1).**



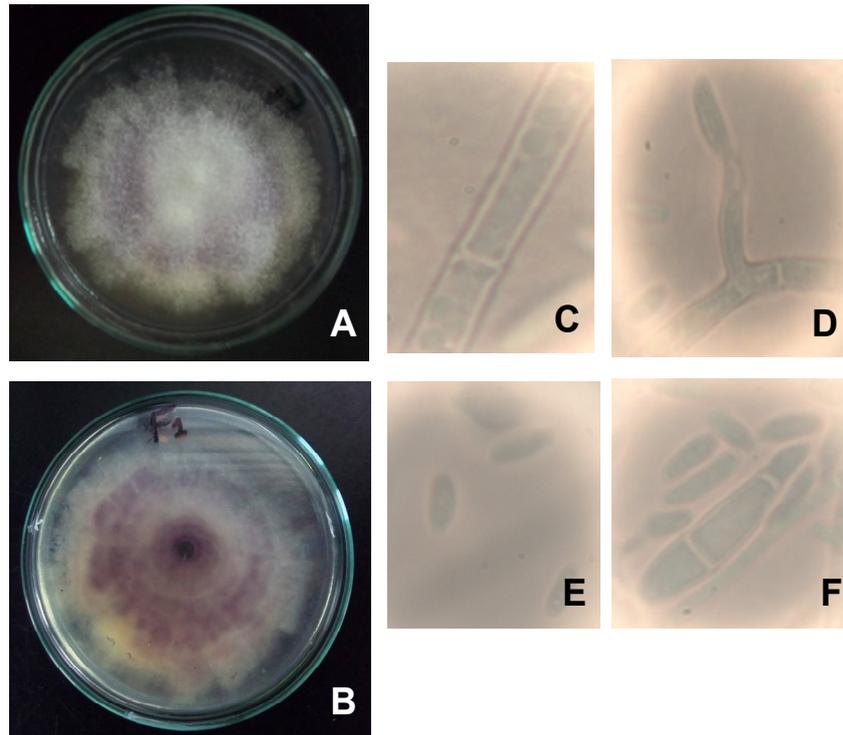
**Figura 1. Síntomas de marchitez en las plantas de tomate colectadas.**

## 5.2.- AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACION DEL PATÓGENO

### 5.2.1.- Características del Patógeno.

El aislado de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* obtenido se caracteriza por presentar colonias de aspecto algodonoso, color morado claro al inicio de su crecimiento, las cuales se tornan de color morado intenso, con un diámetro promedio de 4.10 cm, a los 7 días de crecimiento. El micelio es hialino y septado. Los microconidios se caracterizan por ser de forma oval-elipsoide, sin septos, con un largo promedio de 8.54  $\mu$  y ancho promedio de 3.97  $\mu$ . Los macroconidios presentan 3 septos, largo promedio de 28.97  $\mu$  y ancho promedio de 4.38  $\mu$ , con célula basal en forma de pie y célula apical corta. Las clamidosporas son globosas, solitarias, intercalares o terminales, con diámetro promedio de 7.18  $\mu$ . **(Figura 2 A,B,C, D, E Y F).**

Las características del aislado coinciden tanto con las señaladas por Lugo y col. (2001) para aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* procedentes de diferentes localidades productoras de tomate del estado Aragua como con lo indicado por Booth (1977), quienes destacan que las colonias de este hongo pueden ser de color blanco, rosado, vino a morado y violeta, con un diámetro promedio que oscila entre los 4 y 5 cm, mientras que las características microscópicas se asemejan a las descritas para el patógeno tanto por Booth (1977) como por Leslie y Summerell (2006).



**Figura 2. Características macroscópicas y microscópicas del aislado de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. A. Colonia (anverso), B. Colonia (reverso), C. Micelio, D. Conidióforo, E. Microconidios, F. Macroconidios.**

### 5.2.2.- Prueba de Patogenicidad

Los síntomas se comenzaron a manifestar en las plantas inoculadas, a los 15 días después del trasplante. Las plántulas presentaron disminución del diámetro del tallo a nivel del cuello, necrosis de raíces y tallos y formación de raíces adventicias en la base del tallo. (**Figura 3 A, B, C y D**). Estos síntomas coinciden con los ocasionados por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* en tomate, descritos por Reyes (1997), Walker (1971), Lugo y col. (2001) y Salazar y col. (2011).



**Figura 3. Síntomas en plántulas inoculadas con *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*.**

**A.** Plántula con marchitez en hojas, disminución del diámetro del tallo a nivel del cuello, y necrosis de raíces. **B. y C.** Formación de raíces adventicias en la base del tallo. **D.** Detalle de necrosis de raíces.

De las 10 plantas inoculadas con el patógeno, 7 de ellas murieron, lo cual representa un 70% de mortalidad causada por el mismo. Las plantas testigos sobrevivieron sin presentar ningún síntoma.

Al realizar el reaislamiento de las plantas afectadas, se aisló el hongo *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, coincidiendo sus características con el inoculado originalmente. **(Figura 4 A y B).**



**Figura 4. Características macroscópicas y microscópicas del hongo *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*.**

**A.** Colonia del hongo reaislado de las plántulas inoculadas. **B.** Microconidios del hongo reaislado.

### **5.3.- SELECCIÓN *in vitro* DE AISLADOS PROMISORIOS DE *Trichoderma* spp. Y *Bacillus* spp. A PARTIR DE CULTIVOS DUALES**

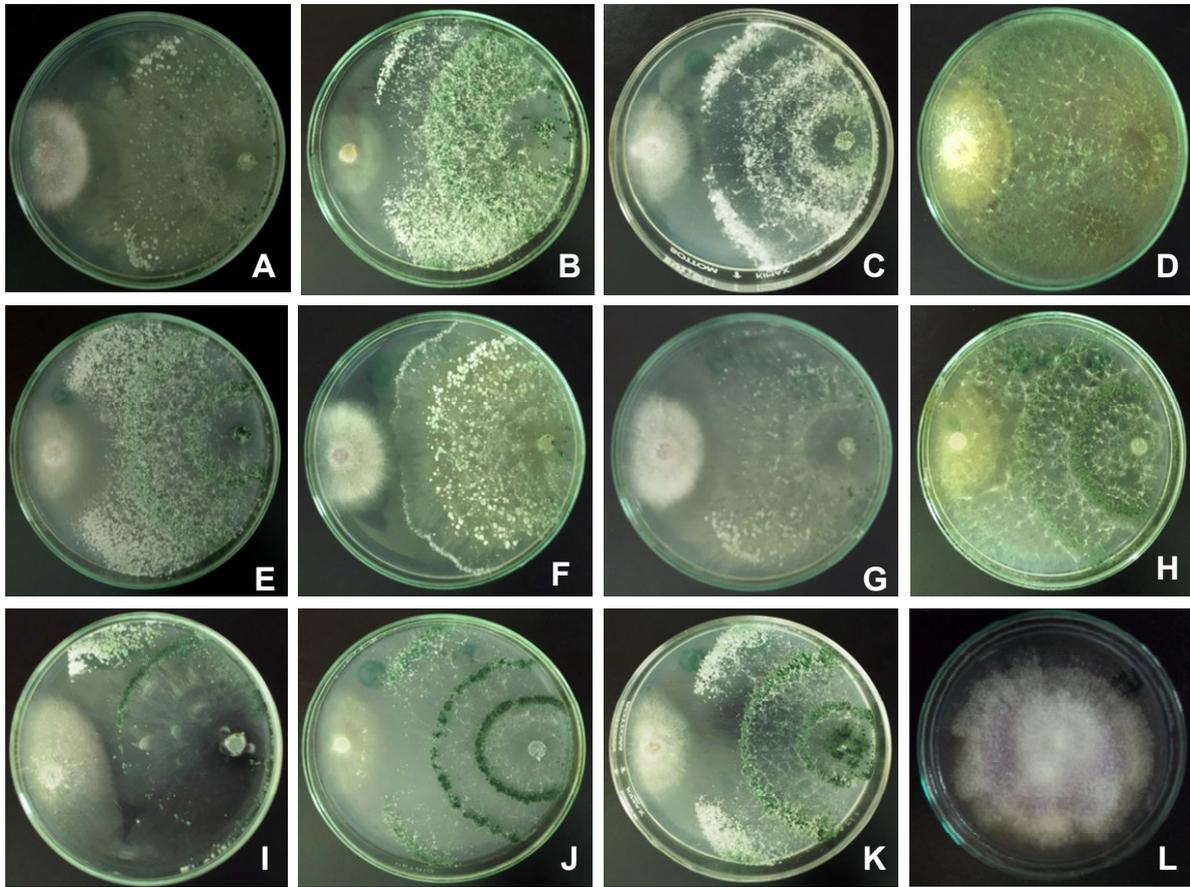
#### **5.3.1.- *Trichoderma* spp.**

Como se observa en el **Cuadro 3**, el aislamiento BMII, el cual es procedente de una muestra de suelo de siembra de pimentón ubicada en Múcura II, presentó un porcentaje de inhibición de crecimiento de 56,92%. A pesar de que los aislados VT, BSM, SM2 y 06143 presentaron un porcentaje de inhibición del crecimiento ligeramente superior (58,46% para el primero y 57,58% para los tres restantes, respectivamente) al de BMII y de que el primero presenta diferencias estadísticamente significativas respecto al resto ( $p < 0.05$ ) en cuanto al PIC, el porcentaje de inhibición de la esporulación del aislado BMII fue superior al de todos

los aislados probados con 92,11%, diferenciándose estadísticamente del resto ( $p < 0.05$ ). En cuanto al PIE, en esta investigación, siete aislados presentaron porcentajes superiores al 85%, siendo éstos PBLP2 (86,40%), LM (86,67%), BSM (87,18%), RP (88,42%), SJ (89,20%), YMII (90,00%) y el de mayor porcentaje, BMII (92,11%).

Con base en lo anterior, el aislado seleccionado fue BMII (**Figura 5 D**). Es necesario acotar además que el crecimiento de dicho aislado fue superior al de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (3 cm/día), invadiendo por completo la placa petri del cultivo dual al cuarto día.

En estudios realizados previamente por Salazar y col. (2011), evaluando diferentes aislados de *Trichoderma* procedentes de algunas zonas agrícolas del estado Aragua para el control de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, se encontró que los porcentajes de inhibición del crecimiento fueron inferiores a los de los aislados probados en esta investigación, siendo el más alto de 38,01% para el aislado I9, procedente de la zona agrícola de Palo Negro.



**Figura 5. Cultivos duales con mayor PIC (%) realizados entre *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y los aislados del género *Trichoderma*.  
A. VT, B. SM2, C. 6143, D. BMII, E. BSM, F. TD, G. RP, H. PIMII, I. SA, J. SJ,  
K. LM, L. Testigo.**

**Cuadro 3. Porcentajes de inhibición del crecimiento (PIC) y porcentajes de inhibición de la esporulación (PIE) obtenidos del enfrentamiento en cultivos duales de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y los aislados del género *Trichoderma* con su respectiva prueba de medias del análisis de varianza de Kruskal-Wallis.**

<b>AISLADO</b>	<b>PIC(%)</b>	<b>AISLADO</b>	<b>PIE(%)</b>
<b>VT</b>	58,46 a	<b>BMII</b>	<b>92,11 a</b>
<b>SM2</b>	57,58 ab	<b>6143</b>	90,26 ab
<b>6143</b>	57,58 ab	<b>YMII</b>	90,00 ab
<b>BSM</b>	57,58 ab	<b>SJ</b>	89,20 ab
<b>BMII</b>	<b>56,92 abc</b>	<b>SM2</b>	88,72 ab
<b>TD</b>	55,38 abc	<b>RP</b>	88,42 ab
<b>RP</b>	53,85 abc	<b>BSM</b>	87,18 ab
<b>PIMII</b>	53,33 abc	<b>PIMII</b>	86,80 ab
<b>SA</b>	52,31 abc	<b>6146</b>	86,76 ab
<b>SJ</b>	51,67 abc	<b>LM</b>	86,67 ab
<b>LM</b>	51,52 abc	<b>PBLP2</b>	86,40 ab
<b>PMII</b>	50,53 abc	<b>SA</b>	83,68 ab
<b>PB1</b>	50,00 abc	<b>VT</b>	81,05 ab
<b>PBLP2</b>	49,33 abc	<b>CT1</b>	79,86 ab
<b>AMII</b>	49,12 abc	<b>PB1</b>	79,60 ab
<b>YMII</b>	46,67 abc	<b>TD</b>	79,47 ab
<b>RMII</b>	44,91 abc	<b>AMII</b>	74,67 ab
<b>TT3</b>	40,00 abc	<b>TT3</b>	64,52 ab
<b>FTSCO5</b>	37,78 bc	<b>RMII</b>	60,00 ab
<b>CT1</b>	37,20 bc	<b>FTSCO5</b>	57,46 ab
<b>6141</b>	35,56 bc	<b>PMII</b>	53,33 ab
<b>6146</b>	33,33 c	<b>6141</b>	46,76 b

\*Las letras iguales significan que no existen diferencias significativas entre tratamientos.  $\alpha = 0.05$

### 5.3.2.- *Bacillus* spp.

Previo a la realización de los cultivos duales, la selección preliminar de los aislados del género *Bacillus*, se basó en la reacción de KOH al 3%, con la cual se seleccionaron las bacterias que resultaron Gram (+). Las mismas, al resultar además positivas para la prueba de catalasa, y presentar forma de bastón y formación de endosporas, fueron las que conformaron el grupo con el cual se procedió a realizar los enfrentamientos. **(Cuadro 4).**

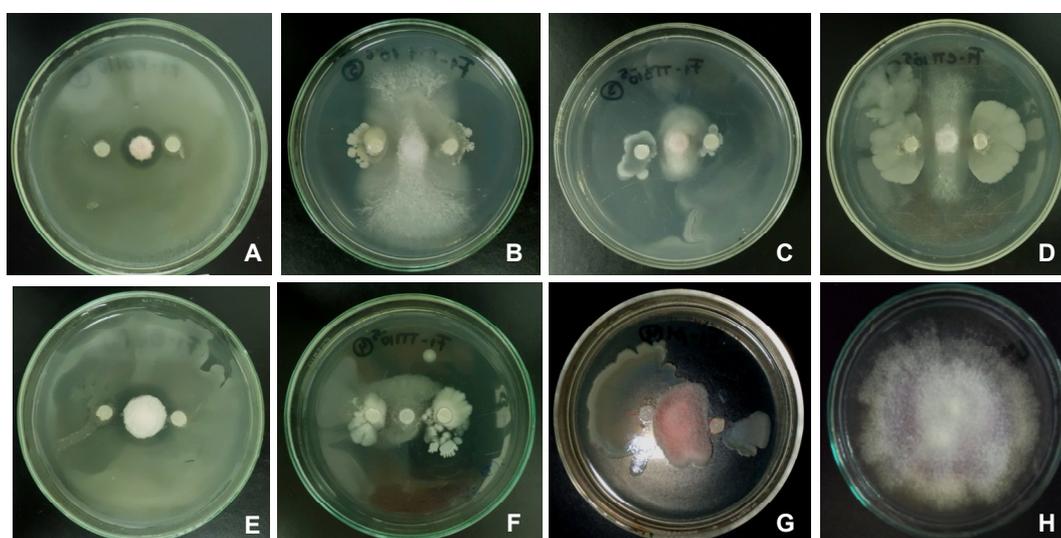
**Cuadro 4. Características de los aislados del género *Bacillus* consideradas para su selección preliminar.**

AISLADO	KOH 3%	Catalasa	Formación de Endosporas	Forma
RT1	+	+	+	Bastón
CT1	+	+	+	Bastón
TT1	+	+	+	Bastón
TT3	+	+	+	Bastón
PB1	+	+	+	Bastón
SM1	+	+	+	Bastón
SM2	+	+	+	Bastón
SJ	+	+	+	Bastón
RP	+	+	+	Bastón
TD	+	+	+	Bastón
VT	+	+	+	Bastón
TM	+	+	+	Bastón
PLL1	+	+	+	Bastón
PLH1	+	+	+	Bastón
PLH2	+	+	+	Bastón

Como se observa en el **Cuadro 5**, el aislado PB1, el cual es procedente de una muestra de suelo de siembra de pimentón ubicada en Barbacoas, ejerció el mejor control del patógeno, presentando tanto el mayor porcentaje de inhibición de crecimiento con 80,00% como el mayor porcentaje de inhibición de la esporulación con 99,70%, siendo ambos superiores al de todos los aislados probados y diferenciándose estadísticamente ( $p < 0.05$ ) del resto.

