



**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE LA MIXTECA**  
**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

USO DE *Trichoderma asperelloides* Y *Bacillus licheniformis* PARA  
EL BIOCONTROL DE *Fusarium oxysporum* Y *Alternaria alternata*  
EN PLANTAS DE JITOMATE (*Solanum lycopersicum*)

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS: PRODUCTOS NATURALES Y  
ALIMENTOS**

PRESENTA:

**HERIBERTO FORTINO RAMÍREZ CARIÑO**

DIRECTOR DE TESIS:

**DR. ROGELIO VALADEZ BLANCO**

COORDIRECTORA DE TESIS:

**DRA. PAULA CECILIA GUADARRAMA MENDOZA**

HUAJUAPAN DE LEÓN, OAXACA, MÉXICO; FEBRERO 2017.

## **DEDICATORIA**

A mi madre Fidelia Esperanza Cariño Lázaro quien con sus consejos, oraciones y plegarias logró inculcarme la formación del trabajo y el esfuerzo. Al recuerdo de mi Padre Pascacio Ramírez Rendón de quien aprendí que debo soñar y luchar por lo que quiero.

A mi esposa Analit González Sánchez, por su apoyo incondicional en este proyecto de formación profesional y de vida familiar. Sin tu respaldo este logro no existiría. A mis hijos Erick, César, Anahí y Fátima, quien con su cariño y alegría me dieron la motivación y la energía para continuar el proceso de superación.

A mis hermanos Edith, Eleuterio, Ricardo, Herminio, Rosaelia y Soledad con quienes viví y compartí momentos llenos de alegría, felicidad y tristeza.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Tecnológica de la Mixteca por darme una segunda oportunidad de formación en la vida profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para el sustento en el tiempo de realización de este trabajo.

A todos los profesores que integran el núcleo académico de la Maestría en Ciencias: Productos Naturales y Alimentos, en especial al Dr. Rogelio Valadez Blanco y la Dra. Paula Cecilia Guadarrama Mendoza por la confianza que me tuvieron y por sus enseñanzas recibidas.

A los Doctores Vladimir Sánchez López, Raúl Salas Coronado y Juan Florencio Gómez Leyva por todas las sugerencias y observaciones para el mejoramiento del presente trabajo.

Al Dr. Jaime Aliosha Cuervo Parra, por el apoyo recibido en la toma de imágenes con el Microscopio Electrónico de Barrido en la Escuela Superior de Apan de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

## RESUMEN

El marchitamiento vascular causado por *Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr. [1] y el tizón temprano causado por *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler [2] representan una problemática fitosanitaria importante en la producción del cultivo de jitomate (*Solanum lycopersicum* L.). La incidencia de estas enfermedades ocasiona grandes pérdidas económicas. Evaluaciones *in vitro* en esta investigación revelan que la cepa de *Trichoderma asperelloides* Samuels, mostró antagonismo hacia los dos hongos fitopatógenos *A. alternata* y *F. oxysporum*. En tanto, la cepa de *Bacillus licheniformis* presentó actividad antagonista sólo contra *F. oxysporum*. En evaluaciones *in vivo* en plantas de jitomate, el uso individual de *B. licheniformis* y *T. asperelloides* redujeron los síntomas de enfermedad causada por *A. alternata* en 60 y 70%, respectivamente. Mientras que el uso combinado de estos agentes de biocontrol disminuyó en un 80% los síntomas de la enfermedad. Los resultados en los tratamientos contra *F. oxysporum*, mostraron que el uso individual de *B. licheniformis* y *T. asperelloides* disminuyeron en un 77.8 y 66.7% la incidencia de enfermedad, respectivamente; sin embargo, el uso combinado sólo disminuyó ésta en un 37.5%. Por otra parte en la evaluación de parámetros agronómicos, el tratamiento combinado de *B. licheniformis* y *T. asperelloides* contra *A. alternata*, incrementó significativamente ( $p < 0.05$ ) la velocidad de crecimiento y la altura de las plantas en un 34 y 19%, respectivamente. En lo que se refiere al peso seco de biomasa, el tratamiento combinado contra *A. alternata*, disminuyó en un 15%, respecto a las plantas testigo. Finalmente, en los parámetros de altura y velocidad de crecimiento, los tratamientos individuales y combinado de *B. licheniformis* y *T. asperelloides* contra *F. oxysporum*, no presentaron diferencia significativa. El sinergismo entre *T. asperelloides* y *B. licheniformis* potencian el efecto antagonista contra la incidencia de la enfermedad del tizón temprano causada por *A. alternata*; además incrementa la velocidad de crecimiento y la altura de las plantas de jitomate. Por otra parte, *B. licheniformis* disminuye el daño causado por *A. alternata* mediante la inducción de resistencia sistémica. Finalmente, el uso combinado de estos agentes de biocontrol no incrementa el antagonismo contra *F. oxysporum*, causante del marchitamiento vascular en plantas de jitomate.

# CONTENIDO

---

RESUMEN.....	iv
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Cultivo de jitomate.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1.1. Importancia comercial.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1.2. Importancia nutricional.....</b>	<b>6</b>
2.1.2.1. Características fisicoquímicas del fruto.....	7
<b>2.1.3. Sistema de producción de jitomate.....</b>	<b>7</b>
<b>2.1.4. Enfermedades fúngicas en jitomate.....</b>	<b>8</b>
2.1.4.1. Importancia económica de los hongos fitopatógenos <i>Fusarium</i> y <i>Alternaria</i> .....	8
2.1.4.2. Procedimiento para aislar y caracterizar a los hongos fitopatógenos <i>Fusarium</i> y <i>Alternaria</i> .....	10
<b>2.2. Métodos de control y su impacto ambiental.....</b>	<b>10</b>
<b>2.2.1. Control químico.....</b>	<b>10</b>
<b>2.2.2. Resistencia de patógenos a los fungicidas sintéticos.....</b>	<b>12</b>
<b>2.2.3. Efecto de fungicidas sintéticos en la salud humana.....</b>	<b>12</b>
<b>2.2.4. Impacto ambiental de los fungicidas sintéticos.....</b>	<b>14</b>
<b>2.2.5. Control biológico.....</b>	<b>15</b>
<b>2.3. Uso de <i>Trichoderma</i> sp. en el biocontrol de fitopatógenos.....</b>	<b>17</b>
<b>2.3.1. Características del género <i>Trichoderma</i>.....</b>	<b>17</b>
<b>2.3.2. Crecimiento de <i>Trichoderma</i> en su hábitat natural.....</b>	<b>18</b>
<b>2.3.3. Crecimiento de <i>Trichoderma</i> <i>in vitro</i>.....</b>	<b>18</b>
<b>2.3.4. Mecanismos de acción antifúngica.....</b>	<b>18</b>

2.3.5 Cepas de <i>Trichoderma</i> usadas como biocontrol.....	21
2.4. Uso de cepas bacterianas de <i>Bacillus</i> para el control de fitopatógenos.....	22
2.4.1. Crecimiento de <i>Bacillus</i> en su hábitat natural .....	23
2.4.2. Mecanismos de acción antifúngica.....	23
2.4.2.1. Competencia por nicho y nutrientes.....	24
2.4.2.2. Antibiosis: Inhibición directa de fitopatógenos.....	25
2.4.2.3. Parasitismo.....	25
2.4.2.4. Inducción de resistencia sistémica.....	26
2.4.3 Cepas de <i>Bacillus</i> usadas para el biocontrol de fitopatógenos .....	27
3. IMPORTANCIA DEL ESTUDIO.....	29
4. ORIGINALIDAD.....	30
5. OBJETIVOS.....	31
6. METAS.....	32
7. METODOLOGÍA.....	33
7.1. Material biológico.....	33
7.2. Meta 1.1. Propagación y producción de conidios de los hongos <i>F. oxysporum</i> , <i>A. alternata</i> y <i>T. asperelloides</i> en medios de cultivo <i>in vitro</i> .....	34
7.2.1. Mantenimiento de las cepas.....	34
7.2.2. Producción de conidios de los hongos.....	34
7.3. Meta 1.2. Propagación y conservación de la bacteria <i>B. licheniformis</i> en un medio sólido y la producción de células en un medio líquido.....	37
7.3.1. Producción de células de <i>Bacillus licheniformis</i> .....	37
7.4. Meta 2.1. Medición de las velocidades de crecimiento de los hongos <i>F. oxysporum</i> , <i>A. alternata</i> y <i>T. asperelloides</i> en medio sólido.....	38
7.4.1. Velocidad de crecimiento de micelio en medio sólido.....	38
7.5. Meta 2.2. Confrontación en cultivo dual de los agentes de biocontrol <i>T. asperelloides</i> y <i>B. licheniformis</i> contra los hongos fitopatógenos <i>F. oxysporum</i> y <i>A. alternata</i> .....	39
7.5.1. Pruebas <i>in vitro</i> del antagonismo de <i>B. licheniformis</i> contra <i>F. oxysporum</i> y <i>A. alternata</i> .....	39

<b>7.5.2. Pruebas <i>in vitro</i> del antagonismo de <i>Trichoderma asperelloides</i> contra <i>F. oxysporum</i> y <i>A. alternata</i>.....</b>	<b>41</b>
<b>7.6. Meta 5. Implementación de técnicas de inoculación de los microorganismos en plantas de jitomate.....</b>	<b>42</b>
<b>7.6.1. Pruebas <i>in vivo</i> de la patogenicidad de los fitopatógenos y el efecto de los agentes de biocontrol en plantas de jitomate.....</b>	<b>42</b>
<b>7.6.1.1. Inoculación de las plantas de jitomate con <i>F. oxysporum</i> y <i>A. alternata</i>.....</b>	<b>43</b>
<b>7.6.1.2. Inoculación de las plantas de jitomate con <i>T. asperelloides</i> y <i>B. licheniformis</i>.....</b>	<b>44</b>
<b>7.6.1.3. Actividades agronómicas para el desarrollo de la prueba de patogenicidad.....</b>	<b>45</b>
<b>7.7. Meta 3.2. Evaluación del antagonismo de <i>T. asperelloides</i> y <i>B. licheniformis</i> contra <i>F. oxysporum</i> y <i>A. alternata</i> en plantas <i>in vivo</i> en condiciones de invernadero.....</b>	<b>47</b>
<b>7.7.1. Experimento de biocontrol <i>in vivo</i> en plantas de jitomate.....</b>	<b>47</b>
<b>7.7.1.1. Tratamiento y siembra de la semilla .....</b>	<b>48</b>
<b>7.7.1.2. Trasplante.....</b>	<b>48</b>
<b>7.7.1.3. Inoculación de los tratamientos.....</b>	<b>49</b>
<b>7.7.1.4. Actividades culturales.....</b>	<b>54</b>
<b>7.7.1.5. Cuantificación y evaluación de los experimentos <i>in vivo</i>.....</b>	<b>55</b>
<b>7.8. Diseño de experimentos y análisis estadístico.....</b>	<b>57</b>
<b>8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>58</b>
<b>8.1. Crecimiento y esporulación <i>in vitro</i> de los agentes de biocontrol y los hongos fitopatógenos.....</b>	<b>58</b>
<b>8.2. Pruebas <i>in vitro</i>.....</b>	<b>65</b>
<b>8.2.1. Efecto <i>in vitro</i> de <i>B. licheniformis</i> contra <i>A. alternata</i> y <i>F. oxysporum</i>.....</b>	<b>65</b>
<b>8.2.2. Efecto <i>in vitro</i> de <i>T. asperelloides</i> contra <i>A. alternata</i> y <i>F. oxysporum</i>.....</b>	<b>67</b>
<b>8.3. Pruebas de patogenicidad de los hongos fitopatógenos y los agentes de biocontrol en plantas de jitomate.....</b>	<b>70</b>
<b>8.3.1. Efecto de patogenicidad de <i>A. alternata</i> en plantas de jitomate.....</b>	<b>70</b>
<b>8.3.2. Efecto de patogenicidad de <i>F. oxysporum</i> en raíces de plantas de jitomate....</b>	<b>71</b>

8.3.3. Efecto de la inoculación de <i>T. asperelloides</i> y <i>B. licheniformis</i> en las plantas de jitomate.....	71
<b>8.4. Resultados del experimento <i>in vivo</i>.....</b>	<b>73</b>
8.4.1. Efecto antagonista de <i>T. asperelloides</i> y <i>B. licheniformis</i> contra <i>A. alternata</i> <i>in vivo</i> .....	73
8.4.1.1. Efecto de la inoculación de <i>T. asperelloides</i> , <i>B. licheniformis</i> y <i>A. alternata</i> en la velocidad de crecimiento, altura y peso seco de las plantas de jitomate.....	77
8.4.2. Efecto antagonista de <i>T. asperelloides</i> y <i>B. licheniformis</i> contra <i>F. oxysporum</i> <i>in vivo</i> .....	82
8.4.2.1. Efecto de la inoculación de <i>T. asperelloides</i> , <i>B. licheniformis</i> y <i>F. oxysporum</i> en la velocidad de crecimiento, altura y peso seco de las plantas de jitomate.....	85
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>89</b>
9.1. Producción de conidios de los hongos <i>T. asperelloides</i> , <i>F. oxysporum</i> y <i>A. alternata</i> y producción de células de <i>B. licheniformis</i> .....	89
9.2. Determinación <i>in vitro</i> de la actividad antagonista de <i>T. asperelloides</i> y <i>B. licheniformis</i> en contra del crecimiento de <i>F. oxysporum</i> y <i>A. alternata</i> .....	89
9.3 Evaluación de la actividad biocontroladora <i>in vivo</i> de <i>T. asperelloides</i> y <i>B. licheniformis</i> contra <i>F. oxysporum</i> y <i>A. alternata</i> en plantas de jitomate bajo condiciones de invernadero.....	90
9.4 Evaluación de velocidad de crecimiento, altura total y peso seco de las plantas de jitomate.....	91
<b>10. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>92</b>
<b>11. REFERENCIAS.....</b>	<b>93</b>
<b>13. APÉNDICE.....</b>	<b>101</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Producción de jitomate a nivel mundial.....	5
<b>Tabla 2.</b> Producción de jitomate en México.....	6
<b>Tabla 3.</b> Fungicidas comerciales usados para el control de enfermedades de jitomate.....	11
<b>Tabla 4.</b> Fungicidas usados contra <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp.....	12
<b>Tabla 5.</b> Medios de cultivo usados para la esporulación de <i>A. alternata</i> .....	35
<b>Tabla 6.</b> Inoculación de las plantas de jitomate en las pruebas de patogenicidad y efecto de los agentes de biocontrol.....	43
<b>Tabla 7.</b> Solución nutritiva Steiner modificada empleada para el riego de las plantas de jitomate.....	47
<b>Tabla 8.</b> Todos los tratamientos del experimento <i>in vivo</i> en plantas de jitomate.....	50
<b>Tabla 9.</b> Tratamientos para el biocontrol de <i>Alternaria alternata</i> .....	51
<b>Tabla 10.</b> Tratamientos para el biocontrol de <i>Fusarium oxysporum</i> .....	53
<b>Tabla 11.</b> Concentración promedio de conidios ( $\times 10^4$ )/mL de <i>A. alternata</i> en diferentes medios de cultivo.....	61
<b>Tabla 12.</b> Crecimiento promedio (cm/día) de <i>A. alternata</i> en diferentes medios de cultivo.....	63
<b>Tabla 13.</b> Concentración promedio de conidios ( $\times 10^6$ )/mL y crecimiento promedio (cm/día) de <i>Fusarium oxysporum</i> en dos medios de cultivo.....	65
<b>Tabla 14.</b> Velocidad de crecimiento promedio de plantas de jitomate (cm/día) en la prueba <i>in vivo</i> para los tratamientos de las cepas usadas en la prueba de patogenicidad .....	72
<b>Tabla 15.</b> Escala de daño en plantas de jitomate en los tratamientos con <i>A. alternata</i> .....	75
<b>Tabla 16.</b> Velocidad de crecimiento de las plantas de jitomate (cm/día) en el experimento <i>in vivo</i> en los tratamientos contra <i>A. alternata</i> .....	78

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Interacciones en la planta con lipopéptidos de <i>Bacillus</i> en el control biológico...	24
<b>Figura 2.</b> Trazado de la caja Petri para medir velocidad de crecimiento de las cepas fúngicas.....	39
<b>Figura 3.</b> Interacciones en cultivo dual <i>B. licheniformis</i> por estriado y <i>A. alternata</i> en el centro de la caja Petri.....	40
<b>Figura 4.</b> Interacción entre <i>T. asperelloides</i> y <i>F. oxysporum</i> en cultivo dual.....	42
<b>Figura 5.</b> Cubrimiento de las plantas con una bolsa para generar humedad en la inoculación con <i>A. alternata</i> .....	52
<b>Figura 6.</b> Crecimiento micelial y producción de conidios de la cepa <i>T. asperelloides</i> a los 7 d de crecimiento en medio APD a 28 °C.....	58
<b>Figura 7.</b> Crecimiento de <i>B. licheniformis</i> en medio LB durante 48 h a 37 °C y microscopía de células bacilares con aumento 1000 x.....	59
<b>Figura 8.</b> Microscopia del crecimiento micelial y conidios de <i>A. alternata</i> a los 12 d de crecimiento en medio agar V <sub>8</sub> a 28 °C con aumento 400 x.....	61
<b>Figura 9.</b> Crecimiento micelial de <i>F. oxysporum</i> a los 12 d de crecimiento en medio APD a 28°C.....	64
<b>Figura 10.</b> Interacción <i>B. licheniformis</i> y <i>A. alternata</i> en cultivo dual a los 7 d de su inoculación.....	66
<b>Figura 11.</b> Confrontación en cultivo dual de <i>B. licheniformis</i> contra <i>F. oxysporum</i> .....	67
<b>Figura 12.</b> Confrontación de <i>T. asperelloides</i> contra <i>F. oxysporum</i> en cultivo dual.....	68
<b>Figura 13.</b> Confrontación de <i>T. asperelloides</i> contra <i>A. alternata</i> en cultivo dual.....	69
<b>Figura 14.</b> Necrosis en hojas de jitomate causada por la inoculación de <i>A. alternata</i> .....	73
<b>Figura 15.</b> Amarillamiento y dorado en hojas de jitomate causado por <i>A. alternata</i> .....	73

<b>Figura 16.</b> Porcentaje de plantas de jitomate con daño en hojas causado por <i>A. alternata</i> .....	74
<b>Figura 17.</b> Altura total de plantas de jitomate en los tratamientos de <i>A. alternata</i> .....	79
<b>Figura 18.</b> Peso seco de plantas de jitomate en los tratamientos de <i>A. alternata</i> .....	81
<b>Figura 19.</b> Pudrición en raíz de plantas de jitomate causado por <i>F. oxysporum</i> .....	83
<b>Figura 20.</b> Daño externo en raíz de plantas de jitomate causados por <i>F. oxysporum</i> .....	83
<b>Figura 21.</b> Daño interno en raíz de plantas de jitomate causadas por <i>F. oxysporum</i> .....	84
<b>Figura 22.</b> Porcentaje de plantas de jitomate con daño en raíz causado por <i>F. oxysporum</i> .....	85
<b>Figura 23.</b> Velocidad de crecimiento (cm/día) de las plantas de jitomate en los tratamientos de <i>F. oxysporum</i> .....	86
<b>Figura 24.</b> Altura total de plantas de jitomate en los tratamientos de <i>F. oxysporum</i> .....	87
<b>Figura 25.</b> Peso seco de plantas de jitomate en los tratamientos de <i>F. oxysporum</i> .....	88

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

APD	Agar papa dextrosa
CLA	Medio de cultivo Agar Clavel
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
NFb	Medio deficiente de nitrógeno con Rojo Congo
V <sub>8</sub>	Medio de cultivo Agar Jugo V <sub>8</sub>
LMR	Límites máximos de residuos permitidos
HMA	Hongos micorrízicos arbusculares
PGPR	Rizobacterias promotoras de crecimiento de plantas (por sus siglas en inglés)
RSI	Resistencia sistémica inducida

## 1. INTRODUCCIÓN

Los microorganismos fitopatógenos representan un factor limitante en la producción mundial de los alimentos. En los cultivos agrícolas y en especial de jitomate, los hongos, las bacterias, los oomicetos, los virus y los nemátodos causan grandes pérdidas en la producción agrícola y por lo tanto en la economía de los agricultores [3]. Los métodos usados para el control de enfermedades son muy variados. En los métodos indirectos se tienen los genéticos y las técnicas culturales, mientras que los métodos directos incluyen los métodos mecánicos, físicos, químicos y biológicos [4]. En la actualidad, los métodos químicos son los más usados para el control de enfermedades en jitomate y también son los que han contribuido de manera importante a los daños causados al medio ambiente debido a la contaminación del aire y el agua [5], el deterioro del suelo y la muerte de los microorganismos benéficos de la rizósfera [6]. El uso de fungicidas químicos ha sido también fuente de riesgos a la salud humana, por ingestión y exposición. Por otra parte, en diferentes estudios se ha comprobado la residualidad de los fungicidas en los alimentos, lo que conlleva graves daños a la salud humana por bioacumulación [7].

Ante este contexto, es necesario brindar alternativas para el control de las enfermedades de las plantas. Es por esto, que en las últimas décadas se ha incrementado el estudio de organismos benéficos que son inocuos para el ser humano y que aprovechan las sinergias naturales del agroecosistema para ser utilizados como agentes eficientes de biocontrol. Respecto al control de enfermedades causadas por fitopatógenos, existen diversos microorganismos que poseen cualidades para usarse como agentes de biocontrol. Especies del género *Trichoderma* son agentes efectivos en el control biológico contra una serie de

enfermedades de los cultivos. La capacidad de *Trichoderma* spp. para suprimir enfermedades de las plantas, se relaciona con el micoparasitismo sobre el patógeno fúngico [8], a su capacidad para competir por espacio y nutrientes [9] y a su capacidad para producir enzimas líticas: quitinasas y  $\beta$ -1,3-glucanasas [10]. Por otra parte, cepas del género *Bacillus*, tienen una alta actividad como antagonistas mediante mecanismos de competencia por espacio y nutrientes y producción de compuestos antibióticos inhibidores [3]. También se ha reportado que *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. inducen resistencia sistémica a las plantas mediante la inducción de hormonas de crecimiento y enzimas de defensa contra agentes fitopatógenos [11].

Con base a lo anterior, el presente estudio tiene como finalidad evaluar el grado de efectividad biocontroladora de *Trichoderma asperelloides* (VSL4) y de *Bacillus licheniformis* (MV1) contra los hongos fitopatógenos, *Fusarium oxysporum* (VSL302) y *Alternaria alternata* (VSL314) en plantas de jitomate cultivadas en invernadero.

## 2. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

### 2.1. Cultivo de jitomate

El jitomate pertenece a la familia botánica Solanaceae, que tiene más de 3000 especies de plantas. *Solanum* es el género más grande de la familia Solanaceae, abarca entre 1250 y 1700 especies [12]. El jitomate (*Solanum lycopersicum*, L.) es una de las especies más importantes de esta familia. Las especies del género *Solanum* están presentes en todos los continentes, en zonas templadas y tropicales y son notables por su diversidad morfológica y ecológica. Las especies de jitomate silvestre son nativas de América del Sur occidental a lo largo de la costa de los Andes, desde el centro de Ecuador y Perú, hasta el norte de Chile. El jitomate crece en gran variedad de hábitats que van desde el nivel del mar en la costa del Pacífico hasta 3300 msnm [13].

Aún no se ha determinado el origen de la domesticación del jitomate. Existe una hipótesis que postula que esta planta fue domesticada en Perú y otra sostiene que el lugar de su origen fue en México. El origen del jitomate en México fue propuesta por Jenkins en 1948, quien argumentó que la palabra “jitomate” proviene de la palabra náhuatl "tomatl" que se refiere a "las plantas dando frutos globosos y jugosos" [14]. En Sudamérica, es probable que la geografía andina, los diversos hábitats ecológicos y los diferentes climas contribuyeron a la gran diversidad de jitomate.

El jitomate ha sido fuente de interés para los científicos y se ha convertido en un organismo modelo para los programas de investigación dado que presenta características como: posibilidad de crecer en diferentes condiciones, ciclo de vida relativamente corto, capacidad de florecer y producir semillas, alta autofertilidad y homocigosis, facilidad de

polinización controlada e hibridación, simplicidad de su genética con un genoma relativamente pequeño y capacidad para ser propagado asexualmente [13].

**2.1.1. Importancia comercial.** El jitomate en años recientes se ha convertido en una de las hortalizas de mayor consumo a nivel mundial. Debido a que es la base para la preparación de una gran cantidad de platillos crudos o cocidos. La industria de los alimentos ofrece una diversidad de presentaciones de esta verdura siendo entre otras: concentrados, jugos, jitomates pelados, jitomates triturados, salsas y purés [15].

Actualmente, el consumo del jitomate es generalizado en todo el mundo y es una de las hortalizas de mayor importancia económica. El fruto se comercializa en fresco, en alimentos procesados y en productos transformados como sopas, pastas, concentrados, zumos, y salsas [16]. La demanda del jitomate seguramente continuará en crecimiento, debido al aumento de la población, la diversificación fenotípica y genotípica de este fruto y los cambios en la dieta actuales que tienden hacia el consumo de este tipo de hortalizas [17].

Después de la papa, el jitomate es el cultivo vegetal más importante en el mundo. El jitomate encabeza la lista de las hortalizas en conserva. La producción mundial de jitomate en el año 2012, fue de 211 millones de toneladas de producto fresco. La Tabla 1 muestra que China fue el principal país productor de jitomate en el 2012 con 50 millones de toneladas (23.75% del total mundial) [18]. Actualmente la producción mundial está dominada por países asiáticos, cuando hace 20 años eran los países de Europa y de América los productores más importantes. Por otra parte, los países con el mayor rendimiento en  $\text{kg ha}^{-1}$  son los del norte de Europa, a pesar de que las condiciones climáticas en estos países no son las más favorables [13]. México ocupa la décima posición en la producción de jitomate a nivel mundial (Tabla 1).

**Tabla 1. Producción de jitomate a nivel mundial [18]**

<b>País</b>	<b>Producción en 2012 (Millones de ton)</b>
China	50.13
India	17.50
EE.UU.	13.21
Turquía	11.35
Egipto	8.63
Irán	6.00
Italia	5.13
España	4.01
Brasil	3.87
México	3.43

La producción de jitomate en México en el año 2013 fue de 3.43 millones de toneladas con una superficie cosechada de 47,100 ha. Sinaloa es el estado que cuenta con mayor producción a nivel nacional con el 28.65% del total nacional (Tabla 2). En esta tabla también muestra que Oaxaca ocupa el octavo lugar a nivel nacional en la producción de jitomate con 96,693 ton y rendimiento de 116.27 ton por ha, siendo éste uno de los más altos a nivel nacional. El alto rendimiento por unidad de producción, indica que en Oaxaca la mayor parte de la producción de jitomate se realiza mediante ambientes controlados como los invernaderos [19].

