



UES

Universidad Estatal de Sonora
La fuerza del saber, estimulará mi espíritu

UNIVERSIDAD ESTATAL DE SONORA

UNIDAD ACADEMICA SAN LUIS RIO COLORADO

MAESTRIA EN CIENCIAS EN SISTEMAS DE PRODUCCION BIOSUSTENTABLES

**“FORMULACIÓN DE UN FUNGICIDA BIOLÓGICO CONTRA EL PATÓGENO
Fusarium oxysporum f. sp *lycopersici* A BASE DE *Fusarium oxysporum* NO
PATOGENICO Y *Pseudomonas fluorescens*”**

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS EN SISTEMAS DE PRODUCCION BIOSUSTENTABLES

PRESENTA:

DIANA VALERIA RIOS CORTEZ

SAN LUIS RIO COLORADO, SONORA

AGOSTO 2016

UES

UNIVERSIDAD ESTATAL DE SONORA

FORMATO F5

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS
PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE MAESTRO.
OPCIÓN TESIS

Los miembros del Comité de Tesis de la alumna Diana Valeria Ríos Cortez recomendamos que el documento titulado: Formulación de un Fungicida Biológico contra el Patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* a base de *Fusarium oxysporum* no patógeno y *Pseudomonas fluorescens* sea aceptado como Requisito Parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias en Sistemas de Producción Biosustentables

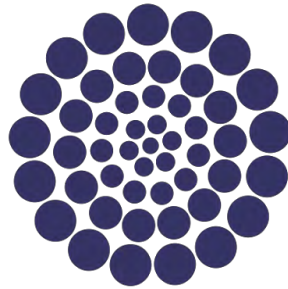
Dr. Noé Ortiz Uribe
Director

Dr. Lorenzo Valenzuela Vásquez
Sinodal

Dra. Sandra Alcaraz
Sinodal

AGRADECIMIENTOS

CONACYT



CONACYT

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, a la Universidad Estatal de Sonora

y



A la empresa **Gowan Company LLC** por el apoyo científico, técnico y económico, para la realización de esta investigación.

AGRADECIMIENTOS

To **Jon and Juli Jessen**, thank you for your support during the development of this research project, I really appreciate your interest, trust and time.

Al comité de Tesis el **Dr. Noé Ortiz Uribe, Dr. Lorenzo Valenzuela Vásquez y Dra. Sandra Alcaraz**, por la enorme ayuda impartida, gracias al profesionalismo, experiencias y conocimientos que aportaron a cada fase de esta investigación, sin ustedes no hubiera sido posible.

A **Frank Jaime** por su gran ayuda, por compartir su conocimiento y sus experiencias.

A mis compañeras **Claudia Caro y Marisol López Arellano** por su ayuda incondicional en todos los ensayos realizados.

A los compañeros de la Universidad de Arizona, **Dr. Mike Matheron, Martin Porchas y Humberto Hernández**, por su asesoría técnica, al igual que la **Dra. Ann Chase**

DEDICATORIA

Gracias a Dios por guiarme, darme fuerza y capacidad para permitirme terminar esta etapa profesional.

A mi hijo Alejandrino y a mi esposo Alejandro, por siempre ser constantes, y pacientes dándole ánimo, esperanza y sonrisas.

A mis papás Rosy y Luis por su apoyo incondicional en cualquier paso de mi vida, por su ayuda y sacrificios.

A mis tías Fina†, Lupe†, Eva, Chelo, Gloria y Alicia, Zonia y a mi suegra Rosa Delia gracias por su apoyo.

A hermano Luis y mis primas Fátima, Rocío, Paola, Mónica y Verence,

A mis eternas amigas Lupita e Isabel.

RESUMEN

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es considerado como una de las hortalizas de mayor importancia en muchos países del mundo, ocupando el segundo lugar en producción a nivel mundial. La marchitez vascular de tomate producida por el patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Snyder y Hansen) es la principal enfermedad que causa problemas en el cultivo de tomate, disminuyendo el rendimiento en un 60% y afectando la calidad del producto. En la actualidad existen muy pocos productos tanto químicos como biológicos que reduzcan significativamente la enfermedad de marchitamientos por *Fusarium*. Las nuevas investigaciones se están enfocando en la aplicación de microorganismos como control biológico, estos presentan mecanismos de producción de metabolitos secundarios como: sideróforos, antibióticos, compuestos volátiles, enzimas y fitohormonas.

La cepa de *Fusarium oxysporum* no patogénica Fo47 controla los marchitamientos por *Fusarium* en clavel, tomate, melón, sandía, plátano, espárrago y linaza (Lemanceau, 1992. Alabouvette, 1993. Blok, 1997. Duijff, 1999). Por su parte la bacteria *Pseudomonas fluorescens* controla varias enfermedades de la raíz, y también es efectiva contra enfermedades como mal del pie del trigo (*Gaeumannomyces graminis*), pie negro del tabaco (*Thielaviopsis basicola*), damping-off en betabel (*Pythium ultimum*), inhibe el crecimiento de pudriciones blandas por bacterias y nematodos, tiene propiedades antivirales, e induce el crecimiento y vigor en las plantas (Showkat, 2012).

La compañía Gowan, tiene más de 50 años de haberse fundado, con base en Yuma, Arizona, Estados Unidos y cuenta con 55 productos, dos laboratorios de formulaciones, y uno de investigación y tamizaje de productos nuevos. La compañía Gowan necesita invertir en la investigación y manufacturación de productos más ecológicos, ya que es la tendencia que se está demostrando en empresas de mayor impacto. Existe la necesidad de un producto para combatir las enfermedades por marchitamiento de *Fusarium*, a base de un microorganismo o mezcla de microorganismos (*Fusarium oxysporum* no patogénico y *Pseudomonas fluorescens*).

En esta investigación se realizaron ensayos *in-vitro* de los microorganismos antagonista para evaluar el porcentaje de inhibición del patógeno. Los agentes

antagonistas redujeron significativamente el crecimiento del patógeno a los cuatro y a los siete días después del establecimiento de los experimentos en cultivo dual (78%), en cultivo dual integrado (69%), y en la exposición individual de Fol a Fo47 (32%) y a Pf-5 (46%). La exposición a compuestos orgánicos volátiles de los antagonistas combinados también redujo significativamente el crecimiento de Fol.

Se realizaron pruebas para determinar la concentración ideal de la combinación de ambos biocontroles, y se determinó que se requiere de una concentración de 10^6 y 10^8 UFC/ml para Fo47 y Pf-5, respectivamente para mantener a ambos microorganismos viables y para presentar antagonismo contra Fol.

En los estudios *in-vivo* con semillas de tomate se presentaron diferencias significativas cuando se inocularon Fo47 y Pf-5 al mismo tiempo que Fol, mostrando un 100% de germinación y un 40% de semillas infectadas.

Para los estudios con plántulas de tomate inoculadas por el método de inmersión de raíz, se presentaron diferencias significativas, mostrando que el control biológico comercial Serenade Soil™ y la formulación B es la que redujo mayormente la incidencia y severidad de Fol. Se presentaron diferencias en la variable de número de brotes laterales, en donde los tratamientos que contenían los biocontroles sobresalieron con un 82% más que el control positivo.

Para los dos estudios en invernadero con plantas de tomate se mostraron diferencias significativas en los valores de incidencia y severidad de la enfermedad, en las cuales la formulación B consiguió disminuir los signos de la enfermedad después de 6 semanas en el primer ensayo y 25 días para el segundo ensayo. Para las evaluaciones de las variables de análisis de crecimiento, se obtuvo una diferencia significativa (>45%) en el número de frutos en las plantas tratadas con la formulación B; para las variables de altura, grosor de tallo, número de brotes laterales y número de flores no se presentaron diferencias significativas.

Se realizaron evaluación poscosecha de peso fresco y peso seco de la parte aérea de la planta, raíces y frutos, no se reportaron diferencias significativas, sin embargo, se pudo observar que para los tratamientos que contenían los biocontroles se mostró que la mayor parte del peso total de las plantas fue destinada a la producción de frutos.

La asociación de Fo47 con Pf-5 es una forma de controlar al patógeno Fol muy viable

INDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	13
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	16
2. OBJETIVOS	18
2.1. Objetivo General	18
2.2. Objetivos Específicos.....	18
3. JUSTIFICACIÓN	19
4. MARCO TEORICO	20
4.1. Marchitez por Fusarium en Tomate (<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp <i>lycopersici</i>)	20
4.2. Control de la enfermedad.....	23
4.2.1. Variedades Resistentes	23
4.2.2. Control químico	23
4.2.3. Control Biológico	24
4.2.4. <i>Fusarium oxysporum</i> no patogénico Fo47.....	25
4.2.5. <i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5	26
5. HIPOTESIS	29
6. METODOLOGIA.....	30
6.1. Selección de cepas	30
6.2. Medios de cultivo y Materiales a utilizar	30
6.3. Evaluación de los agentes antagonistas por cultivo dual	32
6.4. Evaluación de los agentes antagonista combinados	33
6.4.1. Evaluación de los agentes antagonistas por cultivo dual por siembra en la superficie.	33
6.4.2. Evaluación de los agentes antagonistas por cultivo dual por siembra incorporada.	34
6.4.3. Evaluación de los agentes antagonistas por compuestos volátiles.	34
6.5. Formulación.....	35
6.5.1. Pruebas para determinar las concentraciones de los microorganismos antagónistas.....	35
6.5.2. Formulaciones del Producto	37
6.5.3. Estudios de estabilidad de las formulaciones	40
6.6. Estudios in-vivo	41
6.6.1. Estudios en semilla	41
6.6.2. Estudios en plántula por método de inmersión de raíces.....	43
6.6.3. Estudios en Invernadero	47
6.7. Análisis Estadísticos	54

INDICE DE FIGURAS

Figura. 1 Caja de petri mostrando al hongo <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	21
Figura. 2 Microconidias de <i>Fol.</i>	21
Figura. 1 Caja de petri mostrando al hongo <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	21
Fuente: Rios, 2014 Figura. 2 Microconidias de <i>Fol.</i>	21
Figura. 4 Clamidosporas de <i>Fol.</i>	22
Figura. 3 Macroconidias de <i>Fol.</i>	22
Figura. 3 Macroconidias de <i>Fol.</i>	22
Figura. 5 Raíz de Tomate con partículas de suelo adjuntas colonizadas por hifas de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	22
Fuente: Sociedad Americana de Microbiología, 2006 Figura. 3 Macroconidias de <i>Fol.</i>	22
Figura. 5 Raíz de Tomate con partículas de suelo adjuntas colonizadas por hifas de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	23
Figura. 6 <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> invade la planta de tomate por medio de la raíz y causa el marchitamiento. Las hojas cambian a un color amarillo (izquierda) y si se corta el tallo (derecha) se puede observar que el xilema se ha puesto café por la infección	
Figura. 5 Raíz de Tomate con partículas de suelo adjuntas colonizadas por hifas de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> ... ¡Error! Marcador no definido.	
Figura. 6 <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> invade la planta de tomate por medio de la raíz y causa el marchitamiento. Las hojas cambian a un color amarillo (izquierda) y si se corta el tallo (derecha) se puede observar que el xilema se ha puesto café por la infección	23
Figura. 7 Sistema radicular de plantas de Esparrago en suelos esterilizados co-inoculados con <i>Fusarium oxysporum</i> y diferentes cepas de <i>Fusarium oxysporum</i> no patogénico. BI: Sin inocular, Foa: Inoculada con el patógeno, NP, Fo59, Fo12, Fo131: co-inoculada con el patógeno y distintas cepas de <i>F. oxysporum</i> no patogenico	25
Figura. 8 Interacción in vitro entre NP y <i>P. ultimum</i> dos días después de la inoculación del hongo en Agar de Papa. A) <i>P. ultimum</i> B) crecimiento en presencia de NP.	
Figura. 7 Sistema radicular de plantas de Esparrago en suelos esterilizados co-inoculados con <i>Fusarium oxysporum</i> y diferentes cepas de <i>Fusarium oxysporum</i> no patogénico. BI: Sin inocular, Foa: Inoculada con el patógeno, NP, Fo59, Fo12, Fo131: co-inoculada con el patógeno y distintas cepas de <i>F. oxysporum</i> no patogenico	25
Figura. 8 Interacción in vitro entre NP y <i>P. ultimum</i> dos días después de la inoculación del hongo en Agar de Papa. A) <i>P. ultimum</i> B) crecimiento en presencia de NP	26
Figura. 9 <i>P. flourescens</i> en microscopio electronico. Fuente: http://microbiologyglossary.wikispaces.com/Pseudomonas+fluorescens	27
Figura. 10 Cultivo de <i>P. flourescens</i> en el medio Agar de Triptona (TY) (izquierda), a la derecha se muestra la caja de petri bajo luz ultravioleta.	
Figura. 9 <i>P. flourescens</i> en microscopio electronico. Fuente: http://microbiologyglossary.wikispaces.com/Pseudomonas+fluorescens . ¡Error! Marcador no definido.	
Figura. 10 Cultivo de <i>P. flourescens</i> en el medio Agar de Triptona (TY) (izquierda), a la derecha se muestra la caja de petri bajo luz ultravioleta.	27
Figura. 10 Cultivo de <i>P. flourescens</i> en el medio Agar de Triptona (TY) (izquierda), a la derecha se muestra la caja de petri bajo luz ultravioleta. ¡Error! Marcador no definido.	
Figura. 11 Microscopio electronico mostrando la colonizacion por parte de <i>P. flourescens</i> en hifas del patógeno <i>F. oxysporum</i> después de 72 horas	28
Figura. 12 Inhibicion del crecimiento de <i>Fol</i> por <i>Pseudomonas flourescens</i> . Figura. 11 Microscopio electronico mostrando la colonizacion por parte de <i>P. flourescens</i> en hifas del patógeno <i>F. oxysporum</i> después de 72 horas	28
Figura. 12 Inhibicion del crecimiento de <i>Fol</i> por <i>Pseudomonas flourescens</i>	28
Figura. 13 Cultivo combinando ambos microrganismos Fo47 y Pf-5	33