Con base en lo anterior, el aislado seleccionado fue PB1. Es necesario acotar además que dicho aislado se destacó por la formación de halos inhibitorios alrededor de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* en las placas petri de los cultivos duales al quinto día. (**Figura 6 A**).

Los resultados de esta investigación son similares a los obtenidos por Praveen *et al* (2012) al enfrentar *Bacillus* spp. contra *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, a los cinco días encontraron un porcentaje de inhibición del crecimiento de 84,80%.



**Figura 6. Cultivos duales con mayor PIC (%) realizados entre *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y los aislados del género *Bacillus*.**

**A. PB1, B. RT1, C. TT3, D. CT1,  
E. TD, F. TT1, G. RP, H. Testigo.**

**Cuadro 5. Porcentajes de inhibición del crecimiento (PIC) y porcentajes de inhibición de la esporulación (PIE) obtenidos del enfrentamiento en cultivos duales de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y los aislados del género *Bacillus* con su respectiva prueba de medias del análisis de varianza de Kruskal-Wallis.**

<b>MUESTRA</b>	<b>PIC(%)</b>	<b>MUESTRA</b>	<b>PIE(%)</b>
<b>PB1</b>	<b>80,00 a</b>	<b>PB1</b>	<b>99,70 a</b>
<b>TD</b>	<b>70,00 ab</b>	<b>RT1</b>	<b>97,27 ab</b>
<b>PLL1</b>	<b>68,00 ab</b>	<b>TT3</b>	<b>96,96 ab</b>
<b>VT</b>	<b>64,00 abc</b>	<b>CT1</b>	<b>96,09 ab</b>
<b>RT1</b>	<b>61,20 abc</b>	<b>TD</b>	<b>95,15 ab</b>
<b>TT3</b>	<b>60,00 abc</b>	<b>TT1</b>	<b>94,78 ab</b>
<b>RP</b>	<b>58,40 abc</b>	<b>RP</b>	<b>93,94 ab</b>
<b>TM</b>	<b>56,80 abc</b>	<b>PLL1</b>	<b>91,52 ab</b>
<b>TT1</b>	<b>56,50 abc</b>	<b>SM1</b>	<b>90,91 ab</b>
<b>SM2</b>	<b>56,00 abc</b>	<b>PLH2</b>	<b>90,30 ab</b>
<b>SM1</b>	<b>54,80 abc</b>	<b>VT</b>	<b>89,09 ab</b>
<b>PLH1</b>	<b>51,20 abc</b>	<b>PLH1</b>	<b>88,79 ab</b>
<b>CT1</b>	<b>50,00 bc</b>	<b>SM2</b>	<b>84,55 ab</b>
<b>PLH2</b>	<b>22,80 c</b>	<b>TM</b>	<b>83,64 ab</b>
<b>SJ</b>	<b>22,00 c</b>	<b>SJ</b>	<b>65,45 b</b>

\*Las letras iguales significan que no existen diferencias significativas entre tratamientos.  
 $\alpha = 0.05$

Los porcentajes de inhibición de crecimiento encontrados para la mayoría de los aislados del género *Bacillus* probados en esta investigación, los cuales son mayores o iguales al 50% (exceptuando a los aislados SJ y PLH2 con 22,00 y 22,80%, respectivamente) superan ampliamente a los encontrados por otros investigadores, como Mojica-Marin y col. (2009), quienes al realizar la determinación de antagonismo *in vitro* a partir de cultivos duales de 64 aislados de *Bacillus thuringiensis* contra *Ralstonia solani*, *Phytophthora capsici* y *Fusarium oxysporum*, encontraron 41 aislados del antagonista efectivos contra los

patógenos mencionados, destacando que sólo ocho aislados mostraron un efecto inhibitorio contra *F. oxysporum*, siendo sólo cinco los que inhibieron más del 30% del crecimiento, alcanzándose la máxima inhibición con los aislados GM-23 (43,02%) y HD-121 (42,04%).

También son comparables los resultados con los obtenidos por Rodríguez y col. (2010) quienes al probar el potencial biocontrolador de aislados del género *Bacillus* sobre el crecimiento y esporulación del hongo *Fusarium oxysporum* aislado de uchuva, planta que al igual que el tomate pertenece a la familia Solanaceae, encontraron que dichos aislados resultaron ser los más efectivos en cuanto a la restricción del crecimiento y esporulación del patógeno. Por otra parte, Lagunas y col. (2001) encontraron que tres diferentes aislados de *Bacillus firmus* resultaron los más efectivos para el control del crecimiento *in vitro* del patógeno de suelo *Phytophthora capsici* aislado de plantas de tomate, con porcentajes de inhibición del crecimiento de 41, 34 y 33,8%, respectivamente.

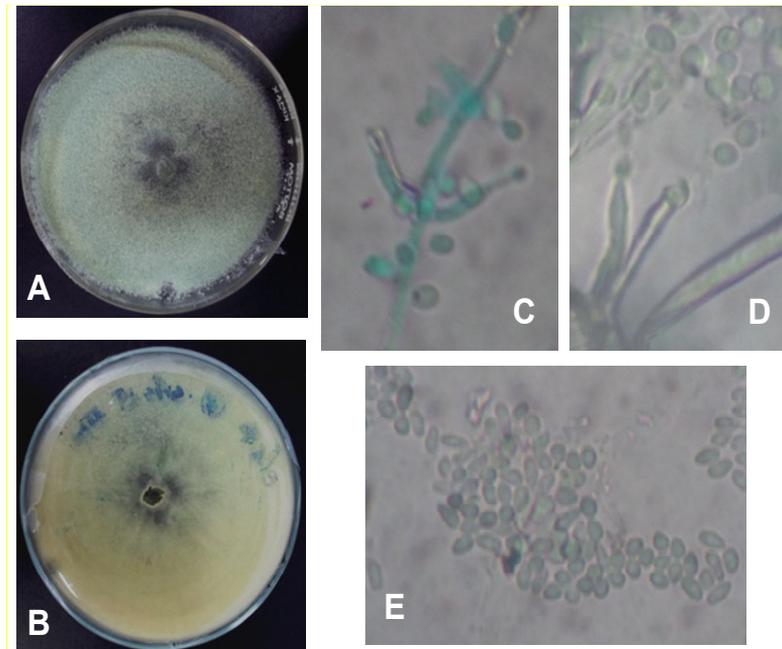
#### **5.4.- IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL AISLADO MÁS EFECTIVO DE *Trichoderma* spp.**

**5.4.1.- Descripción del biocontrolador:** Este aislado fue el que presentó el más rápido crecimiento de la colonia, alcanzando 9 cm a los cuatro días.

La colonia, en medio PDA, es de aspecto concéntrico y ralo, color verde oliva claro, cubre toda la placa y con poca esporulación. Al observar el reverso de la placa, la misma presenta coloración amarillenta difusa y tiñe levemente el medio.

Presenta micelio hialino, con hifas septadas y ramificadas en toda su longitud, conidióforos alargados, con ramificación abierta, medidas de 63,00 a 76,25  $\mu$  de largo y 3,15 a 6,10  $\mu$  de ancho, 3 fiálides lageniformes, ausencia de fiálides

intercalares. Conidios agrupados, globosos a elipsoides, de color verde oliva y diámetro de 3,05 a 6,10  $\mu$ . Clamidosporas intercalares y terminales, lisas, globosas, escasas, con diámetro de 10,50 a 12,20  $\mu$ . (Figura 7 A, B,C,D y E).



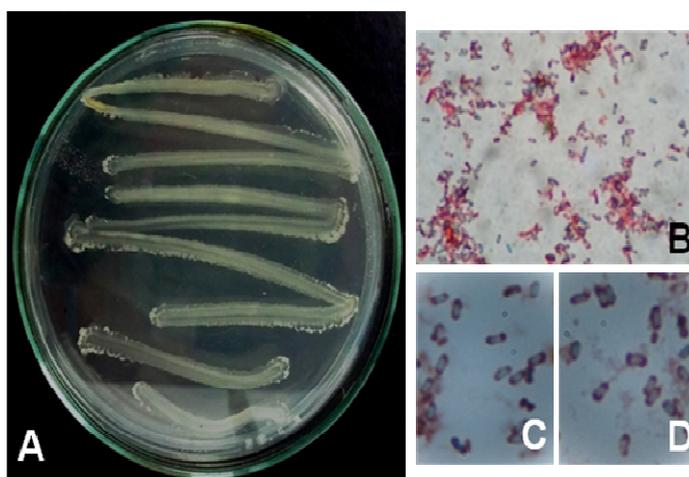
**Figura 7. Características macroscópicas y microscópicas del aislado de *Trichoderma* spp.**

**A. Colonia (anverso), B. Colonia (reverso), C. Conidióforo, D. Fiálides, E. Conidios.**

Las características descritas para el aislado del género *Trichoderma*, coinciden con las dadas para la especie *Trichoderma koningii* por Samuels *et al.* (2013) y Páez y Sanabria (2007), siendo el aislado seleccionado en esta investigación muy similar al de *T. koningii* obtenido de suelo de la zona agrícola de Pao de Zárate, estado Aragua por estos últimos autores.

## 5.5.- IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL AISLADO MÁS EFECTIVO DE *Bacillus* spp.

**5.5.1.- Descripción del biocontrolador:** La bacteria, en medio AN, presenta colonias de crecimiento rápido, de color crema amarillento, opaca, de aspecto rugoso y bordes ondulados. La bacteria presenta forma de bastón y presencia de endosporas. (**Figura 8 A, B, C y D**). Es una bacteria Gram positiva (+) y catalasa positiva. Las características descritas coinciden con las señaladas por Schaad *et al.* (2001) para el género *Bacillus*.



**Figura 8. Características macroscópicas y microscópicas del aislado de *Bacillus* spp.**

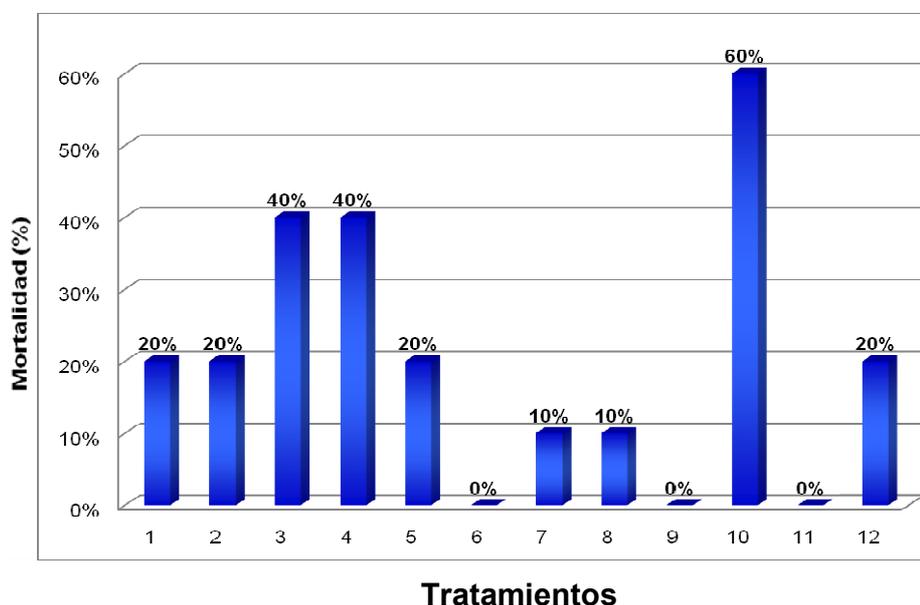
**A. Colonia, B. Celúlas bacterianas con forma de bastón, C. y D. Endosporas.**

Por otra parte, Madigan *et al.* (2012), indican que en el grupo de las bacterias Gram positivas (+) se encuentran muchos organismos que están unidos por una filogenia y estructura celular común, dentro de los cuales se distingue el género *Bacillus* por la formación de endosporas. Asimismo, Cuervo (2010) destaca que aunado a ser una bacteria Gram positiva, que produce endosporas termorresistentes, esta bacteria también resiste factores físicos perjudiciales como la desecación, la radiación, los ácidos y los desinfectantes químicos, además de producir enzimas hidrofílicas extracelulares que descomponen polisacáridos, ácidos nucleicos permitiendo que el organismo emplee estos productos como fuente de carbono y electrones.

## 5.6.- EVALUACIÓN *in vivo* DE AISLADOS PROMISORIOS DE *Trichoderma* spp. Y *Bacillus* spp.

### 5.6.1.- Efecto de los biocontroladores sobre el control de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*

En relación a la variable **mortalidad de las plantas (%)**, se observó que la mortalidad fue nula para los tratamientos 6 (*Bacillus* spp. en semillero, trasplante y semanal), 9 (*T. koningii*. + *Bacillus* spp. en semillero, trasplante y semanal) y 11 (testigo sin inocular), no encontrándose diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tres tratamientos al aplicar la prueba de medias del análisis de varianza de Kruskal-Wallis. La mortalidad más alta se encontró en las plantas del tratamiento 10 (testigo inoculado) con un 60%, mientras que la mortalidad en los tratamientos 3 y 4 fue de 40% y de 20% en los tratamientos 1, 2, 5 y 12. (Figura 9). Las plantas inoculadas que sobrevivieron hasta la evaluación final del ensayo, presentaron síntomas de marchitez, siendo éstos síntomas acentuados en las plantas del tratamiento 10 (testigo inoculado). (Figura 10 A y B).



**Figura 9. Mortalidad (%) de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) cv. Rio Grande inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y tratadas con los biocontroladores de forma individual y combinada y los demás tratamientos aplicados.**



**Figura 10. Síntomas de marchitez en plantas inoculadas.**

**A. Vista general de las plantas con síntomas de marchitez, B. Síntomas acentuados de marchitez en planta testigo inoculada.**

En el caso particular de esta investigación, se observó que una mayor frecuencia de aplicación de los antagonistas favorece la sobrevivencia de las plantas, tal y como fue observado en el tratamiento 6 (*Bacillus* spp. en semillero, trasplante y semanal) y el tratamiento 9 (*Bacillus* spp. y *T. koningii* en semillero, trasplante y semanal).