**Tabla 2. Producción de jitomate en México [19]**

<b>Estado</b>	<b>Producción (Ton)</b>	<b>Sup. Cosechada (Ha)</b>	<b>Rendimiento (Ton/Ha)</b>
Sinaloa	983,288.14	15,263.06	64.42
Baja California	196,452.90	2,782.50	70.60
Zacatecas	143,905.20	2,872.72	50.09
San Luis Potosí	141,108.25	2,310.35	61.08
Jalisco	134,436.65	1,589.50	84.58
Baja California Sur	108,421.60	1,968.20	55.09
Michoacán	98,435.06	3,640.75	27.04
Oaxaca	96,693.30	831.65	116.27
Sonora	91,856.30	1,259.20	72.95
Guanajuato	82,352.00	692.90	118.85

**2.1.2. Importancia nutricional.** El valor nutricional del jitomate no sólo consiste en sus contenidos de proteínas, lípidos y azúcares, puesto que éstos son bajos. Su relevancia en la dieta radica en que sus frutos proveen al ser humano de compuestos bioactivos, entre los cuales se encuentran el licopeno, vitamina A ( $\beta$ -caroteno) y vitamina C (ácido ascórbico) apreciados por su actividad antioxidante [20]. El jitomate también contiene compuestos fenólicos, flavonoides, vitamina E y tocoferoles. Estos antioxidantes se han relacionado con la prevención de enfermedades crónicas asociadas con el estrés oxidativo, como el cáncer y las enfermedades cardiovasculares [21].

El jitomate representa la principal fuente natural de licopeno. Este compuesto que contiene el jitomate ha recibido gran interés recientemente debido a sus propiedades antioxidantes y a su papel en la reducción del riesgo de incidencia de enfermedades crónicas [22]. Adicionalmente, se ha reportado que los alimentos que contienen licopeno y vitamina E, tienen un efecto protector contra el cáncer de próstata humano [23].

**2.1.2.1. Características fisicoquímicas del fruto.** Los sólidos solubles representan azúcares y ácidos orgánicos cuya relación, junto con la composición del aroma volátil, caracteriza el sabor de la fruta. Por otra parte, los ácidos orgánicos son un factor de calidad importante para determinar el sabor característico del jitomate y determinan el pH del producto final [13]. Adicionalmente, los ácidos también son importantes en la estabilidad microbiana [17]. Finalmente, los sólidos insolubles, constituidos por proteínas y componentes de la pared celular, definen la firmeza de la fruta, pero también la viscosidad de los productos finales tales como jugos, salsas, sopas y pastas [13].

El color del fruto es una característica de calidad que ha recibido gran atención por los consumidores e industrias de procesamiento de jitomate fresco. Este parámetro también es un indicador importante de la etapa de madurez del fruto. El color final en el fruto de jitomate está condicionado por la cantidad total y la proporción de los diferentes carotenoides como el licopeno,  $\beta$ -caroteno, fitoeno, fitoflueno, que se encuentran en el jitomate crudo y procesado [24].

**2.1.3. Sistema de producción de jitomate.** El jitomate es un cultivo que se ha adaptado a una gran diversidad de condiciones agroedafológicas y medioambientales. Actualmente los mayores rendimientos (200 ton/ha) [25], se han obtenido bajo condiciones de ambientes controlados (invernaderos, casas sombra, microtúneles, etc.), riegos presurizados y una diversidad de sustratos [14].

Las plantas de jitomate pueden establecerse directamente en el suelo. El jitomate tiene un mejor desarrollo en suelo con una profundidad entre 60 y 80 cm. Los suelos óptimos para el desarrollo del jitomate son aquellos con buen drenaje. El jitomate también se puede

establecer en bolsas de polietileno. La bolsa actúa como contenedor del sustrato. La bolsa también debe contener orificios de salida lateral como drenaje y evitar que las raíces tengan contacto con el ambiente externo. Los requerimientos nutricionales de la planta del jitomate, tanto de macro y de microelementos, deben ser suministrados en forma adecuada y oportuna a lo largo del ciclo de cultivo [26].

**2.1.4. Enfermedades fúngicas en jitomate.** La producción de jitomate se ve disminuida por el ataque de diversos patógenos y plagas que sufren las plantas durante su ciclo de cultivo. Los hongos y oomicetos patógenos, representan una importante causa de la reducción en el rendimiento del cultivo o pérdida total. Algunos patógenos de jitomate importantes incluyen los hongos *Botrytis cinerea*, *Alternaria solani*, *Alternaria alternata* (Fr.) *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y los oomicetes *Phytophthora infestans*.

**2.1.4.1. Importancia económica de los hongos fitopatógenos *Fusarium* y *Alternaria*.** Los fitopatógenos del género *Fusarium* y *Alternaria* son causantes de una gran cantidad de enfermedades en la plantas.

***Fusarium* spp.** El fitopatógeno *Fusarium oxysporum*, es responsable de una enorme gama de enfermedades de las plantas, que suelen implicar un síndrome de marchitamiento vascular. Las cepas que causan el marchitamiento vascular son específicas para un pequeño número de plantas huésped y se diferencian en base a la patogenicidad como formas especiales [27]. *F. oxysporum* cuenta con diferentes formas especiales (f. sp.) que en conjunto infectan a más de 100 especies de plantas entre las cuáles se encuentran cultivos de importancia económica mundial como jitomate, melón, algodón, plátano y cereales [28]. *F. oxysporum* tiene como hábitat natural el suelo, lugar en donde inicia la infección de las plantas. Los síntomas que

presentan las plantas infectadas por este hongo son el marchitamiento vascular, la epinastía de las hojas, retraso en el crecimiento, defoliación y muerte de la planta. La colonización del hongo aumenta la resistencia al flujo de agua dentro de la planta, lo que resulta en déficit de agua en la hoja y puede reducir la fotosíntesis y la longevidad de la hoja [29]. Los marchitamientos causados por *Fusarium* se ven favorecidos por las condiciones ambientales y del suelo en los invernaderos. Este fitopatógeno produce tres tipos de conidios asexuales: microconidios que tienen de una a dos células y son las conidios que el hongo produce con mayor frecuencia y abundancia; macroconidios, son conidios que están constituidas de 3 a 5 células, se adelgazan gradualmente y se encorvan hacia ambos extremos y las clamidosporas que están constituidas por una o dos células, son de pared gruesa y son conidios redondas que sobreviven durante mayor tiempo [30].

***Alternaria spp.*** El hongo fitopatógeno *Alternaria* afecta principalmente a las hojas, tallos, flores y frutos de una variedad de hortalizas. Las enfermedades causadas por *Alternaria* aparecen en forma de manchas y tizones foliares. El color de las manchas foliares varía de café oscuro a negro, a menudo son numerosas y cuando se extienden casi siempre forman anillos concéntricos [30]. El tizón temprano causado por *Alternaria solani* y *A. alternata*, ha cobrado gran importancia económica en la producción de jitomate a nivel mundial, debido a que en algunos países las pérdidas de cosechas por causa de estos fitopatógenos llega a ser hasta del 100% [11]. En sistemas agrícolas de producción intensiva se utilizan variedades con cierta resistencia a tizones foliares. Sin embargo esta resistencia no siempre previene el ataque de los patógenos. A la fecha las prácticas culturales y la aplicación de fungicidas químicos, han constituido la base de los programas de manejo de estas enfermedades.

**2.1.4.2. Procedimiento para aislar y caracterizar a los hongos fitopatógenos *Fusarium* y *Alternaria*.** Cuando un patógeno se encuentra en una planta enferma se puede identificar usando procedimientos y manuales especializados. En caso de que se quiera comprobar que determinado patógeno es la causa de la enfermedad, se deben considerar los siguientes postulados de Koch [30]:

El patógeno debe estar asociado con la enfermedad en todas las plantas enfermas examinadas.

El patógeno debe aislarse y desarrollarse en un cultivo puro en medios nutritivos o sobre una planta hospedante susceptible y registrar su presencia y efectos.

El patógeno que se desarrolle en un cultivo puro debe ser inoculado en plantas sanas de la misma especie en que apareció la enfermedad y debe producir la misma enfermedad en las plantas inoculadas.

El patógeno debe aislarse una vez más en un cultivo puro y sus características deben corresponder a las anotadas en el segundo punto.

## **2.2. Métodos de control y su impacto ambiental**

**2.2.1. Control químico.** El control químico se refiere al uso de productos químicos para el control de enfermedades de las plantas causadas por hongos, virus, bacterias y nematodos [4]. A partir de la revolución verde en los años cuarenta, los fungicidas químicos han sido la base principal para el control de diversas enfermedades [31]. Los fungicidas químicos pueden ser de amplio espectro o específicos para determinada enfermedad y cultivo (Tabla 3). El modo de acción de los fungicidas es por contacto o sistémico. Estos productos químicos están compuestos por ingredientes activos como hidróxido de cobre, clorotalonil, mancozeb y el ión zinc entre muchos otros.

**Tabla 3. Fungicidas comerciales usados para el control químico de enfermedades de jitomate [32–34].**

Producto	Ingrediente activo	Tipo de enfermedad	Empresa
RIDOMIL GOLD® 480 SL	Metalaxil-M: (R)-2-[(2,6-dimetilfenil)-metoxiacetilamino] ácido propiónico metil éster.	Amplio espectro	Syngenta
SCORE 250® CE	Difenoconazole: 3-Cloro- 4-[4-metil- 2-(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil)-1,3-dioxolan-2-il] fenil 4-clorofenil éter.	Tizón temprano	Syngenta
CLOROTALONIL 720	Clorotalonil: Tetracloroisofaltonitrilo	Tizón tardío	Tridente
COBRE HX	Hidróxido cúprico	Tizón foliar	Tridente
CAPTAN E 50 PH	Captan: N-triclorometiltio-4-ciclohexeno-1,2-dicarboximida.	Tizón tardío	Tridente
METALKIL CL	Metalaxil + Clorotalonil	Tizón tardío	Tridente
CUPRAVIT® MIX	Oxicloruro de cobre (59% de cobre) Mancozeb: ion zinc y etilen bis-ditiocarbamato.	Tizón temprano y tardío	Bayer
FUNCOZEB® 800	Mancozeb: Producto de la coordinación del ion zinc con el etilen-bis-ditio-carbamato de manganeso.	Tizón temprano y tardío	Bayer

Los fungicidas químicos utilizados para el tratamiento de enfermedades de las plantas, tienen diversos mecanismos de acción incluyendo la inhibición de la biosíntesis de esterol, del ensamblaje de los microtúbulos y de la cadena respiratoria mitocondrial [35].

Los fungicidas azólicos afectan al conjunto de membranas celulares de los hongos mediante el bloqueo de la síntesis del ergosterol, un componente esencial de la membrana celular. Estos fungicidas inhiben la enzima 14- $\alpha$ -desmetilasa que conduce a la disminución del ergosterol. Como resultado, la estructura de la membrana plasmática se vuelve más susceptible. Los azólicos son uno de los grupos más importantes de fungicidas [6] (Tabla 4).

La inundación del suelo y su fumigación son algunas de las principales estrategias utilizadas para controlar la enfermedad causada por *Fusarium* [36]. Se ha reportado que para el control de *F. oxysporum*, el fungicida benomyl ha resultado más efectivo.

**Tabla 4. Fungicidas sintéticos usados contra *Fusarium oxysporum f.sp.* [37]**

Grupo químico	Ingrediente activo
Benzimidazol	Benomyl
Compuestos de cobre	Oxicloruro de cobre
DMI-imidazol	Prochloraz
DMI-triazol	Ciproconazol/propiconazol
DMI-triazol	Propiconazol
Ácido fosforoso	Fosetil-Al
Phthlalimida	Captab
Estrobilurinas	Azoxistrobina
Estrobilurinas	Cresoxima-metin

**2.2.2. Resistencia de patógenos a los fungicidas sintéticos.** Desde el punto de vista agrícola, la resistencia de organismos patógenos a fungicidas sintéticos, es la selección de un carácter heredable cuya expresión fenotípica se traduce en una falta de control del fitopatógeno a la dosis mínima efectiva en campo [38]. La resistencia a fungicidas limita la sustentabilidad de los métodos químicos para controlar enfermedades. Los hongos fitopatógenos resistentes tienen la capacidad de desarrollarse, vivir y reproducirse en ambientes contaminados por fungicidas [30].

**2.2.3. Efecto de fungicidas sintéticos en la salud humana.** El uso intensivo de plaguicidas en cultivos causa su persistencia en los productos alimenticios, que con base a su concentración y toxicidad pueden ser perjudiciales para la salud de los consumidores. En

México se ha detectado que la presencia de residuos de fungicidas en hortalizas y frutas es frecuente en productos para consumo nacional y de exportación. No obstante, en algunos casos, las concentraciones de fungicidas no rebasan los límites máximos de residuos permitidos (LMR) [39].

En otras investigaciones se ha determinado la concentración de los plaguicidas captan (tetrahydroftalimida, THFI), carbofurán, endosulfán, malatión y metamidofos, en jitomate, calabacita y tomate verde en el estado de Oaxaca. La concentración de metamidofos en tomate verde llegó a ser 15 veces superior al LMR y 42 veces superior en jitomate. La concentración de captan (THFI) en jitomate fue 258 veces superior al LMR. El malatión se cuantificó en calabacita, tomate verde y jitomate con concentraciones 25.5, 1.3 y 1.2 veces el LMR, respectivamente. La concentración del endosulfán en jitomate fue 10.9 veces el LMR [7]. Los productos vegetales estudiados no se pueden considerar seguros para el consumo humano, ya que rebasaron el LMR establecido por la Comunidad Europea y pueden afectar la salud de los consumidores.

El uso generalizado de productos químicos en los sistemas agropecuarios durante varias décadas ha incrementado significativamente los riesgos a la salud humana. Los efectos sobre la salud de estos productos varían de acuerdo con la duración de la exposición y la dosis, pudiéndose presentar intoxicaciones agudas, crónicas y otras patologías como neuropatía retardada y desregulación de las hormonas reproductivas [39].

Por otra parte, la evidencia epidemiológica demuestra que hay una asociación entre la exposición temprana a los fungicidas y los cánceres pediátricos, la disminución de la función cognitiva y problemas de comportamiento. Los niños al estar expuestos al contacto o ingesta de fungicidas, tienen susceptibilidades a su potencial tóxico. Más allá de la intoxicación

aguda, las influencias de las exposiciones de bajo nivel sobre la salud de los niños son cada vez más preocupantes [40].

**2.2.4. Impacto ambiental de los fungicidas sintéticos.** El uso constante de productos químicos en la agricultura para incrementar los rendimientos y para disminuir las pérdidas por plagas y enfermedades, ha causado degradación del suelo, disminución de recursos hídricos por contaminación y salinidad, aumento de la incidencia de enfermedades en animales de granja y daños a la salud humana [31].

Los fungicidas sintéticos representan un riesgo para los ecosistemas debido a que afectan negativamente a los microorganismos benéficos del suelo. También se ha determinado que los tratamientos de control químico crean desequilibrios en la comunidad microbiana, que son desfavorables para las actividades de organismos benéficos [4]. Por otra parte, en el medio acuático, los fungicidas se pueden disolver o unir a la materia en suspensión y a los sedimentos. De esta manera, los fungicidas pueden ser transferidos a los tejidos de los organismos acuáticos provocando su bioacumulación, con consecuencias adversas para especies no objetivo [41].

En los últimos 30 años, se ha reportado que fungicidas orgánicos persistentes emitidos en zonas de producción son transportados por vías naturales hasta el Ártico. Se ha reportado un aumento en las concentraciones de algunos productos químicos de uso actual; como el clorpirifos, endosulfán, trifluralina, así como la bioacumulación de compuestos como pentacloroanisol, clorpirifos, endosulfán y metoxicloro [42].

El clorotalonil es un fungicida organoclorado que se ha detectado en el aire en concentraciones altas en Europa y América del Norte y en menores cantidades en el continente asiático [42]. El clorotalonil también se ha detectado en el agua de mar y en el

aire del Ártico [5], así como en los núcleos de nieve desde el Ártico canadiense [43]. Por otra parte, las aplicaciones frecuentes de fungicidas de cobre han dado lugar a la acumulación de este metal pesado en los suelos y aguas subterráneas [44].

**2.2.5. Control biológico.** En la actualidad, los sistemas de producción agrícola que usan el mínimo de insumos químicos han adquirido gran importancia en muchos países industrializados, con la finalidad evitar daños a la salud humana, reducir el daño ambiental y la búsqueda de lo natural [45]. El enfoque de reducir el uso de fertilizantes y fungicidas consiste en sistemas agrícolas integrales en donde se aproveche las sinergias entre los factores bióticos, abióticos y el cultivo de interés. Bajo estas condiciones se espera que las plantas reciban los beneficios que proporcionan los microorganismos benéficos de la rizósfera del suelo y de la parte aérea [46].

El control biológico implica el uso de organismos benéficos, que reducen los daños de los agentes fitopatógenos, promueven respuestas positivas de la planta y evitan los efectos negativos de los fungicidas químicos. Las interacciones entre la planta y la comunidad microbiana pueden usarse como medios de control para suprimir el desarrollo de patógenos en plantas [47].

Se ha determinado que las especies del género *Trichoderma* utilizan diversos mecanismos de control biológico entre los cuales se encuentran el micoparasitismo, la antibiosis, y la competencia por espacio y nutrientes. Por otra parte, se le ha conferido a este género la capacidad de promover el crecimiento y desarrollo, e inducir la respuesta de defensa de las plantas [48]. Varias especies de hongos del género *Trichoderma* tienen una gran capacidad para proteger las plantas y para regular las poblaciones de patógenos bajo diferentes condiciones agroedafológicas. Estos hongos han sido ampliamente estudiados e incluso

comercializados en el mercado como bioplaguicidas, biofertilizantes y enmiendas del suelo [49].

La combinación de diversos agentes de control biológico hace más eficaz la supresión de enfermedades de las plantas, proporcionando mejores resultados que con el uso de cepas de control biológico individuales. La combinación de una cepa de *T. harzianum* y una cepa de *Pseudomonas sp.* indujo un mayor nivel de resistencia contra *Fusarium oxysporum* en plantas de pepino. Este resultado fue asociado con la expresión de un conjunto de genes relacionados con la defensa contra *Fusarium* [48]. Así también, la combinación de bacterias fluorescentes del género *Pseudomonas*, *T. harzianum* y hongos micorrízicos arbusculares (HMA) proporcionaron un mejor control del daño de *F. oxysporum*, en plantas de jitomate, al reducir la incidencia y gravedad de la enfermedad en un 67% [50]. Por otra parte, la combinación de *Bacillus subtilis* y *T. harzianum* mostraron mayor capacidad para el control de las enfermedades de marchitez bacteriana, damping-off y viruela en plantas de tabaco causado por *Ralstonia sp*, *Pythium sp* y *Cercospora sp*, respectivamente [51].

Las bacterias de la rizósfera (rizobacterias) tienen la capacidad de colonizar el sistema radicular de las plantas y competir con la microflora del suelo. Las especies de *Bacillus* constituyen la mayoría de este tipo de bacterias en los reportes de aislamientos a partir de muestras de suelo rizosférico. Especies endofíticas y epífitas del género *Bacillus*, tienen el potencial de reducir la patogenicidad de microorganismos fitopatógenos debido a la producción de enzimas hidrolíticas como las glucanasas y los lipopéptidos con actividad antibiótica como surfactina, fengicina e iturina [52]. El género *Bacillus* incluye varias especies (*subtilis*, *licheniformis*, *amyloliquefaciens*, *pumilus*, *thuringiensis*, etc.) que se han usado en el biocontrol de enfermedades de cultivos agrícolas [3]. Estos microorganismos benéficos se reconocen como inocuos para el ser humano, forman endosporas, son resistentes

a la disecación y son secretoras de enzimas y antibióticos. Estas bacterias también actúan como micoparásitos y compiten con los microorganismos fitopatógenos por nichos ecológicos en la rizósfera [2].

### **2.3. Uso de *Trichoderma* sp. en el biocontrol de fitopatógenos**

**2.3.1. Características del género *Trichoderma*.** La rizósfera es un hábitat rico en nutrientes y alberga una gran variedad de bacterias y hongos que pueden ser benéficos, nocivos, o sin ningún efecto en la planta. Estos microorganismos del suelo juegan un papel importante en la transformación de los nutrientes de las plantas de las formas no disponibles a las disponibles, lo que conduce a una mejora de la fertilidad del suelo [48].

El género *Trichoderma* comprende un gran número de cepas de hongos filamentosos competentes de la rizósfera que se encuentran en una gran variedad de ecosistemas. A este género se le ha conferido la capacidad de mejorar el crecimiento de la planta por diferentes mecanismos. Diferentes reportes indican que la interacción de la planta con *Trichoderma* sp. se correlaciona con una mejor disponibilidad de fósforo y con el crecimiento de la planta [46]. El hongo *Trichoderma* tiene capacidad antagonista alta y gran actividad de micoparasitismo [53]. Varias cepas de *Trichoderma* son simbioses oportunistas de plantas. Estas especies se han utilizado como agentes de control biológico contra enfermedades de plantas, mientras que otras como *Trichoderma reesei*, son hongos filamentosos industrialmente importantes por su producción de celulasas [54]. Por otra parte, se ha reportado que *Trichoderma* incrementa el crecimiento de raíces y brotes así como el índice de vigor del área foliar de las plántulas de jitomate [11].

**2.3.2. Crecimiento de *Trichoderma* en su hábitat natural.** Los miembros del género *Trichoderma* son componentes cosmopolitas y habitantes de diferentes ecosistemas en una amplia gama de zonas climáticas. La aparición de especies de *Trichoderma* está regulada por varios factores que incluyen el microclima, la disponibilidad de sustratos y las interacciones ecológicas complejas. La supervivencia en diferentes hábitats geográficos está relacionada con la diversidad metabólica, alta capacidad reproductiva y capacidades competitivas [55]. Los hongos del género *Trichoderma* se nutren de los polisacáridos altamente hidratados de la capa de mucigel secretada por la raíz, así como de los monosacáridos y disacáridos excretados por las raíces de las plantas en la rizósfera. Se ha observado que la sacarosa derivada de plantas es un recurso importante utilizado por las células de *Trichoderma* para facilitar la colonización de la raíz, la coordinación de los mecanismos de defensa, y el aumento de la tasa fotosintética de las hojas [56].

**2.3.3. Crecimiento de *Trichoderma in vitro*.** El género *Trichoderma* es fácilmente cultivado *in vitro*. El medio de cultivo agar papa y dextrosa (APD) es el más recomendado para el cultivo de hongos. Se han obtenido conidios de *T. harzianum* en placas de APD colocadas bajo luz blanca fluorescente con una alternancia de luz/oscuridad de 12 h a  $25 \pm 1$  °C [11]. También se han obtenido inóculos de *Trichoderma* en APD en 7 y 14 d a 28 °C [48].

**2.3.4. Mecanismos de acción antifúngica.** Las cepas de *Trichoderma* usadas en el biocontrol, colonizan eficazmente la superficie de las hojas y los sistemas de raíces y la capa del suelo circundante. A su vez, influyen en forma positiva en la planta protegiéndola de la infección de fitopatógenos a través de tres mecanismos principales: micoparasitismo y antibiosis, competencia por espacio y nutrientes e inducción de resistencia sistémica.

**Micoparasitismo.** Los hongos usados para el biocontrol son en general habitantes de la rizósfera. Estos hongos deben poseer capacidades para competir con otros microorganismos que residen en el mismo nicho ecológico, e incluso usar a estos últimos como fuente de nutrientes dado que el esqueleto de las paredes celulares de los hongos fitopatógenos filamentosos contiene glucanos, quitina y proteínas [57]. *Trichoderma* produce numerosos compuestos biológicamente activos, enzimas degradantes y metabolitos secundarios que se utilizan para degradar la pared celular de los hongos fitopatógenos, lo que le permite ser un agente eficiente de biocontrol [49].

El micoparasitismo de patógenos de plantas es un mecanismo para el biocontrol de muchas especies de *Trichoderma*. Antes del contacto con el fitopatógeno, *Trichoderma* inicia una etapa de reconocimiento temprano, en la que produce y libera enzimas que degradan ligeramente la pared celular de su presa. Después de esto, *Trichoderma* crece en dirección de la presa e inicia una mayor producción de enzimas, en su mayoría quitinasas, glucanasas y proteasas [58]. Posteriormente, el hongo *Trichoderma* se adjunta alrededor de su presa y forma apresorios para penetrar en las hifas. Estas hifas son degradadas por las enzimas hidrolíticas producidas por *Trichoderma* [59]. La producción de estas enzimas le da facultades al hongo *Trichoderma*, para ejercer el micoparasitismo y su efecto antagonista [60].

**Antibiosis.** Se ha demostrado que *Trichoderma* sp. produce una gran cantidad de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana contra una amplia gama de microorganismos [58]. La producción de metabolitos secundarios depende de la cepa e incluye compuestos antimicrobianos volátiles y no volátiles pertenecientes a varias clases químicas. Estos compuestos incluyen especies químicas de bajo peso molecular como pironas, butenolides, antraquinonas, tricotecenos y terpenoides, así como péptidos no-

ribosomales y peptaiboles [57]. Se ha demostrado que algunos de estos compuestos actúan sinérgicamente junto con las enzimas líticas.

**Competencia por nutrientes.** En un ambiente con limitación de nutrientes, ocurre la competencia ya sea por nutrientes o por sitios de colonización y de infección entre los microorganismos que tienen los mismos requerimientos fisiológicos en un nicho ecológico. La competencia por nutrientes y especialmente por carbono es inherente del ambiente rizosférico en cuestión. Este mecanismo también ayuda a *Trichoderma* a mejorar su capacidad de sobrevivencia [61].

La competencia por nutrientes es una de las cualidades más importantes de *Trichoderma*. La cepa *T. asperellum* compete por hierro en el medio, lo que le permite controlar la enfermedad causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* en plantas de jitomate. Las poblaciones de *Fusarium* se vuelven menos patógenas en la presencia de esta cepa [62].

**Resistencia inducida.** Las respuestas de defensa sistémica inducida en las plantas se han reportado como uno de los mecanismos por los cuales organismos como *Trichoderma* pueden reducir las enfermedades en plantas. Los hongos *Trichoderma* promueven el crecimiento vegetal por la producción de hormonas de crecimiento vegetal como auxinas y giberelinas [11]. El aumento en los niveles de estas fitohormonas, es uno de los mecanismos directos por el cual los agentes de biocontrol promueven el crecimiento de la raíz y el área foliar en plantas. Las auxinas y giberelinas también estimulan la captación de más nutrientes en el suelo, la señalización entre los órganos de la planta y ayudan a integrar éstas para producir respuestas de defensa adecuada contra la biota patógena o contra el estrés abiótico [63].

Se ha reportado en la literatura, que *T. harzianum* incrementa la actividad de las enzimas relacionadas con la defensa contra el estrés oxidativo, como la peroxidasa, polifenol oxidasa y superóxido dismutasa. Este incremento en la actividad enzimática contribuye a la reducción

significativa de los daños causados por *A. solani* y *P. infestans* [11]. Por otra parte, se determinó que la cepa *T. asperellum* ejerce una actividad de protección en plantas contra la toxicidad producida por concentraciones de hierro altas [62].

**2.3.5 Cepas de *Trichoderma* usadas como biocontrol.** Se ha reportado que *Trichoderma harzianum* incrementó *in vitro* el crecimiento de raíces y plántulas. Esta cepa también mejoró la defensa de las plantas de jitomate contra los fitopatógenos *Alternaria solani* y *Phytophthora infestans* a través de mecanismos de resistencia sistémica como la inducción de hormonas de crecimiento y el incremento de enzimas de defensa de las plantas [11].

Por otra parte, otro estudio reportó que *Trichoderma parareesei* mejoró el crecimiento y el desarrollo de raíces laterales de plantas de jitomate. Asimismo, esta cepa mostró potencial contra fitopatógenos de plantas de jitomate como *Botrytis cinerea* [54].