Figura. 14 Cultivo combinando ambos microrganismo en donde se aprecia la presencia de Fo47 y Pf-5	
Figura. 13 Cultivo combinando ambos microrganismos Fo47 y Pf-5	33
Figura. 14 Cultivo combinando ambos microrganismo en donde se aprecia la presencia de Fo47 y Pf-5	33
Figura. 14 Cultivo combinando ambos microrganismo en donde se aprecia la presencia de Fo47 y Pf-5	33
Figura 15. Cajas de Petri conteniendo los ensayos de compuestos volátiles	35
Figura 15. Cajas de Petri conteniendo los ensayos de compuestos volátiles	35
Figura. 17. Tinción de Gram de Pf-5 100X	37
Figura. 18. Microorganismos en caldo de cultivo después de ser incubados	
Figura. 17. Tinción de Gram de Pf-5 100X	37
Figura. 18. Microorganismos en caldo de cultivo después de ser incubados	38
Figura. 19. Caja de petri mostrando el crecimiento de la combinación de Fo47 y Pf-5	
Figura. 18. Microorganismos en caldo de cultivo después de ser incubados.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura. 19. Caja de petri mostrando el crecimiento de la combinación de Fo47 y Pf-5	38
Figura. 20. Proceso de formulación A. Cultivos de Fo47 y Pf-5, e ingredientes para la formulación B.	
Masa pasando por un rodillo para pasta. C. Masa de 1 mm de grosor dejándose secar, D. Moliendo la masa hasta obtener gránulos.	
Figura. 19. Caja de petri mostrando el crecimiento de la combinación de Fo47 y Pf-5	¡Error! Marcador no definido.
Figura. 20. Proceso de formulación A. Cultivos de Fo47 y Pf-5, e ingredientes para la formulación B.	
Masa pasando por un rodillo para pasta. C. Masa de 1 mm de grosor dejándose secar, D. Moliendo la masa hasta obtener gránulos.	39
Figura. 20. Proceso de formulación A. Cultivos de Fo47 y Pf-5, e ingredientes para la formulación B.	
Masa pasando por un rodillo para pasta. C. Masa de 1 mm de grosor dejándose secar, D. Moliendo la masa hasta obtener gránulos.	39
Fig. 21. Agregando los micorganismos de biocontrol a la Formulación B	40
Figura.22. Vasos de precipitado con semillas de tomate siendo inoculadas por 30 minutos con 20 mililitros de cada tratamiento.	
Fig. 21. Agregando los micorganismos de biocontrol a la Formulación B	¡Error! Marcador no definido.
Figura.22. Vasos de precipitado con semillas de tomate siendo inoculadas por 30 minutos con 20 mililitros de cada tratamiento.	42
Figura. 23 semillas de cada tratamiento fueron colocadas en cada caja de Petri con papel de filtro y 3 mililitros de agua esterilizada.	
Figura.22. Vasos de precipitado con semillas de tomate siendo inoculadas por 30 minutos con 20 mililitros de cada tratamiento.	¡Error! Marcador no definido.
Figura. 23 semillas de cada tratamiento fueron colocadas en cada caja de Petri con papel de filtro y 3 mililitros de agua esterilizada.	43
Figura. 24. Plántulas de Tomate en el laboratorio al ser desprendidas de las charolas	
Figura. 23 semillas de cada tratamiento fueron colocadas en cada caja de Petri con papel de filtro y 3 mililitros de agua esterilizada.	¡Error! Marcador no definido.
Figura. 24. Plántulas de Tomate en el laboratorio al ser desprendidas de las charolas	43
Figura 25. Plántulas de Tomate después de ser lavadas	
Figura. 24. Plántulas de Tomate en el laboratorio al ser desprendidas de las charolas	¡Error! Marcador no definido.
Figura 25. Plántulas de Tomate después de ser lavadas.....	45
Figura. 26. Aplicación de los tratamientos por medio del método de inmersión de raíz	
Figura 25. Plántulas de Tomate después de ser lavadas	¡Error! Marcador no definido.
Figura. 26. Aplicación de los tratamientos por medio del método de inmersión de raíz	45
Figura. 27. Plántulas, ya tratadas y trasplantadas a macetas cónicas	
Figura. 26. Aplicación de los tratamientos por medio del método de inmersión de raíz.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura. 27. Plántulas, ya tratadas y trasplantadas a macetas cónicas	46
Figura. 28. Invernadero utilizado para los estudios en planta	
Figura. 27. Plántulas, ya tratadas y trasplantadas a macetas cónicas.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura. 28. Invernadero utilizado para los estudios en planta	47
Figura 29. Plantas de Tomate el día 0 de la aplicación de los tratamientos	
Figura. 28. Invernadero utilizado para los estudios en planta	¡Error! Marcador no definido.

Figura 29. Plantas de Tomate el día 0 de la aplicación de los tratamientos	49
Figura. 31. Aplicación de los tratamientos en el sustrato.Figura 29. Plantas de Tomate el día 0 de la aplicación de los tratamientos.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura. 31. Aplicación de los tratamientos en el sustrato.	50
Figura. 30. Tratamientos del 1-10 excepto 2 (Fol), el cual fue aplicado 10 días despuésFigura. 31. Aplicación de los tratamientos en el sustrato.....	50
Figura. 30. Tratamientos del 1-10 excepto 2 (Fol), el cual fue aplicado 10 días después	49
Figura 33. Estadios Fenológicos de las plantas al paso del tiempo.Figura. 30. Tratamientos del 1-10 excepto 2 (Fol), el cual fue aplicado 10 días después	¡Error! Marcador no definido.
Figura 33. Estadios Fenológicos de las plantas al paso del tiempo.	51
Figura 33. Estadios Fenológicos de las plantas al paso del tiempo.	¡Error! Marcador no definido.
Figura. 34. Peso fresco de los frutos	53
Figura 35. Peso seco de la planta completaFigura. 34. Peso fresco de los frutos.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 35. Peso seco de la planta completa.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura. 36. Bascula conteniendo 10 g de sustrato obtenido de una de las macetas de las plantas de Tomate que serán mezclados en 90 ml de DI H2O en una bolsa "stomacherFigura 35. Peso seco de la planta completa	¡Error! Marcador no definido.
Figura. 36. Bascula conteniendo 10 g de sustrato obtenido de una de las macetas de las plantas de Tomate que serán mezclados en 90 ml de DI H2O en una bolsa "stomacher	54

INTRODUCCIÓN

El tomate cultivado (*Solanum lycopersicum*) es considerado como una de las hortalizas de mayor importancia en muchos países del mundo, ocupando el segundo lugar en importancia entre las hortalizas mundialmente, debido a su nivel de producción. Los principales países productores son: Estados Unidos, Canadá, Grecia, Italia, México, Turquía, Egipto, India y España (Jiménez, 2003).

En México, está considerado como la segunda especie hortícola más importante, debido a la superficie sembrada, (SAGARPA, 2005), sembrándose alrededor de 81,000 hectáreas donde se obtienen cerca de 2 millones de toneladas, siendo los principales estados productores: Sinaloa, Baja California, San Luis Potosí, Sonora, Nayarit, Morelos y Michoacán (Jiménez, 2003).

La marchitez vascular de tomate producida por el patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Snyder y Hansen) es la principal enfermedad que causa problemas en el cultivo de tomate, disminuyendo el rendimiento en un 60% y afectando la calidad del producto. Esta enfermedad, la cual se ha reportado en por lo menos 32 países (Jones, 1991), prospera en una diversidad de condiciones ambientales desde trópicos secos hasta climas templados (Cai., 2003).

La presión de selección ejercida por el hombre a través de la diversidad en el uso de este cultivo, los diferentes tipos de clima y la presión de los patógenos han originado la gran variabilidad genética existente en el género *Lycopersicon* y sus parientes silvestres (Agris, 1991). En México no se tienen reportes sobre trabajos de búsqueda de fuentes de resistencia a la marchitez vascular.

En la actualidad existen muy pocos productos tanto químicos como biológicos que reduzcan significativamente la enfermedad. Como reporto Tramier y Bettacchini (1974), Leski (1977) y Gullino (1986). Debido a esto, los agricultores hacen múltiples aplicaciones químicas en ocasiones sin un control adecuado sobre el número y momento de las aplicaciones, concentración e ingrediente activo, entre otros; lo que frecuentemente da lugar a mayores costos de producción y contaminación ambiental.

Se reporta que el daño por uso desmedido de pesticidas afecta mundialmente las siguientes áreas: Resistencia genética, Alteraciones en el ecosistema, Provocar la aparición de nuevas plagas, Acumulación en la cadena trófica, Movilidad en el ambiente, Riesgos para la salud humana (Hernández, et al., 2007).

El control biológico ofrece nuevas alternativas para combatir este y muchos patógenos del suelo (Spadaro, Guillino, 2005). Actualmente las nuevas investigaciones se están enfocando a la aplicación de microorganismos como control biológico, ya que se descubrió la producción de metabolitos secundarios como lo son los sideróforos, antibióticos, compuestos volátiles, enzimas y fitohormonas (Gupta, 2001).

Se ha reportado previamente el éxito en los resultados al utilizar un método de control biológico en contra de las enfermedades por *Fusarium* de varios cultivos. La cepa de *Fusarium oxysporum* no patogénica Fo47, controla los marchitamientos por *Fusarium* en clavel, tomate, melón, sandía, plátano, espárrago y linaza (Lemanceau, 1992. Alabouvette, 1993. Blok, 1997. Duijff, 1999).

Por su parte la bacteria *Pseudomonas fluorescens* controla varias enfermedades de la raíz, y también es efectiva contra enfermedades como mal del pie del trigo (*Gaeumannomyces graminis*), pie negro del tabaco (*Thielaviopsis basicola*), damping-off en betabel (*Pythium ultimum*), inhibe el crecimiento de pudriciones blandas por bacterias y nematodos, tiene propiedades antivirales, e induce el crecimiento y vigor en las plantas (Showkat, 2012).

Aislamientos de *Fusarium oxysporum* no patogénico y *Pseudomonas fluorescens* son frecuentemente asociadas a la supresión de marchitamientos de *Fusarium*. Estudios preliminares de campo en plántulas mostraron una supresión de la enfermedad de 50-80% (Larkin, 1998).

La compañía Gowan, tiene más de 50 años de haberse fundado, con base en Yuma, Arizona, Estados Unidos es una empresa familiar que se encuentra establecida en el mercado internacional ofreciendo productos como fungicidas, insecticidas, herbicidas y miticidas. Cuenta con 55 productos, dos laboratorios de formulaciones, y uno de investigación y tamizaje de productos nuevos.

En los últimos años se ha registrado un crecimiento de la empresa, llegando a países tales como India, China, Sudáfrica, España, Inglaterra, y varios países de América del Sur.

Gowan tiene un enfoque a productos pesticidas químicos, contando con solo un producto insecticida a base de extractos de planta, Aza Direct (extracto de Neem, azadiractina) (Gowan, 2014).

En la empresa existen directores que pueden cuestionar si es viable o no el uso de productos de control biológico, esto debido a algunas inconsistencias en los resultados de inhibición de los patógenos, además los agricultores, muchas veces al no tener acceso a la información de los beneficios que trae el utilizar estas alternativas “verdes”, también llegan a poner en duda su efectividad.

La compañía Gowan necesita invertir en la investigación y manufacturación de productos más ecológicos, ya que es la tendencia que se está demostrando en empresas de mayor impacto, como lo son Syngenta, Bayer, etc. Se debe de percibir a Gowan como una empresa mediana, innovativa, futurista y abierta a alternativas de productos “verdes”.

Para lograr llegar a cumplir estos objetivos, se requiere un trabajo conjunto de directores, supervisores, e investigadores y empezar a producir, en este caso, un producto para combatir las enfermedades por marchitamiento de *Fusarium*, a base de un microorganismo o mezcla de microorganismos (*Fusarium oxysporum* no patogénico y *Pseudomonas fluorescense*).

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El hongo Fitopatógeno *Fusarium oxysporum*, causante de las enfermedades llamadas “marchites por Fusarium” afecta una gran cantidad de cultivares en todo el mundo disminuyendo hasta un 60% y afectando la calidad del producto (Jones, 1991).

Específicamente hablando de marchitamientos o fusariosis en el cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum*) causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol), es uno de los problemas fitosanitarios limitantes de la producción del cultivo de tomate a nivel mundial y nacional, tiene mayor incidencia en regiones de clima cálido, ocasionando grandes pérdidas económicas.

Los síntomas inician con un amarillamiento en las hojas más viejas, extendiéndose a toda la planta y ocasionando una clorosis que a veces se presenta en las hojas de un sólo lado de la planta, y en ocasiones sólo en la mitad de éstas (Cárdenas, 2000). Las hojas afectadas se marchitan y mueren, aunque pueden permanecer adheridas al tallo. Se observa una necrosis vascular de color café en forma de anillo, la cual se extiende hacia la parte apical de la planta de acuerdo con la severidad de la enfermedad, marchitando y matando a las plántulas o plantas adultas (Sánchez, 1998).

El control de esta enfermedad puede manejarse de manera química, o biológica, utilizando fungicidas como benomyl, carbendazim, prochloraz, fludioxonil, bromuconazole y azoxystrobin para el control químico y se recomienda para el control biológico el uso de microorganismos antagonistas tales como *Bacillus spp.* *Pseudomonas spp.* *Brevibacillus*, *Fusarium oxysporum* no patogénico, etc.

La compañía Gowan LLC, fundada en 1965, basa sus ventas principalmente en ofrecer productos pesticidas (herbicidas, fungicidas, bactericidas e insecticidas) de carácter químico. Con las recientes regulaciones y una creciente concientización en el medio ambiente, se presenta un cambio en el mercado de las empresas de pesticidas quienes han comenzado a invertir en la creación de productos de control biológico

Actualmente existe una necesidad en la compañía Gowan LLC de un producto efectivo de control biológico que disminuya los daños causados por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, por tal razón es necesario la formulación de un producto a

base de los microorganismos antagonistas *Fusarium oxysporum* no patogénico y *Pseudomonas fluorescens*.

¿Qué efecto de inhibición tendrá la formulación de un producto a base de *Fusarium oxysporum* no patogénico y *Pseudomonas fluorescens* contra la enfermedad de marchitamiento por *Fusarium* de Tomate?

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Formular un fungicida biológico a base de *Fusarium oxysporum* no patogénico y *Pseudomonas flourescens* para combatir la enfermedad de causada por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*.

2.2. Objetivos Específicos

- Evaluar *in-vitro* el porcentaje de inhibición del patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* obtenido por ambos microorganismos (*Fusarium oxysporum* no patogénico y *Pseudomonas flourescens*).
- Evaluar distintos medios de cultivo para la formulación del producto.
- Determinar la estabilidad de la mezcla a de microorganismos a diferentes concentraciones de ambos.
- Evaluar en plantas en invernadero, el producto ya formulado con ambos microorganismos para determinar su eficacia.

3. JUSTIFICACIÓN

El cultivo de tomate es indiscutiblemente uno de los cultivos con mayor importancia mundialmente, y todo lo que se relacione a sus prácticas culturales, hasta obtener el fruto maduro de buena calidad es indispensable para asegurar su establecimiento en el mercado.

Los síntomas que causa el hongo *F. oxysporum* en el fruto son pústulas de esporas de color blanco y rupturas en el fruto, haciendo muy difícil su comercialización.

Existen muy pocos productos para tratar esta enfermedad, siendo estos los de control químico del grupo de los benzimidazoles y debido a su bajo nivel de control se deben de hacer varias aplicaciones, produciendo grandes gastos económicos y daños al medio ambiente ya que cuando se degrada en los suelos, deja residuos tóxicos muy dañinos para humanos (Juraske, Sanjuán, 2011) .

Gupta y Dikshit, (2010) reportaron que algunos de los beneficios de utilizar biopesticidas son los mínimos residuos y la mayoría son biodegradables, poseen un manejo muy fácil para su aplicación, son menos dañinos a la fauna benéfica, son más específicos a su hospedero, y en general son de manejo preventivo a enfermedades. Además, la formulación de los productos a base de microorganismos, contienen medios a base de varios materiales orgánicos como caldos de cultivo, desperdicios, etc., los cuales apoyan la estabilidad y sustentabilidad de los suelos agrícolas (Soesanto, 2014)

Los costos de registro de un nuevo biopesticida en EPA (Environmental Protection Agency), es aproximadamente una cuarta parte de lo que se invierte para registrar un producto químico, a su vez, se requieren una cantidad mucho mayor de diversas pruebas de toxicidad para humanos y otras especies (EPA, 2014).

4. MARCO TEORICO

4.1. Marchitez por *Fusarium* en Tomate (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*)

Las enfermedades inducidas por patógenos del suelo son unas de las más difíciles de controlar. Este es el caso de los marchitamientos por *Fusarium*, causado por *Fusarium oxysporum*, el cual es un hongo cosmopolita que existe en muchas formas patogénicas, parasitando más de 100 especies de plantas Gimnospermas y Angiospermas, gracias a los diversos mecanismos que tiene el hongo para vencer las defensas de muchas plantas (Bosland, 1988).

El cultivo de Tomate es parasitado por un gran número de patógenos, principalmente por la llamada marchitez vascular producida por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) (Snyder y Hansen, 2003) es la principal enfermedad que causa problemas en el cultivo de tomate, disminuye en un 60% el rendimiento y afecta la calidad del producto. Esta enfermedad, la cual se ha reportado en por lo menos 32 países (Jones et al., 1991), prospera en una diversidad de condiciones ambientales desde trópicos secos hasta climas templados (Cai et al., 2003).

Se han reportado tres razas del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, que se distinguen por su virulencia en materiales diferenciales de tomate que contienen diferentes genes de resistencia (Cai et al., 2003). La raza 1 se describió inicialmente en 1886 y la raza 2 se reportó primero en 1945 en Ohio. La raza 3 se observó en Australia, Brasil, Gran Bretaña, Israel, Marruecos, Holanda, Iraq y México, en 1978 y posteriormente en varios estados americanos: California, Florida, Georgia, Arkansas y Carolina del Norte y Tennessee (Snyder, 2003).