En un ensayo realizado por Adebayo y Ekpo (2004) con plantas de tomate inoculadas con *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, encontraron la menor incidencia de marchitez vascular (32,10%) con la aplicación de *Bacillus subtilis* a una concentración de  $2.0 \times 10^7$  ufc/ml, seguido de *Trichoderma viride* a una concentración de  $1.8 \times 10^7$  ufc/ml (37,50%), ambos aplicados como tratamientos independientes a las semillas previo a la siembra.

Abeyasinghe (2007) señala que en plantas de frijol cultivadas en invernadero e inoculadas con *Fusarium solani*, la aplicación de biocontroladores como *B. subtilis* (aislado CA32) y *Trichoderma harzianum* (RU01) reduce significativamente la pudrición de las raíces y disminuye la densidad de la población del patógeno, propiciando una mayor sobrevivencia de las plantas afectadas.

Morsy *et al* (2009) en tomate var. Castle cultivado en invernadero e inoculado con *Fusarium solani*, encontraron que la aplicación tanto de *B. subtilis* ( $10^8$  UFC/ml) como *T. viride* ( $10^6$  esporas/ml) en forma individual y combinada, aumentó significativamente la tasa de supervivencia de las plantas, siendo ésta de 70% con la aplicación de *B. subtilis*, 73% con la aplicación de *T. viride* y 80% con la aplicación de ambos biocontroladores aplicados conjuntamente.

Otras investigaciones respaldan el efecto positivo de la aplicación de ambos antagonistas en la reducción de la mortalidad de plantas, en este sentido, De Cal *et al* (1995), probando diferentes controladores biológicos, entre los que se encontraba *T. harzianum* a una concentración de  $10^6$  UFC/g, se observó que el mismo al ser aplicado en suelo inoculado con microconidios de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* raza 2, redujo las poblaciones del patógeno en un 20 a 30%, hasta los 30 días después de la inoculación.

Pérez-Pivat (2008) encontró en plantas de tomate cv. Río Grande inoculadas con *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* y tratadas con el producto comercial Tricobiol® (*Trichoderma harzianum*) aplicado en tres concentraciones distintas tanto en semillero como al momento del transplante y semanalmente que la mortalidad de plantas (%) fue nula para los tratamientos 1 ( $1 \times 10^2$  UFC/g), 3 ( $1 \times 10^4$  UFC/g) y 5 ( $1 \times 10^6$  UFC/g).

El efecto de la frecuencia de aplicación de *T. harzianum* también fue estudiado por Jiménez y Sanabria (2008) quienes encontraron un control significativo de la marchitez vascular causada por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* en tomate var. Río Grande con la aplicación del antagonista en semillero, trasplante y 15 días después del trasplante, con una incidencia de 16,70%.

Por otra parte, Guillén y col. (2006) al realizar una investigación para controlar *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp. y *Phytophthora capsici* en pimentón cultivado en campo, obtuvieron que la severidad de la marchitez y la pudrición de las raíces en las plantas fue menor con la aplicación de *Bacillus* spp.

Paredes-Escalante y col. (2009) encontraron para la enfermedad conocida como rabia del garbanzo, la cual es ocasionada por un complejo fúngico conformado por *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii* y *Rhizoctonia solani*, que la menor severidad fue registrada con la aplicación de *B. subtilis*.

Hernández-Suárez y col. (2010) encontraron en tomate cv. Floradade cultivado bajo invernadero e inoculado con *Fusarium* sp. y *Rhizoctonia solani*, que la incidencia de daño radicular fue inexistente con la aplicación a la semilla de tres aislados de *Bacillus* spp. tanto de manera independiente como de manera conjunta, encontrándose con el tratamiento químico (aplicación de Tiabendazol) una incidencia de 27% y un 65% de plantas severamente dañadas por los fitopatógenos.

Abo-Elyousr y Mohamed (2009) en plántulas de tomate cv. Prichard cultivadas bajo condiciones de invernadero inoculadas con *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* y tratadas con *Bacillus* spp., hallaron una reducción de la marchitez de 67,40%. Indican además que el antagonista es capaz de producir agentes antimicóticos de forma extracelular, inhibiendo el crecimiento de fitopatógenos.

Omar *et al* (2006) en un ensayo realizado en invernadero con plantas de tomate inoculadas con *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*, hallaron que la aplicación de Carbendazim disminuyó la enfermedad en un 50%, mientras que los aislados de *Bacillus megaterium* redujeron la misma a menos de 20%, evidenciándose en ambos casos una reducción de los síntomas manifestados por las plantas.

Turky *et al* (2005) en un ensayo realizado bajo condiciones de campo con tomate cv. Supermarmment, afectado por *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*, encontraron que al aplicar *B. subtilis* ( $10^8$  células/ml) y *T. harzianum* ( $10^6$  esporas/ml) se logró un 43,7% de protección contra el patógeno en las plantas tratadas.

Ziedan (2006) indica que el porcentaje de transmisión de *Fusarium oxysporum* por semillas de maní disminuyó significativamente al aplicar a las mismas *Bacillus* spp. (15,38%) en comparación con las no tratadas (56,25%).

## **5.6.2.- EFECTO INDIVIDUAL Y COMBINADO DE LOS AISLAMIENTOS MÁS EFECTIVOS DE *Trichoderma* spp. Y *Bacillus* sp. SOBRE EL CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS DE TOMATE.**

### **5.6.2.1.- Evaluación de variables vegetativas.**

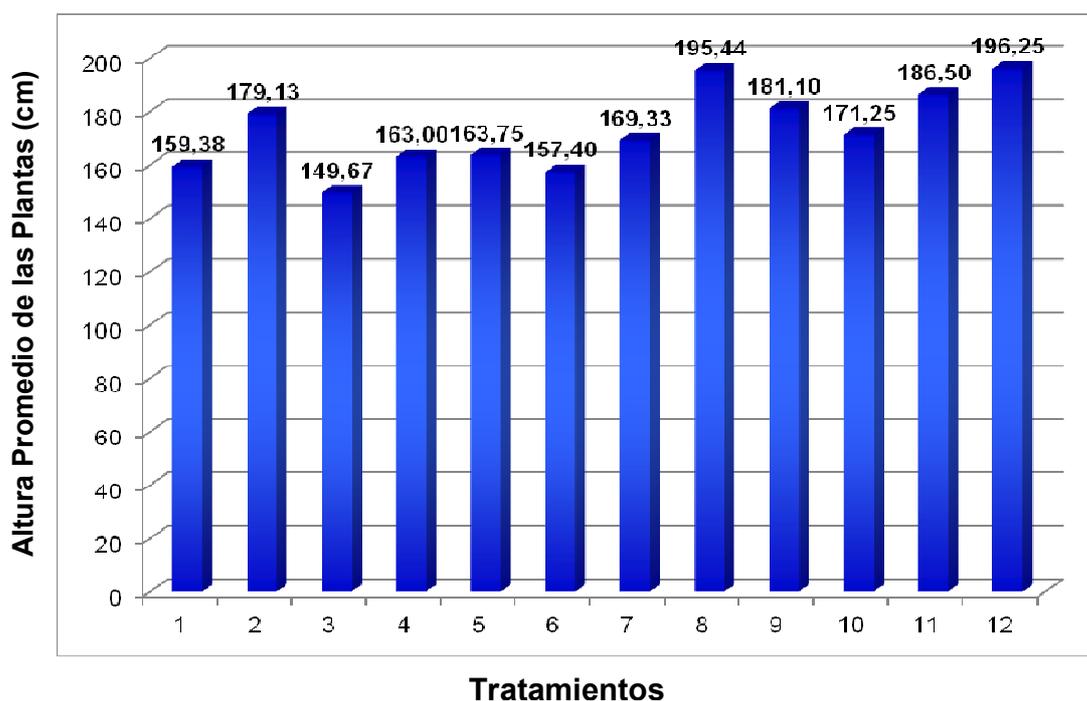
En esta investigación se encontró que para la variable altura de plantas la mayor altura se obtuvo con el tratamiento 12 (196,25 cm), mientras que para la longitud de raíces el mayor valor se obtuvo el tratamiento 10 (54,75 cm). Para las cinco variables restantes, los mayores valores se encontraron con el tratamiento 6. **(Cuadro 6).**

**Cuadro 6. Prueba de Medias del Análisis de Varianza de Kruskal-Wallis para las variables de las plantas de tomate inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y tratadas con los biocontroladores de forma individual y combinada y los demás tratamientos aplicados.**

Altura de Plantas (cm)	Longitud de Raíces (cm)	Volumen de raíces (cm <sup>3</sup> )	Peso Fresco de Raíces (g)	Peso Seco de Raíces (g)	Peso Fresco Parte Aérea (g)	Peso Seco Parte Aérea (g)
T <sub>12</sub> 196,25 a	T <sub>10</sub> 54,75 a	T <sub>6</sub> 90,00 a	T <sub>6</sub> 91,47 a	T <sub>6</sub> 16,44 a	T <sub>6</sub> 420,47 a	T <sub>6</sub> 102,57 a
T <sub>8</sub> 195,44 a	T <sub>12</sub> 51,50 a	T <sub>5</sub> 77,87 ab	T <sub>4</sub> 73,33 a	T <sub>5</sub> 13,94 a	T <sub>5</sub> 397,32 ab	T <sub>5</sub> 63,77 ab
T <sub>11</sub> 186,50 a	T <sub>1</sub> 50,00 a	T <sub>2</sub> 76,87 ab	T <sub>5</sub> 75,43 a	T <sub>2</sub> 13,31 a	T <sub>3</sub> 402,00 abc	T <sub>4</sub> 54,24 ab
T <sub>9</sub> 181,10 a	T <sub>8</sub> 50,22 a	T <sub>12</sub> 60,25 ab	T <sub>12</sub> 69,65 a	T <sub>7</sub> 13,79 a	T <sub>4</sub> 360,06 abc	T <sub>3</sub> 57,39 ab
T <sub>2</sub> 179,13 a	T <sub>4</sub> 48,33 a	T <sub>4</sub> 56,83 ab	T <sub>8</sub> 72,34 a	T <sub>12</sub> 11,17 a	T <sub>11</sub> 324,51 abc	T <sub>11</sub> 49,36 ab
T <sub>10</sub> 171,25 a	T <sub>2</sub> 48,00 a	T <sub>8</sub> 60,00 ab	T <sub>2</sub> 71,19 a	T <sub>3</sub> 12,42 a	T <sub>9</sub> 280,84 abc	T <sub>8</sub> 50,46 ab
T <sub>7</sub> 169,33 a	T <sub>9</sub> 46,10 a	T <sub>7</sub> 53,55 ab	T <sub>7</sub> 65,32 a	T <sub>4</sub> 10,97 a	T <sub>2</sub> 280,71 abc	T <sub>10</sub> 62,60 ab
T <sub>5</sub> 163,75 a	T <sub>11</sub> 43,80 a	T <sub>3</sub> 48,16 ab	T <sub>11</sub> 57,65 a	T <sub>1</sub> 12,44 a	T <sub>8</sub> 247,00 abc	T <sub>9</sub> 48,19 ab
T <sub>4</sub> 163,00 a	T <sub>6</sub> 42,70 a	T <sub>11</sub> 46,60 ab	T <sub>3</sub> 54,32 a	T <sub>8</sub> 12,44 a	T <sub>1</sub> 253,98 abc	T <sub>12</sub> 47,04 ab
T <sub>1</sub> 159,38 a	T <sub>5</sub> 43,50 a	T <sub>10</sub> 45,75 ab	T <sub>1</sub> 48,65 a	T <sub>11</sub> 10,69 a	T <sub>10</sub> 247,75 abc	T <sub>2</sub> 43,45 b
T <sub>6</sub> 157,40 a	T <sub>3</sub> 41,66 a	T <sub>9</sub> 43,90 b	T <sub>9</sub> 50,26 a	T <sub>9</sub> 10,32 a	T <sub>7</sub> 227,27 bc	T <sub>1</sub> 38,34 b
T <sub>3</sub> 149,67 a	T <sub>7</sub> 38,66 a	T <sub>1</sub> 33,75 b	T <sub>10</sub> 39,88 a	T <sub>10</sub> 8,66 a	T <sub>12</sub> 192,28 c	T <sub>7</sub> 38,13 b

\*Las letras iguales significan que no existen diferencias significativas entre tratamientos.  $\alpha = 0.05$   
T<sub>1</sub>: *Trichoderma* spp. Semillero (TrS), T<sub>2</sub>: *Trichoderma* spp. Semillero y Trasplante (TrST), T<sub>3</sub>: *Trichoderma* spp. Semillero, Trasplante y Semanal (TrSTS), T<sub>4</sub>: *Bacillus* spp. Semillero (BS), T<sub>5</sub>: *Bacillus* spp. Semillero y Trasplante (BST), T<sub>6</sub>: *Bacillus* spp. Semillero, Trasplante y Semanal (BSTS), T<sub>7</sub>: *Trichoderma* spp. + *Bacillus* spp. Semillero (TrBS), T<sub>8</sub>: *Trichoderma* spp. + *Bacillus* spp. Semillero y Trasplante (TrBST), T<sub>9</sub>: *Trichoderma* spp. + *Bacillus* spp. Semillero, Trasplante y Semanal (TrBSTS), T<sub>10</sub>: Testigo inoculado (TI), T<sub>11</sub>: Testigo sin inocular (TSI), T<sub>12</sub>: Fungicida (Carbendazim) Semillero, Trasplante y Semanal. (CSTS).

En relación a la variable **altura de plantas (cm)**, no hubo diferencias significativas entre tratamientos ( $p>0.05$ ), sin embargo, al momento de la cosecha se observó que la misma fue mayor con los tratamientos 12 (196,25 cm) y 8 (195,44 cm) (Carbendazim en semillero, trasplante y semanal y *T. koningii*. + *Bacillus* spp. en semillero y trasplante, respectivamente), mientras que la menor altura fue registrada en el tratamiento 3 (149,67 cm) (*T. koningii*. en semillero, trasplante y semanal). (Figura 11).



**Figura 11. Altura promedio (cm) de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) cv. Rio Grande inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y tratadas con los biocontroladores de forma individual y combinada y los demás tratamientos aplicados.**

En otros estudios, Adebayo y Ekpo (2004) reportan que la aplicación de *Bacillus subtilis* en plantas inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, aumentó significativamente la altura de las plantas en comparación con la aplicación de *T. harzianum* y *T. viride*.

Carrillo-Castañeda y col. (2000), al realizar un estudio sobre el efecto de la inoculación de semillas de tomate var. Río Grande con bacterias antagonistas, encontraron que las plantas inoculadas con el aislado A7 de *Pseudomonas fluorescens* alcanzaron la mayor altura (90 cm).

Efectos similares han sido reportados por Guillén y col. (2006) quienes encontraron que plantas de pimentón cv. Caballero tratadas con aislados de *Bacillus* spp. (denominados B13 y B3) para controlar *Fusarium* sp. y *Rhizoctonia solani*, presentaron mayor altura que el testigo.