En estudios sobre la resistencia inducida por *T. koningiopsis* contra el fitopatógeno *Fusarium* en plantas de jitomate en vivero, se reportó que la cepa estimuló el crecimiento de la planta y la inducción en las plantas de genes relacionados con mecanismos de defensa [64]. Así también, se ha evaluado una cepa de *T. harzianum* combinada con *B. subtilis* contra los hongos fitopatógenos *A. alternata* y *F. oxysporum* en hortalizas cultivadas en invernadero. Los resultados indicaron que *Trichoderma* y *Bacillus* tuvieron un efecto positivo en el control de fitopatógenos en forma individual o combinada [65].

Por otra parte, se reportó que la cepa *T. asperellum* proporcionó protección a las plantas de jitomate contra el fitopatógeno *F. oxysporum f.sp. lycopersici*, causante de la marchitez vascular. Se determinó que el mecanismo de acción de *Trichoderma* fue la competencia por hierro en el medio, con lo cual el crecimiento del fitopatógeno se vio limitado [62].

#### **2.4. Uso de cepas bacterianas de *Bacillus* para el control de fitopatógenos**

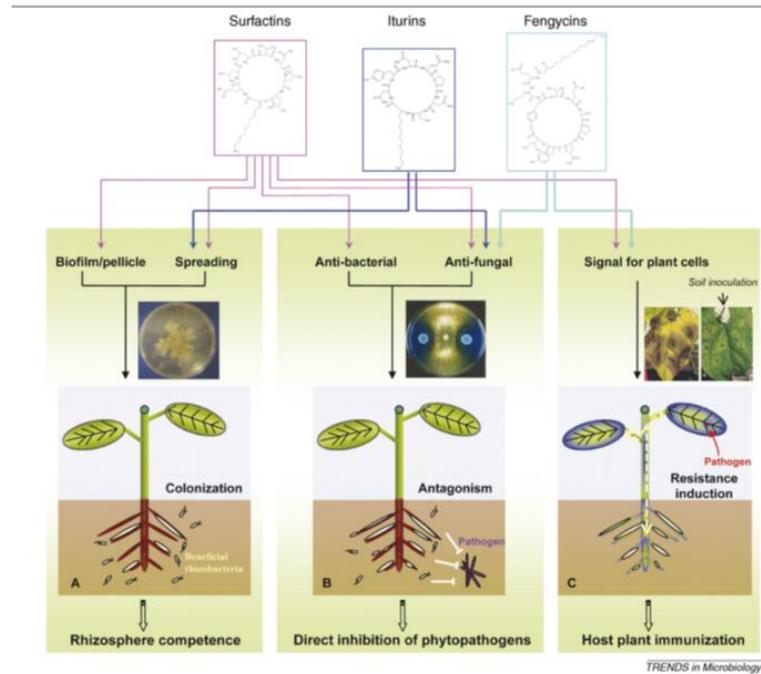
El control biológico de fitopatógenos transmitidos por el suelo puede proporcionar un mejor manejo de enfermedades que no pueden ser controladas mediante otras estrategias. La colonización de raíces de las plantas es un paso esencial tanto para las rizobacterias benéficas como para las patógenas. Patrones de colonización han mostrado que las rizobacterias actúan como agentes de control biológico o como promotoras del crecimiento formando microcolonias en la zona de exudación radicular [66]. Las rizobacterias están presentes en la superficie de la raíz, zona donde las plantas proporcionan nutrientes mediante los exudados y lisados radiculares. Ciertas cepas de bacterias se conocen como rizobacterias promotoras de crecimiento de plantas (PGPR por sus siglas en inglés). La promoción del crecimiento por parte de estas bacterias se debe principalmente a la reducción de los patógenos del suelo y otros microorganismos nocivos. Aunque también se han reportado efectos directos en el crecimiento de las plantas [67].

*Bacillus* comprende más de 60 especies de diferentes fenotipos que tienen propiedades que los hacen capaces para desarrollarse como agentes de control biológico. Poseen una buena resistencia a la tensión mecánica, a la presión osmótica y son capaces de producir compuestos fungicidas de bajo peso molecular. Los microorganismos pertenecientes al género *Bacillus* son aerobios, gram-positivos, saprófitos y forman endosporas. Estas bacterias crecen en medios simples y producen enzimas hidrolíticas como proteasas, manasas y glucanasas [68]. Las especies del género *Bacillus* que son frecuentemente usadas para el control de enfermedades de plantas son *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* y *B. pumilus* [69].

**2.4.1. Crecimiento de *Bacillus* en su hábitat natural.** El género *Bacillus* abarca una gran biodiversidad genética. Las cepas de este género se encuentran en una diversidad de ambientes que van desde el agua, el suelo, hasta en ambientes extremos como las aguas termales [70]. Estas bacterias son conocidas por vivir en ambientes aerobios. También se ha reportado que estas cepas pueden comportarse como microorganismos facultativos en condiciones anaerobias y microaerofílicas [71]. Esto constituye una ventaja importante en la rizósfera de estas bacterias, ya que la disponibilidad de oxígeno es generalmente baja. *Bacillus licheniformis* es una bacteria saprófita muy extendida en el suelo y otros hábitats naturales. La habilidad para producir y secretar numerosas enzimas hidrolíticas permite que las células degraden muchos sustratos [72].

**2.4.2. Mecanismos de acción antifúngica.** Las cepas bacterianas benéficas colonizan la superficie de las raíces. Estas bacterias tienen la capacidad de proteger a la planta de infección por patógenos mediante mecanismos como la competencia por nicho ecológico y por sustrato, la producción de aleloquímicos inhibitorios y la inducción de resistencia sistémica [3,66].

En la Figura 1 se muestra una representación de la inhibición en el crecimiento de hongos por células bacterianas del género *Bacillus* y la reducción de la enfermedad de la hoja después de la inoculación de la bacteria en las raíces de la planta. En esta figura, se presentan los mecanismos de competencia, antibiosis y resistencia sistémica inducida. En este último mecanismo, la emisión de señales por la percepción de la rizobacteria en la raíz se transmite por toda la planta y existe un refuerzo sistémico contra patógenos en sitios distantes a la infección [73].



**Figura 1.** Interacciones en la planta con lipopéptidos de *Bacillus* en diferentes mecanismos de control biológico [73].

**2.4.2.1. Competencia por nicho y nutrientes.** Los organismos que habitan el suelo compiten por los recursos, como los nutrientes y el oxígeno. Esta competencia se da especialmente por los sitios adecuados en la zona radicular. La competencia por los nutrientes, especialmente por carbono, se considera que es responsable del fenómeno conocido como fungistasis, que se refiere a la inhibición de la germinación de los conidios de hongos en el suelo [74]. En la rizósfera, la eficiencia de la absorción de nutrientes y de los procesos catabólicos de las bacterias es un factor clave en la competitividad de los microorganismos. La competencia en el suelo por elementos traza, como hierro, cobre, zinc y manganeso, también es un factor limitante. Se sabe que el hierro es un elemento esencial para el crecimiento de todos los organismos vivos; la escasez de su forma biodisponible en hábitats del suelo resulta en una fuerte competencia entre los organismos rizosféricos [75].

**2.4.2.2. Antibiosis: Inhibición directa de fitopatógenos.** Los miembros de diferentes especies de *Bacillus* como *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. mycoides* y *B. pumilus* son conocidos como productores muy eficientes de moléculas antibióticas que han sido reportados por su actividad inhibidora contra patógenos de plantas [3]. Los lipopéptidos de *Bacillus*, surfactinas, iturinas y fengicinas, han sido objeto de estudio por su actividad antagonista contra fitopatógenos potenciales, como bacterias, hongos y oomicetos [73].

Las surfactinas son heptapéptidos interrelacionados con un ácido graso  $\beta$ -hidroxi para formar una estructura de anillo cíclico de lactona. Las iturinas también son heptapéptidos que están vinculadas a una cadena de ácido graso  $\beta$ -amino. Las fengicinas, son decalipopéptidos con un anillo de lactona y con una cadena de ácido graso  $\beta$ -hidroxi [76]. Recientemente se ha reportado que estos lipopéptidos también pueden influir en la colonización de las raíces ya que desempeñan un papel importante en la interacción de *Bacillus* con las plantas mediante el estímulo de los mecanismos de defensa del huésped [73]. Las rizobacterias *Bacillus* también pueden ser antagónicas a los patógenos por medio de la excreción de enzimas que degradan la pared celular, como las quitinasas, celulasas y glucanasas [77].

**2.4.2.3. Parasitismo.** La depredación/parasitismo es también un mecanismo importante utilizado por algunas bacterias rizosféricas. Este mecanismo se basa en la destrucción enzimática de la pared celular de hongos patógenos. Se ha sugerido la capacidad de las bacterias para parasitar y degradar conidios o hifas de los patógenos mediante la producción de diversas enzimas que degradan la pared celular [78]. *Bacillus ehimensis* produce enzimas degradadoras de quitina. Mientras que *B. subtilis* muestra fungitoxicidad causada por la

secreción de glucosaminidasa N-acetilo y glucanasa [3]. *B. licheniformis* es conocido por su capacidad de producir y secretar numerosas enzimas hidrolíticas que le permiten al microorganismo una gran variedad de sustratos y crecer en un amplio rango de fuentes de nutrientes [79].

**2.4.2.4. Inducción de resistencia sistémica.** La resistencia inducida es un estado de la capacidad defensiva mejorada que desarrolla una planta cuando es estimulada adecuadamente. La resistencia inducida puede ser desencadenada por ciertos productos químicos, no dañinos, formas no virulentas de patógenos y razas incompatibles de patógenos. Generalmente, la resistencia inducida es sistémica, porque la capacidad defensiva aumenta no sólo en las partes infectadas de la planta, sino también en los tejidos no infectados que están separados espacialmente [80].

En algunas especies de plantas, el ácido salicílico producido por las rizobacterias sirve como transductor para activar la resistencia sistémica inducida (RSI). También se ha sugerido que algunas bacterias inducen la producción de etileno o modulan la percepción de etileno por la planta. El etileno es considerado como un paso específico y esencial en la vía de transducción de señales que conduce a la RSI. El ácido jasmónico también ha sido relacionado con la inducción de varias respuestas defensivas [81].

Las bacterias del género *Bacillus* pueden inducir la síntesis de hormonas en la planta, como citocininas, etileno y giberelinas. Asimismo, algunas cepas de *Bacillus* pueden solubilizar fosfato presente en el suelo mediante fosfatasa. Por otra parte, la reducción química del hierro puede ser un mecanismo directo para mejorar la nutrición de la planta [77]. Finalmente, cepas de *Bacillus* incrementan los valores de ácido indol-3-acético y de ácido giberélico en las raíces de las plantas. Estos compuestos mejoran la resistencia

sistémica en plántulas de jitomate mediante la inducción de hormonas de crecimiento y enzimas de defensa [11].

**2.4.3 Cepas de *Bacillus* usadas para el biocontrol de fitopatógenos.** Los métodos de biocontrol basados en *Bacillus* tienen un gran potencial en el manejo integrado de plagas y enfermedades en plantas. Estos microorganismos bacterianos exhiben propiedades antagonistas útiles para la formulación de biofungicidas. El género *Bacillus* abarca una gran cantidad de especies que incluyen varias de las cepas de biocontrol descritas hasta la fecha [82]. Entre las características de biocontrol de estas bacterias están las siguientes: son organismos bien estudiados lo que facilita su uso racional; no son patógenos para los seres humanos; y tienen la capacidad de producir conidios que las hace capaces de soportar condiciones ambientales extremas por tiempos prolongados. Lo anterior facilita su uso como suspensiones bacterianas y formulaciones en polvo [3].

*Bacillus firmus* ha sido usado como agente de biocontrol contra huevecillos y larvas del nematodo agallador de raíz *Meloidogyne incognita*. En condiciones de laboratorio se ha obtenido una reducción de incubación de huevecillos de 98 a 100% y en la etapa juvenil, el 100% de inhibición de la movilidad. Así también, en condiciones de invernadero con plantas de jitomate, se ha reducido el número de agallas en un 91%, la población en un 76% y el número de huevecillos en un 45% [83].

Estudios anteriores han mostrado que cuatro cepas del género *Bacillus* con características morfológicas y fisiológicas similares fueron capaces de disminuir la gravedad de la enfermedad del tizón temprano (*Alternaria alternata*) en plantas de jitomate. La zona de inhibición observada sugirió un mecanismo de antibiosis. Adicionalmente, los perfiles enzimáticos indicaron que las cepas podrían ser potenciales competidores ecológicos [2].

Así también, en otro estudio se seleccionó un aislado de *Bacillus subtilis* como el mejor antagonista contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* en estudios *in vitro*. La cepa de *B. subtilis* fue capaz de reducir la incidencia de la enfermedad en un 75 % [52].

Finalmente, en otro estudio, *B. subtilis* y *T. harzianum* inhibieron el crecimiento de micelio de *Alternaria solani* y *Phytophthora infestans* en condiciones *in vitro*, e incrementaron el crecimiento de raíces y brotes, así como el área foliar y el vigor de plantas de jitomate. Estos tratamientos mejoraron los niveles de enzimas relacionadas con el sistema de defensa de la planta como la peroxidasa, la polifenol oxidasa y la superóxido dismutasa [11].

### 3. IMPORTANCIA DEL ESTUDIO

Los hongos *Fusarium oxysporum* y *Alternaria alternata*, son fitopatógenos que causan grandes pérdidas en la producción de jitomate a nivel nacional y mundial. Las pérdidas por daños y disminución de la calidad del cultivo de jitomate a nivel estatal y nacional han llegado a ser hasta del 50% de la producción total. En Sinaloa, el mayor estado productor de jitomate en México, el hongo *Fusarium* ocasiona pérdidas en la producción de jitomate superiores al 60% [84].

Diversas investigaciones han mostrado que el hongo *Trichoderma* y la bacteria *Bacillus*, presentan mecanismos deseables como agentes de biocontrol: antagonismo, antibiosis, micoparasitismo, competencia por espacio y nutrientes e inducen la resistencia sistémica en las plantas de cultivo [3]. Por otra parte, se ha reportado en literatura científica que el uso de las cepas de *Trichoderma* y *Bacillus* mejora la interacción planta-suelo, aumenta las poblaciones de microorganismos benéficos e inducen el crecimiento de la planta [49]. Finalmente, el uso de estos agentes de biocontrol permite aprovechar las sinergias ambientales orientadas al desarrollo de la agricultura orgánica.

Al evaluar las cepas de microorganismos fitopatógenos y agentes de biocontrol aislados en el estado de Oaxaca, se contribuye al conocimiento sobre la aplicación de la microbiota nativa de suelos de Oaxaca a una problemática de la producción agrícola local, nacional y mundial. Debido a lo anterior en el presente trabajo se evaluará *in vitro* e *in vivo*, el uso de cepas de *Trichoderma asperelloides* (VSL4) y *Bacillus licheniformis* (MV1) como posibles alternativas para el manejo sustentable de enfermedades del jitomate.

#### 4. ORIGINALIDAD

Las cepas de hongos fitopatógenos y de microorganismos biocontroladores que se probarán en este trabajo de tesis, fueron aisladas y caracterizadas en el estado de Oaxaca, y forman parte del cepario del grupo de colaboración de Bioprocesos de la Universidad Tecnológica de la Mixteca y de la Universidad del Papaloapan. La cepa del hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* (VSL314) fue aislada de plantas de jitomate enfermas cultivadas en invernaderos en el estado de Oaxaca. Por otra parte, la cepa del fitopatógeno *Alternaria alternata* (VSL302) fue aislada de una planta de jitomate con síntomas de enfermedad de tizón temprano en un invernadero ubicado en Huajuapán de León, Oaxaca. Asimismo, la cepa del hongo *Trichoderma asperelloides* (VSL4) se aisló a partir de suelo cultivado con caña de azúcar en Tuxtepec, Oaxaca. Finalmente, la cepa de la bacteria *Bacillus licheniformis* (MV1) fue aislada de una muestra de suelo rizosférico en el estado de Oaxaca.

El uso de las cepas *Trichoderma asperelloides* y *Bacillus licheniformis* no se han caracterizado en pruebas *in vitro* ni en evaluaciones *in vivo* en plantas de jitomate cultivadas en invernadero. El estudio del uso separado y combinado de estas cepas de biocontrol contra fitopatógenos de plantas de jitomate aún no ha sido reportado en la literatura científica.

## 5. OBJETIVOS

### General

Evaluar la actividad de las cepas *Trichoderma asperelloides* (VSL4) y *Bacillus licheniformis* (MV1) como agentes de biocontrol contra los fitopatógenos *Fusarium oxysporum* (VSL314) y *Alternaria alternata* (VSL302) *in vitro* y en plantas de jitomate cultivadas en invernadero.

### Particulares

1. Establecer las condiciones para el cultivo *in vitro* y la producción de conidios del hongo *T. asperelloides* y de la bacteria *B. licheniformis*, así como de los microorganismos fitopatógenos *F. oxysporum* y *A. alternata*.
2. Determinar la actividad antagonista *in vitro* de *T. asperelloides* y *B. licheniformis* en contra del crecimiento de los fitopatógenos *F. oxysporum* y *A. alternata*.
3. Evaluar la actividad biocontroladora *in vivo* de las cepas de *T. asperelloides* y *B. licheniformis* contra los fitopatógenos *F. oxysporum* y *A. alternata* en plantas de jitomate bajo condiciones de invernadero.
4. Evaluar los parámetros agronómicos de velocidad de crecimiento, altura total y peso seco de las plantas de jitomate obtenidos en los diferentes tratamientos.

## 6. METAS

### **Del objetivo particular 1**

Meta 1.1. Propagación y producción de conidios de los hongos *F. oxysporum*, *A. alternata* y *T. asperelloides* en medios de cultivo *in vitro*.

Meta 1.2. Propagación y conservación de la bacteria *B. licheniformis* en un medio sólido y producción de células de esta bacteria en un medio líquido.

### **Del objetivo particular 2**

Meta 2.1. Medición de las velocidades de crecimiento de los hongos *F. oxysporum*, *A. alternata* y *T. asperelloides* en medio sólido.

Meta 2.2. Confrontación en cultivo dual de los agentes de biocontrol *T. asperelloides* y *B. licheniformis* contra los hongos fitopatógenos *F. oxysporum* y *A. alternata*.

### **Del objetivo particular 3**

Meta 3.1. Implementación de técnicas de inoculación de los microorganismos en plantas de jitomate.

Meta 3.2. Evaluación del antagonismo de *T. asperelloides* y *B. licheniformis* contra los fitopatógenos *F. oxysporum* y *A. alternata* en plantas *in vivo* en condiciones de invernadero.

### **Del objetivo particular 4**

Meta 4.1. Medición de la velocidad de crecimiento, altura total y peso seco de las plantas de jitomate obtenidas de los diferentes tratamientos.

## 7. METODOLOGÍA

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Bioprocesos del edificio de Laboratorios de la Maestría en Ciencias: Productos Naturales y Alimentos, así como también en el invernadero de la Universidad Tecnológica de la Mixteca, Oax. Méx.

### 7.1. Material biológico

Las cepas de los hongos fitopatógenos *Alternaria alternata* (VSL302) y *Fusarium oxysporum* (VSL314) fueron proporcionadas por el Dr. Vladimir Sánchez López de la Universidad del Papaloapan. El Dr. Sánchez López realizó el aislamiento de las cepas de *F. oxysporum* y *A. alternata* a partir de plantas de jitomate con síntomas de enfermedad de marchitamiento vascular y tizón temprano, respectivamente, cultivadas en invernaderos en el estado de Oaxaca [85].

La cepa del hongo *Trichoderma asperelloides* (VSL4) fue proporcionada por el Dr. Vladimir Sánchez López, quien hizo la identificación de la cepa, misma que fue aislada a partir de suelo de cultivos de caña de azúcar en Tuxtepec, Oaxaca. Por otra parte, la cepa de la bacteria *Bacillus licheniformis* fue aislada e identificada por el M.C. Luis Erick Mota Pacheco [86] y forma parte del material biológico del Laboratorio de Bioprocesos de la Universidad Tecnológica de la Mixteca.

**7.2. Meta 1.1. Propagación y producción de conidios de los hongos *F. oxysporum*, *A. alternata* y *T. asperelloides* en medios de cultivo *in vitro*.**

**7.2.1. Mantenimiento de las cepas.** Las cepas de los hongos fitopatógenos (*F. oxysporum* y *A. alternata*) y del agente de biocontrol *T. asperelloides* fueron mantenidas en medio de cultivo agar papa dextrosa (APD) [87] e incubadas a una temperatura constante de 28 °C, con fotoperiodo de luz/oscuridad de 12 h. Se realizaron resiembras cada 20 d para mantener las cepas activas.

La cepa *B. licheniformis* se mantuvo en medio de cultivo Luria-Bertani (LB) que es un medio general enriquecido para el crecimiento de bacterias [86]. La formulación para la preparación de este medio consiste en: 1 L de agua destilada, 5 g de peptona de caseína, 3 g de extracto de levadura, 2.5 g de NaCl y 15 g de agar [88]. La mezcla de los componentes se esterilizó a 121 °C durante 20 min. A esta formulación se le adicionaron 15 mL de una solución acuosa estéril de Rojo Congo 1:400 [86].

**7.2.2. Producción de conidios de los hongos.** Se evaluó el grado de producción de conidios de los hongos (*F. oxysporum*, *A. alternata* y *T. asperelloides*) utilizando distintos medios de cultivo para elegir aquel que permitiera obtener la mayor cantidad de conidios en el menor tiempo de incubación. A continuación se muestran las condiciones que se evaluaron para cada una de las cepas.

***Alternaria alternata.*** Para el fitopatógeno *A. alternata* se experimentaron 6 diferentes medios de cultivo (Tabla 5). El agar papa dextrosa (APD) fue preparado siguiendo las indicaciones del producto. Los ingredientes, las cantidades y procedimiento para la preparación del resto de los medios se muestran en el Apéndice 1. En este apartado sólo se

describe la preparación del medio de cultivo utilizado de manera rutinaria para la producción de conidios de este hongo.

**Tabla 5. Medios de cultivo usados para la esporulación de *A. alternata***

Medio de cultivo
Medio APD
Medio SNA
Agar jugo V <sub>8</sub> MA
Agar jugo V <sub>8</sub> MB
Medio agar clavel
Medio agar papa-zanahoria

**Medio de cultivo agar Jugo V<sub>8</sub>.** El medio agar jugo V<sub>8</sub> fue preparado para la obtención de conidios de *A. alternata*. Los ingredientes usados por cada L de medio fueron: 900 mL de agua destilada, 100 mL de jugo V<sub>8</sub>, 2 g de CaCO<sub>3</sub> y 15 g de agar bacteriológico [89].

Primeramente, el jugo V<sub>8</sub> fue centrifugado a 4000 rpm durante 20 min. El precipitado fue retirado de la suspensión. Posteriormente, se agregó CaCO<sub>3</sub> al jugo V<sub>8</sub> centrifugado y se agitó hasta disolver. La solución se dejó reposar durante 10 min. Después de esto, la solución fue centrifugada a 4000 rpm durante 20 min para clarificar. Se obtuvo el sobrenadante (sin sólidos) hasta completar 100 mL. El agar fue disuelto por separado en agua. A continuación, se mezcló la solución de jugo V<sub>8</sub> con el agar disuelto y se aforó a 1 L [89]. Posteriormente, con el uso de una barra magnética la solución se homogenizó en una parrilla eléctrica, se vació en matraces y se sometió a esterilización. Subsecuentemente, se hizo el vaciado en cajas Petri a razón de 15 mL cada caja. Finalmente, se inocularon las cajas con un disco con

micelio de *A. alternata* y éstas se incubaron a temperatura constante de 28 °C durante 15 d con fotoperiodo de 12 h de luz/oscuridad.

Para la obtención de conidios de *A. alternata* a cada caja con cultivo de la cepa, se agregaron 15 mL de agua destilada estéril y se raspó el agar con un extensor estéril. Posteriormente, el desprendido de cada caja de Petri y el agar fue transferido a un matraz de 500 mL y se agitó en una incubadora orbital durante 45 min para favorecer el desprendimiento de los conidios. Al término de la agitación, se hizo un filtrado a través de una malla de nylon fino estéril para eliminar los fragmentos de agar. Finalmente con el uso de la cámara Neubauer se cuantificó el número de conidios/mL presentes en la suspensión.

***Fusarium oxysporum.*** Para la obtención de conidios del fitopatógeno *F. oxysporum* se hicieron pruebas con los medios de cultivo agar clavel y APD. Para realizar esto, las cajas Petri con 15 mL de medio fueron incubadas a temperatura de 28 °C durante 10 d [27]. A cada caja Petri se le agregaron 30 mL de agua destilada estéril y se hizo un raspado de conidios con un extensor estéril. El desprendido y el agar de cada caja Petri fueron transferidos a un matraz y sometido a agitación en una incubadora orbital durante 45 min. Posterior a la agitación, se hizo un filtrado a través de una malla de nylon fino estéril para eliminar partes del agar solubilizado. Finalmente, se obtuvo la suspensión de conidios en agua estéril. Con el uso de la cámara Neubauer, se cuantificó la cantidad de conidios y se hizo el ajuste hasta obtener una concentración de  $1.8 \times 10^6$  conidios/mL [90].

***Trichoderma asperelloides.*** Para la obtención de la suspensión de conidios de esta cepa se hicieron resiembras en cajas de Petri con 15 mL de APD y se incubaron a temperatura de 25 °C durante 7 d, con un fotoperiodo de 12 h luz/oscuridad [11]. Posteriormente se realizó

la cosecha de conidios con base a las técnicas usadas con las otras cepas fúngicas. Se hizo el conteo de conidios obtenidas y se ajustó a una concentración de  $1.7 \times 10^7$  conidios/mL [11].

### **7.3. Meta 1.2. Propagación y conservación de la bacteria *B. licheniformis* en un medio sólido y la producción de células en un medio líquido.**

**7.3.1. Producción de células de *Bacillus licheniformis*.** Para la preparación de células de *B. licheniformis* en suspensión, fue empleado el medio líquido NFb modificado por la adición de glucosa. La formulación del caldo consistió en 900 mL de agua destilada, 100 mL de solución salina, 5 g de ácido DL-málico, 0.5 g de extracto de levadura, 4.8 g de KOH y 10 g de glucosa. La solución salina se preparó con base a la siguiente formulación: 1 L de agua destilada, 5 g de  $K_2HPO_4$ , 2 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1 g de NaCl, 2 g de  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  [86]. Los ingredientes fueron mezclados, homogenizados y vaciado en matraces. Posteriormente, se esterilizó a 121 °C durante 20 min.

Cada matraz de 500 mL con caldo NFb fue inoculado con tres asadas de la cepa de *B. licheniformis*. Los matraces fueron incubados en una incubadora orbital a 150 rpm durante 72 h a 37 °C (así también se realizaron pruebas de incubación sin agitación). A continuación, el contenido de los matraces fue vertido en un vaso de precipitados para homogenizar la suspensión. Posteriormente, se hizo la medición de la densidad óptica del cultivo en un espectrofotómetro a 610 nm, usando como blanco caldo NFb sin inocular.

Para la cuantificación de la concentración de biomasa, una suspensión de células se diluyó en agua pasada por ósmosis en proporciones suspensión/agua de 0.8, 0.6, 0.4 y 0.2. Para cada dilución se hizo una medición de la absorbancia y se determinó el peso de la biomasa presente en la suspensión. Para obtener el peso de biomasa, con la ayuda de una bomba de vacío, se hizo pasar la suspensión a través de membranas con diámetro de poro nominal de 0.45  $\mu m$  y

así se retuvo la biomasa de células. Finalmente, se hizo una curva de calibración para relacionar la absorbancia de la suspensión de células con la concentración de biomasa (Apéndice 2). Esta prueba se hizo por duplicado. Mediante la ecuación de la recta obtenida a partir de la curva de calibración concentración vs absorbancia, se determinó la cantidad de biomasa presente en la suspensión de células.