El micelio del hongo (Fol) son delicados de color blanco a rosado, con un tinte purpura (Figura 1), y pueden presentarse escasas o abundantes. El hongo produce tres tipos de esporas: microconidias (Figura 2), macroconidias (Figura 3) y clamidosporas (Figura 4).

Las microconidias nacen de simple fiálides, elevándose lateralmente y son abundantes, con forma oval-elipsoidal, derechas o curvadas, (5-12 x 2.2-3.5 µm). Las macroconidias pueden ser escasas o abundantes, nacen en conidiosporas ramificadas o en la superficie

de esporangias y poseen una pared delgada con tres a cinco septas, las cuales miden 27- 46 x 3-5 μm y 35-60 x 3-5 μm respectivamente, con ambos extremos puntiagudos y una base pedicelada. Las clamidosporas, pueden tener pared lisa o rugosa, son abundantes, usualmente se encuentran separadas, pero ocasionalmente se puede observar en pares o formando una cadena, pueden sobrevivir por más de 20 años, en condiciones favorables y en el suelo como saprófito, (Wong, 2003).

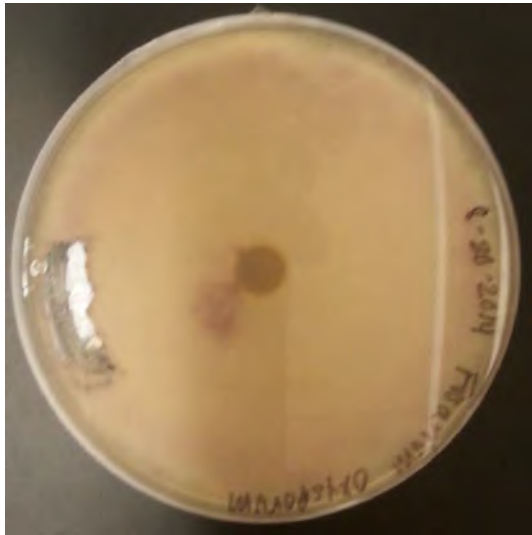


Figura 1. Caja de petri mostrando al hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.
Fuente: Rios, 2014

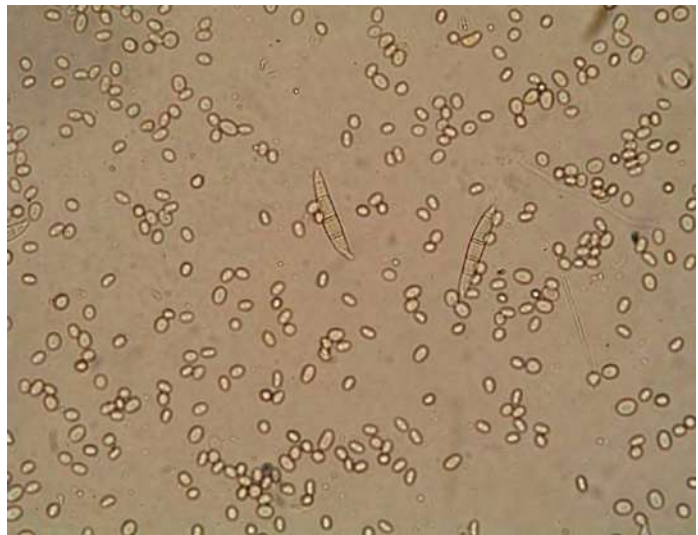


Figura 2. Microconidias de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.
Fuente:
http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/s



Figura 3. Macroconidias de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Fuente: McGinnis, 2000



Figura 4. Clamidosporas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Fuente: Rahman, 2013

Es un hongo de temperatura cálidas el desarrollo óptimo se presenta a 20 °C, el rango va de 12 a 28°C. Esta temperatura acompañada de alta humedad relativa, días cortos de baja intensidad lumínica favorecen el desarrollo de la enfermedad. Otros factores son los suelos ácidos, arenosos, con bajo pH, pobres en nitrógeno y alto suministro de potasio (González, 2006). Una vez que el patógeno se establece, sobrevive en el campo por varios años, afectando las producciones futuras de los cultivos.

La enfermedad se inicia con el crecimiento de las hifas o con la germinación de las clamidiosporas en latencia, presentes en los tejidos muertos del hospedante y estimuladas por los exudados secretados por las raíces de las plantas recién sembradas. Las hifas del hongo penetran directamente la epidermis de las raíces, pasan a la corteza y a la endodermis y entran a los vasos del xilema, las hifas pueden penetrar también, a través de heridas hechas en forma mecánica o por nematodos, insectos o miriódodos. Sin embargo, la penetración directa a través de las raíces es el método más común de entrada del patógeno (Figura 5). El hongo una vez dentro de la planta se mueve hacia el tejido vascular por colonización intercelular de los vasos del xilema y los invade cuando están maduros o si la penetración es por herida se sitúa en ellos. El patógeno coloniza los vasos del xilema por crecimiento del micelio o por medio del transporte pasivo de las microconidias producidas en dichos vasos, lo cual ocasiona una colonización rápida y discontinua.



Figura 5. Raíz de Tomate con partículas de suelo adjuntas colonizadas por hifas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.
Fuente: Sociedad Americana de Microbiología, 2006.

La colonización inicial está restringida a los tejidos vasculares y cuando el hospedante está muy afectado, ocurre la infección a los tejidos adyacentes.

La colonización del tallo es unilateral debido a que la diseminación lateral y radial del hongo parece inhibida por las paredes celulares y otras barreras laterales (Figura 6). Eventualmente resultando en mortandad (Pinto, 2012, Abeysinghe, 2006).

4.2. Control de la enfermedad

4.2.1. Variedades Resistentes

Una de las medidas de control más eficiente es el uso de cultivares resistentes. Casi todas las variedades disponibles en la actualidad son resistentes a la raza 1, la mayoría son resistentes a la raza 1 y 2, y muy pocas a la raza 3.

4.2.2. Control químico

Desinfectar el suelo de semillero o campo definitivo de siembra con metan sodio, cloropicrina, bromuro de metilo o metil isotiocianato. También se



Figura 6. *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* invade la planta de tomate por medio de la raíz y causa el marchitamiento. Las hojas cambian a un color amarillo (izquierda) y si se corta el tallo (derecha) se puede observar que el xilema se ha puesto café por la infección.

pueden emplear fungicidas a base de tcmtb (2- (Tiocianometiltio) benzotiazol), benomyl,

carbendazim, procloraz, entre otros. Pueden ser aplicados al suelo o a través del sistema de riego (Pinto, 2012).

Actualmente no existen fungicidas químicos efectivos para esta enfermedad, debido a la gran dificultad que existe para controlar esta enfermedad se ha llevado a la búsqueda de control de tipo biológico (Borrero, 2004).

4.2.3. Control Biológico

Los biopesticidas o pesticidas biológicos se enfocan en microorganismos patógenos específicos a una enfermedad y ofrecen una solución ecológica. Los productos biológicos pueden proveer a bajo costo un alto nivel de protección al cultivo, especialmente en sistemas de producción donde el uso inadecuado de químicos ha creado resistencia en las plagas, donde los pesticidas son regulados por el daño que causan al humano, en la producción orgánica de cultivos y donde la reducción del uso de químicos es necesaria para evitar efectos secundarios como la contaminación de aguas superficiales y alteración del hábitat de la flora y fauna existente en ambientes sensibles (Mora, 2001).

El interés en los biopesticidas se basa en las siguientes ventajas: (i) inherentemente menos dañinos hacia medio ambiente, (ii) están diseñados para afectar sólo una plaga específica o, en algunos casos, a solo unos organismos, (iii) a menudo son eficaces en cantidades muy pequeñas y con frecuencia se descomponen rápidamente, lo que resulta en exposiciones más bajas y evita los problemas de contaminación, (iv) contribuyen favorablemente cuando se utilizan como un componente en los programas de manejo integrado de plagas (Kamilova, 2008).

Un sistema exitoso de control biológico incluye microorganismos antagonistas naturales que son capaces de reducir la actividad de patógenos de plantas. Estos antagonistas compiten con los patógenos por nutrientes, inhiben el crecimiento del mismo por medio de la secreción de antibióticos, o reducen su población por medio de parasitismo. Además, algunos microorganismos antagonistas inducen resistencia a las plantas hospedadoras, lo cual mejora la habilidad de defenderse por sí misma del ataque del patógeno (Shishido, 2005).

Algunos de los microorganismos de control biológico que generalmente se utilizan incluyen los de los géneros *Bacillus*, *Trichoderma*, y *Pseudomonas*.

En este estudio se dará un enfoque a los microorganismos antagonistas *Fusarium oxysporum* no patogénico Fo47 y *Pseudomonas fluorescens* Pf-5.

4.2.4. *Fusarium oxysporum* no patogénico Fo47

Fusarium oxysporum se encuentra comúnmente en suelos, en donde sobrevive en estado de propágulos inactivos (clamidiosporas) y crece saprófitamente en materia orgánica (Olivain, 2004).

Al igual que Fo1, *Fusarium oxysporum* Fo47 comparten la misma morfología, pero se diferencian en la patogenicidad hacia su hospedero.

Varios autores han demostrado previamente éxito en el uso de la cepa *Fusarium oxysporum* Fo47 para controlar pudrición de clavel (Lemanceau, 1992), tomate, melón (Alabouvette, 1993), esparrago (Blok, 1997) y linaza (Duijff, 1999).

Blok, (1997) realizó estudios sobre la inhibición de *Fusarium oxysporum* f. sp. asparagi, cuando se inoculaba la cepa no patogénica de NP, presentando una reducción del 48% en la germinación de clamidiosporas. A su vez presento una evaluación en el tamaño de la raíz al inocular las plantas de esparrago con la misma cepa (Figura 7).

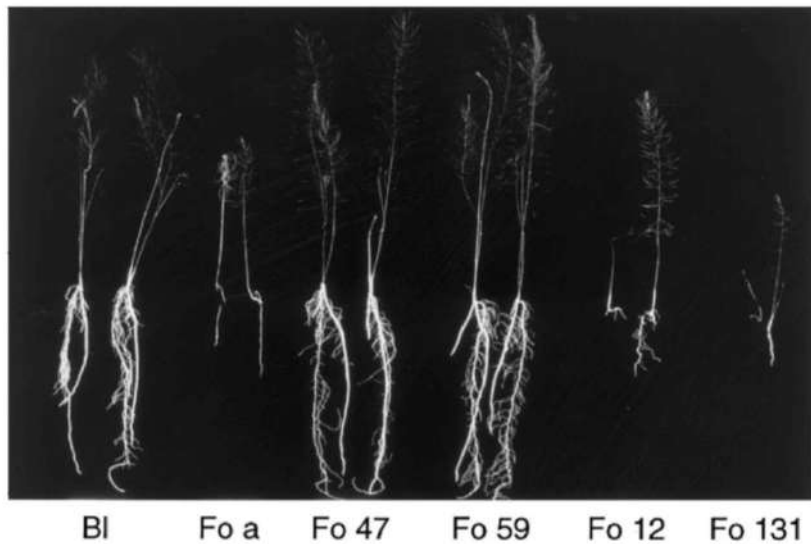
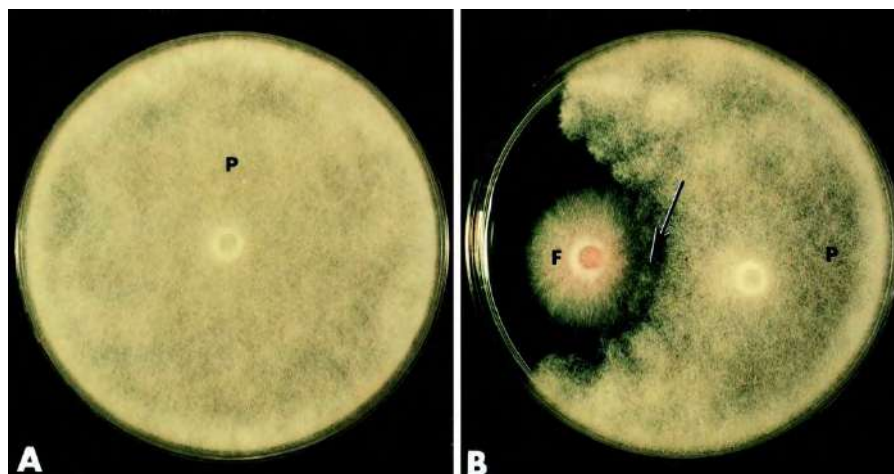


Figura 7. Sistema radicular de plantas de Esparrago en suelos esterilizados co-inoculados con *Fusarium oxysporum* y diferentes cepas de *Fusarium oxysporum* no patogénico. BI: Sin inocular, Foa: Inoculada con el patógeno, NP, Fo59, Fo12, Fo131: co-inoculada con el patógeno y distintas cepas de *F. oxysporum* no patogénico

Benhamou, (2005), reportó inhibición del patógeno *Pythium ultimum*, una enfermedad muy importante en pepino, cuando está en presencia de NP (Figura 8).



Se han Figura 8. Interacción *in vitro* entre Fo47 y *P. ultimum* dos días después de la inoculación del hongo en Agar de Papa. A) *P. ultimum* B) crecimiento en presencia de Fo47. Fuente: Benhamou, 2005.

principalmente los siguientes mecanismos de acción de Fo47 para la supresión de Fol, los cuales son la competencia por nutrientes, competencia por sitios de infección, colonización de la raíz y más recientemente induce resistencia en la planta por medio de estimulación rápida de respuestas de defensa no específicas, incluyendo barreras estructurales, y proteínas relacionadas con la patogénesis como quitinasa y -1,3-glucanases (Benhamou, 2001, 2002).

Alabouvette, (1990), menciona que la eficacia de la cepa Fo47 en controlar la pudrición por *Fusarium*, está relacionada a su habilidad para competir por Carbono.

4.2.5. *Pseudomonas fluorescens* Pf-5

Pseudomonas fluorescens es una bacteria Gran-negativa con forma de bastón. Pertenece al grupo del género *Pseudomonas*; análisis de rRNA 16s establece a *P. fluorescens* en el género de *Pseudomonas fluorescens*, de donde obtiene su nombre.

P. fluorescens tiene múltiples flagelos (Figura 9), y un metabolismo extremadamente versátil. Puede ser encontrada en suelos y agua, es un aerobio obligado, pero algunas cepas son capaces de utilizar nitratos en lugar de oxígeno como aceptor final de electrones durante la respiración celular.



Figura 9. *P. fluorescens* en microscopio electrónico. Fuente: <http://microbiologyglossary.wikispaces.com/Pseudomonas+fluorescens>.

representadas por el grupo de PGPR pueden promover el crecimiento de las plantas y pueden inhibir patógenos por medio de múltiples mecanismos. Su aplicación como agente de biocontrol ha llamado la atención por la producción de metabolitos secundarios como sideróforos, antibióticos, compuestos volátiles, enzimas, fitohormonas, 2, 4-diacetylphloroglucinol (DAPG), phenazine (Phz), pyrrolnitrin, oomycin A, viscosinamide, pyoluteorin e hydrogen cyanide (HCN). (Gupta, 2001).

Cuando se hace la prueba de oxidasa, el resultado es positivo, también es una bacteria no sacarolítica (Palleroni, 1984)

Existen más de 230 especies descritas en el género *Pseudomonas*. Aproximadamente 50 especies están divididas entre cinco mayores subgrupos del cual el grupo *fluorescens* es el más grande (24 especies). Debido a que existen muchas cepas dentro de este grupo que se difieren solamente en propiedades bioquímicas menores, estas se dividieron en biovares. Por ejemplo *P. fluorescens* contiene 5 biovares (Figura 10).