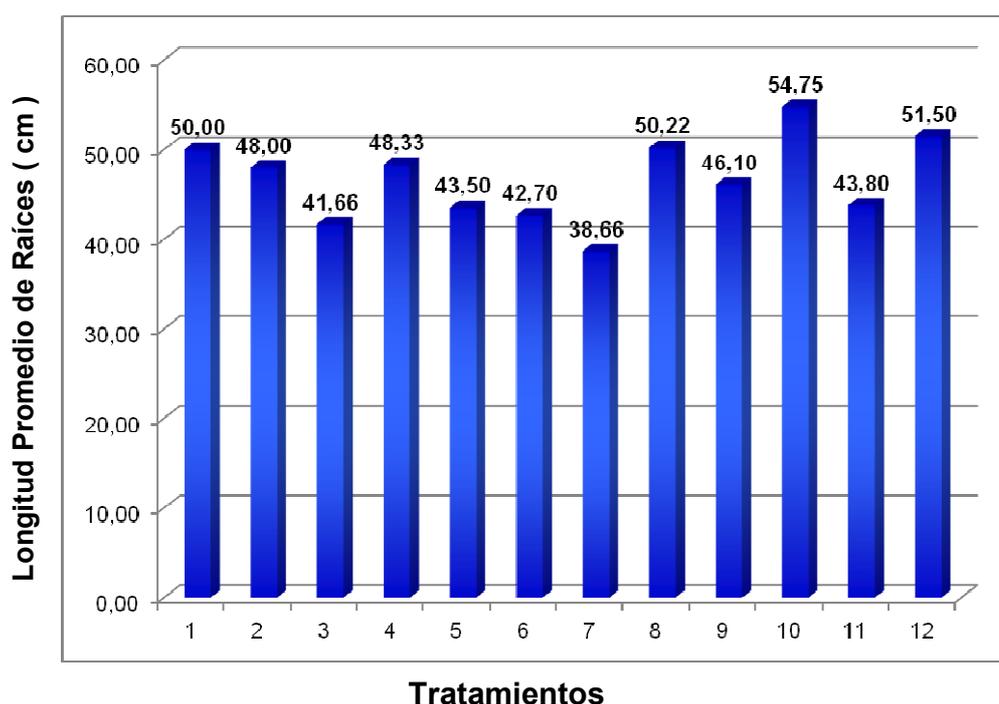
Herrera-Cid (2005) al aplicar previo al trasplante *Paenibacillus lentimorbus* bajo condiciones de invernadero para el control de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* en tomate, encontró la mayor altura de plantas, siendo ésta de 95,80 cm.

Por otra parte, Hernández-Suárez y col. (2010) encontraron los mayores valores de altura de plantas de tomate cv. Floradade al aplicar *B. subtilis* previo a la siembra, siendo de 119,47 cm para el aislado B1 y de 121,05 cm para la mezcla de aislados del género *Bacillus*. Con la aplicación del tratamiento químico con Tiabendazol, se encontró una altura inferior a las reportadas con los antagonistas, siendo ésta de 99,05 cm.

En cuanto a la correlación de la altura de plantas con las demás variables evaluadas, se encontró una correlación positiva de ésta con el peso fresco de la parte aérea y el número de frutos por planta. Dicha correlación resulta lógica, dado que una mayor superficie radical contribuye a que la planta lleve a cabo una adecuada absorción de agua y nutrientes, cumpliendo el proceso fotosintético y desarrollando mayor parte aérea tanto vegetativa como reproductiva y por ende la altura de la planta.

Otro aspecto importante a destacar es que se observa una tendencia al incremento de las alturas promedio de las plantas con la aplicación combinada de *T. koningii* y *Bacillus* spp. en los tres momentos de aplicación (semillero, semillero y trasplante, semillero, trasplante y semanal) respecto a la aplicación individual de cada uno de los biocontroladores.

En relación a la variable **longitud de raíces (cm)**, no se encontró diferencias significativas entre todos los tratamientos aplicados ( $p>0.05$ ), sin embargo, la mayor longitud se alcanzó con el tratamiento 10 (testigo inoculado) (54,75 cm), seguido del tratamiento 12 (Carbendazim en semillero, trasplante y semanal) (51,50 cm) y el tratamiento 1 (*T. koningii*. en semillero) (50,00 cm), no existiendo diferencias significativas entre todos los tratamientos aplicados ( $p>0.05$ ). (Figura 12).



**Figura 12. Longitud promedio de raíces (cm) de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) cv. Rio Grande inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y tratadas con los biocontroladores de forma individual y combinada y los demás tratamientos aplicados.**

Es necesario señalar que si bien la mayor longitud de raíces se observó en el testigo inoculado (**Figura 13 J**), las mismas fueron raíces muy delgadas y frágiles, lo cual contrasta con las raíces formadas en los tratamientos con aplicación de los biocontroladores, especialmente con las aplicaciones de *Bacillus* spp., en los tres momentos de aplicación, con las cuales se obtuvo los mayores valores de volumen, peso fresco y peso seco de raíces. (**Figura 13 D,E,F**).



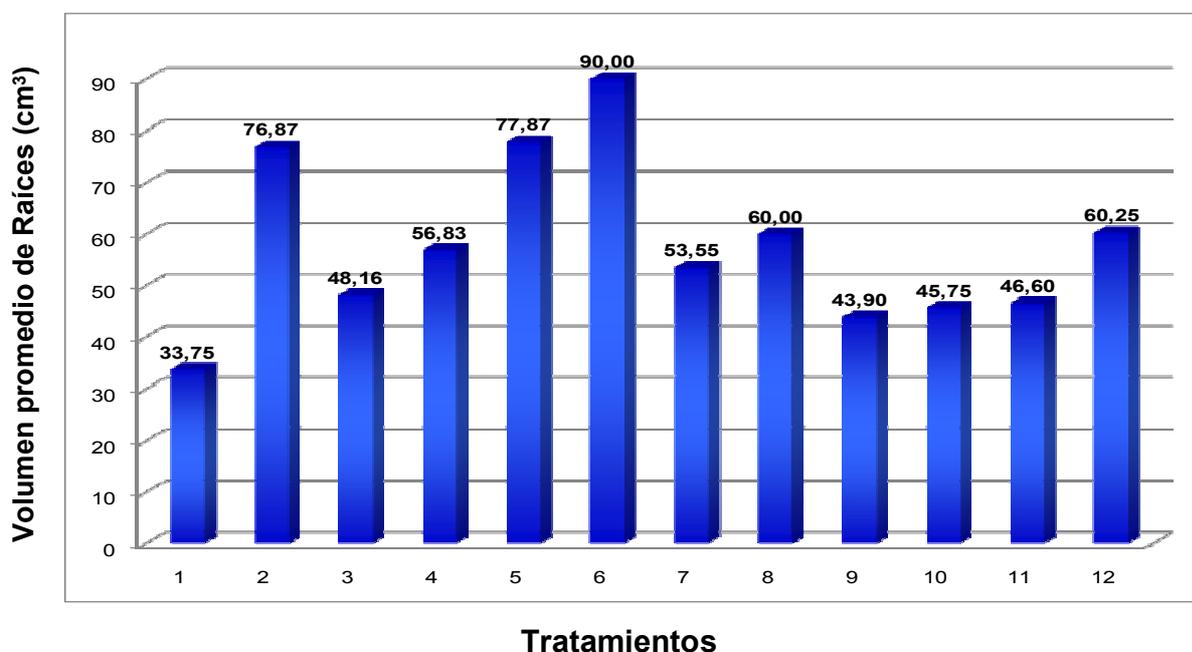
**Figura 13. Sistemas radicales de las plantas de cada tratamiento.**

**A. T<sub>1</sub>, B. T<sub>2</sub>, C. T<sub>3</sub>, D. T<sub>4</sub>, E. T<sub>5</sub>, F. T<sub>6</sub>,  
G. T<sub>7</sub>, H. T<sub>8</sub>, I. T<sub>9</sub>, J. T<sub>10</sub>, K. T<sub>11</sub>, L. T<sub>12</sub>.**

**T<sub>1</sub>: *Trichoderma* spp. Semillero (TrS), T<sub>2</sub>: *Trichoderma* spp. Semillero y Trasplante (TrST), T<sub>3</sub>: *Trichoderma* spp. Semillero, Trasplante y Semanal (TrSTS), T<sub>4</sub>: *Bacillus* spp. Semillero (BS), T<sub>5</sub>: *Bacillus* spp. Semillero y Trasplante (BST), T<sub>6</sub>: *Bacillus* spp. Semillero, Trasplante y Semanal (BSTS), T<sub>7</sub>: *Trichoderma* spp. + *Bacillus* spp. Semillero (TrBS), T<sub>8</sub>: *Trichoderma* spp. + *Bacillus* spp. Semillero y Trasplante (TrBST), T<sub>9</sub>: *Trichoderma* spp. + *Bacillus* spp. Semillero, Trasplante y Semanal (TrBSTS), T<sub>10</sub>: Testigo inoculado (TI), T<sub>11</sub>: Testigo sin inocular (TSI), T<sub>12</sub>: Fungicida (Carbendazim) Semillero, Trasplante y Semanal. (CSTS).**

En investigaciones similares, Abeysinghe (2007) encontró la mayor longitud de raíces en plantas de caraota afectadas por *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli*, con la aplicación de *T. harzianum* (aislado CA32), en comparación con el testigo no tratado.

En cuanto a la variable **volumen de raíces (cm<sup>3</sup>)**, las raíces del tratamiento 6 (*Bacillus* spp. en semillero, trasplante y semanal) ocuparon el mayor volumen (90,00 cm<sup>3</sup>), mientras que el menor volumen se obtuvo en el tratamiento 1 (*T. koningii*. en semillero) (33,75 cm<sup>3</sup>), existiendo diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0.05$ ) (Figura 14).



**Figura 14. Volumen promedio de raíces (cm<sup>3</sup>) de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) cv. Rio Grande inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y tratadas con los biocontroladores de forma individual y combinada y los demás tratamientos aplicados.**

Es necesario destacar que los mayores volúmenes de raíces se observaron en dos tratamientos de aplicación de *Bacillus* spp., los cuales fueron el tratamiento 6, como se describió anteriormente, seguido del tratamiento 5 (*Bacillus* spp. en semillero y trasplante) (77,87 cm<sup>3</sup>).

En otras investigaciones, se ha obtenido resultados similares, tal es el caso de Adebayo y Ekpo (2004), quienes emplearon *B. subtilis* para el control de la marchitez vascular en tomate e indican que al analizar filtrados de este antagonista se encontró que puede contener precursores de auxinas, como el ácido indol-3-pirúvico, induciendo resistencia sistémica y estimulando el crecimiento de las raíces de tomate en semillero. De igual manera, Lagunas y col. (2001) citada por Hernández-Castillo y col. (2008) señala que el tratamiento de semillas de tomate cv. Río Grande con *B. subtilis*, además de estimular la germinación en un 35%, incrementó el volumen de raíces en un 87% en comparación con el testigo.

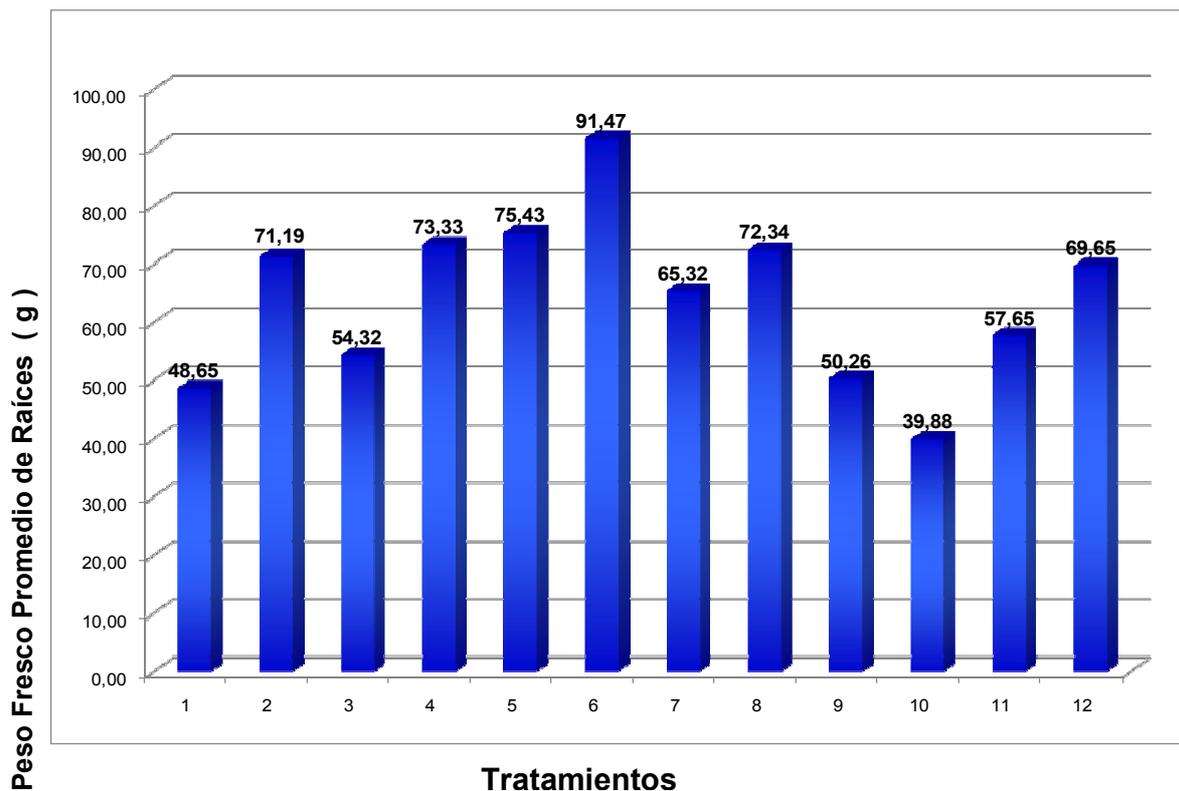
Abo-Elyousr y Mohamed (2009), quienes realizaron un ensayo con la aplicación de *Bacillus subtilis* para el control de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* en tomate cv. Prichard bajo condiciones de invernadero, indican que este antagonista actúa sobre el desarrollo radical de las plantas tratadas con el mismo aumentando tanto la longitud de los pelos radicales como el área de las raíces.

En contraste, Abeysinghe (2007) encontró un aumento del crecimiento del sistema radical de plantas de caraota inoculadas con *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* con la aplicación de *T. harzianum* (aislado RU01).

Carrillo-Castañeda y col. (2000) aplicando aislados de *Pseudomonas fluorescens* con capacidad antagónica de fitopatógenos en semillas de tomate var. Río Grande, encontraron que los volúmenes radicales obtenidos fueron reducidos, siendo éstos de 15,40 cm<sup>3</sup> para el aislado A7 y 17,30 cm<sup>3</sup> para el aislado A9m.