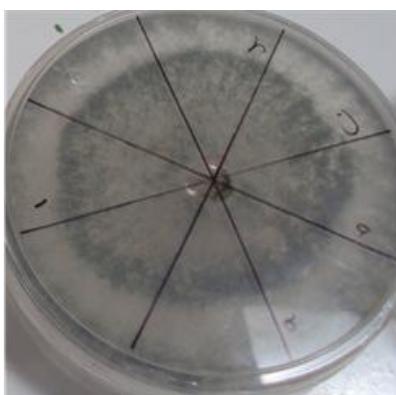
El procedimiento anterior fue considerado como la mejor opción para la cuantificación de *B. licheniformis*. El conteo de células en placas, para esta bacteria, no se consideró conveniente debido a que *B. licheniformis* no presenta un crecimiento de colonias definido, su crecimiento es más bien en forma de líquenes. Además de esto, la medición por absorbancia es un método rápido y eficaz para determinar la densidad óptica de la bacteria, y posteriormente de la biomasa por medio de la correlación con las mediciones de masa seca.

#### **7.4. Meta 2.1. Medición de las velocidades de crecimiento de los hongos *F. oxysporum*, *A. alternata* y *T. asperelloides* en medio sólido.**

**7.4.1. Velocidad de crecimiento de micelio en medio sólido.** Primero se determinaron las velocidades de crecimiento para las diferentes cepas en medio sólido APD. Estas mediciones fueron usadas para colocar el disco de micelio a diferentes tiempos para garantizar que la confrontación del cultivo dual se observara a la mitad de la caja. Se obtuvo *in vitro*, la velocidad de crecimiento de las cepas fitopatógenas *A. alternata* y *F. oxysporum*, en los diferentes medios de cultivo sólido durante 8 días. Para la cepa de *A. alternata* se usaron 4 medios de cultivo diferentes con 5 réplicas (cajas Petri) en cada uno. Para la cepa de *F. oxysporum* se probaron 2 medios de cultivo sólido con 10 réplicas en cada uno.

Se trazaron cuatro líneas (a, b, c y d) en cada caja partiendo de los bordes, todas las líneas cruzaron por el centro de la caja, de tal manera que se formaron octavos del área del círculo.

En cada caja Petri se colocaron 15 mL del medio. En el centro de la caja se depositó un disco con micelio de inóculo del microorganismo a caracterizar (Figura 2). Con el uso de un micrómetro vernier se hizo la medición diaria del crecimiento del hongo a partir del disco con micelio y a lo largo de las cuatro líneas hasta que invadió por completo la caja. Los datos de las mediciones fueron analizados y se determinó el crecimiento acumulado, promedio de crecimiento diario y desviación estándar para cada cepa fúngica en diferentes medios de cultivo. El experimento se hizo por quintuplicado.

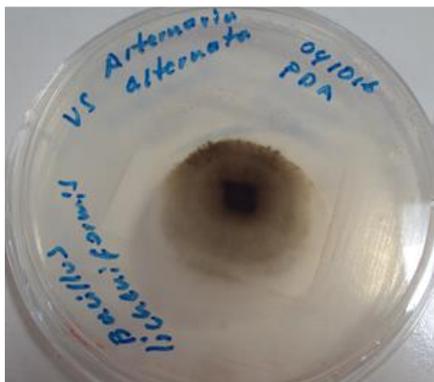


**Figura 2.** Trazado de la caja Petri para medir velocidad de crecimiento de las cepas fúngicas.

## **7.5. Meta 2.2. Confrontación en cultivo dual de los agentes de biocontrol *T. asperelloides* y *B. licheniformis* contra los hongos fitopatógenos *F. oxysporum* y *A. alternata***

**7.5.1. Pruebas *in vitro* del antagonismo de *B. licheniformis* contra *F. oxysporum* y *A. alternata*.** El efecto antagonista de *B. licheniformis* contra *A. alternata* y *F. oxysporum* se determinó por el método de confrontación de cultivos duales en cajas Petri usando el medio de cultivo APD [91]. La cepa de *B. licheniformis* fue inoculada alrededor de la caja Petri mediante el método de estriado. La cepa del fitopatógeno fue colocada en el centro de la caja usando un disco de agar de 0.8 cm de diámetro con crecimiento miceliar del hongo (Figura

3). El experimento se hizo por triplicado y como control positivo se sembró el hongo fitopatógeno en cajas de APD en ausencia de la bacteria *B. licheniformis*. Las cajas fueron incubadas a 25 °C durante 15 d. Se hicieron observaciones diarias para evaluar las interacciones bacteria-hongo.

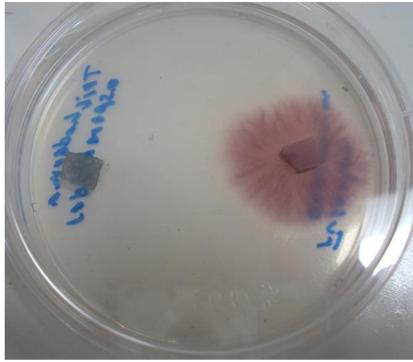


**Figura 3.** Interacciones en cultivo dual *B. licheniformis* por estriado y *A. alternata* en el centro de la caja Petri.

Para tener un mejor conocimiento de lo sucedido en las interacciones, se tomaron micrografías con un microscopio electrónico de barrido (MEB) con sistema de criotransferencia de la marca Jeol, modelo IT300. El procedimiento general fue el siguiente: primero se cortó una muestra de unos 5 x 5 mm con ayuda de un bisturí (conteniendo la menor cantidad de agar posible) directamente de las cajas Petri. La muestra se colocó directamente sobre un fragmento de cinta de carbono a la cual previamente se le retiró el protector y se fijó sobre el porta-muestras. El porta-muestras fue colocado dentro del sputtering (marca Denton Vacuum Modelo Desk V) para recubrir de oro las muestras por medio de la erosión catódica. Para esto, primero se creó un vacío de  $6 \times 10^{-2}$  Torr (el tiempo para alcanzar dicho valor varía de acuerdo al grosor de la muestra). Posteriormente, se bombardeó el bloque de oro con cationes, los cuales desprenden fragmentos muy finos de

oro, los cuales recubren la muestra. Una vez alcanzado el vacío tomó aproximadamente 3 min en recubrirse la muestra. El voltaje de aceleración usado fue 10 y 15 KV dependiendo de la muestra. Finalmente, se sacó el porta-muestras del sputtering y se colocó en el microscopio (marca JEOL Modelo JSM-IT300) para la observación de las muestras. Antes de realizar la captura de las imágenes se creó un alto vacío dentro del microscopio. La observación de las muestras se realizó por medio de una PC.

**7.5.2. Pruebas *in vitro* del antagonismo de *Trichoderma asperelloides* contra *F. oxysporum* y *A. alternata*.** Primeramente se determinaron las velocidades de crecimiento de los hongos *T. asperelloides*, *F. oxysporum* y *A. alternata*. Estas evaluaciones sirvieron como base para saber el tiempo al que se tenían que colocar los inóculos en las cajas Petri para cada hongo, con la finalidad que su interacción en los cultivos duales se realizara en el centro de la caja. La evaluación *in vitro* de la interacción de *T. asperelloides* contra los hongos fitopatógenos, se hizo mediante cultivos duales en el medio de cultivo APD. Dos discos de micelio, uno de cada hongo se colocaron diametralmente opuestos, en una caja Petri de 9 cm de diámetro con 15 mL de medio [9] (Figura 4). Las cajas se incubaron a 25 °C y el crecimiento radial de cada hongo fue medido diariamente con un micrómetro durante 12 d. El experimento se llevó a cabo por triplicado. Al finalizar la prueba se hizo una evaluación cualitativa de la interacción entre los hongos.



**Figura 4.** Interacción entre *T. asperelloides* y *F. oxysporum* en cultivo dual

## **7.6. Meta 5. Implementación de técnicas de inoculación de los microorganismos en plantas de jitomate**

**7.6.1. Pruebas *in vivo* de la patogenicidad de los fitopatógenos y el efecto de los agentes de biocontrol en plantas de jitomate.** La prueba de patogenicidad se realizó en el periodo del 13 de noviembre de 2015 al 22 de enero de 2016. Para la realización de esta prueba, se usó la variedad de jitomate Sun 7705. Esta variedad es comercial usada por productores de la región de Huajuapán de León, ha sido reportada con resistencia al patógeno *Fusarium*, mas no así contra *Alternaria* [92]. Con la finalidad de contar con mayor certeza de los resultados en el experimento, fue importante determinar primeramente que los hongos fitopatógenos eran infectivos y estaban asociados con la enfermedad de acuerdo a los postulados de Koch [30].

Estas pruebas de inoculación y reaislamiento de los fitopatógenos eran importantes para confirmar que efectivamente *A. alternata* y *F. oxysporum* estaban asociados con la enfermedad de tizón temprano y marchitamiento vascular, respectivamente, en plantas de jitomate. Así también, estas pruebas *in vivo* eran importantes para conocer si las cepas *T.*

*asperelloides* y *B. licheniformis* que serían probadas como biocontroles no causaban algún efecto negativo en las plantas.

La inoculación de los microorganismos con potencial benéfico y patógeno se hizo al momento de hacer el trasplante con base a los diferentes tratamientos (Tabla 6). Las plantas fueron elegidas aleatoriamente.

Se hicieron 8 mediciones de altura de las plantas y con base a la última medición se determinó la altura final.

**Tabla 6. Inoculación de las plantas de jitomate en las pruebas de patogenicidad y efecto de los agentes de biocontrol.**

Tratamiento	Deacripción	Plantas por tratamiento
TRI	Plantas + <i>T. asperelloides</i>	6
FUS	Plantas + <i>F. oxysporum</i>	6
TES	Testigo (Plantas sin tratamiento)	6
BAC	Plantas + <i>B. licheniformis</i>	6
ALT	Plantas + <i>A. alternata</i>	6
<b>Total de plantas</b>		<b>30</b>

**7.6.1.1. Inoculación de las plantas de jitomate con *F. oxysporum* y *A. alternata*.** Para la inoculación con el hongo *F. oxysporum*, se removió el sustrato de las raíces de las plantas con agua potable. A continuación, las plantas se dañaron en sus raíces y tallo con una aguja de jeringa estéril. Posteriormente las raíces se sumergieron en una suspensión de conidios del fitopatógeno con una concentración de  $1.1 \times 10^7$  conidios/mL durante 5 min [1]. Finalmente las plántulas fueron trasplantadas en bolsas de plástico que contenían el sustrato y,

adicionalmente 10 mL de la suspensión de conidios se colocaron en cada bolsa para asegurar su inoculación.

Para el tratamiento con *A. alternata*, las plantas fueron colocadas en bolsas con sustrato. Posteriormente, con una aguja de jeringa estéril las plantas fueron dañadas en las primeras hojas verdaderas. A continuación, con un atomizador desinfectado, se asperjó toda el área con una suspensión de conidios del fitopatógeno a una concentración de  $1.0 \times 10^4$  conidios/mL. Finalmente, las plantas fueron cubiertas con una bolsa de polipapel durante 3 d para mantener una humedad relativa alta con la finalidad de tener condiciones adecuadas para la infección del fitopatógeno [2]. Las plantas fueron mantenidas bajo condiciones de invernadero a una temperatura promedio de 26 °C y a una humedad relativa promedio de 53%. El suministro de agua se hizo en forma diaria y las cantidades variaron conforme al crecimiento de las plantas.

#### **7.6.1.2. Inoculación de las plantas de jitomate con *T. asperelloides* y *B. licheniformis***

Para el tratamiento con *T. asperelloides*, primero se removió el sustrato rizosférico de las plantas con agua potable. Posteriormente, las plantas fueron sumergidas en una suspensión de conidios del agente de biocontrol con una concentración de  $2.33 \times 10^7$  conidios/mL [50]. Finalmente, las plantas de jitomate fueron trasplantadas en bolsas de plástico y se les agregó adicionalmente 10 mL de la suspensión de conidios en la zona radicular de la planta para garantizar su inoculación. De manera similar, en las plantas tratadas con *B. licheniformis*, se removió el sustrato de las raíces de las plantas. Posteriormente, las plantas fueron sumergidas durante 5 min en una suspensión de células con una concentración de biomasa de 0.00316 g/mL [48].

**7.6.1.3. Actividades agronómicas para el desarrollo de la prueba de patogenicidad.** Para la siembra de las semillas de jitomate se usaron conos forestales de germinación. El sustrato usado consistió en una mezcla homogénea de 60% peat moss y 40% de agrolita (mineral triturado). El sustrato fue humedecido mediante la adición de agua potable. Posteriormente, el sustrato fue colocado en bolsas de plástico para ser esterilizado a 121 °C durante 40 min. Los conos fueron desinfectados mediante su inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 1% y cloruro de benzalconio al 0.05% durante 12 h. Finalmente, los conos fueron secados y llenados con sustrato estéril.

Para el trasplante de las plántulas de jitomate el sustrato usado fue una mezcla homogénea en una proporción de 1:1, de composta y tierra lama. El sustrato fue vaciado en bolsas de polipropileno y colocadas en un contenedor de 200 L. La desinfección se hizo con calor húmedo mediante un baño María a una temperatura aproximada de 100 °C durante 60 min.

**Tratamiento de la semilla.** En un vaso de precipitados, se prepararon 30 mL de una suspensión de hipoclorito de sodio comercial al 1%. Las semillas de jitomate variedad Sun 7705 fueron colocadas en la suspensión de hipoclorito de sodio durante 5 min con agitación a 150 rpm en un agitador orbital. Posteriormente, se retiró la solución clorada de las semillas y se hicieron dos lavados con 60 mL de agua estéril agitando a 150 rpm durante 10 min para eliminar los residuos de cloro [1].

**Siembra.** Los conos de germinación desinfectados se llenaron con 50 g de sustrato estéril. En cada cono se colocó una semilla de jitomate a una profundidad de 1 cm aproximadamente. Posteriormente, la semilla fue cubierta con el sustrato para su germinación. Los conos de germinación fueron regados a capacidad de campo con agua potable y se mantuvieron en el laboratorio hasta la germinación de las semillas. Cuando todas las semillas germinaron, las plántulas fueron trasladadas al invernadero.

**Trasplante.** Las plántulas de jitomate con 26 d de crecimiento fueron trasplantadas en bolsas de polietileno previamente llenadas con 2 kg de sustrato desinfectado [2]. Las plantas fueron trasplantadas para permitirles desarrollar su sistema radicular y su crecimiento foliar. Se hizo un pequeño hoyo en el sustrato húmedo en el centro de cada bolsa y fue colocada una planta a medida de que sus raíces quedaran cubiertas con el suelo. Posteriormente, se hizo un riego a capacidad de campo para humedecer todo el sustrato contenido en la bolsa y para mantener la turgencia de las plantas.

**Manejo del cultivo.** El manejo del cultivo de las plantas consistió en actividades de riego, fertilización, tutoro y control de plagas y enfermedades. Durante los primeros 10 d después del trasplante, el riego se aplicó diariamente con 100 mL de agua. Posteriormente la cantidad de agua se incrementó a 200 mL diarios conforme a las necesidades de las plantas, hasta llegar a la cantidad de 400 mL diarios. Por otra parte, la fertilización consistió en el suministro de los elementos esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas a través del riego. Los macroelementos nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K) se aplicaron a las plantas a través de los fertilizantes comerciales urea, fosfato monoamónico y nitrato de potasio, respectivamente. La dosis que se usó fue la recomendada por Stenier con modificaciones (Tabla 7) a través de una solución nutritiva [93]. La dosis de fertilización no incluyó microelementos. Se consideró que de acuerdo periodo corto de la prueba, la falta de alguno de estos nutrientes no afectaba el crecimiento adecuado de las plantas. Además, en los resultados del análisis del sustrato realizado posteriormente, se mostró una disponibilidad moderadamente alta de magnesio, zinc, boro y disponibilidad moderadamente bajo de hierro, cobre y manganeso.

**Tabla 7. Solución nutritiva Steiner modificada para el riego de las plantas de jitomate**

<b>Fertilizantes</b>	<b>Cantidad</b>
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	98.918 g
MgSO <sub>4</sub>	49.494 g
KNO <sub>3</sub>	9.126 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	13.608 g
Urea	26.00 g

Valores para 100 L de agua.

El tutoreo se implementó a los 15 d después del trasplante. Esta actividad se realizó para evitar que las plantas por su tamaño pudieran caerse. Posteriormente, el tutoreo de las plantas se realizó cada 7 d conforme las plantas lo fueran necesitando. Finalmente, se hizo una aplicación del fungicida Mycloss para controlar la enfermedad denominada cenicilla a los 37 d del trasplante. Este fungicida es de contacto y no interfirió con el desarrollo de las enfermedades de la prueba.

### **7.7. Meta 3.2. Evaluación del antagonismo de *T. asperelloides* y *B. licheniformis* contra *F. oxysporum* y *A. alternata* en plantas *in vivo* en condiciones de invernadero**

**7.7.1. Experimento de biocontrol *in vivo* en plantas de jitomate.** Para hacer la evaluación del antagonismo *in vivo*, la variedad de jitomate que se usó fue Sun 7705. Esta variedad fue la utilizada en las pruebas de patogenicidad. El experimento fue establecido con 10 plantas por tratamiento y se realizó por duplicado.

Para estas pruebas *in vivo*, el primer experimento se realizó del periodo 14 de junio al 22 de agosto de 2016. El segundo experimento se evaluó en el periodo 19 de julio al 29 de septiembre de 2016.

**7.7.1.1. Tratamiento y siembra de la semilla.** Las semillas de jitomate fueron tratadas con hipoclorito de sodio. En un vaso de precipitados, se prepararon 30 mL de una solución de hipoclorito de sodio comercial al 1%. Las semillas fueron colocadas en la solución de hipoclorito de sodio durante 5 min con una agitación de 150 rpm. Posteriormente, la solución de cloro se retiró de las semillas y se hicieron dos lavados con 60 mL de agua estéril agitando a 150 rpm durante 10 min para eliminar los residuos del cloro [1]. La siembra fue hecha en conos forestales de germinación desinfectados. Los conos se llenaron con 50 g de sustrato estéril. En cada cono se colocó una semilla de jitomate a una profundidad de 1 cm aproximadamente y la semilla fue cubierta con el sustrato. Los conos de germinación fueron regados a capacidad de campo con agua potable y se mantuvieron en el laboratorio hasta la germinación. Una vez germinadas las plántulas fueron trasladadas al invernadero.

**7.7.1.2. Trasplante.** Para el trasplante se utilizó un sustrato homogéneo de composta y lama en proporción 1:1. Este sustrato fue desinfectado mediante calor húmedo a una temperatura aproximada de 100 °C durante 60 min. Con base al análisis de diagnóstico de fertilidad del suelo, este sustrato tuvo un pH de 7.24 que se considera ligeramente alcalino. La conductividad eléctrica fue de 6.19 ds/m. El sustrato es arcilloso con alta capacidad de retención de agua y nutrientes. Así también es moderadamente bajo en carbonatos, muy alta salinidad y muy bajo nivel de calcio. El suministro de fósforo y potasio disponible es muy alto. Suministro importante de nitrógeno inorgánico. Con respecto a la disponibilidad de micronutrientes, el sustrato fue moderadamente alto en magnesio, zinc y boro; moderadamente bajo en fierro y cobre y pobre en manganeso. Por otra parte, el sustrato presentó un alto nivel de materia orgánica.

El trasplante de las plántulas de jitomate se hizo en un invernadero con una temperatura promedio de 26 °C y humedad relativa promedio de 53%. La Radiación Fotosintéticamente Activa (PAR por sus siglas en inglés) fue medida entre las 11:00 y 15:00 horas, usando un medidor de luz cuántica Light Scout® Mod. 3415FSE (Spectrum Technology Inc. USA), se obtuvo un promedio de 515  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ .

El trasplante fue hecho a los 29 d después de la siembra. Las bolsas de polietileno se llenaron con 2 kg de sustrato. En cada bolsa se colocó una planta de jitomate y se regó a capacidad de campo.

**7.7.1.3. Inoculación de los tratamientos.** Se utilizaron 120 plantas de jitomate para llevar a cabo el experimento del antagonismo *in vivo* de *T. asperelloides* y *B. licheniformis* contra *F. oxysporum* y *A. alternata*. Fueron 12 los tratamientos, con 10 plantas cada uno, los que fueron evaluados (Tabla 8).

Los tratamientos BAC y TES se utilizaron en la evaluación de ambos fitopatógenos. Las plantas del tratamiento control positivo BAC con *B. licheniformis* fueron inoculadas en la zona radicular con 15 mL de la suspensión de células con una concentración de 0.00316 g/mL de biomasa (este tratamiento fue el mismo utilizado para evaluar el antagonismo contra *A. alternata*). Por otra parte, las plantas con el tratamiento TES que corresponden al testigo, no recibieron ningún tratamiento. Las plantas fueron mantenidas bajo condiciones de invernadero a una temperatura promedio de 26 °C, a una humedad relativa promedio de 53% y una PAR de 515  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ . Diariamente se hizo el suministro de agua y solución nutritiva de acuerdo a la fenología del cultivo y a sus requerimientos. Las plantas fueron revisadas diariamente para observar el desarrollo de algún síntoma de incidencia de la enfermedad. Finalmente, la evaluación fue realizada al día 40 después del trasplante.

**Tabla 8. Todos los tratamientos del experimento *in vivo* en plantas de jitomate**

Tratamiento	Descripción
TES	Testigo (plantas sin tratamiento)
FUS-TRI	Plantas + <i>T. asperelloides</i> + <i>F. oxysporum</i> (ambos en raíz)
FUS-BAC	Plantas + <i>B. licheniformis</i> + <i>F. oxysporum</i> (ambos en raíz)
FUS-TRI-BAC	Plantas + <i>B. licheniformis</i> + <i>T. asperelloides</i> + <i>F. oxysporum</i> (todos en raíz)
ALT-TRI	Plantas + <i>T. asperelloides</i> + <i>A. alternata</i> (ambos en hoja)
ALT-BAC	Plantas + <i>B. licheniformis</i> en raíz + <i>A. alternata</i> en hoja
ALT-TRI-BAC	Plantas + <i>B. licheniformis</i> en raíz + <i>T. asperelloides</i> en hoja + <i>A. alternata</i> en hoja
FUS	Plantas + <i>F. oxysporum</i> en raíz
ALT	Plantas + <i>A. alternata</i> en hoja
TRI	Plantas + <i>T. asperelloides</i> en hoja
TRI	Plantas + <i>T. asperelloides</i> en raíz
BAC	Plantas + <i>B. licheniformis</i> en raíz

A continuación se describe la preparación de la infección de las plantas de jitomate para cada uno de los tratamientos.

**Tratamientos para el biocontrol del fitopatógeno *Alternaria alternata*.** En la Tabla 9 se muestran los tratamientos que fueron establecidos para el biocontrol de *A. alternata*. Se inocularon las plantas de los tratamientos ALT-TRI, ALT-BAC y ALT-TRI-BAC, que corresponden a *T. asperelloides*, *B. licheniformis* y a la combinación de ambos, respectivamente. Las plantas del tratamiento ALT-TRI fueron asperjadas en las hojas con 15 mL de una suspensión con  $1.09 \times 10^7$  conidios/mL de *T. asperelloides*. La inoculación se hizo con un atomizador de 500 mL estéril, procurando que la totalidad del follaje fuera

cubierto con la suspensión. Las plantas del tratamiento ALT-BAC fueron inoculadas en la zona radicular con 15 mL de una suspensión de células de *B. licheniformis* con una concentración de biomasa de 0.00316 g/mL.

Para la inoculación de las plantas del tratamiento ALT-TRI-BAC, primero se hizo la aspersión de 15 mL de la suspensión de conidios de *T. asperelloides* a una concentración de  $1.09 \times 10^7$  conidios/mL. Subsecuentemente, las plantas fueron inoculadas en la zona radicular con 15 mL de la suspensión de células de *B. licheniformis* con una concentración de biomasa de 0.00316 g/mL.

**Tabla 9. Tratamientos para el biocontrol de *Alternaria alternata***

Tratamiento	Concepto
ALT	Plantas + <i>Alternaria en hoja</i>
TRI	Plantas + <i>Trichoderma</i> en hoja
ALT-TRI	Plantas + <i>Trichoderma</i> + <i>Alternaria</i> ambos en hoja
ALT-BAC	Plantas + <i>Bacillus</i> (en raíz) + <i>Alternaria</i> (en hoja)
ALT-TRI-BAC	Plantas + <i>Bacillus</i> (en raíz) + <i>Trichoderma</i> (en hoja) + <i>Alternaria</i> (en hoja)

La inoculación de *A. alternata* y del tratamiento control, se realizó 2 d después de la inoculación de los biocontroles. Las plantas de los tratamientos ALT-TRI, ALT-BAC y ALT-TRI-BAC, fueron inoculadas con una suspensión de micelio de *A. alternata* con el contenido del micelio de una caja Petri de 20 mL de agua. La suspensión fue preparada con Twin al 1%. Con el uso de un atomizador estéril de 500 mL estéril se asperjó la suspensión de micelio de *A. alternata* a razón de 15 mL por planta. La aspersión fue hecha de tal forma que se cubrió todo el follaje de las plantas. Inmediatamente después de la aspersión, las plantas de

estos tratamientos fueron cubiertos con una bolsa de polipapel (Figura 5) durante 3 d para mantener una humedad relativa alta y tener condiciones adecuadas de infección [2]. Las plantas fueron mantenidas en el invernadero a una temperatura entre promedio de 26 °C, humedad relativa de 53% y una PAR 515  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ .

Las plantas del tratamiento ALT que corresponde al control positivo de *A. alternata*, fueron inoculadas bajo el mismo procedimiento explicado para los tratamientos ALT-TRI, ALT-BAC y ALT-TRI-BAC. Las plantas del tratamiento TRI que corresponde al control positivo con *T. asperelloides* en hojas, fueron inoculadas bajo el mismo procedimiento explicado en la inoculación de biocontroles del tratamiento ALT-TRI.



**Figura 5.** Cubrimiento de las plantas con una bolsa para generar humedad en la inoculación con *A. alternata*

**Tratamientos para evaluar el antagonismo contra *Fusarium oxysporum*.** Para evaluar el antagonismo de *T. asperelloides* y *B. licheniformis* contra *F. oxysporum*, cinco tratamientos fueron evaluados. En la Tabla 10 se muestran los tratamientos con el hongo fitopatógeno *F.*

*oxysporum* que fueron inoculados con los agentes de biocontrol *T. asperelloides*, *B. licheniformis* y una combinación de ambos microorganismos benéficos. Las plantas de jitomate de los tratamientos con los agentes de biocontrol fueron inoculadas un día posterior al trasplante.

Para el tratamiento FUS-TRI, la inoculación de las plantas con *T. asperelloides*, se hizo adicionando 15 mL de una suspensión de conidios con concentración de  $1.09 \times 10^7$  conidios/mL con una probeta graduada estéril. La suspensión fue inoculada en la zona radicular de la planta de jitomate. El mismo procedimiento fue usado para la inoculación de las plantas en el tratamiento FUS-BAC, usando una suspensión de *B. licheniformis* con una concentración de biomasa de 0.00316 g/mL.