Las bacterias *Pseudomonas fluorescens*

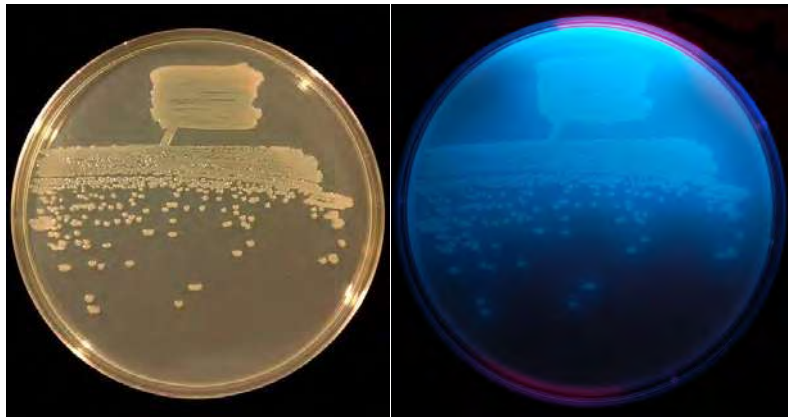


Figura 10. Cultivo de *P. fluorescens* en el medio Agar de Triptona (TY) (izquierda), a la derecha se muestra la caja de petri bajo luz ultravioleta. Fuente: Ninjatacoshell, 2010.

Estas bacterias se han estudiado intensamente ya que son responsables de la supresión de varias enfermedades del suelo como *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, (Weller, 2002), *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Tamietti, 1993), *Thielaviopsis basicola* (Stutz, 1986), *Pythium ultimum* (Fenton, 1992). Además de su actividad anti hongos, también poseen propiedades antivirales (Tada, 1990) y pueden inhibir el crecimiento de bacterias causantes de la pudrición blanda y nematodos en papa (Cronin, 1997).

Kamilova, (2008) realizó unos estudios sobre la inhibición de esporas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en exudados de raíces de tomate utilizando la bacteria *P. fluorescens* WC365 como metodo de control biologico. Se concluyó que la presencia de la bacteria reduce el número de germinación de microconidas de Fol en un 68-75%,



Figura 12. Inhibición del crecimiento de Fol por *Pseudomonas fluorescens*. Fuente: Showcat, 2012

explicando que cuando se co-inocularon las raices de las plantas

pequeñas se observó que después de 3 semanas *P.*

fluorescens WC365 es la bacteria dominante en el desarrollo radicular, en donde representó un 90% de la microflora al cultivarse (Figura 11)

Showcat, (2012), realizó estudios in vitro con *Pseudomonas fluorescens* contra *Fusarium oxysporum* y encontró que existe un halo de inhibición cuando se aplican co-inoculados en cajas de Petri. (Figura 12)

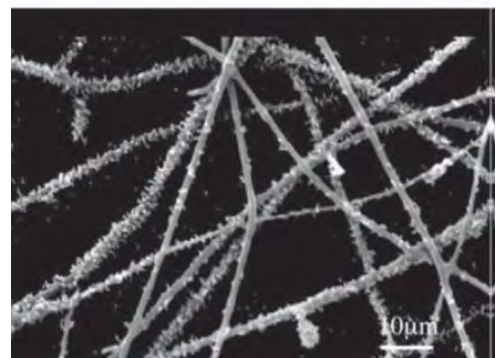
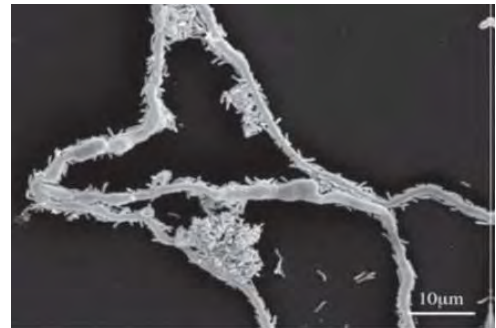


Figura 11. Microscopio electronico mostrando la colonizacion por parte de *P. fluorescens* en hifas del patógeno *F. oxysporum* después de 72 horas

5. HIPOTESIS

El producto obtenido con base en *Fusarium oxysporum* no patogénico Fo47 y *Pseudomonas flourescens* Pf-5, controlará efectivamente la infección causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopercisi* en el cultivo de tomate.

6. METODOLOGIA

6.1. Selección de cepas

En este trabajo se utilizaron cepas que presentan mayor inhibición hacia Fol y fueron las siguientes, *Fusarium oxysporum* Fo47 y *Pseudomonas flourescens* Pf-5

Los microorganismos utilizados fueron obtenidos de un banco de organismos llamado ATCC, localizado en Virginia, Estados Unidos.

El patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* tiene un número asignado en ATCC de 34298, el cual fue aislado de una planta de tomate en California, Estados Unidos,

Fusarium oxysporum NP tiene un numero asignado ATCC Mya-1198 y fue aislado del suelo en Chateaurenard, Francia.

Pseudomonas flourescens Pf-5 tiene un número asignado ATCC BAA-477 y fue aislada de la superficie de raíces de Algodón.

6.2. Medios de cultivo y Materiales a utilizar

- Agar Dextrosa de Papa (PDA) de la compañía Neogen Corporation (Lansing, Michigan, Estados Unidos)

Composición	Formula/Litro
Infusión de Papa de 200 g.....	4 g*
Dextrosa.....	20 g
Agar.....	15 g

*4.0 g de extracto de papa es equivalente a 200 g de infusión de papas.

pH final: 5.6 ± 0.2 at 25°C.

- King's B Agar / Pseudomonas Agar, Sigma-Aldrich (Saint Louis, Minnesota, Estados Unidos).

Composición	Gramos/Litro
Peptona combinada.....	20.0
Fosfato de hidrogeno di potásico.....	1.5

Sulfato de magnesio.....1.5
 Agar.....10.0

pH Final 7.2 +/- 0.2 (at 25°C)

- Caldo de nutrientes de la compañía Neogen Corporation (Lansing, Michigan, Estados Unidos)

Composición Formula / Litro

Digestión enzimática de gelatina.....5 g

Extracto de carne.....3 g

pH final: 6.8 ± 0.2 at 25°C

- Medio Komada

Primera parte:

Agua destilada..... 1 L

Na₂B₄O₇ • 10 H₂O..... 1 g

K₂HPO₄..... 1 g

KCl..... 0.5 g

MgSO₄ • 7 H₂O..... 0.5 g

Fe-Na-EDTA.....0.01 g

D-galactose..... 20 g

L-asparagine..... 2 g

Agar.....15 g

PCNB (Terraclor 75 % WP) (pentacloronitrobenzene)..... 1.0 g

Segunda Parte:

Oxgall (Bilis bovina)..... 0.5 g

Sulfato de Estreptomicina..... 0.3 g

Para la purificación y concentración de los microorganismos se utilizó una centrifuga de la marca Thermo Fisher Scientific™.

Un baño a vapor con movimiento para 5 litros Thermo Fisher Scientific™.

Incubadora Thermo Fisher Scientific™.

Pipetas automáticas

Cristalería para laboratorio (vasos de precipitado, botellas, tubos de ensayo)

Asa de inoculación

Sacabocados de 5 milímetros

6.3. Evaluación de los agentes antagonistas por cultivo dual

Se preparó el medio PDA acorde a las instrucciones del fabricante, se esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 minutos, se dejó enfriar hasta 50 °C y se aplicaron 15 ml del medio en cajas de Petri esterilizadas; una vez sólido el medio, se inoculó con *F. oxysporum* NP cortando 5 mm de una caja de Petri previamente inoculada con el hongo y se incubó a 25°C durante 7 días.

Se preparó el medio King's B para *P. flourescens* Pf-5, acorde a las instrucciones, se esteriliza en autoclave a 121 °C por 15 minutos, se deja enfriar hasta 50 °C y se aplican 15 ml del medio en cajas de Petri esterilizadas; una vez sólido el medio, fue inoculada la masa de bacteria con un haza de fierro previamente esterilizada para obtener colonias individuales. Se incubó a 27°C durante 48 horas.

Una vez obtenido el inóculo de ambos antagonistas, con el objetivo de comprobar el efecto antagonista de ambos microorganismos, se preparó una caja de Petri con Agar PDA conteniendo 5 mm del hongo patógeno *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y al lado izquierdo se inoculó con una pieza de 5 mm con *F. oxysporum* Fo47, se incubó a 25°C durante 7 días (Figura 13 y 15).

Se realizó el mismo procedimiento para *P. flourescens* Pf-5, solo que aquí se efectuó la inoculación utilizando un asa de fierro esterilizada, haciendo un patrón lineal de 1 cm al lado derecho de cada unidad; las cajas de Petri se incubaron a 25°C durante 7 días (Figura 14 y 15).

Ambas pruebas consistieron en 3 unidades o repeticiones (cajas de Petri) y el experimento se realizó por duplicado.

6.4. Evaluación de los agentes antagonista combinados

Se llevaron a cabo evaluaciones de los agentes de control combinados, con el objetivo de comprobar que ambos microorganismos sobrevivirían al estar combinados en un mismo cultivo; para este procedimiento se inocularon 4 matraces previamente esterilizados y se le agregaron 50 ml de caldo de crecimiento de papa y dextrosa, y se inoculó con una pieza de 5 mm del hongo NP, se depositó en una incubadora de agua con movimiento por 6 días a 24°C y 100 rpm; para Pf-5 se utilizó el medio caldo de nutrientes y se inoculó con una colonia de la bacteria, se depositó en una incubadora de agua con movimiento por 2 días a 27°C y 100 rpm, se obtuvo un pH final de 4.3.

Se tomaron ambos cultivos por separado y se obtuvo un pH de 8.9 para la bacteria y

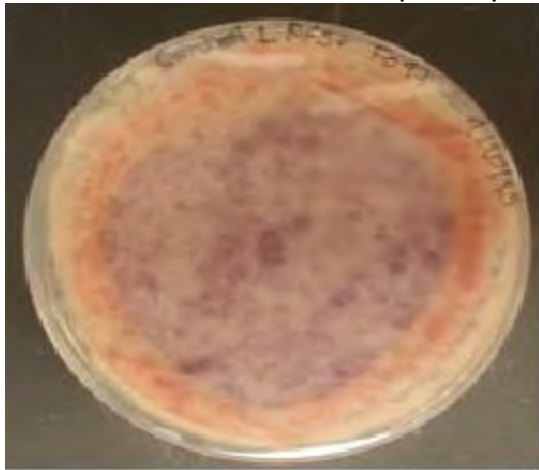


Figura 13. Cultivo combinando ambos microorganismos Fo47 y Pf-5



Figura 14. Cultivo combinando ambos microorganismos en donde se aprecia la presencia de Fo47 y Pf-5

4.03 para el hongo; se mezclaron ambos cultivos durante 30 minutos utilizando un mezclador de magneto hasta obtener un cultivo homogéneo, y se tomó la medida de pH nuevamente, el cual fue de 5.15. (Figuras 13 y 14).

6.4.1. Evaluación de los agentes antagonistas por cultivo dual por siembra en la superficie.

Se decidió a su vez, realizar pruebas de cultivo dual también incluyendo la mezcla de ambos microorganismos contra el patógeno utilizando el tipo de siembra incorporada en

el agar, así como la siembra tradicional. Para este método se siguió el procedimiento de crecimiento anteriormente descrito, pero en lugar de aplicar el cultivo dual de cada lado, primero se inocularon las cajas de Petri conteniendo 15 ml de Agar PDA con 100 microlitros de la mezcla de ambos microorganismos, una vez secos, se inocularon en el centro con un disco de 5 mm de diámetro del patógeno Fol y se incubaron a 24 °C por 5 días.

6.4.2. Evaluación de los agentes antagonistas por cultivo dual por siembra incorporada.

Debido a lo complicado de diferenciar a simple vista el crecimiento de ambos hongos, se decidió realizar otros ensayos de inhibición de crecimiento del patógeno por cultivo dual, pero esta vez el inóculo es sembrado incorporado al agar, es decir, una vez obtenido el cultivo de ambos antagonistas con el método anteriormente descrito, se realizaron diluciones hasta obtener la concentración deseada y se aplicaron 100 micro litros en las cajas de Petri; se esterilizó el medio PDA y se dejó enfriar hasta 47°C, entonces se aplicaron 15 mililitros del agar a cada caja de Petri, realizando movimientos circulares, con la finalidad de mezclar el medio con el inóculo previamente aplicado.

Se incluyeron evaluaciones de compuestos volátiles para los antagonistas contra el patógeno;

Todas las combinaciones se consistieron en 3 unidades o repeticiones (cajas de Petri) y el experimento se realizó por triplicado.

6.4.3. Evaluación de los agentes antagonistas por compuestos volátiles.

Se decidieron realizar más estudios para entender la manera en la que funcionan las cepas antagonistas, la literatura reporta que las bacterias del género *Pseudomonas* producen compuestos volátiles, incluyendo aldehídos, ketonas, alcoholes y compuestos que contienen sulfuro, los cuales pueden llegar a tener efectos de inhibición en el crecimiento de varios patógenos (Hernández-León et al., 2014). (Figura 15).

El procedimiento consistió en inocular cajas de Petri con el patógeno y otras con los antagonistas y tomar la parte de la caja en donde contiene el agar, acomodándolas una frente a otra sin la tapa, y sellándolas con plástico parafilm. Las cajas de Petri fueron

incubadas a 25°C y se midió el crecimiento del patógeno en centímetros a los 4 y 7 días después de la inoculación.

Se consideró como parámetros de evaluación la siguiente ecuación para obtener el

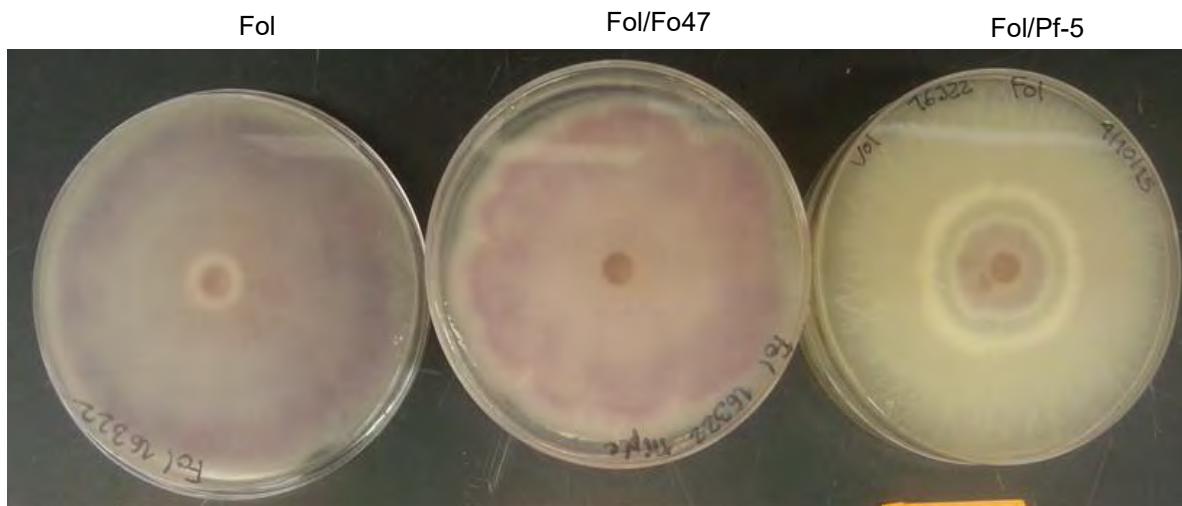


Figura 15. Cajas de Petri conteniendo los ensayos de compuestos volátiles

porcentaje de inhibición en todas las pruebas mencionadas (Miclea, 2010).

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \frac{((CP - CPA) * 100)}{CP}$$

CP = Crecimiento del patógeno (Control)

CPA = Crecimiento del Patógeno en presencia del Antagonista

6.5. Formulación

6.5.1. Pruebas para determinar las concentraciones de los microorganismos antagónicos

Se realizaron pruebas con los microorganismos para determinar las concentraciones más adecuadas, ya que se menciona en la literatura (Mamdouh, 2008) que las concentraciones para una formulación a base de Fo47 son de 10^6 y para Pf-5 son de 10^8 .