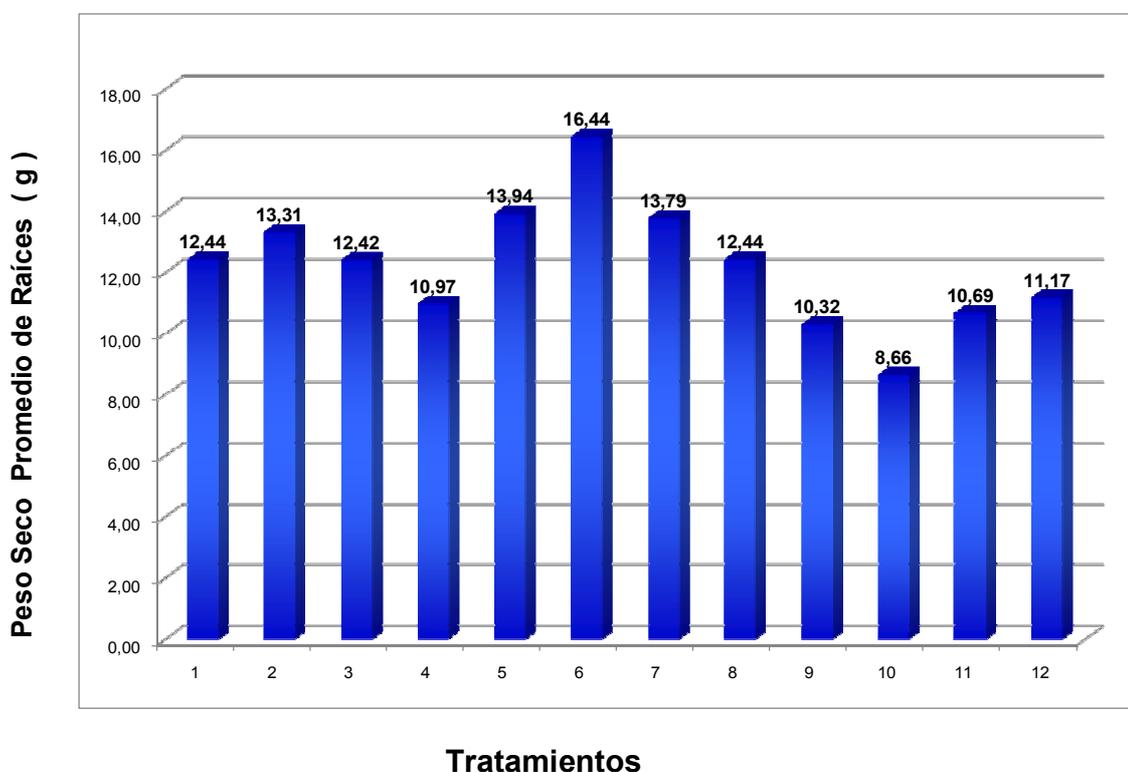
Zongzheng *et al* (2009) señalan que plantas de berenjena tratadas con *B. subtilis* (aislado SY1) para evaluar su efecto promotor del crecimiento, presentaron mayor desarrollo del sistema radical así como una mayor formación de raíces laterales, lo cual contribuye a una mayor absorción de agua y nutrientes.

En cuanto a la variable **peso fresco de raíces (g)**, el mayor peso se obtuvo con el tratamiento 6 (*Bacillus* spp. en semillero, trasplante y semanal) (91,47 g), mientras que el menor peso se observó en el tratamiento 10 (testigo inoculado) (39,88 g), no existiendo diferencias significativas entre todos los tratamientos aplicados ( $p>0.05$ ) (**Figura 15**). En lo referente a la correlación de esta variable con las demás, la misma fue positiva con el volumen y peso seco de raíces.



**Figura 15.** Peso fresco promedio de raíces (g) de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) cv. Rio Grande inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y tratadas con los biocontroladores de forma individual y combinada y los demás tratamientos aplicados.

En relación al **peso seco de raíces (g)**, no se encontró diferencias significativas entre los tratamientos aplicados ( $p > 0.05$ ), sin embargo, el mayor peso seco fue alcanzado en las plantas del tratamiento 6 (*Bacillus* spp. en semillero, trasplante y semanal) (16,44 g), seguido de los tratamientos 5 (*Bacillus* spp. en semillero y trasplante) (13,94 g) y 2 (*T. koningii* en semillero y trasplante) (13,31 g). El menor peso se registró en el tratamiento 10 (testigo inoculado) (8,66 g) (**Figura 16**). En cuanto a la correlación de esta variable con las demás, la misma fue positiva con el volumen y peso fresco de raíces.



**Figura 16. Peso seco promedio de raíces (g) de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) cv. Rio Grande inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y tratadas con los biocontroladores de forma individual y combinada y los demás tratamientos aplicados.**

En el caso de esta investigación, el tercer valor más alto del peso seco de raíces se obtuvo con la aplicación de *T. koningii* en semillero y trasplante. Resultados similares han sido reportados por otros investigadores, como Guigón y González (2004) quienes al aplicar *Trichoderma* spp. a una concentración de  $1 \times 10^7$  esporas/ml en plantas de pimentón para el control de *Phytophthora capsici*, encontraron que se incrementó la biomasa de las raíces en un 60%.

Herrera-Cid (2005) encontró un mayor peso fresco y seco de raíces en plantas de tomate tratadas con *Paenibacillus lentimorbus*, siendo el peso seco de 14,30 g, siendo superado este valor en esta investigación con la aplicación de *B. subtilis* en semillero, trasplante y semanal.

Respecto al efecto de los biocontroladores sobre el peso tanto fresco como seco del sistema radical, Adebayo y Ekpo (2004), indican que la aplicación de *B. subtilis* a la semilla de tomate propició un mayor desarrollo radical, encontrándose un mayor peso fresco de raíces, en contraste con la aplicación de *T. viride*, donde el peso fue menor.

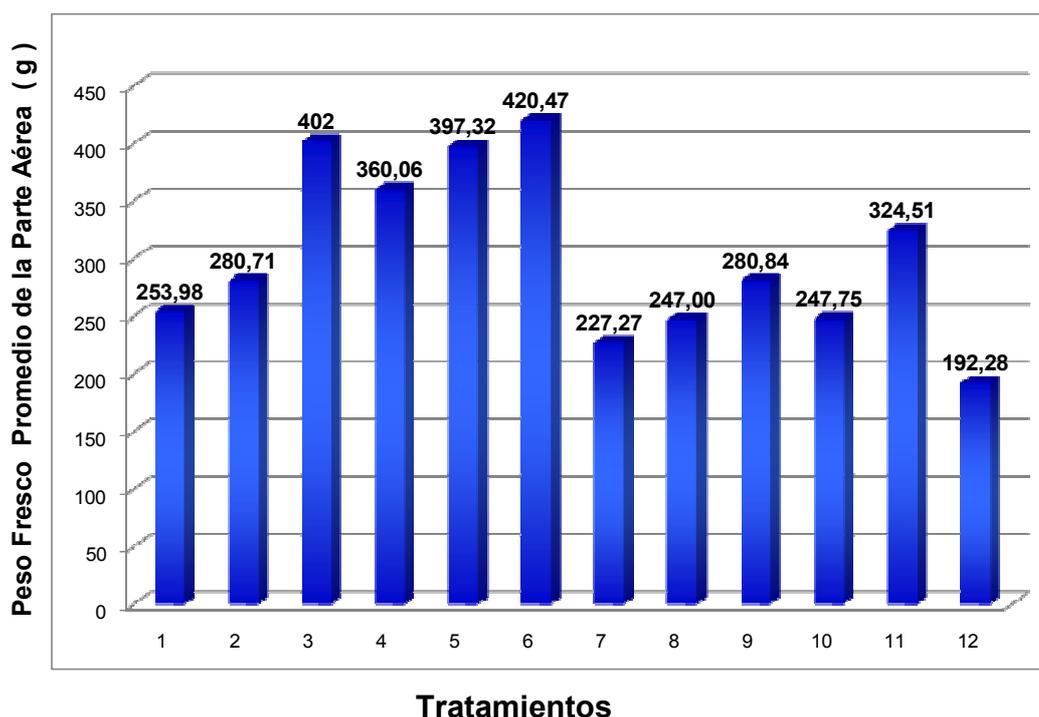
Hernández-Suárez y col. (2010) al aplicar *B. subtilis* en tomate cv. Floradade para el control de *Fusarium* sp. y *R. solani*, encontraron la mayor biomasa radicular (96.63 g) con el aislado B1J1M2, mientras que una de los menores valores de biomasa se obtuvo con el tratamiento químico con Tiabendazol (33,38 g).

De igual manera, Abo-Elyousr y Mohamed (2009) reportan incrementos en el peso fresco y seco de raíces de plantas de tomate cv. Prichard afectadas por *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, con la aplicación de *B. subtilis*.

Por otra parte, Turkey *et al* (2005) encontraron el mayor peso seco de raíces en plantas de tomate cv. Supermarmment afectadas por *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* con la aplicación conjunta de *B. subtilis* y *T. harzianum*.

La variable **peso fresco de la parte aérea (g)** mostró su máximo valor en el tratamiento 6 (*Bacillus* spp. en semillero, trasplante y semanal) (420,47 g), presentando este tratamiento diferencias con los demás ( $p < 0.05$ ), seguido del tratamiento 5 de *Bacillus* spp. en semillero y trasplante (397,32 g).

El menor peso se registró en el tratamiento 12 (Carbendazim en semillero, trasplante y semanal) (192,28 g), el cual también presentó diferencias con el resto de los tratamientos aplicados (**Figura 17**).



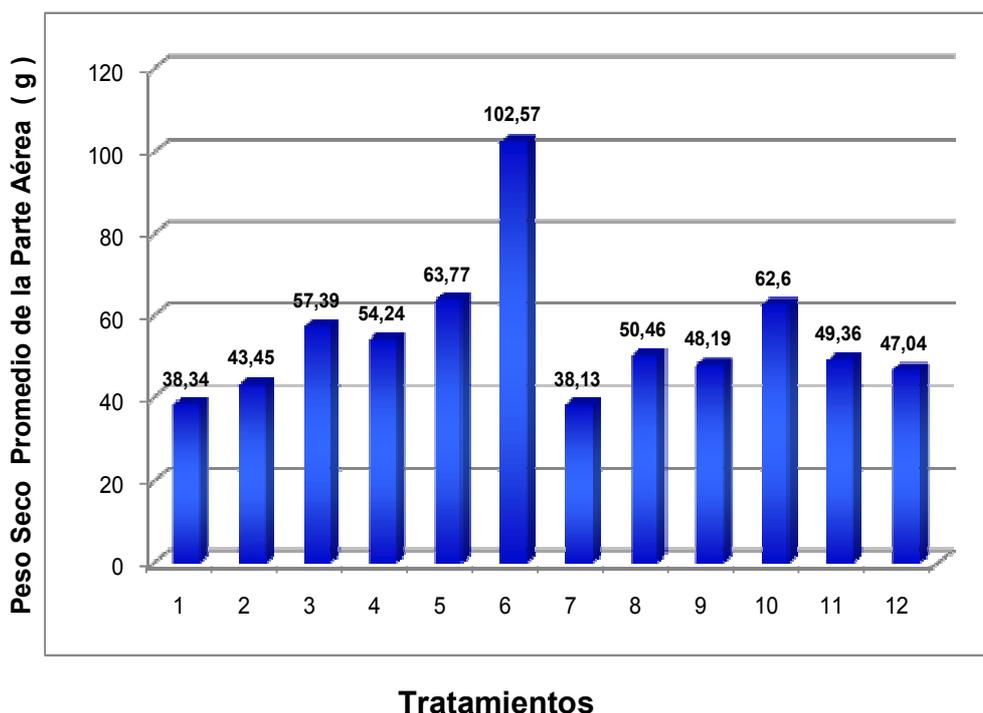
**Figura 17.** Peso fresco promedio de la parte aérea (g) de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) cv. Rio Grande inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y tratadas con los biocontroladores de forma individual y combinada y los demás tratamientos aplicados.

El peso fresco de la parte aérea de la planta presentó correlación positiva tanto con la altura de plantas como con el número de frutos.

Esto resulto lógico dado que la aplicación al suelo de antagonistas de los géneros *Bacillus* y *Trichoderma*, sea de forma individual o conjunta, induce un incremento en la tasa de emergencia de plántulas, altura de las plantas, área foliar, peso fresco y peso seco; es decir, que la aplicación de los biocontroladores no sólo ofrece un efecto protectorio contra patógenos del suelo sino que además contribuye a la expresión positiva de las variables de la planta, tanto en fase vegetativa como reproductiva.

La variable **peso seco de la parte aérea (g)** expresó su máximo valor con el tratamiento 6 (*Bacillus* spp. en semillero, trasplante y semanal) (102,57 g), el cual se diferencia del resto de los tratamientos.

No existen diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los tratamientos 2 (*T. koningii* en semillero y trasplante) (43,45 g), 1 (*T. koningii* en trasplante) (38,34 g) y 7 (*T. koningii* + *Bacillus* spp. en semillero) (38,13 g), siendo éstos los menores valores encontrados para la variable. Es importante destacar que los tratamientos 6 (*Bacillus* spp. en semillero, trasplante y semanal) y 5 (*Bacillus* spp. en semillero y trasplante), propician un notable desarrollo de biomasa en las plantas tratadas. **(Figura 18).**



**Figura 18. Peso seco promedio de la parte aérea (g) de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) cv. Río Grande inoculadas con *F. oxysporum* f. *sp. lycopersici* y tratadas con los biocontroladores de forma individual y combinada y los demás tratamientos aplicados.**

En investigaciones similares, Adebayo y Ekpo (2004) encontraron mayor peso fresco de la parte aérea en plantas de tomate desarrolladas a partir de semillas tratadas con *B. subtilis*.

Por otra parte, Lagunas y col. (2001), encontraron mayor peso seco de la parte aérea previa aplicación de *B. subtilis* a las semillas de tomate cv. Río Grande, al igual que Hernández-Suárez y col. (2010) quienes obtuvieron el mayor peso seco de hojas con la aplicación de los aislados B1 y J1 del antagonista en tomate cv. Floradade con valores máximos de 116,41g y 107,57 g, respectivamente.

Xin *et al* (2009) explican que la aplicación de *Bacillus subtilis* mejora las propiedades físicas del suelo, incrementa la absorción de nutrientes y acelera el crecimiento de las plantas, además de presentar efecto antifúngico, tal y como lo observaron en plantas de berenjena cultivadas bajo condiciones controladas tratadas con el antagonista, encontrando el mayor peso seco de las mismas con dicho tratamiento.

Morsy *et al* (2009) señalan que en plantas de tomate var. Castle inoculadas con *Fusarium solani*, se encontró el mayor peso tanto fresco como seco de plantas con la aplicación conjunta de *B. subtilis* y *T. viride*, siendo éstos valores superiores a los obtenidos con el tratamiento químico (Vitavax). De igual manera, al aplicar los antagonistas de forma individual, se obtuvo los mayores pesos con la aplicación de *B. subtilis* en comparación con *T. viride*.

Turky *et al* (2005) en plantas de tomate cv. Supermanmment inoculadas con *F.oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* y tratadas con *B. subtilis*, observó incrementos significativos del peso fresco y seco de las mismas en comparación con las plantas testigo.