**Tabla 10. Tratamientos para el biocontrol de *Fusarium oxysporum***

Tratamiento	Concepto
FUS	Plantas + <i>Fusarium</i> en raíz
TRI	Plantas + <i>Trichoderma</i> en raíz
FUS-TRI	Plantas + <i>Trichoderma</i> + <i>Fusarium</i> ambos en raíz
FUS-BAC	Plantas + <i>Bacillus</i> + <i>Fusarium</i> ambos en raíz
FUS-TRI-BAC	Plantas + <i>Bacillus</i> + <i>Trichoderma</i> + <i>Fusarium</i> todos en raíz

En el tratamiento FUS-TRI-BAC las plantas primeramente fueron inoculadas con *T. asperelloides*, agregando 15 mL de una suspensión de conidios con  $1.09 \times 10^7$  conidios/mL; subsecuentemente se inocularon 15 mL de la suspensión de *B. licheniformis* con una concentración de biomasa de 0.00316 g/mL.

Dos días después de la inoculación de los agentes de biocontrol, se hizo la inoculación del hongo fitopatógeno. La suspensión de conidios de *F. oxysporum* fue inoculada a cada una de

las plantas de los tratamientos FUS-TRI, FUS-BAC y FUS-TRI-BAC. Con el apoyo de una pipeta graduada se midieron 15 mL de suspensión de conidios con una concentración de  $2.35 \times 10^6$  conidios/mL. La suspensión de conidios fue inoculada en la zona radicular de las plantas. Este mismo procedimiento fue usado para la inoculación de las plantas del tratamiento FUS que corresponden al control positivo *F. oxysporum*. Las plantas del tratamiento FUS y TRI en raíz, se inocularon 3 d después del trasplante. Las plantas del tratamiento TRI que corresponden al control positivo de *T. asperelloides* fueron inoculadas en la raíz con 15 mL de la suspensión a una concentración de  $1.09 \times 10^7$  conidios/mL.

**7.7.1.4. Actividades culturales.** Antes de establecer el experimento *in vivo*, se hizo una fumigación con un fungicida y un insecticida. El fungicida aplicado fue Mycloss (azufre + myclobutanil) con una dosis de 3.3 mL/1.5 L de agua. Este fungicida tiene actividad preventiva sobre cenicillas y otros Ascomicetos. Por otra parte, se hizo la aplicación del insecticida Movento. Este insecticida tiene actividad contra la mosquita blanca y otros insectos chupadores. La dosis aplicada antes de establecer el experimento fue de 6 mL/10 L de agua. Además se hizo otra aplicación de Movento a los 15 d posterior al trasplante una dosis de 22.5 mL/20 L de agua. .

Las actividades posteriores al trasplante de las plántulas de jitomate, consistieron en: riego de plantas y tutorio. El riego que se aplicó en el momento del trasplante fue a capacidad de campo. Posteriormente los riegos se aplicaron diariamente con dosis de 100, 150, 200 y 400 mL de agua o solución nutritiva, conforme al desarrollo fenológico de las plantas. Las aplicaciones de la solución nutritiva estándar Steiner modificada fueron a los 8, 11, 14, 19, 23, 26 y 30 días después del trasplante. Los resultados del análisis del suelo hecho posteriormente, mostraron una disponibilidad alta de los macronutrientes: fósforo, potasio y

nitrógeno inorgánico. Además, el sustrato tenía disponibilidad alta de azufre, magnesio y contenido de materia orgánica. El tutoreo se hizo a los 15 d después del trasplante. El material utilizado para el tutoreo consistió en un anillo sujetador e hilo de tutoreo para cada planta. Posteriormente, el enredado de las planta se hizo cada 7 d. No se hizo deshije o poda de las plantas, debido a que el peso de la biomasa de la planta era un parámetro a evaluar.

**7.7.1.5 Cuantificación y evaluación de los experimentos *in vivo*.** El efecto de los tratamientos *T. asperelloides* y *B. licheniformis*, en la supresión de la infección de *F. oxysporum*, fue determinado a los 40 d posterior al trasplante. Se ha determinado que una cepa de *F. oxysporum* coloniza la superficie de la raíz en 48 h después de la inoculación y que a los 7 d, el patógeno tiene un crecimiento dentro de los tejidos vasculares de la raíz [94]. Para poder observar los síntomas de la enfermedad se consideró que 40 d después del trasplante eran suficientes para poder observar algún síntoma. Este periodo basado en las pruebas de patogenicidad hechas con anterioridad. Para evaluar el daño en las plantas, éstas fueron extraídas de su bolsa; sus raíces fueron examinadas para evaluar la severidad del daño causado por el fitopatógeno [64]. Cabe señalar que se había considerado hacer la evaluación mediante una escala de desarrollo de la marchitez. Sin embargo no fue posible aplicar la escala debido a que los síntomas en las pruebas de patogenicidad no fueron evidentes de acuerdo a la escala. Por ello, la evaluación que se hizo fue cualitativa, con base a daño en raíces: daño externo, interno y pudrición. Pero sin una escala de daño. Para confirmar la colonización de *F. oxysporum* en la planta, se realizó un cultivo de muestras obtenidas de las raíces en medio APD. Además, se hizo una comparación de la velocidad de crecimiento, altura de planta y peso seco de las plantas entre los diferentes tratamientos [9].

En el caso de *A. alternata*, la evaluación de la efectividad de los agentes de biocontrol se realizó mediante la observación cualitativa del desarrollo de la infección en las hojas de las plantas de jitomate, a través de la siguiente escala: 0 = planta sana, 1 = hojas con infección intermedia (amarillamiento y dorado) y 2 = hojas con infección grave (manchas necróticas) [87] [95]. Las observaciones se realizaron a partir de los 21 d después de la inoculación. Lo anterior con base a reportes en la literatura hechos *in vivo* que indican que los síntomas típicos del tizón en la hoja causado por *A. alternata* comenzaron a desarrollarse después de 4 d después de la inoculación [87] y las manchas de color castaño oscuro y manchas necróticas de 7 a 10 d después de la inoculación [95]. Para confirmar que los daños observados correspondían a *A. alternata*, se hizo el cultivo de muestras de hojas con daño en medio APD.

El daño de las plantas fue calculado en porcentaje, por la fórmula: plantas con síntoma/plantas inoculadas x 100 [11]. Para confirmar que los daños observados correspondían al fitopatógeno *A. alternata*, se hizo el cultivo de muestras de hojas con daño en medio APD. Otros parámetros evaluados en los tratamientos fueron la velocidad de crecimiento, altura de la planta y peso seco. Los parámetros de la floración y la fructificación no fueron evaluados por no ser parte de los alcances de este trabajo de investigación.

Para evaluar la velocidad de crecimiento de cada tratamiento, para cada planta se hicieron 6 mediciones en un periodo de 22 d, siendo la primera medición el día 15 después del trasplante y la última medición el día 37 después del trasplante. Los datos fueron ordenados y graficados. Se hizo un ajuste de regresión lineal en el que la pendiente de la recta corresponde a la velocidad de crecimiento (cm/día) para cada planta. De esta manera se obtuvieron las medias de velocidad de crecimiento. Por otra parte, se obtuvo la desviación estándar y el coeficiente de variación para cada tratamiento. La altura total de la planta fue determinada con base a la última medición de la planta de jitomate. Asimismo, se obtuvo la

desviación estándar y el coeficiente de variación para cada tratamiento. Finalmente, el peso seco de plantas fue obtenido mediante el secado de cada planta a una temperatura entre 60 y 70 °C durante 6 h. Las plantas secas fueron pesadas y se obtuvieron las medias del peso seco, la desviación estándar y el coeficiente de variación para cada tratamiento.

Cabe señalar que los 12 tratamientos fueron estudiados durante el mismo lapso de tiempo.

### **7.8. Diseño de experimentos y análisis estadístico**

Para cada medio de cultivo, los valores de las mediciones diarias de cada caja Petri fueron ajustados a un modelo lineal, en donde la pendiente correspondió a la velocidad de crecimiento. Se hizo una comparación de medias de velocidad de crecimiento Duncan con una significancia del 5% ( $p < 0.05$ ) con el software de análisis estadístico SAS versión 9. Para la cuantificación de conidios de *A. alternata* en los 4 medios de cultivo, y de *F. oxysporum* en los 2 medios de cultivo, se realizó una comparación de medias Duncan con una significancia del 5% ( $p < 0.05$ ) con el software de análisis estadístico SAS versión 9.

Para el establecimiento de los experimentos *in vivo*, se usó un diseño completamente al azar (DCA) debido a que las condiciones en el invernadero donde se instalaron los tratamientos fueron homogéneas. Para cada tratamiento se usaron 10 réplicas y se realizaron dos repeticiones independientes del experimento. Los valores obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante un análisis de varianza (ANOVA), se realizó comparación de medias de Duncan con una significancia del 5% ( $p < 0.05$ ) con el software de análisis estadístico SAS versión 9.

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1. Crecimiento y esporulación *in vitro* de los agentes de biocontrol y los hongos fitopatógenos

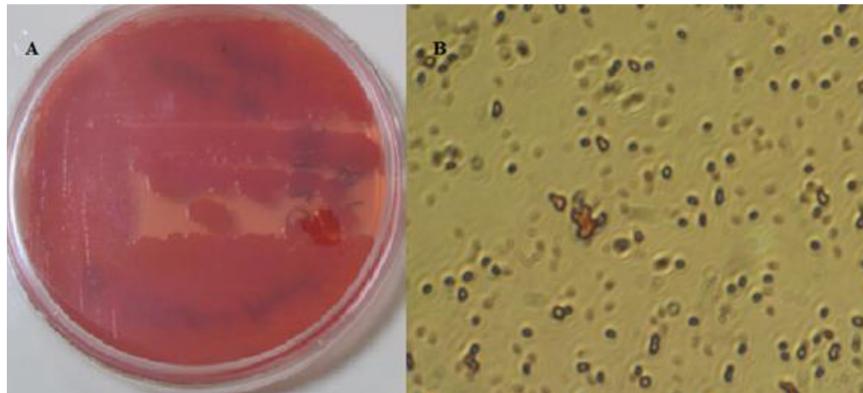
El crecimiento y la producción de conidios de los hongos fitopatógenos *in vitro* fue observado.

*Trichoderma asperelloides*. Con base a lo observado, el crecimiento del hongo *T. asperelloides* al inicio presentó un color blanco que se tornó a verde oscuro o amarillento. El micelio es fino, con múltiples núcleos (cenocítico). Los conidióforos se observaron en estructuras que formaron anillos. Los conidios son abundantes y esféricas. El crecimiento de *T. asperelloides* fue rápido en el medio agar papa dextrosa (APD). La velocidad de crecimiento en este medio fue de  $2.84 \pm 0.03$  cm/día. En cuanto a la esporulación, en este medio a los 10 d de incubación se alcanzaron concentraciones de  $2.99 \times 10^7$  conidios/mL. El medio de cultivo que se seleccionó para el mantenimiento y esporulación de *T. asperelloides* fue APD (Figura 6).



**Figura 6.** Crecimiento micelial y producción de conidios de la cepa *T. asperelloides* a los 7 d de crecimiento en medio APD a 28 °C.

***Bacillus licheniformis***. Para el crecimiento y mantenimiento de la cepa de la bacteria se usó el medio de cultivo LB. Los bacilos de *B. licheniformis* son gram positivas, con un tamaño que oscila entre  $9.3 \times 10^{-4}$  a  $1.6 \times 10^{-3}$  mm de longitud y un diámetro de  $5.0 \times 10^{-4}$  mm (con base a las imágenes tomadas en MEB). Las colonias de esta bacteria tienen un crecimiento en forma de líquenes. Las colonias de *B. licheniformis* adquieren una coloración roja escarlata característica en presencia del colorante Rojo Congo en medio sólido (Figura 7A). El crecimiento en medio líquido se observó que no presentó cambios importantes en la forma de las células bacilares, tal y como se ha reportado para otros medios que tienen como fuente de carbono al ácido málico, la glucosa y/o el glicerol [86]. Lo anterior fue comprobado mediante una microscopía, en la cual se observaron las células bacilares de la bacteria con un aumento de 1000 x (Figura 7B).



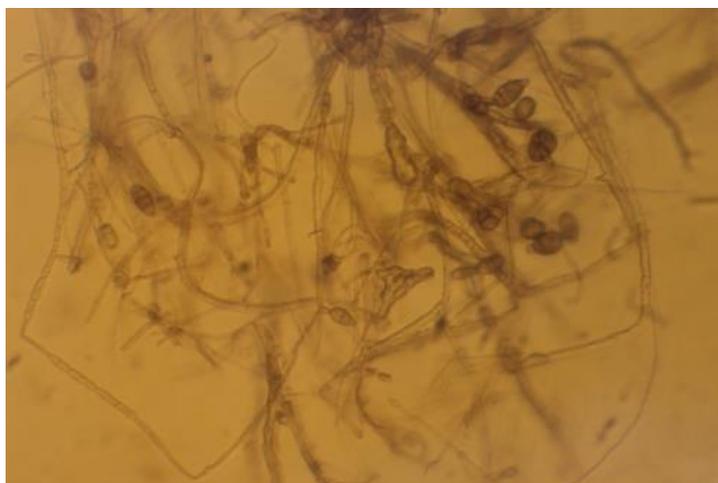
**Figura 7.** A) Crecimiento de *B. licheniformis* en medio LB durante 48 h a 37 °C, B) Microscopía de células bacilares con aumento de 1000 x.

Por otra parte, para la obtención de biomasa de *B. licheniformis* para ser usada en las pruebas *in vivo* se usó el medio de cultivo líquido NFb modificado. Al hacer la medición de la densidad óptica a 610 nm después de 72 horas de incubación, se obtuvo un valor de 0.9.

Con ayuda de la curva de calibración (Apéndice 2) se obtuvo que la densidad óptica correspondió a una concentración de biomasa de 0.00316 g/mL. Con este medio se obtuvo una adecuada cantidad de biomasa de la célula bacteriana en un tiempo relativamente corto. Además, se observó que cuando la incubación se hizo sin agitación se tuvo presencia de polímero; en cambio en la incubación con agitación se observó una menor presencia de polímero. Lo anterior fue importante, ya que una cantidad importante de polímero podría influir en los resultados del experimento *in vivo*. Este medio de cultivo fue considerado adecuado para la obtención de biomasa de *B. licheniformis*.

***Alternaria alternata***. La obtención de conidios de *A. alternata* resultó un reto muy importante en el desarrollo de esta investigación. Se probaron diferentes medios de cultivo para lograr la obtención de conidios del fitopatógeno. El micelio de *A. alternata* es grueso de color oscuro y septado. La cepa de *A. alternata* contiene conidióforos primarios rectos o curvos, cortos o largos, simples o ramificados. Los conidios son obclavos, elipsoides largos, de tamaño pequeño o moderado, septados, ligeramente estrechados cerca de algunos septos con pocos septos longitudinales, en cadenas moderadamente largas a largas, simples o ramificadas. El cuerpo del conidio puede estrecharse gradualmente en un pico cónico [96] (Figura 8).

La presencia de conidios de *A. alternata* se pudo observar en cuatro medios de cultivo. Al analizar estadísticamente los datos se encontró que no existe diferencia significativa en la cantidad de conidios para los diferentes medios sólidos (Tabla 11).



**Figura 8.** Microscopia del crecimiento micelial y conidios de *A. alternata* a los 12 d de crecimiento en medio agar V<sub>8</sub> a 28 °C (Aumento 400x).

**Tabla 11.** Concentración promedio de conidios ( $\times 10^4$ )/mL de *A. alternata* en diferentes medios de cultivo.

Medio de cultivo	Concentración promedio de esporas ( $\times 10^4$ )/mL *
APD	NE
SNA	NE
Agar jugo V <sub>8</sub> MA	$1.06 \pm 0.08^a$
Agar jugo V <sub>8</sub> MB	$2.93 \pm 0.44^b$
Agar clavel	$1.00 \pm 0.35^a$
Agar papa-zanahoria	$1.18 \pm 0.09^a$

NE = No se observó esporulación.

\* Diferentes letras indican una diferencia significativa de las medias ( $p < 0.05$ )

Sin embargo, una de las dificultades que presentó este medio de cultivo fue mantener el cultivo axénico, ya que generalmente después de unos días el medio se contaminaba. Por lo tanto, debido a esto y con base a la cantidad de conidios, velocidad de crecimiento micelial,

facilidad de preparación del medio y riesgo de contaminación, se seleccionó al medio de cultivo agar V<sub>8</sub> como sustrato para la producción de las conidios para las pruebas *in vivo*.

Es importante señalar que para el experimento, *in vivo*, en el cultivo de este hongo en esta parte del trabajo ya no se lograron observar la formación de conidios. Posiblemente la dificultad para que la sepa esporulara se debió a factores como el fotoperiodo luz/oscuridad. Se ha reportado en la literatura que la luz inhibe la esporulación cuando la temperatura es relativamente alta, pero no cuando la temperatura es más baja. El mecanismo inhibitor de la luz se evita a baja temperatura. La esporulación bajo luz constante disminuye con el aumento de la temperatura por encima de 24 °C [97]. De acuerdo a lo que se observó en este experimento y que coincide con lo que se ha reportado en la literatura, los aspectos que definieron la esporulación de *A. alternata*, fue el medio de crecimiento, la temperatura, la luz y la adición de CaCO<sub>3</sub> [98]. De estos parámetros, sólo la luz no se pudo controlar adecuadamente, debido a que la incubación fue a temperatura constante pero a diferente fotoperiodicidad. El periodo de pruebas de esporulación fue en los meses septiembre-febrero y el periodo de incubación para la obtención de conidios del experimento *in vivo* fue en los meses de abril-agosto. La esporulación de este hongo es afectada por irradiación de luz de manera constante o con periodos alternos de luz y oscuridad de 12 h. Según la literatura, se ha logrado la producción de conidios de *A. alternata* de manera constante usando irradiación con luz ultravioleta [97]. Sin embargo, esta actividad no se consideró como opción viable en este estudio, debido a que existiría un alto riesgo de que el fitopatógeno sufriera algún tipo de mutación.

A pesar de que existió dificultad para observar las conidios del hongo, para las pruebas *in vivo* se hizo una inoculación de las plantas con suspensión del micelio, observándose los síntomas de daño característico de *A. alternata*.

Adicionalmente se evaluaron los parámetros de velocidad de crecimiento micelial (cm/día) de *A. alternata* en los medios de cultivo en que hubo producción de conidios. Como se puede apreciar en la Tabla 12, se encontró una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en el crecimiento micelial del hongo, alcanzándose la mayor rapidez de crecimiento en el medio clavel ( $1.40 \text{ cm/día} \pm 0.02$ ).

**Tabla 12. Crecimiento promedio (cm/día) de *A. alternata* en diferentes medios de cultivo.**

Medio de cultivo	Velocidad de crecimiento total (cm/día)*
Agar clavel	$1.40 \pm 0.02^a$
Papa-zanahoria	$1.06 \pm 0.02^b$
Agar jugo V <sub>8</sub> MB	$1.05 \pm 0.01^b$
Agar jugo V <sub>8</sub> MA	$1.04 \pm 0.01^b$

\* Diferentes letras indican una diferencia significativa de las medias ( $p < 0.05$ )

***Fusarium oxysporum*.** Dos medios de cultivo fueron evaluados para la obtención de conidios de *F. oxysporum*: APD y agar clavel. En ambos medios se pudo observar conidios. El micelio de *F. oxysporum* es redondo sin septos, puede ser flocosa, escasa o abundante y una coloración de blanco rosado a violeta pálido. *F. oxysporum* puede producir un pigmento magenta oscuro o violeta oscuro en el agar [27] (Figura 9). Las conidias que presentan son microconidias, macroconidias y, ocasionalmente, clamidosporas. En el presente trabajo se pudo observar los microconidios y macroconidios en el medio clavel. En el medio APD se observó en forma general las microconidias. Las formas más comunes de las microconidias

son de forma oval, reniforme (en forma de riñón), ovoide, piriforme y napiforme. Los macroconidios son relativamente más alargados y tienen tres formas básicas: rectos, con curvatura dorsiventral y con el lado dorsal superior más curvado que el lado ventral. Las clamidosporas tardan más de 6 semanas en formarse y se presentan mayoritariamente en medios más especializados [27].



**Figura 9.** Crecimiento micelial de *F. oxysporum* en medio APD a 28°C

Por otra parte, al evaluar la velocidad de crecimiento micelial de *F. oxysporum* en ambos medios, se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), siendo el crecimiento en el medio clavel el más rápido con un valor de  $1.42 \pm 0.02$  cm/día. Adicionalmente, al comparar la cantidad de conidios que se obtuvo en los dos medios de cultivo se encontraron diferencias significativas. La cantidad de conidios de *F. oxysporum* que se obtuvo con el medio clavel fue de  $2.7 \pm 0.15 \times 10^7$  conidios/mL, mientras que en el medio APD fue aproximadamente una orden de magnitud menor (Tabla 13). A pesar de que el medio agar clavel fue el mejor desde el punto de vista de producción de conidios y de velocidad de crecimiento micelial, este medio presentó el problema de ser propenso a contaminarse. Ante este problema se

decidió usar en medio APD para las pruebas *in vivo*, ya que el crecimiento y producción de conidios de *F. oxysporum* en este medio fue también adecuado.

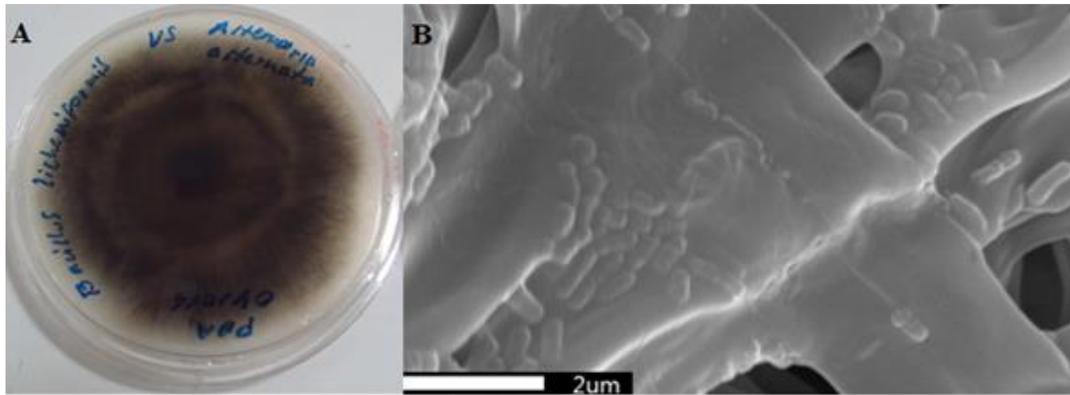
**Tabla 13. Concentración promedio de esporas ( $\times 10^6$ )/mL y crecimiento promedio (cm/día) de *F. oxysporum* en 2 medios de cultivo.**

Medio de cultivo	Concentración promedio de esporas ( $\times 10^6$ )/mL *	Crecimiento promedio (cm/día)
Agar clavet	$27.00 \pm 1.48^a$	$1.42 \pm 0.02$
APD	$2.00 \pm 0.42^b$	$0.95 \pm 0.38$

\* Diferentes letras indican una diferencia significativa de las medias ( $p < 0.05$ )

## 8.2. Pruebas *in vitro*

**8.2.1. Efecto *in vitro* de *B. licheniformis* contra *A. alternata* y *F. oxysporum*.** Al evaluar el efecto que tuvo *B. licheniformis* sobre el crecimiento micelial de *A. alternata* no hubo una inhibición visible, ya que el hongo fitopatógeno continuó su crecimiento extendiéndose en toda la caja de Petri (Figura 10A). También se observa que los bacilos de *B. licheniformis* están interaccionando con micelio de *A. alternata* y se puede ver que no ocurre algún tipo de inhibición del hongo fitopatógeno. Pero llama la atención que los bacilos al parecer están hospedados en el hongo (Figura 10B).



**Figura 10.** A) Interacción entre *B. Licheniformis* y *A. alternata* en cultivo dual. A) Crecimiento de *A. alternata* en presencia de *B. licheniformis*. B) Micrografía electrónica de la interacción a los 7 d de su inoculación. Se observa que *Bacillus* está hospedado en el micelio de *Alternaria*.

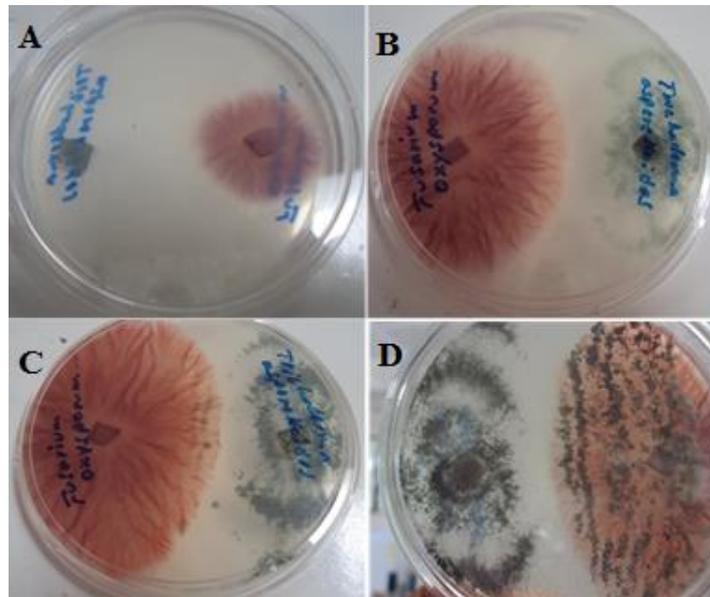
Por otra parte, en la prueba de *B. licheniformis* contra el hongo fitopatógeno *F. oxysporum*, se puede apreciar que en ausencia del biocontrol el fitopatógeno invade completamente la caja (Figura 11A). En la confrontación se observó que en un inicio el hongo creció rápidamente e invadió toda la caja Petri. Sin embargo, después de 12 d, el crecimiento micelial del fitopatógeno se replegó alejándose de la zona donde creció *B. licheniformis* (Figura 11B). Es evidente que se observaron zonas de inhibición en las que el crecimiento micelial de *F. oxysporum* empieza a replegarse, siendo muestra del efecto supresor de *B. licheniformis*. De hecho, se observó que la zona de inhibición aumentó conforme transcurrió la confrontación. Considerando lo anterior, se puede concluir que la cepa de *B. licheniformis* tuvo un efecto antagonista sobre el desarrollo micelial de *F. oxysporum* en cultivos *in vitro* en caja Petri. Estos resultados concuerdan con lo reportado por otros autores, en donde el porcentaje de inhibición del crecimiento de micelio de *F. oxysporum* a causa de cepas de *Bacillus*, llega a ser hasta del 64% [52].



**Figura 11.** Confrontación en cultivo dual de *Bacillus licheniformis* contra *Fusarium oxysporum*. A) Crecimiento micelial sólo de *Fusarium oxysporum* (coloración rosada). B) Crecimiento de *Fusarium oxysporum* en presencia de *Bacillus licheniformis* después de 20 d de incubación.