Para este estudio se inocularon dos matraces conteniendo 50 ml de caldo de dextrosa de papa y dos matraces conteniendo 50 ml de caldo de nutrientes, se inocularon los primeros con una pieza de 5 mm de un cultivo de Fo47 previamente crecido y los otros

dos con uno colonia de Pf-5 previamente inoculado en un cultivo de NA, se incubo Fo47 durante 7 días y Pf-5 durante 2 a 25°C, en una incubadora con agua y movimiento a 100 rpm. Ambos cultivos se colocaron en un centrifuga a 3000 g y se ajustaron a las concentraciones deseadas por medio de diluciones seriales.

Se decidió probar Fo47 a las concentraciones de 10^8 , 10^6 y 10^4 y Pf-5 a 10^{10} , 10^8 y 10^6 para observar la sobrevivencia de ambos al estar combinados durante 7 días.

Las unidades formadoras de colonias de los antagonistas se calculó utilizando la siguiente formula:

$$\text{Unidades Formadoras de Colonias} = \frac{\text{Promedio de número de colonias} \times \text{Factor de dilucion}}{\text{Tamaño de la muestra}}$$

Se realizaron los siguientes tratamientos de concentraciones:

1. Control (Fol)
2. Pf-5 (10^{10}) + Fo47 (10^8)
3. Pf-5 (10^{10}) + Fo47 (10^6)
4. Pf-5 (10^{10}) + Fo47 (10^4)
5. Pf-5 (10^8) + Fo47 (10^8)
6. Pf-5 (10^8) + Fo47 (10^6)
7. Pf-5 (10^8) + Fo47 (10^4)
8. Pf-5 (10^6) + Fo47 (10^8)
9. Pf-5 (10^6) + Fo47 (10^6)
10. Pf-5 (10^6) + Fo47 (10^4)

Una vez obtenidas las diluciones deseadas para cada combinación de los microorganismos antagonistas, se tomaron 100 µl de cada tratamiento y se inocularon en la superficie de cajas de Petri conteniendo 15 ml de agar de dextrosa de papa, utilizando un haza de metal previamente esterilizada; se dejaron secar por 15 minutos y se incubaron por 5 días a 24 °C.

6.5.2. Formulaciones del Producto.

Con el objetivo de determinar los componentes de una formulación comercial de la

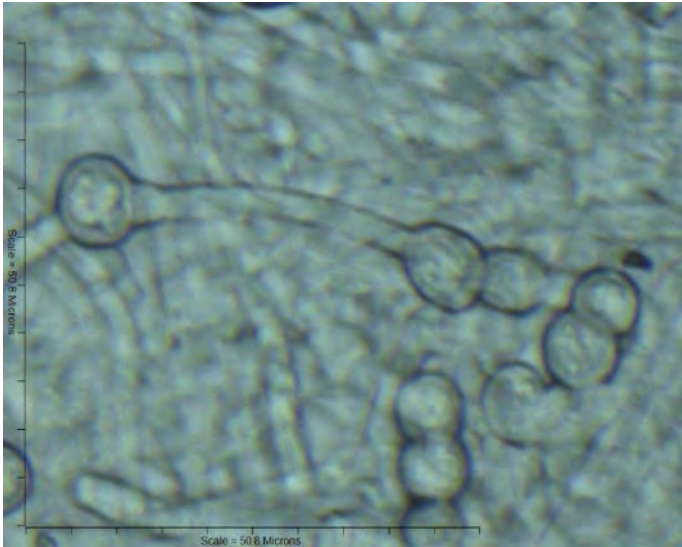


Figura 16. Imagen capturada de Clamydiospora de Fo47 a 100X

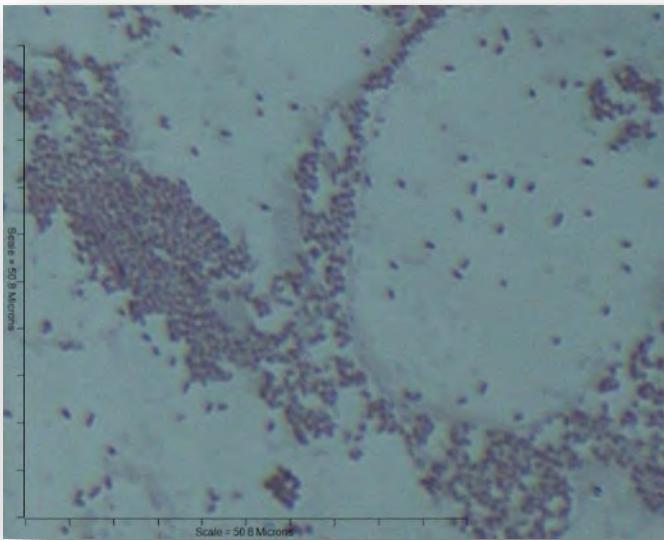


Figura. 17. Tinción de Gram de Pf-5 100X

mezcla de los biocontroles, se inocularon 4 matraces con 75 ml de medio PDA con Fo47 y se incubó por 7 días en baño a vapor con movimiento a 125 rpm a 25°C para producir clamidiosporas (Figura 16). Se inocularon 4 matraces con 75 ml de caldo de nutrientes con una colonia de Pf-5 y se incubó por 2 días en incubadora de agua con movimiento a 27°C y 100 rpm (Figura 17). Ambos cultivos fueron mezclados (Figura 18) y la suspensión se introdujo en un centrifuga (Thermofisher Scientific) a 3000 g por 10 minutos y se ajustó a 5×10^8 microconidia mL^{-1} y 2.7×10^7 clamidiosporas mL^{-1} . Se tomó una muestra de cada cultivo por separado y en mezcla para contabilizar las esporas del hongo, utilizando un

hemocitómetro, a su vez también se utilizaron 100 μl para inocular cajas de Petri con agar de dextrosa y papa y con agar de nutrientes, realizando diluciones seriales para

confirmar la concentración del cultivo (Figura 19). El pH de los microorganismos fue de



Figura. 18. Microorganismos en caldo de cultivo después de ser incubados durante 48 horas
4.88 para Fo47, 8.17 para Pf-5 y 6.02 al combinarse.

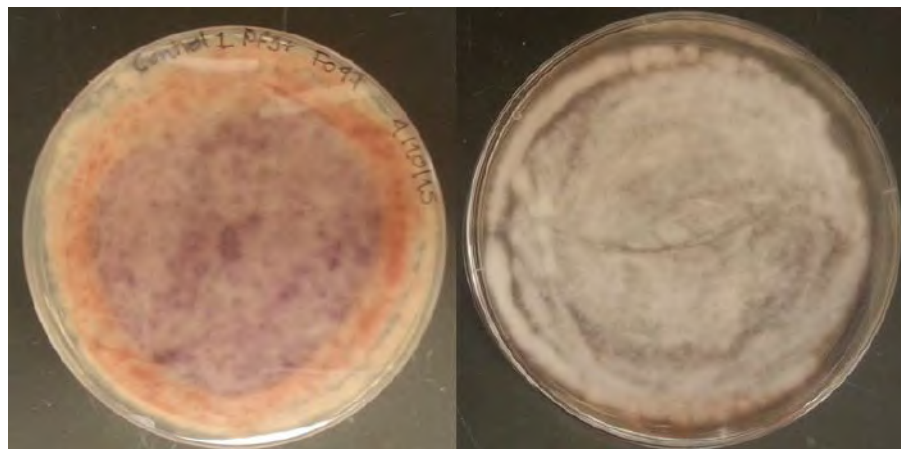


Figura. 19. Caja de Petri mostrando el crecimiento de la combinación de
Fo47 y Pf-5.

Formulación Sólida

Se utilizaron los siguientes ingredientes:

- 38 g de ingrediente 1
- 4g de ingrediente 2
- 6 g de ingrediente 3
- 2 g de ingrediente 4
- 2 ml de ingrediente 5
- 20 ml de ingrediente 6

Se preparó una masa moliendo los ingredientes. La masa se pasó por una máquina para hacer pasta, y se repitió el procedimiento 10 veces. Se produjo una lámina de 1 mm de grosor, y se dejó secar a temperatura ambiente, se molió y tamizó en tamaños (Figura 20) de 151–500 μm y 501–2000 μm). (Figura 20).

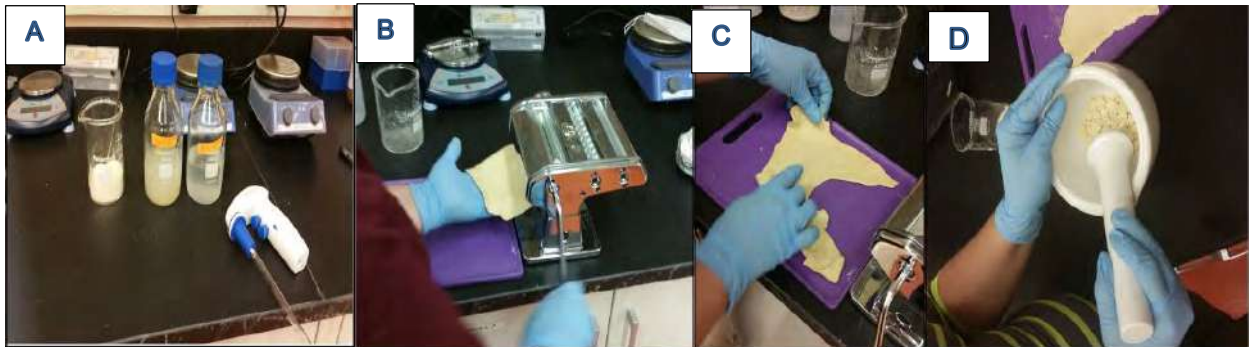


Figura 20. Proceso de formulación A. Cultivos de Fo47 y Pf-5, e ingredientes para la formulación B. Masa pasando por un rodillo para pasta. C. Masa de 1 mm de grosor dejándose secar, D. Moliendo la masa hasta obtener gránulos.

Formulación Líquida

Para esta formulación se utilizaron solo dos ingredientes siendo estos

- 10 g de ingrediente 7
- 200 ml de ingrediente 6

Esta formulación fue guardada en refrigeración a 4 °C. Para la formulación A y B se tomaron muestras a los días 0, haciendo una dilución 1:10 (1 g o ml de la formulación en

9 ml de agua estéril), se mezcló y se inocularon 100 μ l en cajas de Petri conteniendo PDA.

Formulación A

Para esta formulación se utilizaron los siguientes ingredientes:

- 52 g de ingrediente 8
- 2.5 g de ingrediente 4
- 2.5 g de ingrediente 3
- 3 ml de ingrediente 6

En el caso de Fo47 se utilizaron dos tipos de esporas (microconidias y macroconidias) a las concentraciones previamente descritas y para Pf-5.

Formulación B

Los ingredientes para esta formulación fueron los siguientes:

- 60 g de ingrediente 8
- 60 g de ingrediente 7
- 6 ml de ingrediente 7 (Figura 21).



Figura 21. Agregando los microorganismos de biocontrol a la Formulación B.

6.5.3. Estudios de estabilidad de las formulaciones

Se realizaron estudios de estabilidad de cada producto semanalmente, tomando en cuenta los siguientes factores:

- Temperatura
- Sobrevivencia de los microorganismos
- Evaluación *in vitro* de las formulaciones

Utilizando la técnica de cultivo dual en caja de Petri que se describió en la sección 4.2 se tomó un gramo o un mililitro de cada muestra, mezclándose con 9 ml de agua destilada, se realizaron diluciones seriales y se inocularon 100 microlitros en cajas de

Petri conteniendo 15 mililitros de Agar PDA. Las cajas de Petri se incubaron por 5 días a 25°C. Cada evaluación consiste en 3 repeticiones (cajas de Petri) por cada tratamiento.

El procedimiento se repitió a los 0, 4, 8, 15 y 30 días después de la inoculación.

Las formulaciones sólida, A y B fue mantenidas a temperatura ambiente, mientras que la formulación líquida se mantuvo a 4°C.

6.6. Estudios in-vivo

6.6.1. Estudios en semilla

Se utilizó la variedad de tomate John Beer, y se inoculó con un cultivo de Fol, Fo47 y PF-5 obtenido con el método y concentración ya mencionados.

Según el método descrito por Sarker, 2013, se tomaron 240 semillas de cada variedad y se colocaron 40 dentro de vasos de precipitado previamente esterilizados (Figura 22) y se expusieron a 10 mililitros por 30 minutos de los siguientes tratamientos:

- 1) Control absoluto (3% Hipoclorito de Sodio)
- 2) Fol (10^6 CFU/ml)
- 3) Fo47 (10^6 CFU/ml)
- 4) Pf-5 (10^8 CFU/ml)
- 5) Fo47 + Pf-5 (10^6 and 10^8 CFU/ml respectivamente)
- 6) Serenade Soil (*Bacillus subtilis* cepa QST 713, 10^9 CFU/g)
- 7) Control (solo semillas)

La evaluación de la prevalencia de Fol en las semillas se determinó por medio del método de papel para filtrado (ISTA, 1996), en donde 10 semillas se colocaron en 3 papeles de filtro esterilizados (Whatman No. 1) en cada caja de Petri, contando con 4 repeticiones (cajas de Petri) por tratamiento. Estas fueron incubadas a 25°C durante ciclos 12/12 horas de luz y oscuridad por 7 días. Cada semilla fue observada con el fin de recolectar información sobre la presencia del patógeno después de 7 días de



Figura 22. Vasos de precipitado con semillas de tomate siendo inoculadas por 30 minutos con 20 mililitros de cada tratamiento.

inoculación basándose en el hábito de crecimiento, utilizando un estereoscopio (Fisher Scientific™); a su vez también se recolectaron los datos sobre la germinación de las semillas. Los resultados se presentan como porcentaje de incidencia de la enfermedad en una escala del 0-100. (Figura 23).



Figura 23. Semillas de cada tratamiento fueron colocadas en cada caja de Petri con papel de filtro y 3 mililitros de agua esterilizada.

6.6.2. Estudios en plántula por método de inmersión de raíces

El primero de Febrero de 2016 se sembraron semillas de tomate de la variedad John Beer en charolas de plástico de 50 cavidades conteniendo peat moss y perlita (2:1 vol/vol). Las charolas fueron depositadas en un invernadero, con una temperatura constante de 22 °C durante el día y 15 °C por la noche; se utilizó riego automatizado, 2 veces por día, durante 5 minutos.

Una vez que las plántulas de tomate alcanzaron las 3 hojas verdaderas, se llevaron al laboratorio, en donde se extrajeron de las charolas y cuidadosamente se lavaron con agua para limpiar el sustrato hasta dejar descubierto el sistema radicular (Figura 24).



Figura 24. Plántulas de Tomate en el laboratorio al ser desprendidas de las charolas

El ensayo consistió en los siguientes tratamientos:

- 1) Control absoluto (Agua)
- 2) Control positivo (Fol)
- 3) Control biológico (Serenade Soil) / Fol
- 4) Control químico (Actigard) / Fol
- 5) Fo47
- 6) Pf-5
- 7) Fo47 / Fol
- 8) Pf-5 / Fol
- 9) Fo47 + Pf-5
- 10)Fo47 + Pf-5 / Fol
- 11)Formulación A / Fol
- 12)Formulación B / Fol
- 13)Formulación A 3X / Fol
- 14)Formulación B 3X / Fol

Se utilizaron vasos de precipitados previamente esterilizados, para preparar un total de 200 mililitros de los tratamientos, como se indica:

- 1) 200 ml de agua destilada
- 2) 200 ml de el patógeno Fol a una concentración de 10^4 CFU/ml
- 3) Serenade Soil (2 ml / 200 ml de agua)
- 4) Actigard (0.08 gramos / 200 ml de agua)
- 5) 200 ml del hongo Fo47 a una concentración de 10^6 CFU/ml
- 6) 200 ml de la bacteria Pf-5 a una concentración de 10^8 CFU/ml
- 7) 200 ml del hongo Fo47 a una concentración de 10^6 CFU/ml
- 8) 200 ml de la bacteria Pf-5 a una concentración de 10^8 CFU/ml
- 9) 100 ml del hongo Fo47 (10^6 CFU/ml) + 100 ml de la bacteria Pf-5 (10^8 CFU/ml)
- 10) 100 ml del hongo Fo47 (10^6 CFU/ml) + 100 ml de la bacteria Pf-5 (10^8 CFU/ml)
- 11) Formulación A (2 g / 200 ml)
- 12) Formulación B (2 g / 200 ml)
- 13) Formulación A 3X (2 g / 200 ml)

14) Formulación B 3X (2 g / 200 ml)

Una vez que las plántulas estuvieron libres de sustrato, se distribuyeron y etiquetaron 6 repeticiones aleatoriamente para cada tratamiento (Figura 25).