Destaca en el caso particular de este trabajo, que para las variables analizadas, el tratamiento 6 (*Bacillus* spp. en semillero, trasplante y semanal), fue el más efectivo lo cual evidencia que la dosis del biocontrolador aplicada con mayor frecuencia, ejerce un mejor control de este patógeno vascular, que suele afectar a las plantas jóvenes.

Esta última característica hace necesaria la protección de las plantas tanto en semillero como en sus primeros estadios a fin de evitar la muerte de las plántulas antes de culminar el ciclo del cultivo.

### 5.6.2.2.- Evaluación de variables reproductivas.

Para las variables de fruto, se tomaron las mediciones realizadas en cada cosecha. Las variables fueron analizadas vía no paramétrica, aplicando el análisis de varianza de Kruskal-Wallis con su respectiva prueba de medias ( $p = 0.05$ ) (**Cuadro 7**). Se muestran también los coeficientes de variación (C.V.) obtenidos para cada una de estas variables (**Cuadro 8**).

**Cuadro 7. Análisis de varianza de Kruskal-Wallis con su respectiva prueba de medias para las variables de los frutos de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) cv. Rio Grande inoculadas con *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y tratadas con los biocontroladores de forma individual y combinada y los demás tratamientos aplicados.**

Diámetro de Frutos (cm)	Peso de Frutos (g)	Número de Frutos por planta
T <sub>11</sub> 13,41 a	T <sub>11</sub> 77,91 a	T <sub>6</sub> 11,10 a
T <sub>12</sub> 12,75 a	T <sub>4</sub> 72,00 a	T <sub>5</sub> 10,75 ab
T <sub>3</sub> 12,75 a	T <sub>3</sub> 65,75 a	T <sub>4</sub> 8,50 ab
T <sub>9</sub> 12,31 a	T <sub>2</sub> 63,51 ab	T <sub>3</sub> 7,50 ab
T <sub>2</sub> 12,18 a	T <sub>9</sub> 61,56 ab	T <sub>2</sub> 6,12 ab
T <sub>8</sub> 12,09 a	T <sub>1</sub> 59,16 ab	T <sub>9</sub> 7,00 ab
T <sub>5</sub> 11,78 a	T <sub>5</sub> 55,81 ab	T <sub>1</sub> 5,25 ab
T <sub>7</sub> 11,78 a	T <sub>8</sub> 55,90 ab	T <sub>7</sub> 6,11 ab
T <sub>4</sub> 10,73 a	T <sub>7</sub> 52,34 ab	T <sub>8</sub> 4,55 ab
T <sub>1</sub> 11,70 a	T <sub>6</sub> 50,72 ab	T <sub>11</sub> 3,60 ab
T <sub>6</sub> 11,62 a	T <sub>12</sub> 35,62 ab	T <sub>10</sub> 3,25 ab
T <sub>10</sub> 10,81 a	T <sub>10</sub> 28,63 b	T <sub>12</sub> 2,62 b

\*Las letras iguales significan que no existen diferencias significativas entre tratamientos.  $\alpha = 0.05$

T<sub>1</sub>: *Trichoderma* spp. Semillero (TrS), T<sub>2</sub>: *Trichoderma* spp. Semillero y Trasplante (TrST), T<sub>3</sub>: *Trichoderma* spp. Semillero, Trasplante y Semanal (TrSTS), T<sub>4</sub>: *Bacillus* spp. Semillero (BS), T<sub>5</sub>: *Bacillus* spp. Semillero y Trasplante (BST), T<sub>6</sub>: *Bacillus* spp. Semillero, Trasplante y Semanal (BSTS), T<sub>7</sub>: *Trichoderma* spp. + *Bacillus* spp. Semillero (TrBS), T<sub>8</sub>: *Trichoderma* spp. + *Bacillus* spp. Semillero y Trasplante (TrBST), T<sub>9</sub>: *Trichoderma* spp. + *Bacillus* spp. Semillero, Trasplante y Semanal (TrBSTS), T<sub>10</sub>: Testigo inoculado (TI), T<sub>11</sub>: Testigo sin inocular (TSI), T<sub>12</sub>: Fungicida (Carbendazim) Semillero, Trasplante y Semanal. (CSTS).

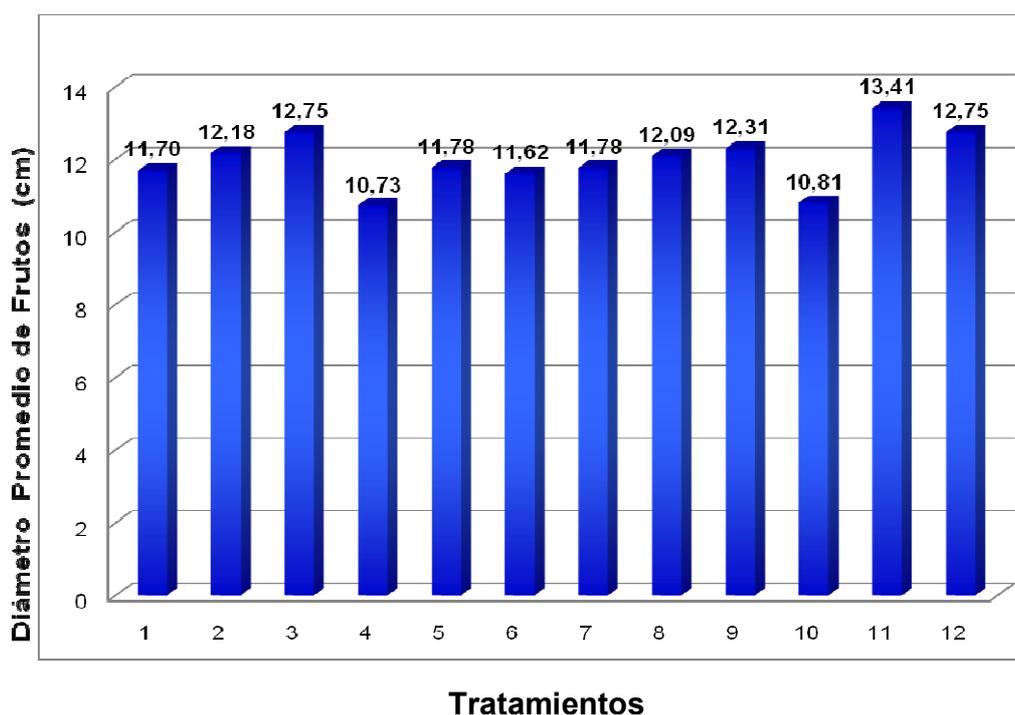
**Cuadro 8. Coeficientes de variación para las variables de los frutos de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) cv. Rio Grande inoculadas con *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y tratadas con los biocontroladores de forma individual y combinada y los demás tratamientos aplicados.**

Tratamiento	Diámetro de Frutos (cm)	Peso de Frutos (g)	Número de Frutos por planta
T <sub>1</sub>	14.57	43.56	69.61
T <sub>2</sub>	17.63	54.79	23.80
T <sub>3</sub>	11.90	38.24	55.13
T <sub>4</sub>	38.48	40.47	61.69
T <sub>5</sub>	18.29	49.11	61.25
T <sub>6</sub>	18.06	61.19	62.91
T <sub>7</sub>	18.76	63.59	103.96
T <sub>8</sub>	17.48	59.74	124.23
T <sub>9</sub>	15.90	54.55	90.85
T <sub>10</sub>	9.07	54.71	58.24
T <sub>11</sub>	11.21	50.56	89.00
T <sub>12</sub>	10.89	33.91	103.71

T<sub>1</sub>: *Trichoderma* spp. Semillero (TrS), T<sub>2</sub>: *Trichoderma* spp. Semillero y Trasplante (TrST), T<sub>3</sub>: *Trichoderma* spp. Semillero, Trasplante y Semanal (TrSTS), T<sub>4</sub>: *Bacillus* spp. Semillero (BS), T<sub>5</sub>: *Bacillus* spp. Semillero y Trasplante (BST), T<sub>6</sub>: *Bacillus* spp. Semillero, Trasplante y Semanal (BSTS), T<sub>7</sub>: *Trichoderma* spp. + *Bacillus* spp. Semillero (TrBS), T<sub>8</sub>: *Trichoderma* spp. + *Bacillus* spp. Semillero y Trasplante (TrBST), T<sub>9</sub>: *Trichoderma* spp. + *Bacillus* spp. Semillero, Trasplante y Semanal (TrBSTS), T<sub>10</sub>: Testigo inoculado (TI), T<sub>11</sub>: Testigo sin inocular (TSI), T<sub>12</sub>: Fungicida (Carbendazim) Semillero, Trasplante y Semanal. (CSTS).

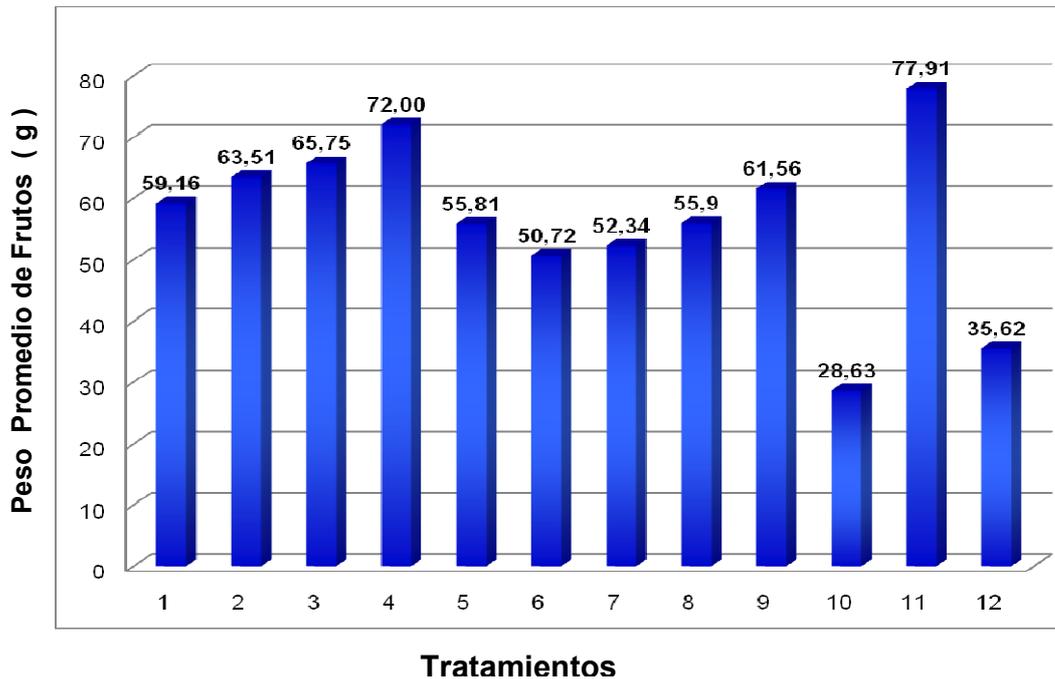
Como se observa, los coeficientes de variación son relativamente bajos para la primera variable, la cual presentó medidas similares en cada evaluación realizada para cada tratamiento, mientras que para el peso de los frutos y el número de frutos por planta, los coeficientes de variación son elevados; esto puede deberse al hecho de en cada cosecha efectuada, se obtuvo un número distinto de frutos, que a su vez presentaban diferencias en relación al peso, lo cual produce un incremento en dichos coeficientes.

Para la variable **diámetro de frutos (cm)**, no se encontraron diferencias significativas entre la totalidad de los tratamientos aplicados ( $p>0.05$ ), sin embargo, se observó el mayor diámetro en los frutos correspondientes al tratamiento 11 (testigo sin inocular) (13,41 cm). El menor diámetro se registró en los frutos de los tratamientos 10 (testigo inoculado) (10,81 cm) y 4 (*T. koningii* aplicado en semillero) (10,73 cm) (**Figura 19**).



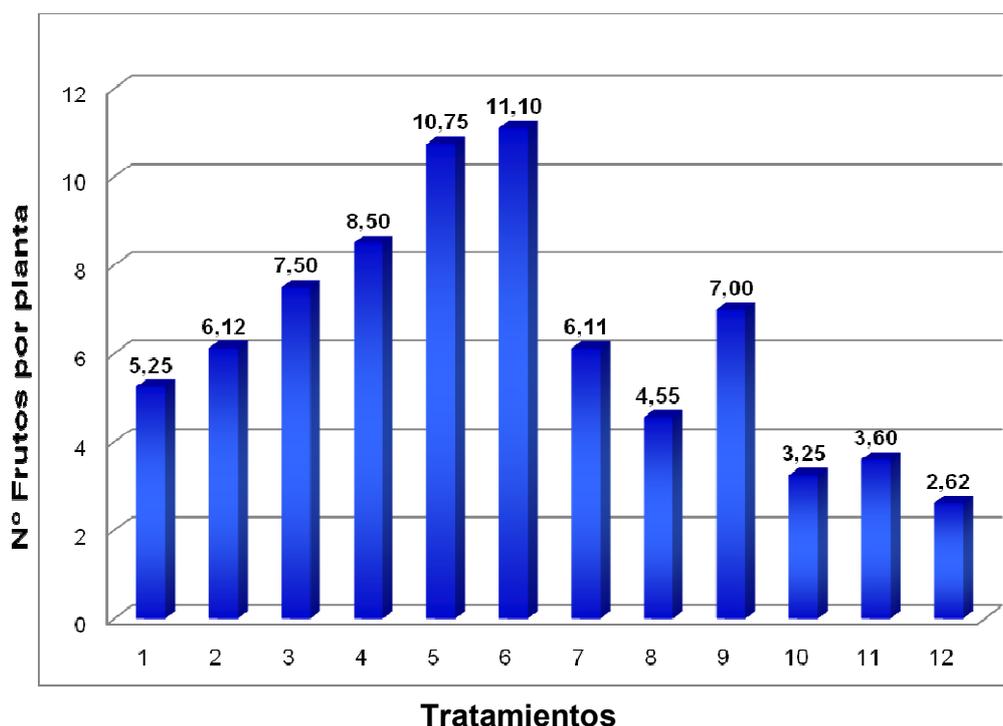
**Figura 19. Diámetro promedio de frutos (cm) de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) cv. Rio Grande inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y tratadas con los biocontroladores de forma individual y combinada y los demás tratamientos aplicados.**

En relación al **peso de frutos (g)**, se observó el mayor valor en los frutos correspondientes al tratamiento 11 (testigo sin inocular) (77,91 g), no encontrándose diferencias significativas ( $p>0.05$ ) entre éste y los tratamientos 4 (*Bacillus* spp. en semillero) (72,00 g) y 3 (*Trichoderma* spp. en semillero, trasplante y semanal) (65,75 g). El menor valor se registró con el tratamiento 10 (testigo inoculado) (35,62 g). (**Figura 20**).