**8.2.2. Efecto *in vitro* de *T. asperelloides* contra *A. alternata* y *F. oxysporum*.** Al hacer la evaluación de las velocidades de crecimiento de las cepas, la cepa que fue más rápida fue *T. asperelloides* con un crecimiento de 2.85 cm/día, mientras que las cepas de *F. oxysporum* y *A. alternata* presentaron velocidades de crecimiento de 0.61 y 0.79 cm/día, respectivamente. Con base a estos valores, *F. oxysporum* fue inoculada 3 d antes que *T. asperelloides*. Se observó que *T. asperelloides* no sólo inhibió en el crecimiento micelial de *F. oxysporum* sino que también sobrecreció sobre el micelio del fitopatógeno (Figura 12). Después de 14 d de confrontación de ambos microorganismos, la cepa de *T. asperelloides* creció, esporuló e invadió a la cepa de *F. oxysporum*, la cual dejó de crecer en el medio. Estos resultados demuestran y confirman lo reportado por otros autores que mencionan que especies del

género *Trichoderma* presenta mecanismos antagonistas de tipo micoparasitario hacia los fitopatógenos [49].

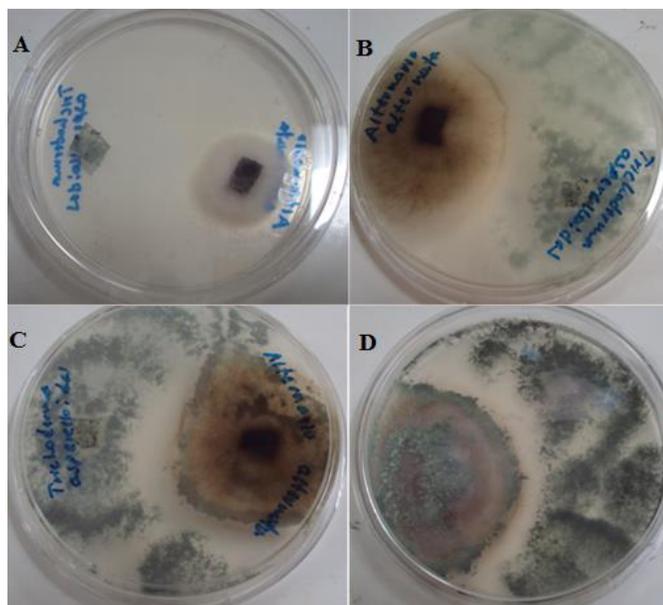


**Figura 12.** Confrontación de *T. asperelloides* contra *F. oxysporum* en cultivo dual. A) *Fusarium oxysporum* (coloración rosada) con 3 d de crecimiento y adición de disco con micelio de *T. asperelloides* (coloración verde). B) Crecimiento micelial de ambos microorganismos en 3 d de confrontación. C) Inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* con 7 d de confrontación. D) Sobrecrecimiento de *Trichoderma asperelloides* sobre *Fusarium oxysporum* a los 14 d de inicio de la confrontación.

En el proceso de micoparasitismo, las cepas de *Trichoderma* secretan enzimas hidrolíticas (quitinasas,  $\beta$ -1, 3-glucanasas) que hidrolizan los principales compuestos estructurales de las paredes celulares de los hongos, quitina y  $\beta$ -glucano. Las cepas de *Trichoderma* en presencia de paredes celulares de *Fusarium* incrementan sus actividades enzimáticas [10,65]. Adicionalmente, la habilidad para crecer rápidamente de *Trichoderma* posiblemente le da

una ventaja que le permite competir por espacio y nutrientes presentes en el medio en comparación con el fitopatógeno.

Respecto a la evaluación *in vitro* de *T. asperelloides* contra *A. alternata*, la inoculación del fitopatógeno se hizo 3 d antes respecto al agente de biocontrol, debido a que crece más lento. A los 7 d de crecimiento de *A. alternata* se observó una invasión de *Trichoderma* sobre el patógeno, demostrando nuevamente su actividad antagonista mediante mecanismos de parasitismo (Figura 13). De acuerdo a las observaciones, parece evidente que *T. asperelloides* utiliza la biomasa del patógeno para alimentarse. *Trichoderma* obtiene nutrientes de las hifas parasitadas después de la excreción de enzimas que degradan la pared celular del fitopatógeno que facilitan su penetración [65].



**Figura 13.** Confrontación de *T. asperelloides* contra *A. alternata* en cultivo dual en APD.

A) Inicio *Alternaria alternata* (coloración oscura) con 3 d de crecimiento. B) Crecimiento micelial de ambas cepas a los 3 d de confrontación C) Inhibición del crecimiento micelial de *A. alternata* con 7 d de confrontación. D) Sobrecrecimiento de *Trichoderma asperelloides* (coloración verde) sobre *A. alternata* a los 14 d de inicio de la confrontación.

Los Conidios de *T. asperelloides* pueden desarrollarse sobre el micelio del fitopatógeno. Estos resultados coinciden con reportes en la literatura, en donde, cepas del género *Trichoderma* han mostrado sobrecrecimiento y un efecto reductor en el crecimiento de *A. alternata* [65].

### **8.3. Pruebas de patogenicidad de los hongos fitopatógenos y los agentes de biocontrol en plantas de jitomate**

**8.3.1. Efecto de patogenicidad de *A. alternata* en plantas de jitomate.** La necrosis de las hojas de jitomate se observó a los 14 d de haber hecho el trasplante e inoculación de la planta con la aspersión de la suspensión de micelio de *A. alternata*. La necrosis fue antecedida por un amarillamiento en los márgenes y en el ápice de la hoja. Esta necrosis también se observó en las zonas cercanas a las microheridas realizadas a las hojas. Al día 43 del trasplante, la necrosis presentó una mayor área de daño en las hojas. En un estudio similar en la literatura se menciona que los síntomas de hojas dañadas inician con un amarillamiento y oscurecimiento de las hojas inferiores. Luego los síntomas se van extendiendo de las puntas de las hojas y de los márgenes del peciolo al resto de la hoja [87].

Para confirmar que los daños fueron causados efectivamente por *A. alternata*, se desprendieron las hojas de 2 plantas que presentaban daño y se colocaron dos muestras del tejido afectado en cajas Petri con medio APD. Se incubaron las cajas a 28 °C y después de varias resiembras en diferentes medios (clavel y V<sub>8</sub>), se logró aislar micelio y conidios que concuerdan con las características de la cepa patógena original de *A. alternata*. Con estos resultados, se pudo comprobar que efectivamente la infección mostrada en las hojas de las

plantas de jitomate se debieron al daño provocado por la cepa inoculada de *A. alternata*, quedando de manifiesto la capacidad infectiva de la cepa.

**8.3.2. Efecto de patogenicidad de *F. oxysporum* en raíces de plantas de jitomate.** Las plantas con el tratamiento de *F. oxysporum* fueron extraídas de las bolsas de plástico a los 43 d después del trasplante. Las raíces de las plantas se limpiaron y revisaron para observar si presentaban algún daño: externo en la raíz principal, necrosamiento o pudrición de las raíces secundarias. La raíz principal de las plantas inoculadas con *F. oxysporum* mostraron daños notorios: reblandecimiento de pared celular de la raíz y fisura longitudinal, observándose el mayor daño en la parte media de la raíz. Internamente, los daños se presentaron como un oscurecimiento a lo largo de los haces vasculares de la raíz que se encuentran en la parte central.

Para determinar si efectivamente los daños observados fueron causados por la presencia de *F. oxysporum*, se tomaron muestras de las partes dañadas de las raíces y se inocularon en medio de cultivo APD. A partir de estos cultivos se observó crecimiento de colonias de hongos característicos del fitopatógeno *F. oxysporum*. Con estos resultados se pudo comprobar la capacidad infectiva (patogenicidad) de la cepa de *F. oxysporum* en las raíces de plantas de jitomate.

**8.3.3. Efecto de la inoculación de *T. asperelloides* y *B. licheniformis* en las plantas de jitomate.** El efecto en raíz a causa de los agentes de biocontrol *B. licheniformis* y *T. asperelloides* fue observado después de 43 d de crecimiento de las plantas. Se hizo una revisión de las raíces de ambos tratamientos y no se observó ningún síntoma de daño. Para confirmar la presencia y sobrevivencia de estos agentes de biocontrol en la zona radicular, se

hizo un reaislamiento a partir de las raíces tratadas con los agentes de biocontrol. En todas las muestras se obtuvieron aislamientos con características similares a las cepas originales. Con estos resultados, se demostró que durante el periodo de evaluación, el uso de estos agentes no tiene efectos negativos en las estructuras vasculares de las plantas.

Otro de los criterios que se empleó para conocer el posible efecto que tenían los agentes de biocontrol y las cepas fitopatógenas fue la medición de la velocidad de crecimiento de las plantas de jitomate (Tabla 14). Al hacer en análisis de la velocidad de crecimiento de los tratamientos, se observó que sólo las plantas inoculadas con *A. alternata* mostraron una velocidad de crecimiento estadísticamente inferior a los demás tratamientos ( $p < 0.05$ ). Lo que indica que la infección de *A. alternata* afecta el crecimiento y desarrollo de las plantas de jitomate.

**Tabla 14. Velocidad de crecimiento promedio de plantas de jitomate (cm/día) en la prueba *in vivo* para los tratamientos de las cepas usadas en la prueba de patogenicidad**

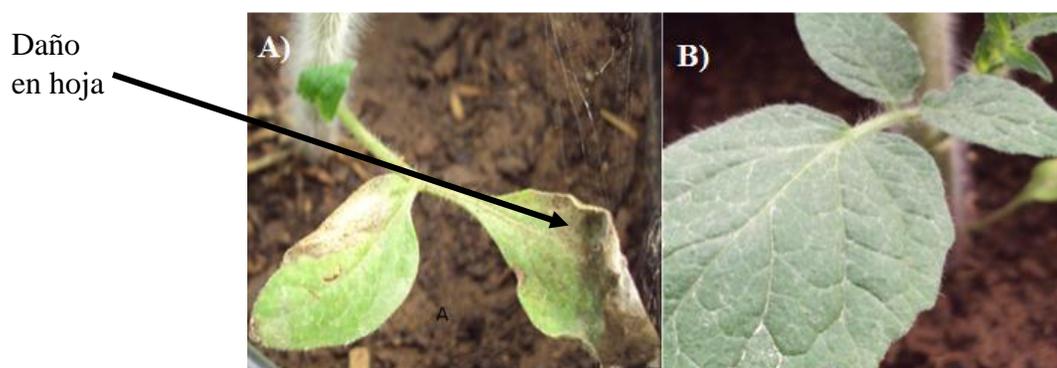
Tratamiento	Descripción	Crecimiento promedio (cm/día) *
TRI	Plantas + <i>T. asperelloides</i>	1.84 ± 0.33 <sup>a</sup>
FUS	Plantas + <i>F. oxysporum</i>	1.81 ± 0.16 <sup>a</sup>
TES	Testigo (plantas sin tratamiento)	1.74 ± 0.29 <sup>a</sup>
BAC	Plantas + <i>B. licheniformis</i>	1.71 ± 0.15 <sup>a</sup>
ALT	Plantas + <i>A. alternata</i>	1.26 ± 0.18 <sup>b</sup>

\* Diferentes letras indican una diferencia significativa de las medias ( $p < 0.05$ )

#### 8.4. Resultados del experimento *in vivo*

##### 8.4.1. Efecto antagonista de *T. asperelloides* y *B. licheniformis* contra *A. alternata* *in vivo*.

Al final del experimento, se hizo una valoración y cuantificación de las plantas que presentaron algún síntoma relacionado con la enfermedad de tizón temprano causada por *A. alternata*. Se observaron los síntomas de necrosis (Figura 14), amarillamiento y dorado de las hojas inferiores a partir del ápice de la hoja y a lo largo del margen del peciolo foliar (Figura 15). Estos síntomas se habían observado en las pruebas de patogenicidad.



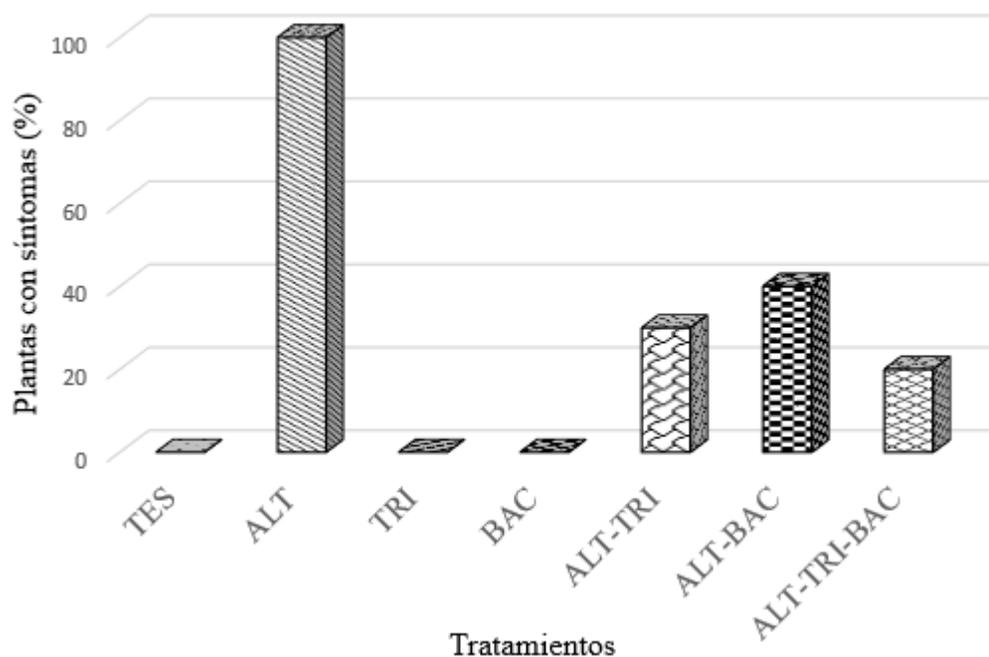
**Figura 14.** Daños en hojas de plantas de jitomate causados por la inoculación de *A. alternata*. A) Planta con daño de necrosis por *Alternaria alternata* B) Planta testigo.



**Figura 15.** Amarillamiento y dorado en hojas de jitomate causado por *A. alternata*.

Se hizo la cuantificación de las plantas que presentaron algún síntoma en los diferentes tratamientos y se determinó el porcentaje de plantas con daño de *A. alternata* (Figura 16). En

el tratamiento que incluyó únicamente *A. alternata*, todas las plantas mostraron algún síntoma de la enfermedad. Como era de esperar los controles testigo positivo con *T. asperelloides* y positivo con *B. licheniformis*, no mostraron ningún síntoma de enfermedad. En las plantas con los tratamientos individuales *T. asperelloides* y *B. licheniformis* contra *A. alternata*, se observó un 30 y 40% de daño, respectivamente. Por otra parte, en el tratamiento combinado de los dos agentes de biocontrol contra *A. alternata*, sólo se observó un 20% de las plantas con algún síntoma de enfermedad.



**Figura 16.** Porcentaje de plantas de jitomate con daño en hojas causado por *A. alternata*.

TES testigo, ALT *Alternaria*, TRI *Trichoderma*, BAC *Bacillus*, ALT-TRI *Alternaria-Trichoderma*, ALT-BAC *Alternaria-Bacillus* y ALT-TRI-BAC *Alternaria-Trichoderma-Bacillus*

Así también se hizo la valoración de los daños con base a la escala señalada en la metodología (Tabla 15). El tratamiento positivo con *A. alternata*, mostró un puntaje de 1.3,

que indica que todas las plantas tuvieron al menos el síntoma de amarillamiento y dorado de las hojas, sin embargo no todas las plantas mostraron la necrosis.

**Tabla 15. Escala de daño en plantas de jitomate en los tratamientos con *A. alternata***

Tratamientos	Escala de daño
TES	0
ALT	1.3
TRI	0
BAC	0
ALT-TRI	0.3
ALT-BAC	0.6
ALT-TRI-BAC	0.4

Muestras de las plantas observadas con síntomas fueron incubadas en medio de cultivo APD. Los crecimientos de hongos con morfología parecida a *A. alternata* fueron reaislados y mediante microscopia comparados con las cepas originales. Los resultados de las microscopias hechas de los reaislamientos mostraron que era la cepa de *A. alternata*. Con esta prueba pudo comprobarse que los síntomas observados en las hojas de las plantas correspondían a la presencia de *A. alternata*.

Por otra parte, se puede inferir que el biocontrol de *A. alternata* por *B. licheniformis* está asociada con el efecto de resistencia sistémica inducida (RSI), debido a que la inoculación de ambas cepas se hizo en tejidos diferentes de la planta, aplicando en hojas *A. alternata* y en la raíz *B. licheniformis*. De hecho, se ha reportado que las cepas del género *Bacillus* son eficientes en el control biológico debido a que pueden activar los sistemas de defensa de la planta huésped. La reducción de la enfermedad por parte de la cepa bacteriana es mediante

la estimulación de un estado cebado en la planta huésped que permite una activación acelerada de las respuestas de defensa ante el ataque de patógenos, lo que conduce a una resistencia mejorada contra la cepa atacante [99] .

La RSI se puede ver como un proceso de tres pasos: i) la precepción por las células vegetales de los estímulos producidos por los agentes inductores que inician el fenómeno, ii) la transducción de señales que ayuda a propagar el estado inducido sistemáticamente a través de la planta y iii) la expresión de mecanismos de defensa que limitan o inhiben la penetración de patógenos en los tejidos del huésped [100]. Las moléculas de defensa incluyen fitoalexinas, proteínas relacionadas con la patogénesis (quitinasas, beta-1,3-glucanasas, inhibidores de proteinasas, etc.) y lignina para reforzar paredes celulares [3].

La resistencia sistémica de *B. licheniformis* contra *A. alternata* es un mecanismo que se pudo observar en los resultados obtenidos, pero que se deberá estudiar con mayor detalle en futuros trabajos para entender con mayor precisión los mecanismos intrínsecos de esta resistencia.

En lo que se refiere al biocontrol de *T. asperelloides* contra *A. alternata* se ha reportado en la literatura que los mecanismos de cepas de *Trichoderma* para suprimir el desarrollo de hongos fitopatógenos es a través de la competencia por nutrientes, micoparasitismo y rompimiento de la pared celular de los patógenos. El proceso de micoparasitismo inicia cuando *Trichoderma* detecta al fitopatógeno y crece hacia él [65]. Este fenómeno fue observado en el experimento de antagonismo *in vitro* contra *A. alternata*.

El uso combinado de los agentes de biocontrol *B. licheniformis* y *T. asperelloides* reducen en un 80% la incidencia de la enfermedad causada por *A. alternata*. Es posible que exista sinergismo entre las cepas que potencian el efecto protector. Además, en plantas de jitomate se ha comprobado que las enzimas relacionadas con su defensa, como la peroxidasa (PO),

polifenol oxidasa (PPO) y superóxido dismutasa (SOD), se incrementan con la presencia de especies de los géneros *Bacillus* y *Trichoderma* [11]. Este es uno de los factores que pueden explicar la reducción de la incidencia de la enfermedad con la aplicación de los dos microorganismos en el mismo tratamiento.

**8.4.1.1. Efecto de la inoculación de *T. asperelloides*, *B. licheniformis* y *A. alternata* en la velocidad de crecimiento, altura y peso seco de las plantas de jitomate.** Los parámetros de altura total y velocidad de crecimiento de las plantas tratadas con los agentes de biocontrol y el fitopatógeno *A. alternata* fueron más altos que los de las plantas tratadas solo con los agentes de biocontrol. Es decir, al parecer la presencia de *A. alternata* en combinación con los agentes de biocontrol tuvo un efecto promotor del crecimiento. En general, los agentes de biocontrol aumentaron apreciablemente la velocidad de crecimiento y la altura de plantas de jitomate.

El tratamiento combinado *B. licheniformis* y *T. asperelloides* contra *A. alternata* causó que la altura y velocidad de crecimiento de las plantas de jitomate, fueran significativamente ( $p < 0.05$ ) superior sobre los otros tratamientos (Tabla 16, Figura 17). La velocidad de crecimiento y la altura de las plantas está relacionada con la interacción entre el agente de biocontrol y su hospedero. La interacción física entre *Trichoderma* y la planta se limita a las primeras capas de células de la epidermis vegetal. En esta interacción ocurre una conversación molecular directa y muy activa. Elicitores de *Trichoderma* activan la expresión de genes implicados en el sistema de defensa y promoción de crecimiento de la planta [101].

Se ha reportado en la literatura que cepas de *Trichoderma* secretan compuestos relacionados con la promoción del crecimiento como la harzianolida una fitohormona auxina que incrementa el crecimiento de plántulas de jitomate. La investigación sugiere que los

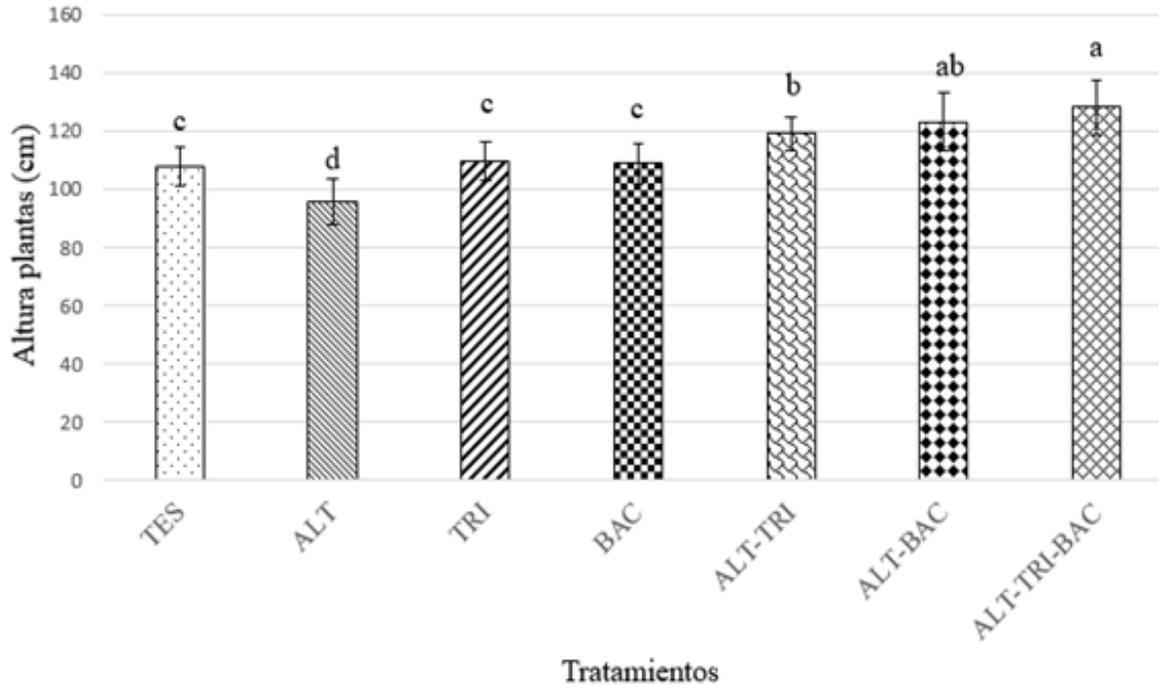
metabolitos secundarios de *Trichoderma* pueden influir en las primeras etapas del crecimiento de la planta promoviendo un mejor desarrollo de la raíz, mejorando su puntas y su longitud [102].

**Tabla 16. Velocidad de crecimiento de las plantas de jitomate (cm/día) en el experimento *in vivo* en los tratamientos contra *A. alternata*.**

Tratamientos	Concepto	Velocidad de crecimiento (cm/día)
ALT-TRI-BAC	<i>Alternaria-Trichoderma-Bacillus</i>	5.13 ± 0.40 <sup>a</sup>
ALT-BAC	<i>Alternaria-Bacillus</i>	4.67 ± 0.77 <sup>ab</sup>
ALT-TRI	<i>Alternaria-Trichoderma</i>	4.31 ± 0.64 <sup>bc</sup>
BAC	<i>Bacillus</i>	4.04 ± 0.28 <sup>cd</sup>
TES	Blanco	3.83 ± 0.49 <sup>cd</sup>
TRI	<i>Trichoderma</i>	3.74 ± 0.70 <sup>cd</sup>
ALT	<i>Alternaria</i>	3.46 ± 0.65 <sup>d</sup>

\*Diferentes letras indican una diferencia significativa de las medias ( $p < 0.05$ )

Adicionalmente, el hongo *Trichoderma* también estimula el crecimiento de las plantas mediante sustancias similares a las fitohormonas y el suministro de fósforo (P), que promueve el desarrollo del sistema radicular y el crecimiento de la planta. Además de esto, *Trichoderma* también es capaz de solubilizar micronutrientes como Fe, Cu, Mn y Zn por quelación que ayudan a mejorar la captación de estos compuestos por las raíces [103].



**Figura 17.** Altura total de plantas de jitomate en los tratamientos con *A. alternata*. TES, testigo; ALT, *Alternaria*; TRI, *Trichoderma*; BAC, *Bacillus*; ALT-TRI, *Alternaria-Trichoderma*; ALT-BAC, *Alternaria-Bacillus* y ALT-TRI-BAC, *Alternaria-Trichoderma-Bacillus*. Las barras de error representan la desviación estándar calculada a partir de 10 réplicas. Diferentes letras indican una diferencia significativa de las medias ( $p < 0.05$ ).  $F = 19.02$ ,  $P = 0.0001$ ,  $CME = 56.41$ ,  $C.V. = 6.66$ .

Por otra parte, estudios anteriores han mostrado que algunas cepas de *B. licheniformis* tienen efectos de promoción de crecimiento. En un estudio reportado en la literatura, los parámetros aéreos de altura de plantas y área foliar se incrementaron con la inoculación de *B. licheniformis* en plantas de pimiento y jitomate; aunque en el caso de las plantas de pimiento, sólo la altura fue significativamente superior. Estos incrementos se deben a la

capacidad de esta cepa para producir fitohormonas como auxinas y giberelinas y su capacidad de colonizar en forma eficiente el sistema radicular de las plantas [104].

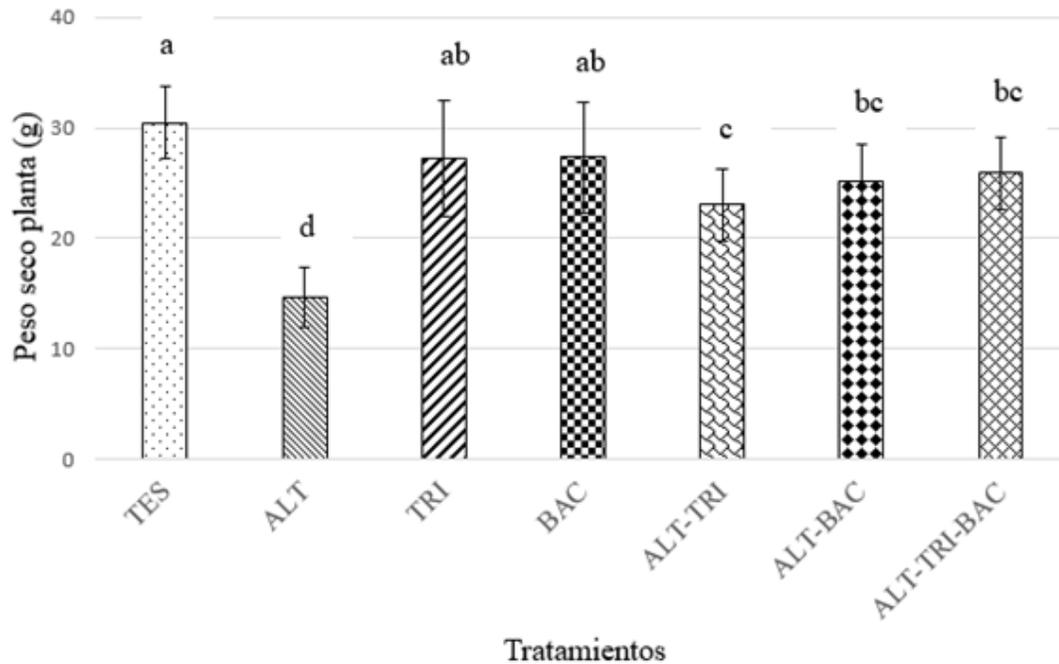
Adicionalmente, se ha reportado en la literatura que algunas cepas de *Bacillus* tienen funciones benéficas que incluyen la solubilización del fósforo (P) y una capacidad de nitrificación heterotrófica eficiente. Estos microorganismos son una parte indispensable de la biota de la rizósfera. Las rizobacterias exhiben típicamente la función de promoción de crecimiento de la planta dando como resultado velocidades de crecimiento más rápidas que las plantas normales [105]. Además, se ha reportado en la literatura que las rizobacterias promueven el crecimiento de plantas mediante la síntesis de fitohormonas (auxinas, citoquininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno), la producción de sideróforos y la competencia de solubilización mineral. Con las fitohormonas se favorece la asimilación de los nutrientes mediante la activación de las raíces y la estimulación de la división celular de los tejidos radiculares. Los sideróforos son quelantes del hierro (III) y por lo tanto, juegan un papel importante en la nutrición del hierro de las plantas [106].