Figura 25. Plántulas de Tomate después de ser lavadas



Figura 26. Aplicación de los tratamientos por medio del método de inmersión de raíz

Se dejaron secar por 20 minutos mientras se preparaban los tratamientos. Se inocularon los tratamientos por el método de inmersión de raíz, en el cual se sumergieron las plántulas a la altura de la raíz durante 5 minutos (Figura 26).

Una vez que se aplicaron los tratamientos, se dejaron secar las plántulas nuevamente por 5 minutos, y se trasplantaron en macetas cónicas de plástico de 15 x 5 cm y se trasladaron al invernadero (Figura 27).



Figura 27. Plántulas, ya tratadas y trasplantadas a macetas cónicas

Después de 5 días de la aplicación de los tratamientos preventivos, se inoculó el patógeno Fol, a una concentración de 10^4 CFU/ml, aplicando 20 ml de la solución, únicamente a los tratamientos 3, 4, 7, 8, 10, 11, 12, 13, y 14.

Se realizaron evaluaciones al día 0, 23 y 43 después de la aplicación de los tratamientos, considerando las siguientes variables:

- Altura de la planta (cm)
- Grosor de tallo (mm)
- Número de brotes laterales
- Número de flores
- Número de frutos
- Incidencia (%)
- Severidad (Escala de 0-4)

6.6.3. Estudios en Invernadero

Se sembraron a mediados de noviembre de 2015, 50 macetas de ¼ de galón conteniendo una mezcla de 80:10:10 vol/vol (tierra para maceta, peat y perlita), con la variedad orgánica de Tomate John Beer obtenidas de la tienda electrónica Seed Savers Exchange, debido a que no han sido modificadas genéticamente. El invernadero utilizado para esta investigación se encuentra ubicado en el Centro de Investigación Agrícola de



Figura 28. Invernadero utilizado para los estudios en planta

la Universidad de Arizona, en la ciudad de Yuma, Arizona (Figura 28) y presentó una temperatura promedio de 27°C, y una humedad relativa de 70%, el sistema de riego automatizado se programó para encender 1 minuto 2 veces al día.

Se preparó el inoculo de la enfermedad, y del hongo antagonista tomando una pieza de 5 mm de cajas de Petri conteniendo los hongos previamente cultivados y agregándolo a 4 matraces para cada uno, previamente esterilizados conteniendo 50 mililitros de caldo de dextrosa de papa, a su vez se utilizó una colonia de una caja de Petri de *Pseudomonas fluorescens* y se inocularon 4 matraces con 50 ml de Caldo de nutrientes. Se incubaron ambos hongos durante 7 días en incubadora en agua con movimiento a 25°C y 100 revoluciones por minutos y la bacteria por 2 días a la misma temperatura y movimiento.

Los cultivos se mezclaron y se utilizó una centrifuga (Thermo Fisher Scientific) a 3000 g por 10 minutos para concentrar los microorganismos; estos se re suspendieron en agua destilada estéril hasta obtener la concentración deseada de 10^3 para Fol y para Fo47, y 10^6 para PF-5 se llegó a la concentración de 10^8 CFU/ml, respectivamente.

Se tomó una muestra de cada microorganismo y se inocularon cajas de Petri para corroborar las concentraciones.

Se decidió utilizar las formulaciones A y B debido a la sobrevivencia de ambos microorganismos antagonista.

Los tratamientos fueron los siguientes:

1. Control absoluto
2. Control positivo (Fol)
3. Control Biológico Comercial (Serenade Soil 4 quarts/Acre) / Fol
4. Control químico (Actigard .5 oz/Acre) / Fol
5. Fo47 + Pf-5 (cultivo puro)
6. Fo47 + Pf-5 / Fol
7. Formulación A / Fol
8. Formulación B / Fol
9. Formulación A 3X / Fol
10. Formulación B 3X / Fol

Se utilizaron 5 macetas (repeticiones) por tratamiento, el experimento se organizó por bloques completamente al azar utilizando el programa estadístico ARM asignando distintos colores por tratamiento.

Cuando las plantas de tomate tenían alrededor de 3-4 hojas verdaderas se prepararon los tratamientos, aplicando sólo los benéficos, agregando 200 mililitros de cada tratamiento a cada maceta; se decidió utilizar este volumen de agua, ya que se realizó una prueba anteriormente para obtener el punto de saturación del sustrato y el resultado fue tal cantidad para el tamaño de planta y maceta (Figura 29).

Los tratamientos se mezclaron de la siguiente manera:

1. 1 L de agua (200 ml x 5 macetas)
2. Fol 10^3 1 Litro por tratamiento
3. 10 ml de Serenade Soil en 1 L de agua
4. 0.38 g de Actigard en 1 L de agua
5. 1:1 vol/vol de Fo47 (10^6) y Pf-5 (10^8) 500 ml de cada uno = 1 Litro

6. 1:1 vol/vol de Fo47 (10^6) y Pf-5 (10^8) 500 ml de cada uno = 1 Litro
7. 10 gramos de Formulación A en 1 L de Agua
8. 10 gramos de Formulación B en 1 L de Agua
9. 30 gramos de Formulación A en 1 L de Agua
10. 30 gramos de Formulación B en 1 L de Agua



Figura 29. Plantas de Tomate el día 0 de la aplicación de los tratamientos

sustrato de las macetas a una concentración de 10^3 según reportó Alabouvette, et al., 200, en la investigación que realizo inoculando el patógeno en plantas de tomate (Figura 31).

La duración total del estudio fue de 6 semanas en total repitiendo la aplicación de los benéficos en la 4^{ta} semana.

10 días después de la aplicación de los tratamientos benéficos, se aplicaron 200 ml de una suspensión del patógeno Fol previamente preparada en Caldo de Dextrosa de Papa a una concentración de 10^3 para cada maceta (Figura 30).

Fol fue inoculado en el



Figura 30. Tratamientos del 1-10 excepto 2 (Fol), el cual fue aplicado 10 días después



Figura 31. Aplicación de los tratamientos en el sustrato.

Cada semana se evaluaron las siguientes variables (Figura 32):

- Altura de la planta (cm)
- Grosor de tallo (mm)
- Número de brotes laterales
- Número de flores
- Número de frutos
- Incidencia (%)
- Severidad



Figura 32. Evaluación semanal de los valores de crecimiento de las plantas

El porcentaje de incidencia de 0-100 se midió de acuerdo a la escala mencionada por Srinivasa et al., 2009, en donde 0- sin infección; <25 síntomas iniciales de clorosis de las hojas y marchitamiento inicial con una o dos hojas amarillas; >25- <50 clorosis severa del follaje y marchitamiento inicial durante las horas más calientes del día; >50-<75 Marchitamiento severo, síntomas incipientes de clorosis en las hojas e inhibición del crecimiento; <75- <100 hojas completamente amarillas, marchitamiento de la planta seguido por la muerte.

El nivel de severidad de la enfermedad se evaluó utilizando la escala de severidad que siguió Validov, et al., 2011, en donde plantas sanas se les dio un valor de 0, las plantas



Figura 33. Estadios de las plantas al paso del tiempo.

con lesiones pequeñas ($< 2 \text{ mm}$) se les dio un valor de 1, las plantas con lesiones desarrollados recibieron un valor de 2, y las plantas con lesiones grandes (pie podrido, inmensa podredumbre de la raíz) un valor de 3. El valor de plantas muertas fue de 4 (Figura 33).

A su vez también se realizaron evaluaciones poscosecha (Figura 34), considerando las siguientes variables:

- Peso fresco y seco de la planta completa
- Peso fresco y seco de los frutos
- Peso fresco y seco de las raíces
- Contenido de agua
- Biomasa

Una vez terminado el estudio en la 6ta semana, se procedió a pesar la parte aérea de cada planta al igual que los frutos y las raíces fueron remojadas en cubetas de agua para poder extraer el sustrato, ya que, por el tamaño de la planta y la maceta, el sistema radicular se encontraba muy compactado.

Ya que se obtuvo el peso fresco se guardó cada muestra en bolsas de papel y se secaron a 85°C durante 48 horas.

Posteriormente se pesaron las muestras deshidratadas y se obtuvo el contenido de agua con la siguiente ecuación:

$Peso\ fresco\ (g) - Peso\ seco\ (g) = Contenido\ de\ agua$

El ensayo en invernadero se replicó en la primavera del 2016, utilizando los siguientes



Figura 34. Peso fresco de los frutos
tratamientos:

- 1) Control absoluto
- 2) Control positivo (Fol)
- 3) Control Biológico Comercial (Serenade Soil 4 quarts/Acre) / Fol
- 4) Control químico (Actigard .5 oz/Acre) / Fol
- 5) Fo47 / Fol
- 6) Pf-5 / Fol
- 7) Fo47 + Pf-5 (cultivo puro)
- 8) Fo47 + Pf-5 / Fol
- 9) Formulación B / Fol
- 10) Formulación B 3X / Fol

El procedimiento y las variables fueron exactamente las mismas del primer ensayo.

Aislamiento del Patógeno Fol del sustrato de las macetas

Por último, se tomaron muestras de 10 gramos del sustrato de cada tratamiento en donde estuvieron presentes las plantas de tomate.

Las muestras fueron llevadas al laboratorio de Gowan y se mezclaron con 90 mililitros de agua destilada estéril en una bolsa de plástico “stomacher” (Figura 36), para así

obtener una dilución de 1:10; las muestras fueron homogenizadas por 1 minutos en un Stomacher® 80 Biomaster a 135 revoluciones por minuto.

Se prepararon previamente cajas de Petri conteniendo medio Komada, el cual es selectivo para el patógeno *Fusarium oxysporum* (Komada, 1976).

Una vez homogenizadas las muestras, se tomaron 100 microlitros para inocular cajas de Petri conteniendo el medio Komada por triplicado. Las muestras se incubaron a 25°C por 5 días.



Figura 36. Báscula conteniendo 10 g de sustrato obtenido de una de las macetas de las plantas de Tomate que serán mezclados en 90 ml de DI H₂O en una bolsa "stomacher".

6.7.

Análisis Estadísticos

Se utilizó el programa estadístico ARM (Agricultural Research Manager) para analizar los resultados, con una comparación de medias simple utilizando la prueba de Duncan de rango múltiple, con una confianza del 95% ($\alpha=0,05$)

Se decidió utilizar esta prueba debido a que los tamaños de las muestras presentadas en esta investigación eran bastante similares y los tratamientos presentan una relación ordinal.

Es conveniente aplicarla cuando los tamaños de las muestras son iguales y los tratamientos presentan una relación ordinal, es decir, pueden ordenarse de manera ascendente o descendente en una escala no numérica, a diferencia de los tratamientos que responden a variables continuas en las que procede un análisis de regresión. Navarro (2006) y Montgomery (2003) presentan las fórmulas de cálculo y particularidades de esta prueba.

Las diferencias observadas entre las medias son probadas, comenzando con la mayor versus la menor y luego entonces comparadas.

A seguir, una nueva diferencia entre las medias es calculada, comenzando con la próxima mayor versus la próxima menor, y entonces comparada con. El proceso continuo hasta el final. Si una diferencia observada fuera mayor que la correspondiente amplitud de mínima significancia, se concluye que el par de medias en cuestión es estadísticamente diferente.

Para evitar contradicción, ninguna diferencia entre un par de medias será considerada significativa, si esas dos medias envueltas estuvieran entre dos medias que no difieran significativamente.

La prueba de Duncan es muy efectiva en detectar diferencias entre medias, cuando diferencias reales existen. Esa es la razón por la cual la prueba utilizada en esta investigación es bastante popular para ensayos en agricultura.

7. RESULTADOS

7.1. Resultados de Evaluaciones in-vitro

Los agentes antagonistas redujeron significativamente el crecimiento del patógeno a los cuatro y a los siete días después del establecimiento de los experimentos en cultivo dual ($t = 2.1475$, $p=0.0389$), en cultivo dual integrado ($t = 1.5737$, $p=0.1248$), y en la exposición individual de Fol a Fo47 ($t=1.1477$, $p=0.2590$) y a Pf-5 ($t=2.8934$, $p=0.0066$). La exposición a compuestos orgánicos volátiles de los antagonistas combinados también redujo significativamente el crecimiento de Fol ($t=2.4399$, $p=0.0200$). En el caso del cultivo dual los patógenos redujeron el crecimiento cuando se aplicaron solos (Figura 37 y 38) y en mezcla. Comparando el efecto de cada antagonista por separado, se determinó que el Pf-5, presenta mayor reducción del crecimiento del patógeno que el Fo47 (Figura 39) ($t = 17.1408$, $p=0.0001$). La aplicación de los antagonistas en mezcla detuvo totalmente el crecimiento de Fol a los cuatro días, aunque a los 7 días este presentaba crecimiento equivalente a un 21.7% (Cuadro 1) comparado con el control.

Los compuestos volátiles que emiten tanto Fol, como Pf-5, afectan el crecimiento del patógeno (Figura 40).



Figura 37. Cultivo dual de Fol con Fo47



Figura 38. Cultivo dual de Fol con Pf-5



Figura 39. Cajas de Petri conteniendo ensayos *in-vitro* por cultivo dual de los microorganismos benéficos en presencia del patógeno Fol.

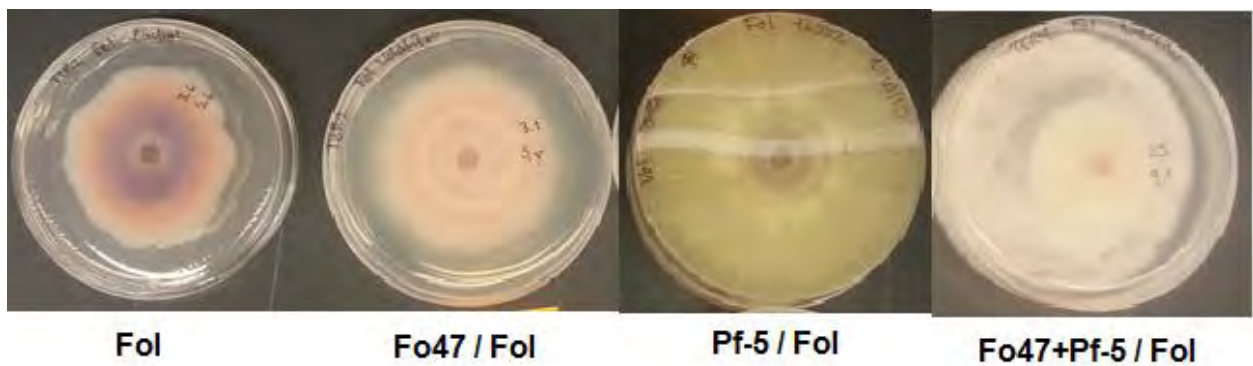


Figura 40. Cajas de Petri conteniendo los ensayos *in-vitro* por compuestos volátiles de los microorganismos benéficos en presencia del patógeno Fol.

7.2 Resultados de los estudios de las concentraciones de Fo47 y Pf-5

La utilización de concentraciones crecientes de Fo47 y Pf5, no mostraron un posible efecto antagónico entre ellos (Figura 41). Así mismo, se encontró que el crecimiento de ambos en presencia uno del otro, se mantiene estable a través de un amplio rango de concentraciones. Sin embargo, se obtuvo la mayor sobrevivencia de ambos, cuando Fo47 estaba a una concentración de 10^6 y Pf-5 a 10^8

La inhibición del crecimiento del patógeno, el cual fue sembrado en el centro de cada caja de Petri, no se vio afectada por ninguna de las concentraciones, comportándose muy similar en cada unidad.

Se decidió usar concentraciones de 10^6 para Fo47 y Pf-5 a 10^8 ya que existen antecedentes de publicaciones científicas en las cuales se realizaron investigaciones con Fo47 y Pf-5 por separado y dichas concentraciones fueron las utilizadas en dichos trabajos.