**Figura 20. Peso promedio de frutos (g) de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) cv. Rio Grande inoculadas con *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y tratadas con los biocontroladores de forma individual y combinada y los demás tratamientos aplicados.**

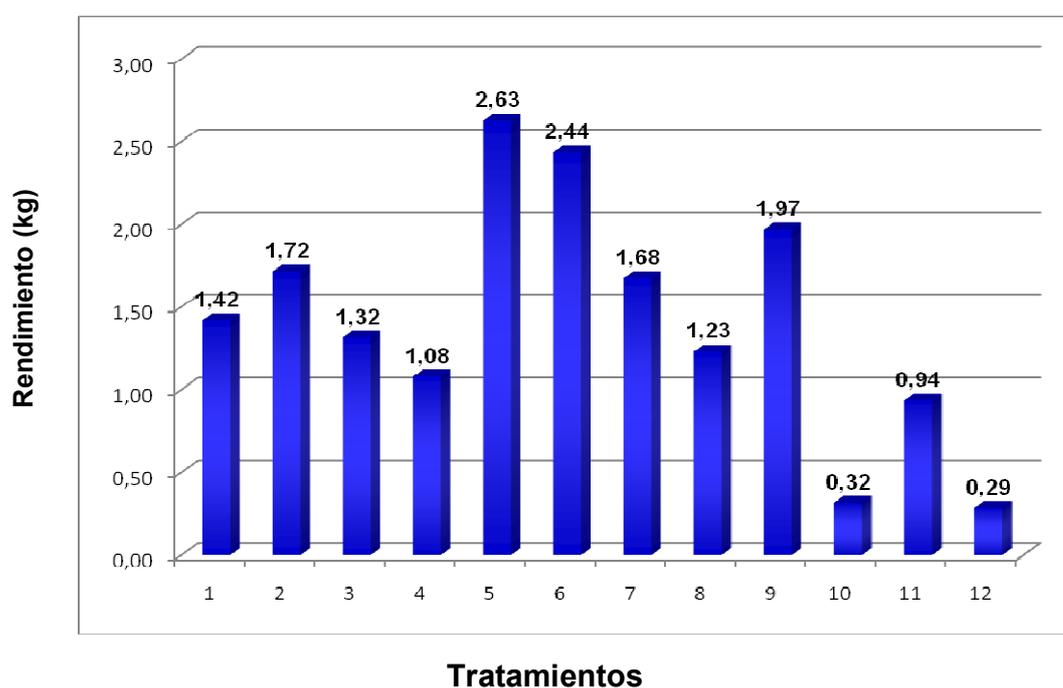
Para la variable **número de frutos por planta**, se observó que el mayor valor se obtuvo con el tratamiento 6 (*Bacillus* spp. en semillero, trasplante y semanal), (11,00). Este tratamiento presentó diferencias significativas con el resto de los tratamientos ( $p > 0.05$ ), excepto con el tratamiento 12 (Carbendazim en semillero, trasplante y semanal), el cual presentó el menor número de frutos por planta (2,62). (Figura 21).



**Figura 21. Número de frutos promedio por planta de tomate (*Lycopersicon esculentum*) cv. Rio Grande inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y tratadas con los biocontroladores de forma individual y combinada y los demás tratamientos aplicados.**

Esta variable presentó correlación positiva con la altura de las plantas, la longitud de raíces y el peso fresco de la parte aérea, la cual resulta lógica, ya que la planta al contar con una mayor superficie radical es capaz de realizar una absorción más efectiva de agua y nutrientes, lo que mejora su crecimiento vegetativo y una vez alcanzada la fase reproductiva, tanto la floración como el llenado del fruto ocurre de manera más eficiente.

La variable **rendimiento (kg)**, expresó su mayor valor con el tratamiento 5 (*Bacillus* spp. en semillero y trasplante), seguido del tratamiento 6 (*Bacillus* spp. en semillero, trasplante y semanal) (2,63 kg). En este caso, el menor rendimiento fue obtenido con el tratamiento 12 (Carbendazim en semillero, trasplante y semanal), (0,29 kg) seguido de los tratamientos 10 (testigo inoculado) (0,32 kg) y 11 (testigo sin inocular) (0,94 kg). **(Figura 22).**



**Figura 22. Rendimiento (kg) de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) cv. Río Grande inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y tratadas con los biocontroladores de forma individual y combinada y los demás tratamientos aplicados.**

Carrillo-Castañeda y col. (2000) encontró que parcelas de tomate var. Río Grande tratadas con el aislado A9m de *P. fluorescens*, registraron un 45% más de producción, obteniendo 6 kg por parcela útil en comparación con la producción de plantas que no fueron tratadas y cuya producción promedio alcanzó 4,2 kg.

Por otra parte, Guillén y col. (2006) al tratar plantas de pimentón cv. Caballero en cultivadas en invernadero con *B. subtilis*, encontraron mayor producción de frutos, superando en 144% la producción de las plantas testigo. Estos resultados son similares a los obtenidos en esta investigación, donde el mayor número de frutos se encontró en el tratamiento 6 (*Bacillus* spp. aplicado en semillero, trasplante y semanal).

Mayores rendimientos con la aplicación de *Bacillus* spp. también han sido reportados en papa cultivada en campo, donde Hernández-Castillo y col. (2008) encontraron incrementos de hasta 117% con la aplicación conjunta de tres aislados de este antagonista.

Hernández-Suárez y col. (2010) trabajando con tomate cv. Floradade señalan que los tratamientos con *Bacillus* spp. estimularon significativamente el rendimiento, ya que el aislado J1 reportó en promedio 600 g por planta, mientras que el testigo sólo 180 g por planta, lo cual representa una diferencia de 70%.

Por su parte, Santiago y col. (1998) en un trabajo realizado para evaluar los componentes de rendimiento de diferentes genotipos de tomate, registra para el cv. Río Grande, un rendimiento promedio de 1,76 kg/planta, siendo éste valor superado en el caso de esta investigación, con el tratamiento 5 (*Bacillus* spp. aplicado en semillero y trasplante) donde se obtuvo un rendimiento promedio de 2,63 kg/planta.

Mena-Violante y col. (2009) señalan que en tomate cv. Río Fuego tratado con *B. subtilis* (aislado BS13), el rendimiento por planta fue 28% mayor que el del testigo, además de observar que el peso y diámetro de los frutos también fue mayor con la aplicación del antagonista.

Por otra parte, Morsy *et al* (2009) en tomate var. Castle registraron el mayor rendimiento con *B. subtilis*, a diferencia del tratamiento con *T. viride*. Con la aplicación conjunta de ambos antagonistas, observaron un aumento significativo con respecto a las aplicaciones individuales y aplicando los antagonistas sea de forma individual o conjunta, reportan un mayor número de frutos en comparación con las plantas testigo. Resultados similares encontraron Turkey *et al* (2009) en tomate cv. Supermanment, con un mayor rendimiento aplicando conjuntamente *B. subtilis* y *T. harzianum*.

## VI. CONCLUSIONES

- ❖ El aislado de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* obtenido de la zona productora de tomate de Tucutunemo, estado Aragua muestreada resultó patogénico en tomate cv. Río Grande, ocasionando un 60% de mortalidad de las plantas testigo inoculadas con el mismo.
  
- ❖ Se obtuvieron 22 aislados de *Trichoderma* spp. y 15 aislados de *Bacillus* spp. de las zonas agrícolas del estado Aragua muestreadas para el control de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, seleccionados como más promisorios los aislados identificados como BMII y PB1, respectivamente.
  
- ❖ Los aislados más efectivos de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. fueron identificados taxonómicamente como *Trichoderma koningii* y *Bacillus* spp., respectivamente.
  
- ❖ El control del marchitamiento vascular causado por el hongo *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* fue más efectivo con los tratamientos 6 (*Bacillus* spp. en semillero, trasplante y semanal) y 9 (*Bacillus* spp. y *T. koningii* en semillero, trasplante y semanal), siendo nula la mortalidad de plantas en ambos tratamientos.

- ❖ Las variables vegetativas volumen, peso fresco y peso seco de raíces, peso fresco y peso seco de la parte aérea de las plantas inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* se favorecieron con el tratamiento 6 (*Bacillus* spp. en semillero, trasplante y semanal), excepto las variables altura de las plantas y longitud de raíces.
  
- ❖ En el caso de las variables reproductivas, el mayor número de frutos se presentó en el tratamiento 6 (*Bacillus* spp. en semillero, trasplante y semanal), el mayor rendimiento se obtuvo con el tratamiento 5 (*Bacillus* spp. en semillero y trasplante) y los mayores valores de diámetro y peso de frutos se obtuvieron en el tratamiento 11 (testigo sin inocular).

## VII. RECOMENDACIONES

- ❖ El uso de *Bacillus* spp. de forma individual y en conjunto con *T. koningii* se recomienda para el control del patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en el cultivo de tomate cv. Río Grande bajo condiciones de umbráculo.
- ❖ Se recomienda la aplicación de *Bacillus* spp. en los tres momentos de aplicación evaluados: semillero, trasplante y semanal, a fin de proteger adecuadamente el cultivo contra el efecto del patógeno antes mencionados y garantizar una eficiente producción de frutos, de calidad comercial y de mayor aceptabilidad por el consumidor.
- ❖ Para el control de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* en tomate cv. Río Grande, se recomienda evaluar bajo condiciones de campo, los biocontroladores *Trichoderma koningii* y *Bacillus* spp. aplicados en semillero, trasplante y semanalmente.
- ❖ Es necesario realizar un estudio continuo de los efectos de los biocontroladores sobre cultivos de interés agrícola, dado que la incorporación de éstos en el suelo favorece la productividad, con mayores rendimientos y mayor protección del cultivo en el tiempo contra el ataque de fitopatógenos, todo ello de forma cónsona con el medio ambiente, garantizando mejores condiciones de salud y seguridad ocupacional en el campo, así como mayor seguridad y confianza en el consumidor final de los productos agrícolas.
- ❖ Se recomienda determinar la relación entre *Trichoderma* spp. y *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* desde el punto de vista anatómico.

### VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEYSINGHE, S. 2007. Biological control of *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* the causal agent of root rot of bean using *Bacillus subtilis* CA32 and *Trichoderma harzianum* RU01. *Ruhuna Journal of Science*. 2:82-88.
- ABO-ELYOUSR, K; MOHAMED, H. 2009. Biological control of *Fusarium* wilt in tomato by plant growth-promoting yeasts and rhizobacteria. *Plant Pathol. J.* 25(2):199-204.
- ADEBAYO, O; EKPO, E. 2004. Efficacy of fungal and bacterial biocontrol organisms for the control of *Fusarium* wilt of tomato. *Nigerian Journal of Horticultural Science*. 9:63-68.
- AGRIOS, G. 2005. *Plant Pathology*. 5th Ed. Elsevier Academic Press. U.S.A. 922 p.
- ANZOLA, D; ROMÁN, G. 1982. Evaluacion de la tolerancia de cultivares de tomate a diversas razas de *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici*. *Agronomía Tropical*. 32(1-6): 261-272.
- ARCIA, M. 2003. *El Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades. Consideraciones Y Estrategias Generales*. En: *Curso Manejo Integrado de Enfermedades*. Maracay, Venezuela. 11 p.

- ASLIM, B; SAGLAM, N; BEYATLI, Y. 2002. Determination of some properties of *Bacillus* isolated from soil. Turk. J. Biol. 26:41-48.
- ATTITALLA, I; JOHANSSON, P; BRISHAMMAR, S; GERHARDSON, B. 2001. *Pseudomonas* sp. strain MF30 suppresses *Fusarium* wilt of tomato *in vivo*. *Phytopathol. Mediterr.* 40:234-239.
- BOCHOW, H; EL-SAYED, S; JUNGE, H; STAVROPOULOU, A; SCHMIEDEKNECHT, G. 2001. Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. IV. Salt-stress tolerance induction by *Bacillus subtilis* FZB24 seed treatment in tropical vegetable field crops, and its mode of action. *Journal of Plant Diseases and Protection*. Stuttgart, Germany. 108(1):21-30.
- BOOTH, C. 1977. *Fusarium*: Laboratory guide identification of the major species. Commonwealth Mycological Institute. United Kingdom. 58 p.
- CALVO, P; ORMEÑO-ORRILLO, E; MARTÍNEZ-ROMERO, E; ZÚÑIGA, D. 2010. Characterization of *Bacillus* isolates of potato rhizosphere from andean soils of Peru and their potential PGPR characteristics. *Brazilian Journal of Microbiology*. 41:899-906.
- CARRILLO-CASTAÑEDA, G; JUÁREZ-MUÑOZ, J; RUIZ-LANDA, D; MÜLLER-GARCÍA, R. 2000. Aumento del rendimiento de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) cuando la raíz se desarrolla colonizada por microorganismos. *Biotechnología Aplicada*. México. 17:171-176.

- CASADO, A; FERNÁNDEZ, M. 1998. Estudio in vitro sobre la fertilización natural de pastizales. Suelos de la Sierra de Guadarrama. España. *Edafología*. 5:121-128.
- CUERVO, J. 2010. Aislamiento y caracterización de *Bacillus* spp. como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales. Tesis de Grado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas. Bogotá, Colombia. 35 p.
- DAVIS, M; DINHAM, B. 2002. [22 marzo 2013]. Producción sostenible de tomate. Reseñas sobre el manejo de plagas. N° 13. Pesticidas Action Network. Londres, Reino Unido. [ en línea ] <http://www.pan-uk.org/archive/Internat/IPMinDC/Spanish8.pdf>
- DE CAL, A; PASCUAL, S; LARENA, I; MELGAREJO, P. 1995. Biological control of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *Plant Pathology*. 44: 909-917.
- DE LA CRUZ, J; HIDALGO-GALLEGO, A; LORA, J; BENITEZ, T; PINTOR-TORO, J. 1992. Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. *Eur. J. Biochem.* 206: 859-867.
- DÍAZ POLANCO, C; CASTRO, J. 1977. Estudios sobre el control biológico de *Sclerotium rolfsii*. *Agronomía Tropical*. 27 (5): 539-547.

- ESCALONA, V; ALVARADO, P; MONARDES, H; URBINA, C; MARTIN, A. 2009. Manual de cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de Chile. 60 p.
- FAO. 2006. [24 mayo 2013]. Tomate (*Lycopersicon esculentum*). Fichas Técnicas. Productos frescos y procesados. [ en línea ] [http://www.fao.org/inpho\\_archive/content/documents/vlibrary/AE620s/Pfrescos/TOMATE.HTM](http://www.fao.org/inpho_archive/content/documents/vlibrary/AE620s/Pfrescos/TOMATE.HTM)
- FAO. 2012. [04 marzo 2013]. Tomato: Area Harv, Yield and Production. FAOSTAT Database Results. [en línea]. <http://www.fao.org>
- FERNÁNDEZ-HERRERA, E; ACOSTA, M; PONCE, F; PINTO, V. 2007. Manejo biológico de *Phytophthora capsici* Leo., *Fusarium oxysporum* Schlechtend. Fr. y *Rhizoctonia solani* Kühn en jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Revista Mexicana de Fitopatología. 25(1).35-42.
- FERNÁNDEZ LARREA-VEGA, O. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Avances en el fomento de productos fitosanitarios no sintéticos. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica). 62: 96-100.
- FRAVEL, D; OLIVAIN, C; ALABOUVETTE, C. 2003. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. Research review. New Phytologist. 157: 493-502.
- FRITZE, D. 2004. Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: the aerobic endospore-forming bacteria. Phytopathology. 94:1245-1248.