Finalmente, en la literatura se ha comprobado que el uso combinado de agentes de biocontrol de los géneros *Bacillus* y *Trichoderma* incrementa el contenido de P, K, Zn, Cu, Mn y Fe en hojas y también incrementa la actividad de enzimas fosfatasas en el suelo en la zona radicular [107].

En nuestra investigación, con base a los resultados, es posible establecer que existió un efecto sinérgico entre las cepas *B. licheniformis* y *T. asperelloides* que indujeron una mayor velocidad de crecimiento y altura total de las plantas de jitomate.

El peso seco de las plantas de cada tratamiento fue evaluado al concluir el experimento de biocontrol. No existió una diferencia significativa en todos los tratamientos (Figura 18), a

excepción del tratamiento positivo con *A. alternata* que fue el que obtuvo el menor promedio de peso seco.



**Figura 18.** Peso seco de plantas de jitomate en los tratamientos de *A. alternata*. TES, testigo; ALT, *Alternaria*; TRI, *Trichoderma*; BAC, *Bacillus*; ALT-TRI, *Alternaria-Trichoderma*; ALT-BAC, *Alternaria-Bacillus* y ALT-TRI-BAC, *Alternaria-Trichoderma-Bacillus*. Las barras de error representan la desviación estándar calculada a partir de 10 réplicas. Diferentes letras indican una diferencia significativa de las medias ( $p < 0.05$ ).  $F = 15.61$ ,  $P = 0.0001$ ,  $CME = 15.14$ ,  $C.V. = 15.59$ .

Estos datos coinciden con investigaciones anteriores que determinaron que *B. licheniformis* no incrementa significativamente el peso seco del follaje en plantas de jitomate, aunque sí lo hace con plantas de pimiento [104]. Sin embargo, contrasta con investigaciones que han determinado que con el uso combinado de cepas de *Bacillus* y *Trichoderma* se

obtienen los valores máximos de peso seco de hojas y ramas en plantas medicinales del género *Solanum* [107].

Con base a los resultados obtenidos en este estudio, se sugiere que para el manejo de la enfermedad tizón temprano causado por *A. alternata* es recomendable utilizar en forma combinada los dos agentes de biocontrol *T. asperelloides* y *B. licheniformis*, dado que el tratamiento combinado tiene potencial no sólo para el control de la enfermedad sino también para incrementar la velocidad de crecimiento y la altura de las plantas bajo las condiciones aquí establecidas.

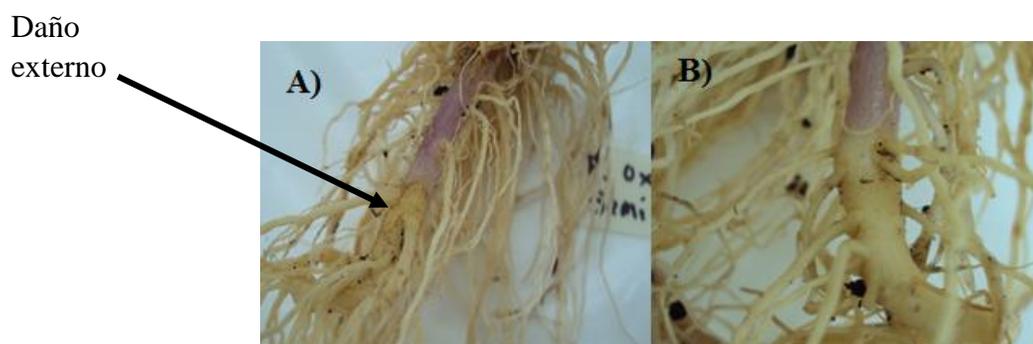
**8.4.2. Efecto antagonista de *T. asperelloides* y *B. licheniformis* contra *F. oxysporum* *in vivo*.** La evaluación de biocontrol contra *F. oxysporum* fue determinada al día 40 después del trasplante. Se hizo una valoración y cuantificación de las plantas que presentaron algún síntoma de daño causado por *F. oxysporum*. Los daños de este hongo pueden presentarse como pudrición de raíces. Al principio se muestra una mancha ligeramente rojiza que posteriormente adquiere una tonalidad que va de rojo oscuro a pardo y se extiende hasta cubrir la raíz principal. En la raíz principal aparecen fisuras longitudinales, en tanto que las pequeñas raíces laterales son destruidas [30]. Los síntomas visibles de daño observado en las plantas inoculadas con *F. oxysporum*, se mostraron como pudrición en raíces laterales (Figura 19), daño externo de la raíz (Figura 20) y daño interno de la raíz principal (Figura 21).

Es importante señalar que no se observaron síntomas graves de daño por *F. oxysporum* como marchitamiento de las plantas y bloqueo vascular de la raíz, como se ha señalado en diferentes estudios. Se ha reportado en la literatura, que la mayoría de las cepas de *F.*

*oxysporum* no son patógenas porque son incapaces de inducir la enfermedad en la planta. Sin embargo, son parásitos porque colonizan los tejidos de la raíz de la planta [94].

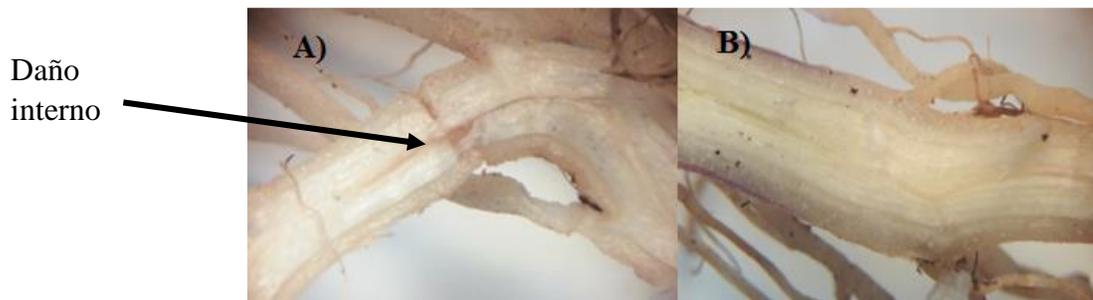


**Figura 19.** Pudrición en raíz de plantas de jitomate causado por *F. oxysporum*. A) Raíz sana, B) Raíz con coloración café indica daño por la presencia de *F. oxysporum*.



**Figura 20.** Daño externo en raíz de plantas de jitomate causados por la inoculación de *Fusarium oxysporum*. A) Daño por *Fusarium oxysporum* B) Planta testigo.

En ocasiones, las plantas colonizadas por *Fusarium*, forman raíces secundarias y numerosas raicillas que puede ser suficiente para que la planta llegue a la madurez. Sin embargo, en la mayoría de los casos las plantas infectadas mueren presenten o no los síntomas [30].



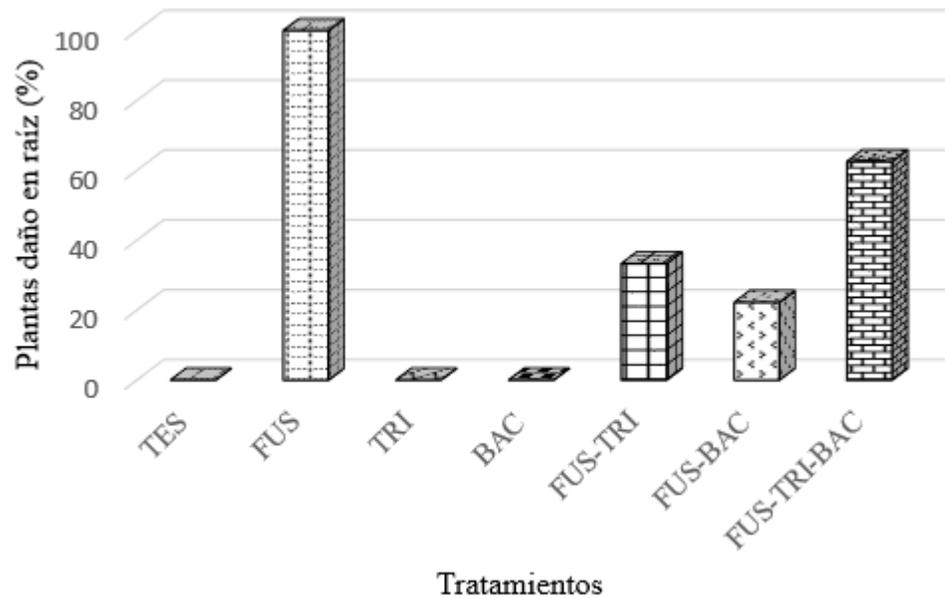
**Figura 21.** Daño interno en raíz de planta de jitomate causadas por *Fusarium oxysporum*.

A) Daño interno por *Fusarium oxysporum* B) Planta testigo.

Los resultados muestran que los tratamientos individuales de *T. asperelloides* y *B. licheniformis* controlaron un 70% y 80% de aparición de los síntomas de la enfermedad, respectivamente (Figura 22). En contraste, el uso combinado sólo controló la enfermedad en un 40%, observándose en este tratamiento los daños más relevantes y notorios. Estos resultados coinciden con reportes de la literatura que indican que cepas de *B. subtilis* reducen la incidencia de la enfermedad causada por *F. oxysporum* en plantas de jitomate en un 52% [52]. Sin embargo el uso combinado de cepas de *Bacillus* con cepas de *Trichoderma* tienen un débil efecto sinergista contra fitopatógenos en el suelo [65].

Por otra parte, en la literatura se ha reportado que la competencia por nutrientes es uno de los mecanismos de la acción antagonista de *T. harzianum* contra *F. oxysporum*. La capacidad competitiva de *Trichoderma* se mejora con la tolerancia al ácido fusárico producido por *F. oxysporum* [9]. Se ha reportado en la literatura que las interacciones entre dos o más agentes de biocontrol también pueden influir en forma negativa en el control de la enfermedad [108]. La competencia puede ser una limitación al uso combinado de microorganismos benéficos. La competencia por nutrientes o espacio y la competencia por hierro, puede limitar la

colonización o actividad de las cepas de biocontrol. La competencia agresiva se expresa mediante la liberación de compuestos inhibidores [9]. Esto puede explicar, en alguna medida, que las plantas en el tratamiento combinado hayan presentado un mayor daño en las raíces.



**Figura 22.** Porcentaje de plantas de jitomate con daño en raíz causado por *F. oxysporum*.

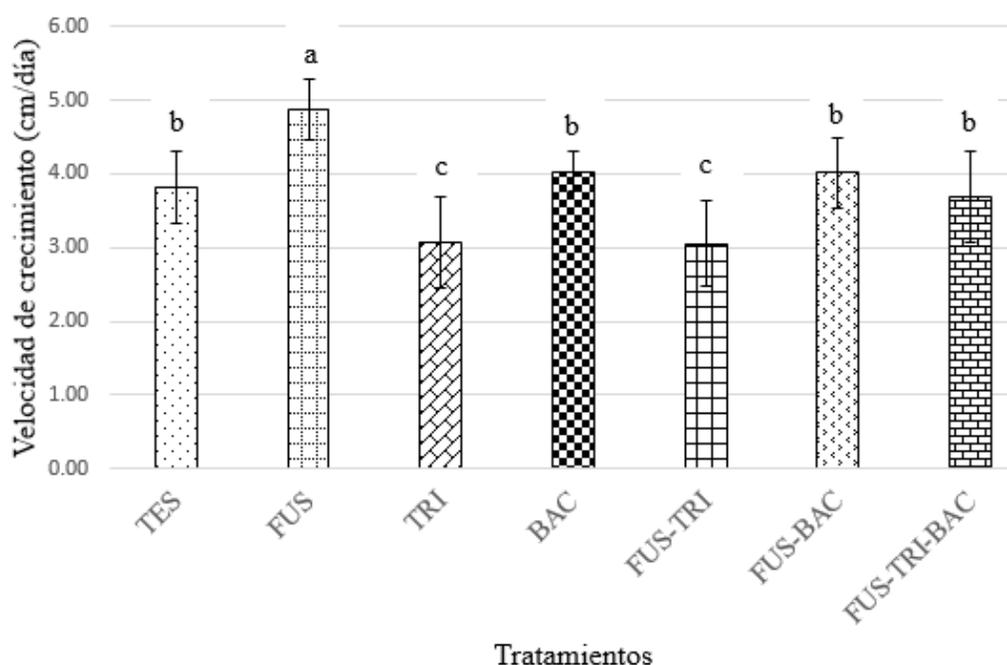
TES testigo, FUS *Fusarium*, BAC *Bacillus*, TRI *Trichoderma*, FUS-TRI *Fusarium-Trichoderma*, FUS-BAC *Fusarium-Bacillus* y FUS-TRI-BAC *Fusarium-Trichoderma-Bacillus*

Con base a los resultados obtenidos en este experimento, para el biocontrol de *F. oxysporum*, bajo las condiciones aquí establecidas, se sugiere aplicar los agentes de biocontrol en forma individual y no combinada.

**8.4.2.1. Efecto de la inoculación de *T. asperelloides*, *B. licheniformis* y *F. oxysporum* en la velocidad de crecimiento, altura y peso seco de las plantas de jitomate.** En los

tratamientos con *F. oxysporum*, las plantas del tratamiento control con el fitopatógeno (FUS) mostraron una mayor altura total y velocidad de crecimiento de las plantas ( $p < 0.05$ ) con respecto a los demás tratamientos (Figura 23 y 24). Los tratamientos con *Trichoderma* (testigo y *Fusarium-Trichoderma*) resultaron con la menor velocidad de crecimiento.

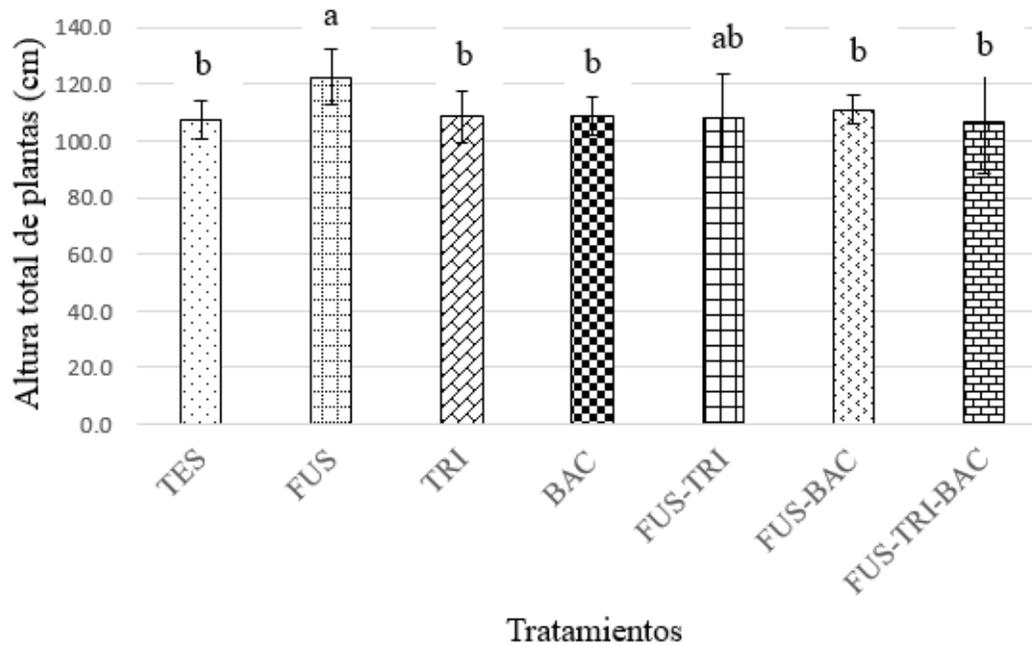
Es probable que el ácido fusárico liberado por *F. oxysporum* en el suelo, tiene un efecto inhibitorio sobre *T. asperelloides*. Se ha reportado en la literatura que el ácido fusárico que es un metabolito secundario de *F. oxysporum*, es una fitotoxina que tiene un fuerte efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *T. harzianum* [9].



**Figura 23.** Velocidad de crecimiento (cm/día) de las plantas de jitomate en los tratamientos de *F. oxysporum*. TES, testigo; FUS, *Fusarium*; BAC, *Bacillus*; TRI, *Trichoderma*; FUS-TRI, *Fusarium-Trichoderma*; FUS-BAC, *Fusarium-Bacillus* y FUS-TRI-BAC, *Fusarium-Trichoderma-Bacillus*. Diferentes letras indican una diferencia significativa de las medias

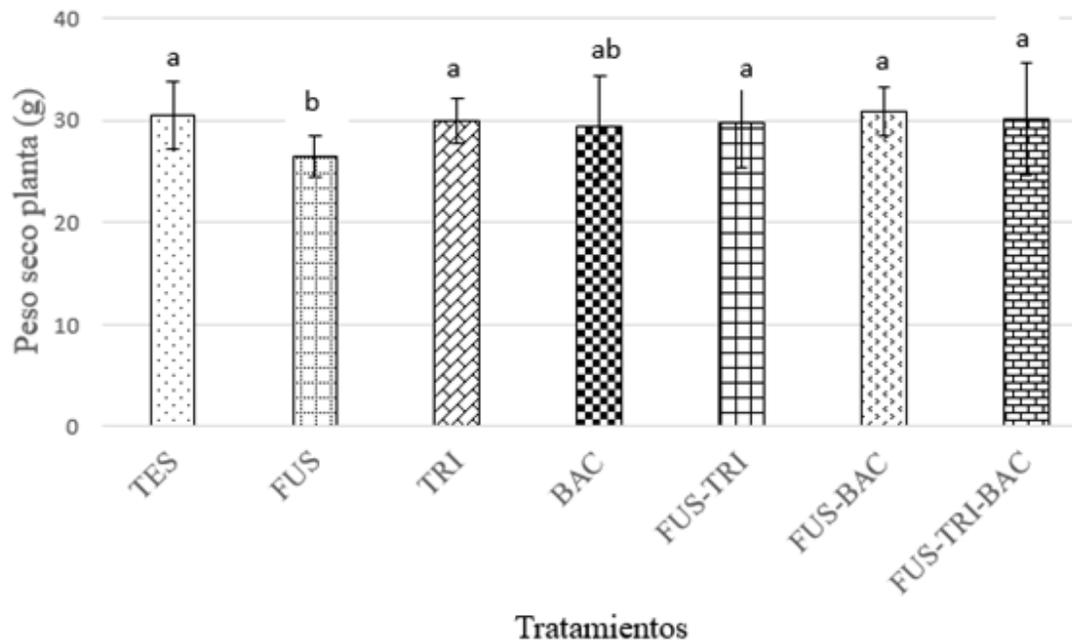
( $p < 0.05$ ).  $F = 14.11$ ,  $P = 0.0001$ ,  $CME = 0.24$ ,  $C.V. = 12.79$

Así también, es probable que la liberación en el suelo de los metabolitos secundarios de *F. oxysporum* y de *T. asperelloides* afectaron en forma negativa el crecimiento y desarrollo de las plantas de jitomate.



**Figura 24.** Altura total de plantas de jitomate (cm) en los tratamientos de *F. oxysporum*. TES, testigo; FUS, *Fusarium*; BAC, *Bacillus*; TRI, *Trichoderma*; FUS-TRI, *Fusarium-Trichoderma*; FUS-BAC, *Fusarium-Bacillus* y FUS-TRI-BAC, *Fusarium-Trichoderma-Bacillus*. Diferentes letras indican una diferencia significativa de las medias ( $p < 0.05$ ).  $F = 4.03$ ,  $P = 0.002$ ,  $CME = 71.58$ ,  $C.V. = 7.59$

Al analizar estadísticamente los datos, no se encontró una diferencia significativa entre los tratamientos en la variable de peso seco de la biomasa de las plantas (Figura 25). Es probable que para observar alguna diferencia, se requiera de que las plantas tengan un periodo mayor de desarrollo.



**Figura 25.** Peso seco de plantas de jitomate en los tratamientos de *F. oxysporum*. TES testigo, FUS *Fusarium*, BAC *Bacillus*, TRI *Trichoderma*, FUS-TRI *Fusarium-Trichoderma*, FUS-BAC *Fusarium-Bacillus* y FUS-TRI-BAC *Fusarium-Trichoderma-Bacillus*. Los tratamientos con la misma letra no difieren significativamente ( $p < 0.05$ ),  $P = 0.58$ ,  $CME = 9.02$ ,  $C.V. = 10.19$

De manera general los resultados agronómicos en los tratamientos de *F. oxysporum* mostraron que el fitopatógeno probablemente pudo ocasionar que las plantas de jitomate presentaran un mejor desarrollo. Esto no indica que el fitopatógeno indujo el crecimiento, sino que las plantas pudieron haber respondido al estímulo de la colonización de *F. oxysporum*. Sin embargo, debido a que es un parásito, con el transcurso del tiempo, posiblemente le ocasionará a las plantas un efecto negativo o incluso la marchitez y su muerte.

## 9. CONCLUSIONES

### 9.1. Producción de conidios de los hongos *T. asperelloides*, *F. oxysporum* y *A. alternata* y producción de células de *B. licheniformis*

Los agentes de biocontrol mostraron capacidad para crecer en medios de cultivo sintéticos. El medio de cultivo APD fue el adecuado para obtener la máxima producción de conidios de *T. asperelloides*, alcanzando valores superiores a  $1 \times 10^7$  conidios/mL. En el caso de *B. licheniformis* el medio líquido NFb modificado presentó una producción de células. En este medio la cepa de *B. licheniformis* mostró estabilidad celular y no formó polímero abundante. En relación a los fitopatógenos, la cepa de *F. oxysporum* presentó concentraciones de conidios en el intervalo de  $2 \times 10^6$  conidios/mL en medio APD y velocidad de crecimiento aceptable; además de no presentar problemas de contaminación.

Para la producción de conidios de *A. alternata*, el medio más adecuado fue V<sub>8</sub>; sin embargo requiere de condiciones muy específicas de temperatura y luz. Ante esta problemática, la inoculación de plantas con una suspensión de micelio resultó adecuada ya que mostró infectividad en las plantas de jitomate.

### 9.2. Determinación *in vitro* de la actividad antagonista de *T. asperelloides* y *B. licheniformis* en contra del crecimiento de *F. oxysporum* y *A. alternata*

En la pruebas hechas en cultivo dual, ambos agentes de biocontrol inhibieron el crecimiento micelial de *F. oxysporum*. La cepa *Trichoderma asperelloides* (VSL4) inhibió e invadió *in vitro* el crecimiento micelial de los hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum* (VSL314) y *Alternaria alternata* (VSL302). El mecanismo de antagonismo que se observó fue el

micoparasitismo. Por otra parte, la cepa *B. licheniformis* sólo mostró inhibición en el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*.

### **9.3 Evaluación de la actividad biocontroladora *in vivo* de *T. asperelloides* y *B. licheniformis* contra *F. oxysporum* y *A. alternata* en plantas de jitomate bajo condiciones de invernadero**

El tratamiento combinado de *T. asperelloides* y *B. licheniformis* contra *A. alternata* redujo en un 80% el síntoma de daño del tizón temprano. Los resultados llevan a la conclusión de que existió un efecto sinérgico entre ambos agentes de biocontrol que potenciaron el efecto protector de la planta. Adicionalmente, el tratamiento individual de *T. asperelloides* contra *A. alternata* redujo en un 70% el daño en las plantas. Finalmente, el tratamiento individual de *B. licheniformis* contra *A. alternata* redujo en un 60% el daño. Este último resultado mostró que *B. licheniformis* indujo resistencia sistémica en las plantas de jitomate, debido a que el agente de biocontrol y el fitopatógeno estuvieron espacialmente separados.

Por otra parte, el mejor resultado obtenido contra *F. oxysporum* fue con el tratamiento con *B. licheniformis*, el cual disminuyó en un 80% los síntomas de daño de la enfermedad. Adicionalmente, el tratamiento con *T. asperelloides* disminuyó en un 70% los síntomas de daño causados por *F. oxysporum*. Finalmente, el uso combinado de los agentes de biocontrol fue el menos efectivo debido a que sólo disminuyó en un 40% los síntomas de daño de la enfermedad.

#### **9.4 Evaluación de velocidad de crecimiento, altura total y peso seco de las plantas de jitomate**

Como era de esperarse, las plantas tratadas con los agentes de biocontrol presentaron los mejores resultados en los parámetros de productividad agronómica. Los parámetros de altura total y velocidad de crecimiento tuvieron valores más altos en los tratamientos que incluyeron los agentes de biocontrol y el fitopatógeno *A. alternata*. Sin embargo, el tratamiento combinado de los agentes de biocontrol y *A. alternata* incrementaron apreciablemente la velocidad de crecimiento y la altura de las plantas de jitomate. Por otra parte, en la evaluación del peso seco de las plantas de jitomate, tuvieron menor biomasa los tratamientos con *A. alternata* control y los tratamientos que incluyeron al fitopatógeno y a los agentes de biocontrol.

Finalmente, en los tratamientos con *F. oxysporum*, las plantas tratadas únicamente con el fitopatógeno, mostraron la mayor altura y velocidad de crecimiento de las plantas de jitomate. En cambio, en el parámetro de peso seco de las plantas no existió diferencia significativa entre los tratamientos.

## 10. PERSPECTIVAS

En el presente trabajo se evaluó el efecto antagonista de los agentes de biocontrol *T. asperelloides* y *B. licheniformis* contra los fitopatógenos *A. alternata* y *F. oxysporum* en plantas de jitomate bajo condiciones de invernadero. También fue evaluado el efecto de los agentes de biocontrol en parámetros agronómicos de las plantas hasta la etapa de 70 d a partir de la siembra. Con la finalidad de contar con mayor información acerca de los mecanismos de control de los agentes de biocontrol, es importante estudiar más a detalle el mecanismo de la resistencia sistémica inducida. Por otra parte, se requiere que las evaluaciones de los agentes de biocontrol sean determinadas hasta la producción del fruto para determinar no sólo el efecto antagonista, sino también el efecto en la productividad y calidad fitoquímica del fruto. Además, se requiere investigar el efecto biofertilizante de *T. asperelloides* y *B. licheniformis* en otros cultivos de importancia económica en la región mixteca de Oaxaca, bajo condiciones de invernadero y en cielo abierto.