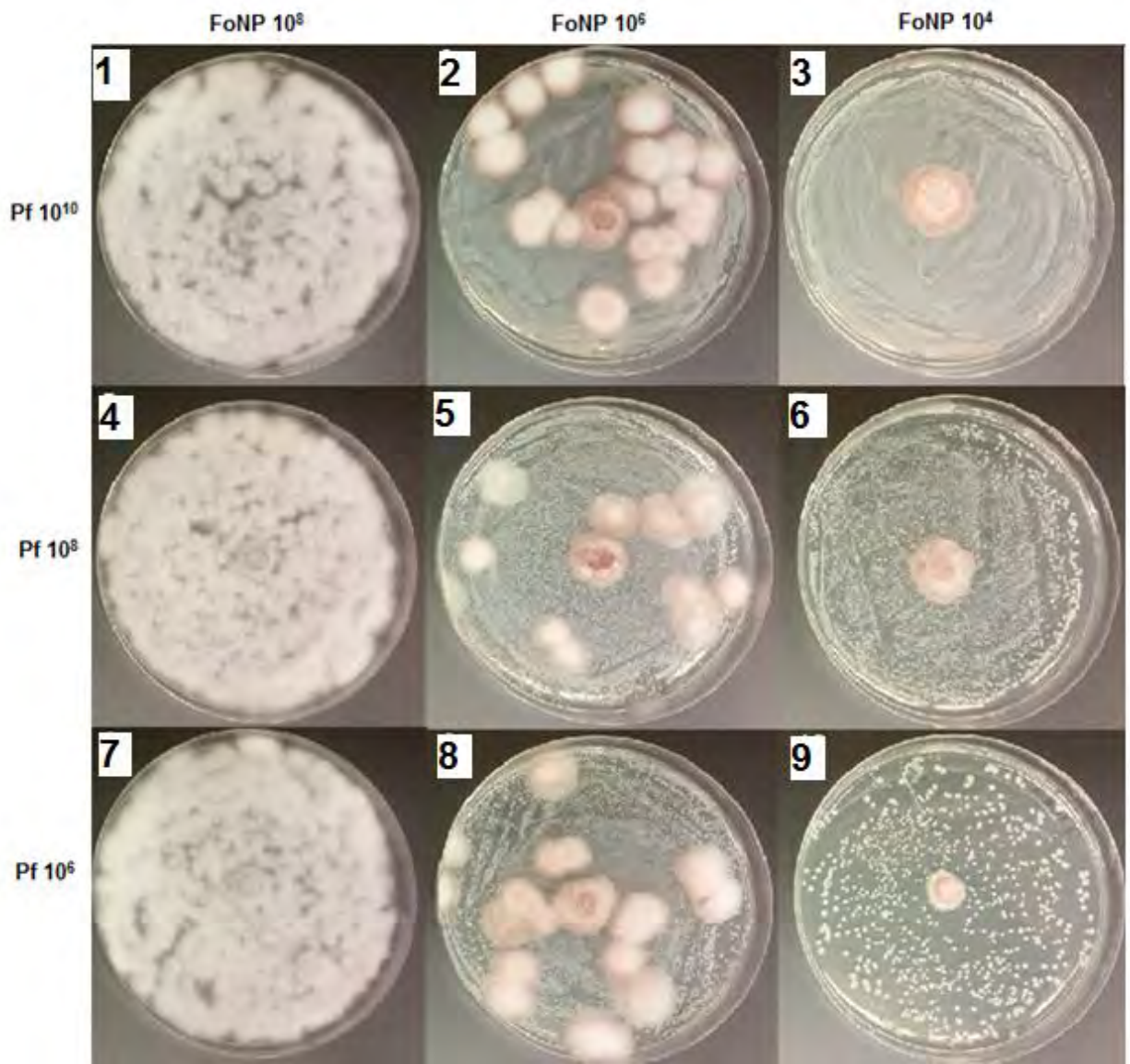


Figura 41. Crecimiento de Fo47 y Pf-5 en diversas combinaciones de concentraciones de inoculo: 1. Pf-5 (10^{10}) + Fo47 (10^8), 2. Pf-5 (10^{10}) + Fo47 (10^6), 3. Pf-5 (10^{10}) + Fo47 (10^4), 4. Pf-5 (10^8) + Fo47 (10^8), 5. Pf-5 (10^8) + Fo47 (10^6), 6. Pf-5 (10^8) + Fo47 (10^4), 7. Pf-5 (10^6) + Fo47 (10^8), 8. Pf-5 (10^6) + Fo47 (10^6), 9. Pf-5 (10^6) + Fo47 (10^4). Se muestra una imagen representativa de los resultados de cada tratamiento.

7.3 Resultados de los estudios de las formulaciones

Las evaluaciones realizadas respecto a la sobrevivencia de los microorganismos benéficos en formulaciones elaboradas con inertes líquidos (figura 43) y sólidos (figura 44) previamente descritos, mostraron al inicio, una concentración ideal de 10^6 para Fo47 y 10^8 para Pf-5, sin embargo, después de 4, 8, 15 y 30 días las formulaciones suspendidas en liquido presentaron una concentración similar al día 0 para Pf-5 y un decline de 2 logaritmos para Fo47. En la formulación suspendida en inertes solidos los resultados fueron opuestos, a los 8 días después de la elaboración la bacteria Pf-5 disminuyo su concentración hasta 0 unidades formadoras de colonias detectadas y Fo47 estuvo oscilando su concentración entre 10^5 y 10^4 UFC/gramo. (Figura 42).

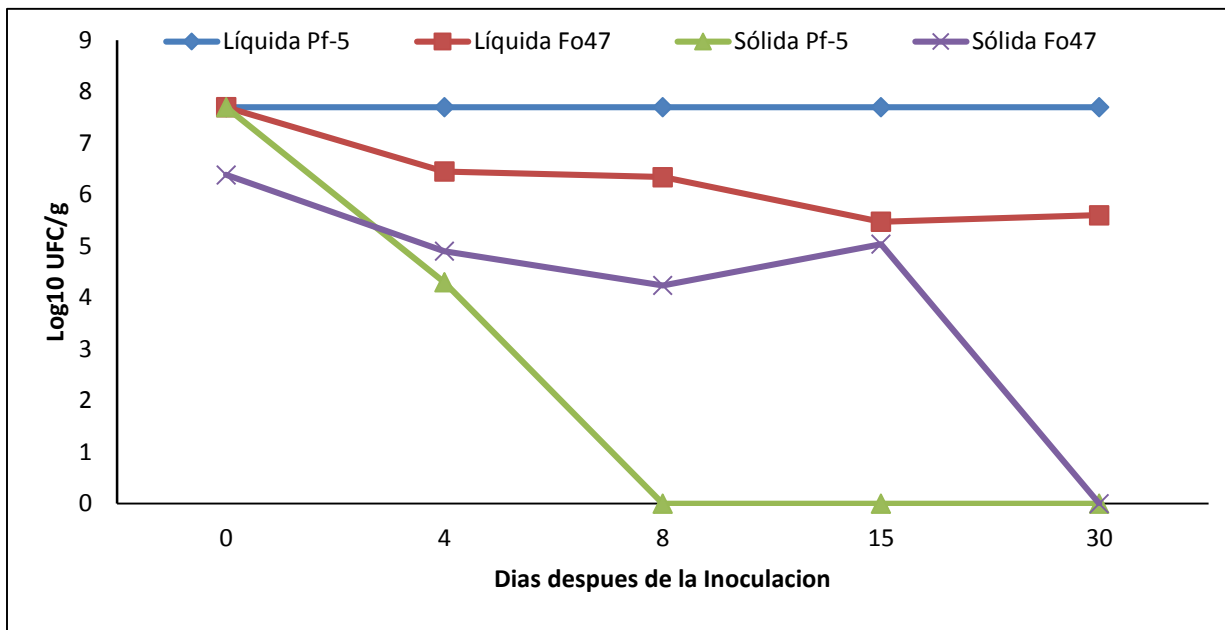


Figura 42. Sobrevivencia de los microorganismos antagonistas a los 0, 4, 8 15 y 30 días después de la inoculación en formulaciones sólida y líquida.

Los resultados mostraron mayor sobrevivencia de UFC en medio líquido, ya que este fue almacenado a una temperatura de 4°C, al final se optó por continuar con los siguientes ensayos utilizando solo inertes contenidos en la formulación líquida para suspender los microorganismos estudiados.

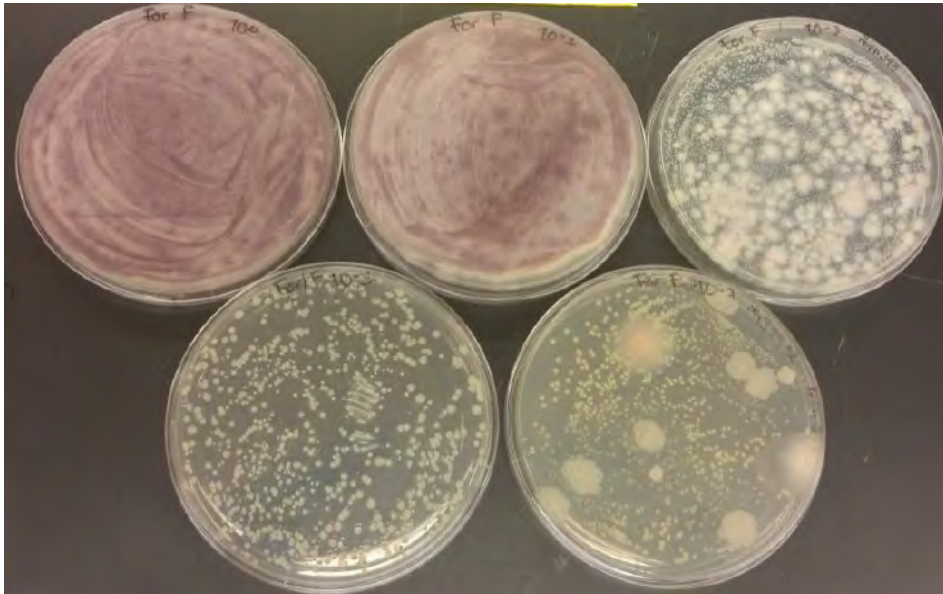


Figura 43. Formulación líquida de Fo47 y Pf5, en diluciones 10^0 , 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} , después de 4 días de la inoculación.

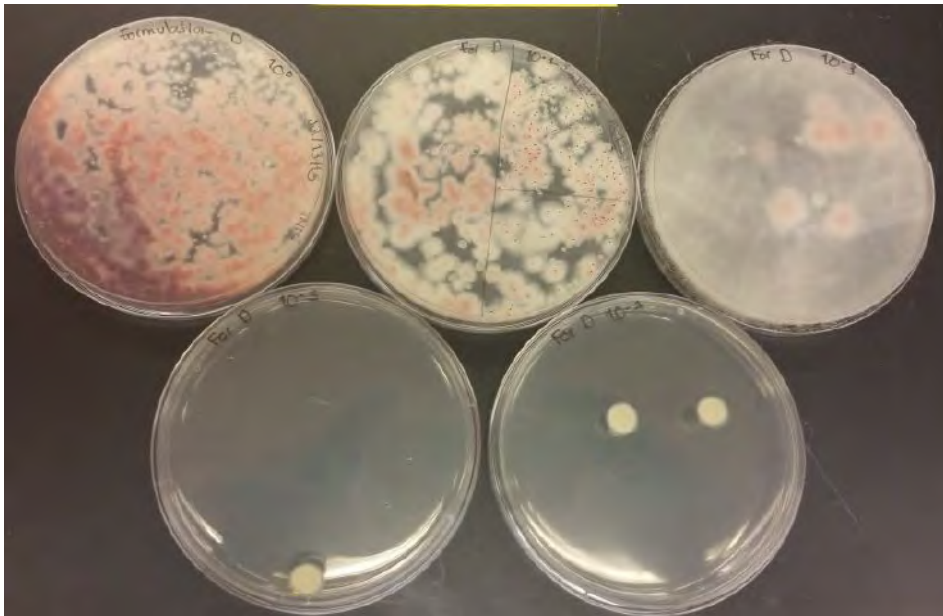


Figura 44. Formulación sólida de Fo47 y Pf5, en diluciones 10^0 , 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} , después de 4 días de la inoculación.

7.4 Resultados de evaluaciones en semilla

El ensayo *in-vivo* mostró, que la inoculación de las semillas con los biocontroleros, tienden a reducir los porcentajes de semillas infectadas, e incrementan el porcentaje de germinación. Respecto porcentaje de semillas infectadas, los tratamientos con los biocontroleros de Pf-5 y la mezcla de Fo47 + Pf-5 presentaron los niveles de infección más bajas en semillas (40%); le siguieron Fo47 y el producto comercial Serenade Soil™ con un 50%, todas comparadas con el control positivo Fol, el cual obtuvo un 100% de semillas infectadas (Figura 45).

El porcentaje de semillas germinadas fue del 100% para el tratamiento de la combinación de Fo47 + Pf-5; para los demás tratamientos, hubo una germinación de 80-90%. (Figura 45, Cuadro 2)

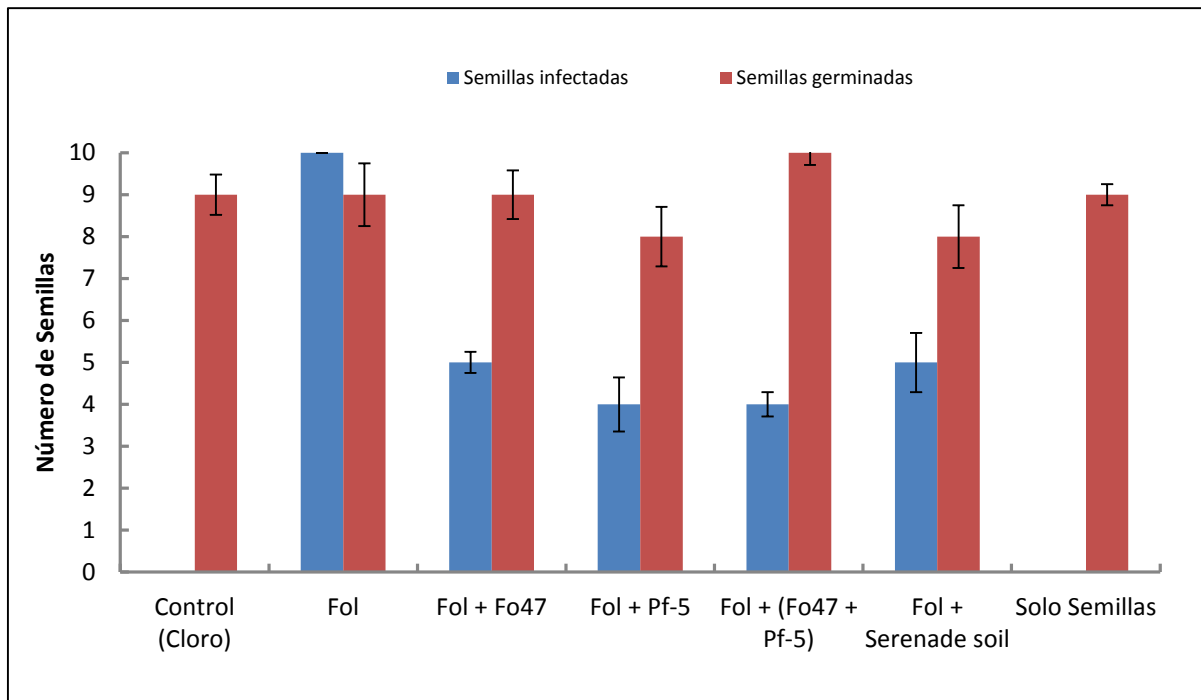


Figura 45. Infección y germinación de semillas de tomate *Solanum lycopersicon*, bajo combinaciones de tratamientos de infección con *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, y los biocontroleros Fo47 y Pf5.

Cuadro 2. Efecto de combinaciones de Fo47 y Pf-5 en el porcentaje de semillas de tomate infectadas y germinadas, en comparación con el Control Positivo (Fol) a 6 días después de la inoculación.