- GONZÁLEZ, I; ARIAS, Y; PETEIRA, B. 2012. Aspectos generales de la interacción *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*-tomate. Rev. Protección Veg. 27(1): 1-7.
- GRONDONA, I; HERMOSA, M.R; GOMISI, M.D; GARCÍA BENAVIDES, P; GARCÍA-ACHA, I; MONTE, E. 1995. Control Biológico de hongos del suelo que afectan a las semillas y plántulas. En: Alternativas del bromuro de metilo en la agricultura. Seminario Internacional. Junta de Andalucía. Conserjería de Agricultura y Pesca. Colección Congresos y Jornadas. Nº 44-97. Almería, España. pp. 43-53.
- GUIGÓN, C; GONZÁLEZ, P. 2004. Selección de cepas nativas de *Trichoderma* spp. con actividad antagónica sobre *Phytophthora capsici* Leonian y promotoras de crecimiento en el cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.). Revista Mexicana de Fitopatología. 22(1): 117-124.
- GUILLEN, R; HERNÁNDEZ, F; MORALES, G; RODRÍGUEZ, R; AGUILAR, C; PADRÓN, E; REYES, M. 2006. *Bacillus* spp. como biocontrol en un suelo infestado con *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora capsici* Leonian y su efecto en el desarrollo y rendimiento del cultivo de chile. Revista Mexicana de Fitopatología. 24(2): 105-114.
- HARMAN, G.E. 2001. [04 marzo 2013]. *Trichoderma* spp., including *T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. hamatum* and other spp. Deuteromycetes, Moniliales (asexual classification system). Biological Control: A guide to natural enemies in North America. Cornell University. [en línea]. <http://www.biocontrol.entomology.cornell.edu/pathogens/trichoderma.html>

- HARMAN, G.E; HOWELL, C; VITERBO, A; CHET, I; LORITO, M. 2004. *Trichoderma* species: opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews*. 2: 43-55.
  
- HERNÁNDEZ-CASTILLO, F; LIRA-SALDIVAR, R; CRUZ-CHÁVEZ, L; GALLEGOS-MORALES, G; GALINDO-CEPEDA, M; PADRÓN-CORRAL, E; HERNÁNDEZ-SUÁREZ, M. 2008. Potencial antifúngico de cepas de *Bacillus* spp. y extracto de *Larrea tridentata* contra *Rhizoctonia solani* en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.). *Phyton. Revista Internacional de Botánica Experimental*. 77: 241-252.
  
- HERNÁNDEZ-SUÁREZ, M; HERNÁNDEZ-CASTILLO, F; LIRA-SALDIVAR, R; GALLEGOS-MORALES, G. 2010. Biocontrol de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium* sp. con microencapsulados de *Bacillus subtilis* y su efecto en crecimiento y rendimiento de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Revista Agraria Nueva Época. México*. 7.17-25.
  
- HERRERA-CID, R. 2005. [11 junio 2013]. Control biológico de *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *Fusarium solani* en tomates bajo invernaderos. Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de Chile. Biblioteca Digital de la Universidad de Chile. [en línea]. [http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias\\_agronomicas/montealegre\\_j/14.html](http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_agronomicas/montealegre_j/14.html)
  
- HIBAR, K; DAAMI-REMADI, M; EL MAHJOUB, M. 2007. Induction of resistance in tomato plants against *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* by *Trichoderma* spp. *Tunisian Journal of Plant Protection* 2:47-58.

- INDEX FUNGORUM. 2008. [04 marzo 2013]. [en línea].  
<http://www.indexfungorum.org>
- JIMÉNEZ, C; SANABRIA, N. 2008. Población final de *Trichoderma harzianum* en el control de la marchitez vascular en tomate causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Fitopatología Venezolana. 21:29-30.
- JONES, J.P. 2001. La Fusariosis vascular del tomate. En: JONES, J.B; JONES, J.P; STALL, R.E; ZITTER, T.A. Plagas y Enfermedades del Tomate. The American Phytopathological Society. Ediciones Mundi-Prensa. México. pp. 15.
- KILLIAN, M; STEINER, U; KREBS, B; JUNGE, H; SCHMIEDEKNECHT, G; HAIN, R. 2000. FZB24® *Bacillus subtilis*- mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer. 1(1):72-93.
- LAGUNAS, J; ZAVALETA-MEJÍAS, E; OSADA, S; ARANDA, S; LUNA, I; VAQUERA, H. 2001. *Bacillus firmus* como agente de control biológico de *Phytophthora capsici* Leo. en jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Revista Mexicana de Fitopatología. 19(1):57-65.
- LESLIE, J; SUMMERELL, B. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Publishing. Iowa, U.S.A. 388 p.
- LUGO, Z. 1998. Identificación de razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder & Hansen procedentes de algunas zonas productoras del estado Aragua y Norte de Guárico. Tesis de Maestría. Fac. Agronomía. U.C.V. Maracay, Venezuela. 100 p.

- LUGO, Z; DÍAZ, A. SANABRIA, N. 2001. Diversidad genética en aislamientos de dos razas de *F. oxysporum*. Fitopatología Venezolana. 14:26-30.
- MADIGAN, M; MARTINKO, J; STAHL, D; CLARK, D. 2012. Biology of Microorganisms. 13th Ed. Benjamin Cummings. Pearson Education. Illinois. U.S.A. 1155 p.
- MATAS, A. 2005. Estudio de los factores incidentes en el agrietado del fruto de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) tipo cereza: el papel de la cutícula del fruto. Tesis Doctoral. Universidad de Málaga. España. 226 p.
- MENA-VIOLANTE, H; CRUZ-HERNÁNDEZ, A; PAREDES-LÓPEZ, O; GÓMEZ-LIM, M; OLALDE-PORTUGAL, V. 2009. Cambios relacionados con textura de frutos y mejoramiento de la vida de anaquel por la inoculación de raíces de tomate con *Bacillus subtilis* BEB-13BS. Agrociencia. 43: 559-567.
- MENTEN, L; MACHADO, C; MINUSSI, E; CASTRO, C; KIMATI, H. 1976. Efecto de algunos fungicidas en el crecimiento micelial de *Macrophomina phaseolina* (Tass) *in vivo*. Revista de Fitopatología Brasileña 1:57-66.
- MOJICA-MARÍN, V; LUNA-OLVERA, H; SANDOVAL-CORONADO, C; PEREYRA-ALFEREZ, B; MORALES-RAMOS, L; GONZÁLEZ-AGUILAR, N; HERNÁNDEZ-LUNA, C; ALVARADO-GÓMEZ, O. 2009. Control biológico de la marchitez del chile (*Capsicum annuum* L.) por *Bacillus thuringiensis*. Phyton. Revista Internacional de Botánica Experimental. 78:105-110.
-

- MÖLLER-HOLTKAMP, E. 2009. Efecto de dos formulaciones biológicas sobre poblaciones de *Erwinia carotovora* (Dye) Hall en un cultivo de calas (*Zantedeschia* spp.). Tesis de Grado. Universidad Austral de Chile. Escuela de Agronomía. Chile. 59 p.
  
- MONROY, L. 2009. Identificación de hongos fitopatógenos y antagonistas asociados a la especie roble (*Quercus humboldtii*) en los Municipios Encino (Santander), Arcabuco y Tipacoque (Boyacá). Proyecto “Corredor de conservación de robles, una estrategia para la conservación y el manejo forestal en Colombia”. Fundación Natura. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. 41 p.
  
- MORSY, E; ABDEL-KAWI, K; KHALIL, M. 2009. Efficiency of *Trichoderma viride* and *Bacillus subtilis* as Biocontrol Agents against *Fusarium solani* on Tomato Plants. *Egypt. J. Phytopathol.* 37(1):47-57.
  
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). 2011. [04 marzo 2013]. Taxonomy Database. [en línea]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>
  
- NOGUÉS, S; COTXARRERA, L; ALEGRE, L; TRILLAS, M. 2002. Limitations to photosynthesis in tomato leaves induced by *Fusarium* wilt. *New Phytologist.* 154: 461-470.
  
- OMAR, I; O'NEILL, T; ROSSALL, S. 2006. Biological control of *Fusarium* crown and root rot of tomato with antagonistic bacteria and integrated control when combined with the fungicide carbendazim. *Plant Pathology.* 55:92-99.

- PÁEZ, A; PAZ, V; LÓPEZ, J.C. 2000. Crecimiento y respuestas fisiológicas de plantas de tomate cv. Río Grande en la época mayo-julio. Efecto del sombreado. Rev. Fac. Agron. (LUZ). 17: 173-184.
- PÁEZ, M; SANABRIA, N. 2007. Identificación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *Trichoderma koningii* colectados en el estado Aragua, Venezuela. Rev. Fac. Agron. (LUZ). 24(Supl.1):51-56.
- PAREDES-ESCALANTE, J; CARRILLO-FASIO, J; GARCÍA-ESTRADA, R; ALLENDE-MOLAR, R; SAÑUDO-BARAJAS, VALDEZ-TORRES, J. 2009. Microorganismos antagonistas para el control del complejo de hongos causantes de la rabia del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en el Estado de Sinaloa, México. Revista Mexicana de Fitopatología. 27(1):27-35.
- PAREJA-JAIME, Y; RONCERO, M; RUIZ-ROLDAN, M. 2008. Tomatinase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* is required for full virulence on tomato plants. Mol Plant Microbe 21(6): 728- 736.
- PEÑA, C; MORENO, D. 1997. Evaluación de trece cultivares de híbridos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), en Tocorón, Aragua - Venezuela. Revista Forestal Venezolana. 41 (1): 45-52.
- PÉREZ-PIVAT , H. 2008. Efecto de la dosis y el momento de aplicación de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre el control de *Sclerotium rolfsii* Sacc. y de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cv. Río Grande bajo condiciones *in vivo*. Tesis de Maestría. Postgrado en Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela. 116 p.

- PRAVEEN, D; THENMOZHI, R; ANUPAMA, D; NAGASATHYA, A; THAJUDDIN, N; PANEERSELVAM, A. 2012. Selection of potential antagonistic *Bacillus* and *Trichoderma* isolates from tomato rhizospheric soil against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *J. Microbiol. Biotech. Res.* 2 (1):78-89.
  
- RAGAZZO-SÁNCHEZ, J; ROBLES-CABRERA, A; LOMELÍ-GONZÁLEZ, L; LUNA-SOLANO, G; CALDERÓN-SANTOYO, M. 2011. Selección de cepas de *Bacillus* spp. productoras de antibióticos aisladas de frutos tropicales. México. *Revista Chapingo. Serie Horticultura.* 17(Especial 1): 5-11.
  
- REYES, J. 1997. Diagnóstico de enfermedades fúngicas en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en algunas localidades de los estados Aragua y Guárico. Tesis de Grado. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela. 54 p.
  
- RODRÍGUEZ, J; VELANDIA, J; VITERI, S. 2010. Evaluación de microorganismos aislados de gallinaza por su potencial para el biocontrol de *Fusarium* (*F. oxysporum*) en plántulas de uchuva (*Physalis peruviana*). *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín* 63(2):5499-5509.
  
- SALAZAR, L; SANABRIA, N; APONTE, G; ALCANO, M; HERRERA, R; COLMENARES, D; ESPINOZA, M; ALEMÁN, L; MAGAÑA, S. 2011. Efectividad de aislamientos de *Trichoderma* spp. en el control de la fusariosis del tomate en condiciones *in vitro* e *in vivo*. *Bioagro.* 23(3):185-190.

- SAMUELS, G. 2006. *Trichoderma*: Systematics, the sexual state and ecology. *Phytopathology*. 96 (2): 195-206.
  
- SAMUELS, G; CHAVERRI, P; FARR, D; McCRAY, E. 2013. [01 abril 2013]. *Trichoderma* Online, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. U.S.A. [en línea] <http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>
  
- SANTIAGO, J; MENDOZA, M; BORREGO, F. 1998. Evaluación de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en invernadero: criterios fenológicos y fisiológicos. *Agronomía Mesoamericana*. México. 9(1):59-65.
  
- SCHAAD, N; JONES, J; CHUN, W. 2001. Laboratory guide for identification of Plant Pathogenic Bacteria. APS Press. St. Paul, Minnesota. U.S.A. 371 p.
  
- SOSA, A; PAZOS, V; TORRES, D. 2005. Aislamiento y selección de bacterias pertenecientes al género *Bacillus* con potencialidades para el control biológico en semilleros de tabaco. *Centro Agrícola*. Cuba. 32(3):26-31.
  
- SOSA-BRICEÑO, M; CASTILLO-COLOMBO, C; SCORZA, J. 2004. Actividad inhibitoria del género *Bacillus* spp. contra dermatofitos. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* 24(1-2):59-64.

- SRÓBAROVÁ, A; EGED, S; TEXEIRA DA SILVA, J; RITIENI, A; SANTINI, A. 2009. The use of *Bacillus subtilis* for screening fusaric acid production by *Fusarium* spp. Czech Journal of Food Sciences -UZEI. 27(3): 203-209.
  
- 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. Rev. Fac. Agron. ( LUZ ). 16: 509-516.
  
- TODAR, K. 2012. [04 marzo 2013]. Todar's Online Textbook of Bacteriology. University of Wisconsin. Department of Bacteriology. Madison, Wisconsin. U.S.A. [en línea] <http://textbookofbacteriology.net>
  
- TURKY, A; HAMED, H; ATTIA, M. 2005. Influence of root colonization with *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum* and arbuscular mycorrhizae on promoting tomato seedling yield, and protection against *Fusarium* crown and root rot. National Research Center, Cairo, Egypt. 11 p.
  
- VENEGAS, E; CIAMPI, L; COLLADO, L; COSTA, M; FUENTES, R; NISSEN, J; SCHOBITZ, R; SCHOEBITZ, M. 2005. Aislamiento e identificación de bacterias nativas del género *Bacillus* Cohn antagonistas de cepas patógenas de *Fusarium* Link. en cala. Agro Sur. 33(2):1-12.
  
- WALKER, J.C. 1971. *Fusarium* wilt of tomato. Monograph N°6. The American Phytopathological Society. St. Paul. Minnesota. U.S.A. 56 p.

- WATTERSON, J. 1985. Tomato Diseases. A practical guide for seedsmen, growers and agricultural advisors. Petoseed Co., Inc. Breeders Growers. California. U.S.A. 47 p.
- XIN, L; JINZHAO, P; ZONGZHENG, Y. 2009. The effect of *Bacillus subtilis* SY1 and *Pseudomonas fluorescens* W1 in the ecological remediation of the soil. Journal of Sustainable Development. 2(2):90-94.
- ZAVALETA-MEJÍA, E. 1999. Alternativas de manejo de las enfermedades de las plantas. Revista Terra. 17 (3): 201-207.
- ZIEDAN, E. 2006. Manipulating endophytic bacteria for biological control to soil borne diseases of peanut. Journal of Applied Sciences Research. 2(8):497-502.
- ZONGZHENG, Y; XIN,L; ZHONG,L; JINZHAO,P; JIN,Q; WENYAN, Y. 2009. Effect of *Bacillus Subtilis* SY1 on antifungal activity and plant growth. Int J Agric & Biol Eng. 2(4):55-61.