## 11. REFERENCIAS

- [1] V. Shanmugam, N. Kanoujia, Biological management of vascular wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* by plant growth-promoting rhizobacterial mixture, *Biol. Control*. 57 (2011) 85–93.
- [2] C. Pane, M. Zaccardelli, Evaluation of *Bacillus* strains isolated from solanaceous phylloplane for biocontrol of *Alternaria* early blight of tomato, *Biol. Control*. 84 (2015) 11–18.
- [3] M. Cawoy, H., Bettioli, W., Fickers, P., Ongena, *Bacillus*-based biological control of plant diseases. In: Stoytcheva, M. (Ed.), *Pesticides in the Modern World – Pesticides Use and Management.*, InTech., (2011) 273–302.
- [4] C.F. Ajillogba, O.O. Babalola, Integrated management strategies for tomato *Fusarium* wilt., *Biocontrol Sci*. 18 (2013) 117–27.
- [5] G. Zhong, Z. Xie, M. Cai, A. Möller, R. Sturm, J. Tang, G. Zhang, J. He, R. Ebinghaus, Distribution and air-sea exchange of current-use pesticides (CUPs) from East Asia to the high Arctic Ocean, *Environ. Sci. Technol*. 46 (2012) 259–267.
- [6] J.E. Chambers, H. Greim, R.J. Kendall, H. Segner, R.M. Sharpe, G. Van Der Kraak, Human and ecological risk assessment of a crop protection chemical: a case study with the azole fungicide epoxiconazole., *Crit. Rev. Toxicol*. 44 (2014) 176–210.
- [7] L.G. Ramírez Milla, Determinación de pesticidas en vegetales mediante cromatografía de gases-espectrometría de masa/masa (GC-MS/MS), Tesis de Ing. Alimentos, Universidad Tecnológica de la Mixteca, 2009.
- [8] V. Sánchez, O. Rebolledo, R.M. Picaso, E. Cárdenas, J. Córdova, O. González, G.J. Samuels, In vitro antagonism of *Thielaviopsis paradoxa* by *Trichoderma longibrachiatum*, *Mycopathologia*. 163 (2007) 49–58.
- [9] M. Marzano, A. Gallo, C. Altomare, Improvement of biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum* vs. *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* through UV-induced tolerance to fusaric acid, *Biol. Control*. 67 (2013) 397–408.
- [10] M.H. El Komy, A.A. Saleh, A. Eranthodi, Y.Y. Molan, Characterization of Novel *Trichoderma asperellum* Isolates to Select Effective Biocontrol Agents Against Tomato *Fusarium* Wilt, 31 (2015) 50–60.
- [11] P. Chowdappa, S.P. Mohan Kumar, M. Jyothi Lakshmi, K.K. Upreti, Growth stimulation and induction of systemic resistance in tomato against early and late blight by *Bacillus subtilis* OTPB1 or *Trichoderma harzianum* OTPB3, *Biol. Control*. 65 (2013) 109–117.
- [12] A. Raiola, M.M. Rigano, R. Calafiore, L. Frusciante, A. Barone, Enhancing the health-

- promoting effects of tomato fruit for biofortified food, *Mediators Inflamm.* (2014).
- [13] V. Bergougnoux, The history of tomato: From domestication to biopharming, *Biotechnol. Adv.* 32 (2014) 170–189.
- [14] G. Bauchet, M. Causse, Genetic Diversity in Tomato (*Solanum lycopersicum*) and Its Wild Relatives, *Genet. Divers. Plants.* (2010) 133–162.
- [15] R. Ilahy, C. Hdider, M.S. Lenucci, I. Tlili, G. Dalessandro, Phytochemical composition and antioxidant activity of high-lycopene tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivars grown in Southern Italy, *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 127 (2011) 255–261.
- [16] J. Pinela, L. Barros, A.M. Carvalho, I.C.F.R. Ferreira, Nutritional composition and antioxidant activity of four tomato (*Solanum lycopersicum*) farmer' varieties in Northeastern Portugal homegardens., *Food Chem. Toxicol.* 50 (2012) 829–34.
- [17] C. Kaur, S. Walia, S. Nagal, S. Walia, J. Singh, B.B. Singh, S. Saha, B. Singh, P. Kalia, S. Jaggi, Sarika, Functional quality and antioxidant composition of selected tomato (*Solanum lycopersicon* L) cultivars grown in Northern India, *LWT - Food Sci. Technol.* 50 (2013) 139–145.
- [18] FAOSTAT, Food and Agricultural Commodities Production., (2015).
- [19] SIAP-SAGARPA, Agricultura-Producción-Anual, (2015).
- [20] M. Dorais, D.L. Ehret, A.P. Papadopoulos, Tomato (*Solanum lycopersicum*) health components: From the seed to the consumer, *Phytochem. Rev.* 7 (2008) 231–250.
- [21] A. Riahi, C. Hdider, Bioactive compounds and antioxidant activity of organically grown tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivars as affected by fertilization, *Sci. Horticulture*. 151 (2013) 90–96.
- [22] A. Bovy, E. Schijlen, R.D. Hall, Metabolic engineering of flavonoids in tomato (*Solanum lycopersicum*): The potential for metabolomics, *Metabolomics*. 3 (2007) 399–412.
- [23] C. Itsiopoulos, A. Hodge, M. Kaimakamis, Can the Mediterranean diet prevent prostate cancer?, *Mol. Nutr. Food Res.* 53 (2009) 227–239.
- [24] J.W. Finley, A. Sigrid-keck, R.J. Robbins, K.J. Hintze, Symposium : Relative bioactivity of functional foods and related dietary supplements selenium enrichment of broccoli : interactions between selenium and secondary plant compounds, (2005) 1236–1238.
- [25] M. Garza Arizpe, M. Molina Velazquez, Manual para la producción de tomate en invernadero en suelo en el estado de Nuevo León., México, 2008.
- [26] A. Zambrano, Cultivo de tomate en invernadero, 2009.
- [27] J.F. Leslie, B.A. Summerell, The *Fusarium* Laboratory Manual, 2006.
- [28] R. Dean, J.A.L. Van Kan, Z.A. Pretorius, K.E. Hammond-Kosack, A. Di Pietro, P.D. Spanu, J.J. Rudd, M. Dickman, R. Kahmann, J. Ellis, G.D. Foster, The Top 10 fungal

- pathogens in molecular plant pathology, *Mol. Plant Pathol.* 13 (2012) 414–430.
- [29] E. Švecová, S. Proietti, C. Caruso, G. Colla, P. Crinò, Antifungal activity of *Vitex agnus-castus* extract against *Pythium ultimum* in tomato, *Crop Prot.* 43 (2013) 223–230.
- [30] G.N. Agrios, *Plant Pathology*, Fifth edit, USA, 2005.
- [31] S. Rahman, Green revolution in India: Environmental degradation and impact on livestock, *Asian J. Water, Environ. Pollut.* 12 (2015) 75–80.
- [32] Tridente, *Agroquímica*, (2015).
- [33] Syngenta México, (2015).
- [34] Bayer de México, S.A. de C.V. Pro-Agro., (2015).
- [35] B.M. Hayes, M.A. Anderson, A. Traven, N.L. Van Der Weerden, M.R. Bleackley, Activation of stress signalling pathways enhances tolerance of fungi to chemical fungicides and antifungal proteins, *Cell. Mol. Life Sci.* 71 (2014) 2651–2666.
- [36] D. Sant, E. Casanova, G. Segarra, M. Avilés, M. Reis, M.I. Trillas, Effect of *Trichoderma asperellum* strain T34 on *Fusarium* wilt and water usage in carnation grown on compost-based growth medium, *Biol. Control.* 53 (2010) 291–296.
- [37] B. Nel, C. Steinberg, N. Labuschagne, A. Viljoen, Evaluation of fungicides and sterilants for potential application in the management of *Fusarium* wilt of banana, *Crop Prot.* 26 (2007) 697–705.
- [38] J.C. Rodriguez, *Resistencia a insecticidas: de la teoría a la práctica.*, Col. Postgraduados, México. (2001).
- [39] H. Navarro, E. Miranda, Residuos de plaguicidas en hortalizas: Problemática y riesgo en México, *Rev. Int. Contam. Ambie.* 29 (2013) 45–64.
- [40] J.R. Roberts, C.J. Karr, Pesticide Exposure in Children, *Am. Acad. Pediatr.* 130 (2013).
- [41] E.T. Rodrigues, I. Lopes, M.Â. Pardal, Occurrence, fate and effects of azoxystrobin in aquatic ecosystems: A review, *Environ. Int.* 53 (2013) 18–28.
- [42] K. Vorkamp, F.F. Rigét, A review of new and current-use contaminants in the Arctic environment: Evidence of long-range transport and indications of bioaccumulation, *Chemosphere.* 111 (2014) 379–395.
- [43] X. Zhang, T. Meyer, D. Muir, C. Teixeira, X. Wang, F. Wania, Atmospheric deposition of current use pesticides in the Arctic: Snow core records from the Devon Island Ice Cap, Nunavut, Canada, *Environmetal Sci. Process. Impacts.* 15 (2013) 2304–2311.
- [44] E. Rohner, A. Carabet, H. Buchenauer, Effectiveness of plant extracts of *Paeonia suffruticosa* and *Hedera helix* against diseases caused by *Phytophthora infestans* in tomato and *Pseudoperonospora cubensis* in cucumber, *J. Plant Dis. Prot.* 111 (2004)

83–95.

- [45] I. Chet, J. Inbar, Biological control of fungal pathogens., *Appl. Biochem. Biotechnol.* 48 (1994) 37–43.
- [46] A. Martínez-Medina, A. Roldán, J. a. Pascual, Interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and *Trichoderma harzianum* under conventional and low input fertilization field condition in melon crops: Growth response and *Fusarium* wilt biocontrol, *Appl. Soil Ecol.* 47 (2011) 98–105.
- [47] A.S. Dukare, R. Prasanna, S. Chandra Dubey, L. Nain, V. Chaudhary, R. Singh, A.K. Saxena, Evaluating novel microbe amended composts as biocontrol agents in tomato, *Crop Prot.* 30 (2011) 436–442.
- [48] H. Alizadeh, K. Behboudi, M. Ahmadzadeh, M. Javan-Nikkhah, C. Zamioudis, C.M.J. Pieterse, P. a. H.M. Bakker, Induced systemic resistance in cucumber and *Arabidopsis thaliana* by the combination of *Trichoderma harzianum* Tr6 and *Pseudomonas* sp. Ps14, *Biol. Control.* 65 (2013) 14–23.
- [49] F. Vinale, K. Sivasithamparam, E.L. Ghisalberti, R. Marra, S.L. Woo, M. Lorito, *Trichoderma*-plant-pathogen interactions, *Soil Biol. Biochem.* 40 (2008) 1–10.
- [50] R. Srivastava, A. Khalid, U.S. Singh, A.K. Sharma, Evaluation of arbuscular mycorrhizal fungus, fluorescent *Pseudomonas* and *Trichoderma harzianum* formulation against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* for the management of tomato wilt, *Biol. Control.* 53 (2010) 24–31.
- [51] M. Maketon, J. Apisitsantikul, C. Siriraweeikul, Greenhouse evaluation of *Bacillus subtilis* AP-01 and *Trichoderma harzianum* AP-001 in controlling tobacco diseases, 1 (2008) 296–300.
- [52] O. Baysal, M. Çalışkan, Ö. Yeşilova, An inhibitory effect of a new *Bacillus subtilis* strain (EU07) against *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 73 (2008) 25–32.
- [53] R. Hermosa, A. Viterbo, I. Chet, E. Monte, Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes., *Microbiology.* 158 (2012) 17–25.
- [54] M. Belén Rubio, N.M. Quijada, E. Pérez, S. Domínguez, E. Monte, R. Hermosa, Identifying beneficial qualities of *Trichoderma parareesei* for plants, *Appl. Environ. Microbiol.* 80 (2014) 1864–1873.
- [55] L. Kredics, L. Hatvani, S. Naeimi, P. Kormoczi, L. Manczinger, C. Vagvolgyi, I. Druzhinina, Biodiversity of the Genus *Hypocrea/Trichoderma* in Different Habitats, 2014.
- [56] W. Vargas, J.C. Mandawe, C.M. Kenerley, Plant-derived sucrose is a key element in the symbiotic association between *Trichoderma virens* and maize plants., *Plant Physiol.* 151 (2009) 792–808.
- [57] J.L. Reino, R.F. Guerrero, R. Hernández-Galán, I.G. Collado, Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*, *Phytochem. Rev.* 7 (2008) 89–123.

- [58] C.M. Vos, Y. Yang, B. De Coninck, B.P. Cammue, Fungal (-like) biocontrol organisms in tomato disease control, *Biol. Control*. 74 (2014) 65–81.
- [59] M.F. Shores M, Harman GE, Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents, *Annu. Rev. Phytopathol.* 48 (2010) 21–43.
- [60] J.A. Cuervo-Parra, M. Ramírez-Suero, V. Sánchez-López, M. Ramírez-Lepe, Antagonistic effect of *Trichoderma harzianum* VSL291 on phytopathogenic fungi isolated from cocoa (*Theobroma cacao* L.) fruits, 10 (2011).
- [61] C. Alabouvette, C., Olivain, C., Migheli, Q., Steinberg, Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt-inducing *Fusarium oxysporum*, *New Phytol.* 184 (2009) 529–544.
- [62] G. Segarra, E. Casanova, M. Avilés, I. Trillas, *Trichoderma asperellum* strain T34 controls *Fusarium* wilt disease in tomato plants in soilless culture through competition for iron, *Microb. Ecol.* 59 (2010) 141–149.
- [63] P. Taylor, M. Street, L. Wt, Role of auxin-responsive genes in biotic stress responses, *Plant Signal. Behav.* (2009).
- [64] C.A. Moreno, F. Castillo, A. González, D. Bernal, Y. Jaimes, M. Chaparro, C. González, F. Rodríguez, S. Restrepo, A.M. Cotes, Biological and molecular characterization of the response of tomato plants treated with *Trichoderma koningiopsis*, *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 74 (2009) 111–120.
- [65] M. Saad Alamri, Y.S. Mostafa, *In vitro* and *in vivo* biocontrol of soil-borne phytopathogenic fungi by certain bioagents and their possible mode of action, *Biocontrol Sci.* 17 (2012) 155–167.
- [66] D.K. Choudhary, B.N. Johri, Interactions of *Bacillus* spp. and plants - With special reference to induced systemic resistance (ISR), *Microbiol. Res.* 164 (2009) 493–513.
- [67] C.M.J. Pieterse, S.C.M. Van Wees, J. Ton, J. A. Van Pelt, L.C. Van Loon, Signalling in rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Biol.* 4 (2002) 535–544.
- [68] M. Pérez, R. Piad, G. Milian, A. Ferreira, Preparation of a crude enzymatic from *Bacillus licheniformes* E-44 and its evaluation in the hydrolysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls, *Enzyme Microb. Technol.* (2006).
- [69] W. Bettiol, P. Fickers, M. Ongena, *Bacillus* -Based Biological Control of Plant Diseases, 1849 (2009).
- [70] L.A. Hoch, J., Sonenshein, A., *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria : biochemistry, physiology and molecular genetics., *Am. Soc. Microbiol.* (1993).
- [71] M. Nakano, M., Hulett, Adaptation of *Bacillus subtilis* to oxygen limitation, *Microbiologie.* 157 No. 1 (1997) 1–7.
- [72] B. Voigt, T. Schweder, B. Dörte, A. Ehrenreich, G. Gottschalk, J. Feesche, K.H. Maurer, M. Hecker, A proteomic view of cell physiology of *Bacillus licheniformis*, *Proteomics.* 4 (2004) 1465–1490.

- [73] M. Ongena, P. Jacques, *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol, *Trends Microbiol.* 16 (2008) 115–125.
- [74] C. Alabouvette, C. Olivain, C. Steinberg, Biological control of plant diseases: The European situation, *Eur. J. Plant Pathol.* 114 (2006) 329–341.
- [75] J.E. Loper, M.D. Henkels, Availability of iron to *Pseudomonas fluorescens* in rhizosphere and bulk soil evaluated with an ice nucleation reporter gene, *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1997) 99–105.
- [76] Y.L. Lee, S.C., Kim, S.H., Park, I.H., Chung, S.Y., Choi, Isolation and structural analysis of bamylocin A, novel lipopeptide from *Bacillus amyloliquefaciens* LP03 having antagonistic and crude oil-emulsifying activity., *Arch. Microbiol.* 188 (2007) 307–312.
- [77] D. Rojas-Solís, M. Contreras-Pérez, G. Santoyo, Mecanismos de estimulación del crecimiento vegetal en bacterias del género *Bacillus*, 15 (2013) 36–41.
- [78] J.M. Whipps, Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere, *J. Exp. Bot.* 52 (2001) 487–511.
- [79] W.O. Schallmeyer M, Singh A, Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production., *Can J Microbiol.* 50 (2004) 1–17.
- [80] L.C. Van Loon, P.A.H.M. Bakker, C.M.J. Pieterse, Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria, *Phytopathology.* 36 (1998) 453–483.
- [81] P.B. Wasternack C, Jasmonate-signalled plant gene expression., *Trends Plant Sci.* 2 (1997) 302–307.
- [82] B.J. Jacobsen, N.K. Zidack, B.J. Larson, The role of *Bacillus*-based biological control agents in integrated pest management systems: plant diseases., *Phytopathology.* 94 (2004) 1272–1275.
- [83] M. Terefe, T. Tefera, P.K. Sakhuja, Effect of a formulation of *Bacillus firmus* on root-knot nematode *Meloidogyne incognita* infestation and the growth of tomato plants in the greenhouse and nursery, *J. Invertebr. Pathol.* 100 (2009) 94–99.
- [84] J.A. Carrillo Fasio, Montoya Rodríguez, T. de J. García Estrada, R.S. Cruz Ortega, J. E. Márquez Zequera, I. y Sañudo Barajas, Razas de *Fusarium oxysporum f. sp lycopersici* Snyder y Hansen , en Tomate ( *Solanum lycopersicum* Mill.) en el Valle de Culiacán , Sinaloa , México, *Rev. Mex. Fitopatol.* 21 (2003) 123–127.
- [85] K.I. Lira-De León, M. V Ramírez-Mares, V. Sánchez-López, M. Ramírez-Lepe, R. Salas-Coronado, N.F. Santos-Sánchez, R. Valadez-Blanco, B. Hernández-Carlos, Effect of crude plant extracts from some Oaxacan flora on two deleterious fungal phytopathogens and extract compatibility with a biofertilizer strain., *Front. Microbiol.* 5 (2014) 1–10.
- [86] L.E. Mota Pacheco, Utilización de un medio enriquecido con melazas para la producción de biomasa de *Bacillus Licheniformis* con potencial biofertilizante, Tesis de M.C. Productos naturales y alimentos, Universidad Tecnológica de la Mixteca,

2013.

- [87] K.P. Akhatar, M.Y. Saleem, M. Asghar, M.A. HAq, New report of *Alternaria alternata* causing leaf blight of tomato in Pakistan., *Plant Pathol.* 56, 816 (2004).
- [88] K. Tilak, K.K. Pal, R. Dey, *Microbes for sustainable agriculture*, New Delhi, India I. K. Int. Pvt. Ltd. (2010).
- [89] M. Espadas Resendiz M. y G. de los A. Zita Padilla, *Manual de laboratorio de fitopatología*, México, 2009.
- [90] V. Shanmugam, P. Chugh, P. Sharma, Cold-tolerant *Trichoderma* species for the management of *Fusarium* wilt of tomato plants, *Ann. Microbiol.* (2014) 543–551.
- [91] Y. Reinoso Pozo, D. Vaillant Flores, C.R. L., G.P. E., Pazos Álvarez-Rivera V., Selección de cepas de *Bacillus* y otros géneros relacionados para el control biológico de hongos fitopatógenos., *Fitosanidad.* 11, no. 1 (2007).
- [92] Nunhems, *Tomates Híbridos*, 2010.
- [93] P. Rangel, F. Hernández, J. Luis, R. Puente, E. Omar, E. Rivera, J. Ramón, L. Herrera, S. Castruita, M. Ángel, O. Vidal, J. Arnaldo, Evaluación de soluciones nutritivas orgánicas en la producción de tomate en invernadero, 36 No. 9 (2011) 689–693.
- [94] C. Olivian, C. Alabouvette, Process of tomato root colonization by a pathogenic strain of *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* in comparison with a non-pathogenic strain, *New Phytol.* (1999) 497–510.
- [95] E. Osdaghi, N. Rahimi Kakavandi, A new leaf disease on *Populus euphratica* in southwestern Iran, *For. Pathol.* 45 (2015) 336–341.
- [96] J.H.C. Woudenberg, J. Z. Groenewald, M. Binder, P.W. Crous, *Alternaria* redefined, *Stud. Mycol.* 2004 (2004) 171–212.
- [97] R.F. Masangkay, C. Paulitz, S.G. Hallett, A.K. Watson, Characterization of Sporulation of *Alternaria alternata f. sp. sphenocleae*, *Biocontrol Sci. Technol.* 10 (2000) 385–397.
- [98] E.A. Shahin, S.J. F., An efficient technique for inducing profuse sporulation of *Alternaria* species, *Phytopathology.* 69 (1978) 618–620.
- [99] U. Conrath, V.F. Gerold J. M. Beckers, P. García-Agustín, G. Jakab, M.-A.N. Felix Mauch, C.M.J. Pieterse, B. Poinssot, M.J. Pozo, A. Pugin, U. Schaffrath, and B.M.-M. Jurriaan Ton, David Wendehenne, Laurent Zimmerli, Priming : Getting Ready for Battle, *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19 (2009) 1062–1071.
- [100] L.C. Van Loon, Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria, *Eur. J. Plant Pathol.* 119 (2007) 243–254.
- [101] I. Yedidia, M. Shores, Z. Kerem, Y. Kapulnik, I. Chet, N. Benhamou, Concomitant Induction of Systemic Resistance to *Pseudomonas syringae* pv . lachrymans in Cucumber by *Trichoderma asperellum* ( T-203 ) and Accumulation of Phytoalexins Concomitant Induction of Systemic Resistance to *Pseudomonas syringae* pv .

- lachrymans in C, Appl. Environ. Microbiol. 69 (2003) 7343–7353.
- [102] F. Cai, Yu G, Wang P, Wei Z, Fu L, Shen Q, Harzianolide, a novel plant growth regulator and systemic resistance elicitor from *Trichoderma harzianum*, Plant Physiol Biochem. 73 (2013) 106–113.
- [103] F. Cai, W. Chen, Z. Wei, G. Pang, R. Li, W. Ran, Q. Shen, Colonization of *Trichoderma harzianum* strain SQR-T037 on tomato roots and its relationship to plant growth, nutrient availability and soil microflora, Plant Soil. 388 (2015) 337–350.
- [104] J.A. Lucas, A. Probanza, B. Ramos, M. Palomino, F.J. Gutiérrez, Effect of inoculation of *Bacillus licheniformis* on tomato and pepper., Agron. EDP Sci. 24 (4) (2004) 169–176.
- [105] K. Zhang, K. Zhang, B. Ge, B. Liu, T.T. Nwet, W. Zhao, M. Shi, F. Disclosure, *Bacillus methylotrophicus* strain NKG-1, Isolated from Changbai Mountain, China, has Potential Applications as a Biofertilizer or Biocontrol Agent, PLoS One. (2016) 1–13.
- [106] M.R. Elshahat, A.A. Ahmed, A.H. Enas, M.S. Fekria, Plant growth promoting rhizobacteria and their potential for biocontrol of phytopathogens, African J. Microbiol. Res. 10 (2016) 486–504.
- [107] N. Hemashenpagam, T. Selvaraj, Effect of arbuscular mycorrhizal (AM) fungus and plant growth promoting rhizomicroorganisms (PGPR's) on medicinal plant *Solanum viarum* seedlings, J. Environ. Biol. 32 (2011) 579–583.
- [108] Thrane, C., Funck Jensen, D. Tronsmo, A., Substrate Colonization, Strain Competition, Enzyme Production In Vitro, and Biocontrol of *Pythium ultimum* by *Trichoderma* spp. Isolates P1 and T3, Eur. J. Plant Pathol. 106 (2000) 215–225.
- [109] A. Rezusta López, A. Sánchez Sousa, J. Gil Tomás, Fundamentos básicos para el diagnóstico micológico., Rev. Iberoam. Micol. (2007).

## 13. APÉNDICES

### Apéndice 1. Preparación de diferentes medios de cultivo usados en el experimento in vitro

#### Medio SNA (Nirenberg, 1976)

Ingredientes:

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g
KNO <sub>3</sub>	1 g
MgSO <sub>4</sub>	0.5 g
KCl	0.5 g
Glucosa	0.2 g
Sacarosa	0.2
Agar	20 g
Agua destilada	1000 mL

#### Procedimiento de preparación

Los ingredientes fueron mezclados y disueltos en una parte del agua destilada. El agar se disolvió en la parte restante del agua. La suspensión del agar y el SNA fueron homogenizados en una parrilla eléctrica.

#### Agar jugo V<sub>8</sub>

#### Método A

#### Ingredientes:

Jugo V <sub>8</sub> centrifugado	20 mL
Agar	15 g
CaCO <sub>3</sub>	4.5 g
Agua destilada	Aforar a 1000 mL

#### **Método B**

#### Ingredientes:

Jugo V <sub>8</sub> centrifugado	100 mL
Agar	15 g
CaCO <sub>3</sub>	2 g
Agua destilada	Aforar a 1000 mL

#### **Procedimiento de preparación**

El CaCO<sub>3</sub> fue agregado al jugo V<sub>8</sub>, previamente centrifugado, y fue agitado hasta disolver. Se dejó reposar durante 10 min. Posteriormente, se sometió a centrifugación durante 20 min a 4000 RPM. Se obtuvo el sobrenadante hasta completar la cantidad requerida [89].

Para el método A, se añadió a la solución de agar el jugo V<sub>8</sub> centrifugado y se aforó a 1000 mL.

Para el método B, utilizó 900 mL para disolver el agar, mezclando esta solución con el jugo V<sub>8</sub> centrifugado.

En ambos casos se sometió a esterilización a 115 °C durante 20 min y se vació en cajas Petri.

### **Medio Agar Clavel (CLA)**

#### **Método A**

Ingredientes:

Hojas de clavel fresco	200 g
Glucosa	20 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 mL

#### **Método B**

Ingredientes:

Hojas de clavel fresco	63.4 g
Glucosa	20 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 mL

#### **Procedimiento de preparación**

Las hojas de clavel fueron licuadas durante 3 min a una sola velocidad. El agar y la glucosa fueron disueltos en agua destilada ligeramente caliente. El licuado de clavel fue vertido en la suspensión de agar, se homogenizó y se sometió a esterilización a 115 °C durante 20 min [27]. El medio es vertido en cajas Petri.

#### **Medio agar papa-zanahoria**

Ingredientes:

Papa rallada	20 g
--------------	------

Zanahoria rallada	20 g
Agar	18 g
Agua destilada	1000 mL

### Procedimiento de preparación

La zanahoria y la papa rallada fueron hervidas en 1 L de agua destilada durante 1 h. Posteriormente, se hizo un filtrado con una malla, se agregó el agar y la infusión fue homogenizada [109]. La suspensión se esterilizó y el medio agar papa-zanahoria fue vertido en cajas Petri.

### Apéndice 2. Curva de calibración para determinar la cantidad de biomasa de *B. licheniformis* con base a la densidad óptica del cultivo a 610 nm (OD<sub>610</sub>) a diferentes concentraciones