Tratamiento	Semillas infectadas (%)	Semillas germinadas (%)
Fol	100	90 ± 1.5
Control (Cloro)	0	90 ± 0.96
Fol + Fo47	50 ± 0.5	90 ± 1.15
Fol + Pf-5	40 ± 1.29	80 ± 1.41
Fol + (Fo47+Pf-5)	40 ± 0.58	100 ± 0.58
Fol + Serenade soil	50 ± 1.41	80 ± 1.5
Solo Semillas	0	90 ± 0.5

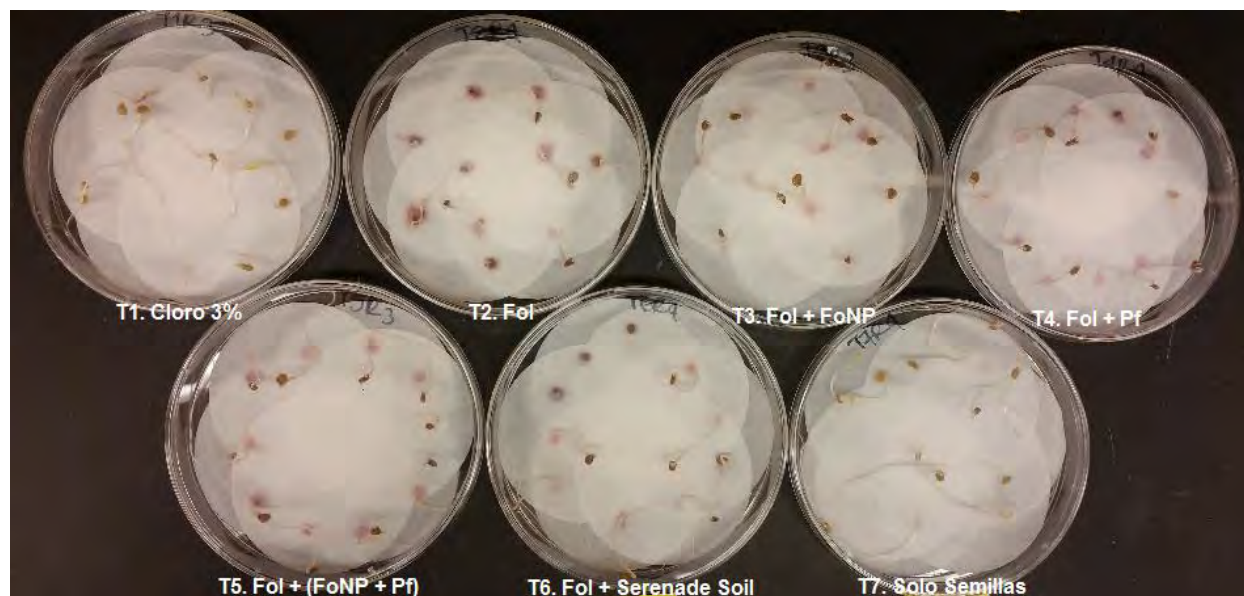


Figura 46. Respuesta de semillas de tomate (*Solanum lycopersicum*) sometidas a infección con Fol y combinaciones de Fo47 y Pf-5 después de 6 días de inoculación.

7.5 Resultados en Plántulas por el Método de Inmersión de Raíz

Incidencia

Los signos de la enfermedad se manifestaron en la segunda evaluación, que se realizó a los 23 días después de la inoculación de todos los tratamientos.

La tercera evaluación, realizada 43 días después de la inoculación, se presentó una diferenciación muy notoria de la respuesta a los tratamientos de cada planta; los tratamientos que mostraron diferencia en comparación al control positivo (Fol) fueron el control biológico (Serenade Soil™), y la formulación B, los cuales presentaron una reducción de la infección del 34.1 y 19.8% respectivamente, cuando se compara al tratamiento del control positivo (Fol) únicamente (Figura 47 y Cuadro 3).

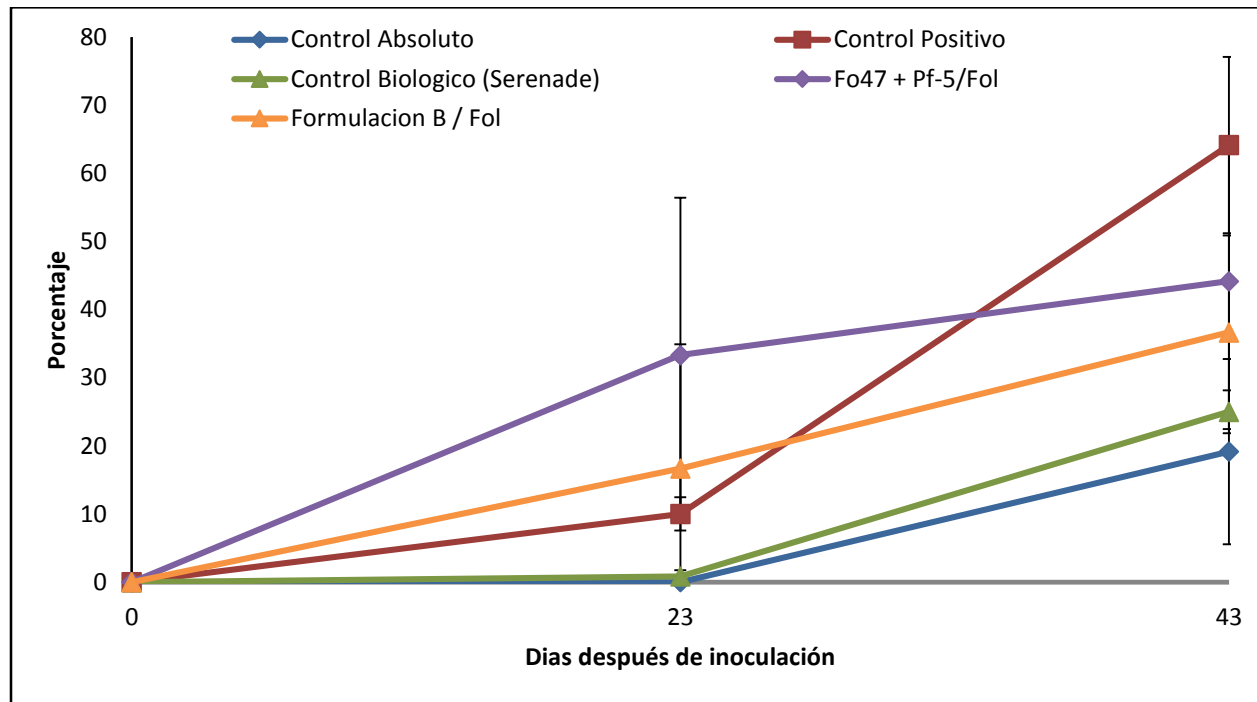


Figure 47. Porcentaje de Incidencia de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* en plántulas de tomate. Cada punto representa la media (\pm ES) de 6 repeticiones.

Cuadro 3. Comparación de medias para la variable porcentaje de incidencia de infección por *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* en plántulas de tomate. Las medias seguidas por la misma letra o símbolo no difieren significativamente (P=.05, Duncan's New MRT).

Tratamientos	Dias					
	0		23		43	
Control Absoluto	0	a	0	b	12.3	a
Control Positivo Fol	0	a	9	a	72.5	a
Control Biologico (Serenade)	0	a	0.3	b	24.7	a
Fo47 +Pf-5 / Fol	0	a	3.7	ab	51.2	a
Formulacion B / Fol	0	a	3.7	ab	58.6	a
LSD P=.05 (% mean diff)	.		5.68 - 8.09 (145%)		48.37 - 50.84 (75%)	
Standard Deviation	0		0.60t		25.44t	
CV	0		120.71t		62.26t	

Severidad

Para la escala de severidad de la enfermedad los resultados siguieron con la misma tendencia que la variable de incidencia; los tratamientos que presentaron un menor nivel de severidad de la enfermedad fueron el control biológico (Serenade Soil™), Pf-5 sin el patógeno y la formulación B. Estadísticamente solo Pf5 obtuvo una diferencia significativa en comparación al control positivo. (Figura 48 y Cuadro 4).

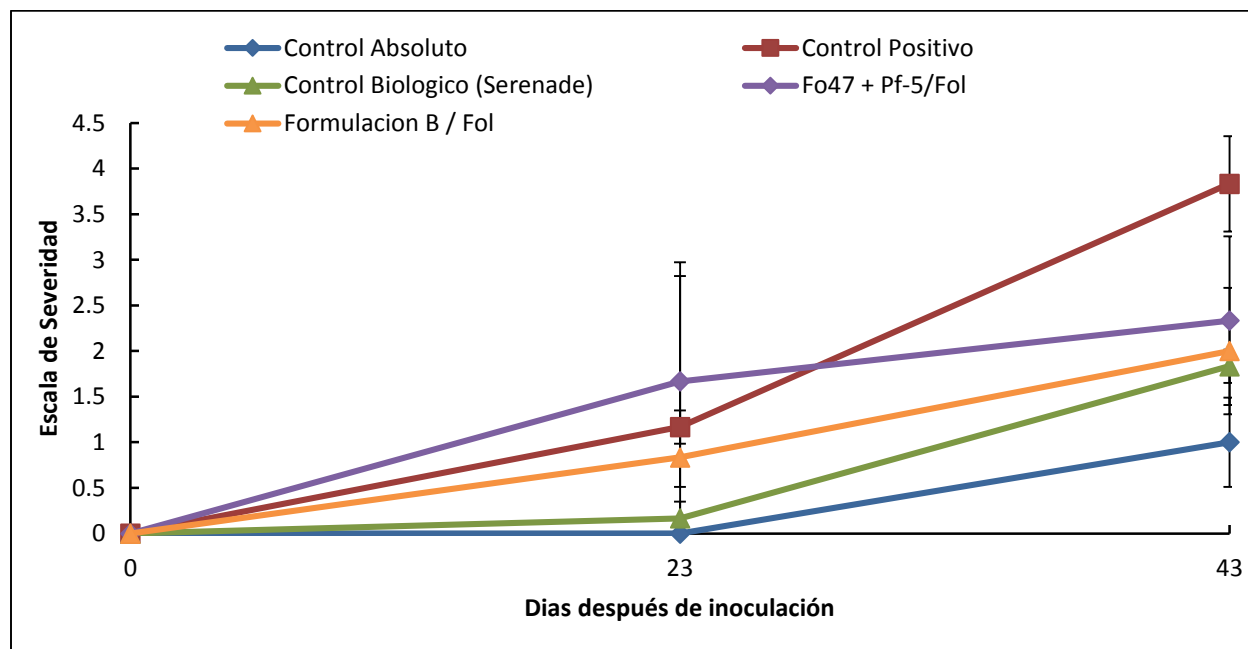


Figura 48. Evaluación de Severidad (0-4) de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* en plántulas de tomate. Cada punto representa la media (\pm ES) de 6 repeticiones.

Cuadro 4. Comparación de medias para la variable Severidad de Infección por *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* en plántulas de Tomate. Las medias seguidas por la misma letra o símbolo no difieren significativamente ($P=.05$, Duncan's New MRT).

Tratamientos	Dias					
	0		23		43	
Control Absoluto	0	a	0	a	0.6	b
Control Positivo Fol	0	a	1.1	a	3.8	a
Control Biológico (Serenade)	0	a	0.1	a	1.8	ab
Fo47 +Pf-5 / Fol	0	a	0.8	a	2	ab
Formulación B / Fol	0	a	0.8	a	2.2	a
LSD $P=.05$ (% mean diff)			1.01 - 1.02 (155%)		1.37 - 2.01 (45%)	
Standard Deviation	0		0.23t		2.98t	
CV	0		128.98t		37.19t	

Altura

Para la variable de altura en plántulas de tomate, existieron diferencias significativas con el control positivo, ya que las plantas tratadas con los biocontroles, incluyendo al control biológico comercial Serenade Soil™ mostraron una menor altura de planta. (Figura 49 y Cuadro 5).

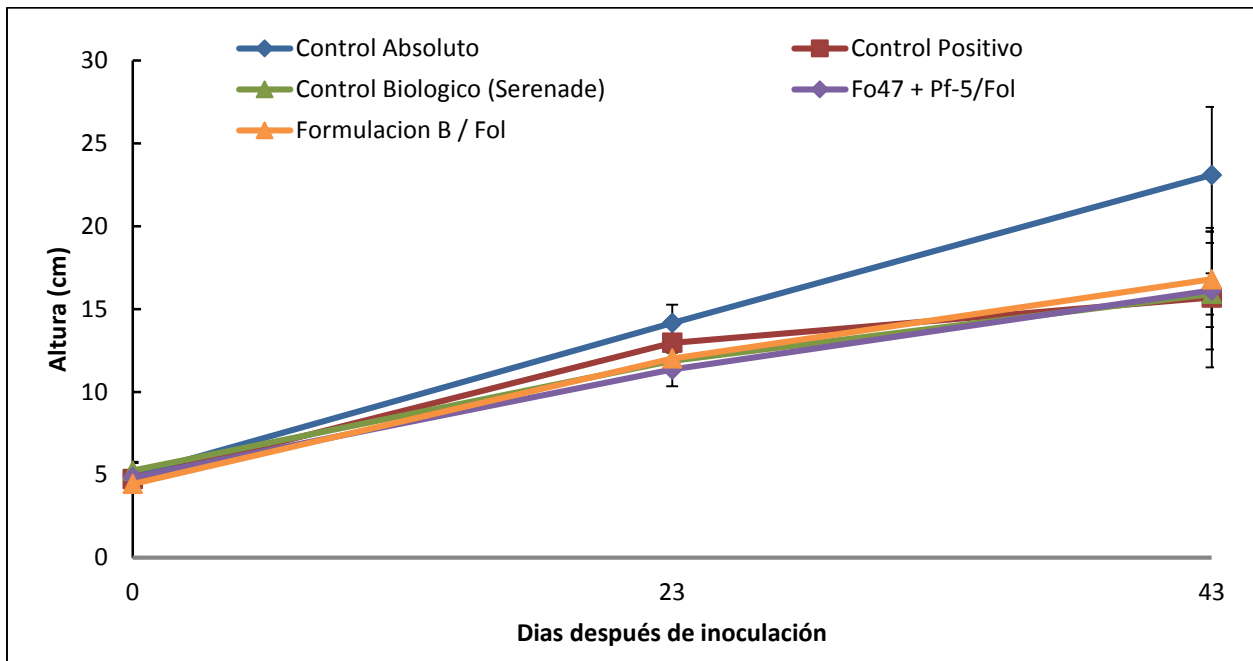


Figura 49. Altura de plántulas de tomate infectadas con Fol, y tratadas con combinaciones de microorganismos benéficos. El experimento se llevó a cabo en invernadero, y cada punto (+ES), representa la media de 6 repeticiones.

Cuadro 5. Comparación de medias para la variable altura de plántulas de tomate expuestas a distintos tratamientos. Las medias seguidas por la misma letra o símbolo no difieren significativamente ($P=0.05$, Duncan's New MRT).

Tratamientos	Dias					
	0		23		43	
Control Absoluto	4.98	a	14.16	a	23.1	a
Control Positivo Fol	4.73	a	12.97	a	19.63	ab
Control Biológico (Serenade)	5.25	a	11.88	a	15.92	b
Fo47 +Pf-5 / Fol	4.85	a	11.35	a	16.13	b
Formulacion B / Fol	4.45	a	12.02	a	16.8	b
LSD $P=0.05$ (% mean diff)	1.450 (30%)		2.161 (20%)		3.772 (26%)	
Standard Deviation	1.204		1.766		3.046	
CV	24.81		16.28		20.86	

Número de Brotes Laterales

El número de brotes laterales presentó diferencias significativas de los tratamientos conteniendo a los biocontroles en comparación con el control positivo (Fol), especialmente para los que contenían a ambos microorganismos benéficos Fo47 y Pf-5 y la formulación B, dichos tratamientos presentaron en promedio un 92.7 y 67.3% mayor producción de brotes laterales que el control positivo (Figura 50 y Cuadro 6).

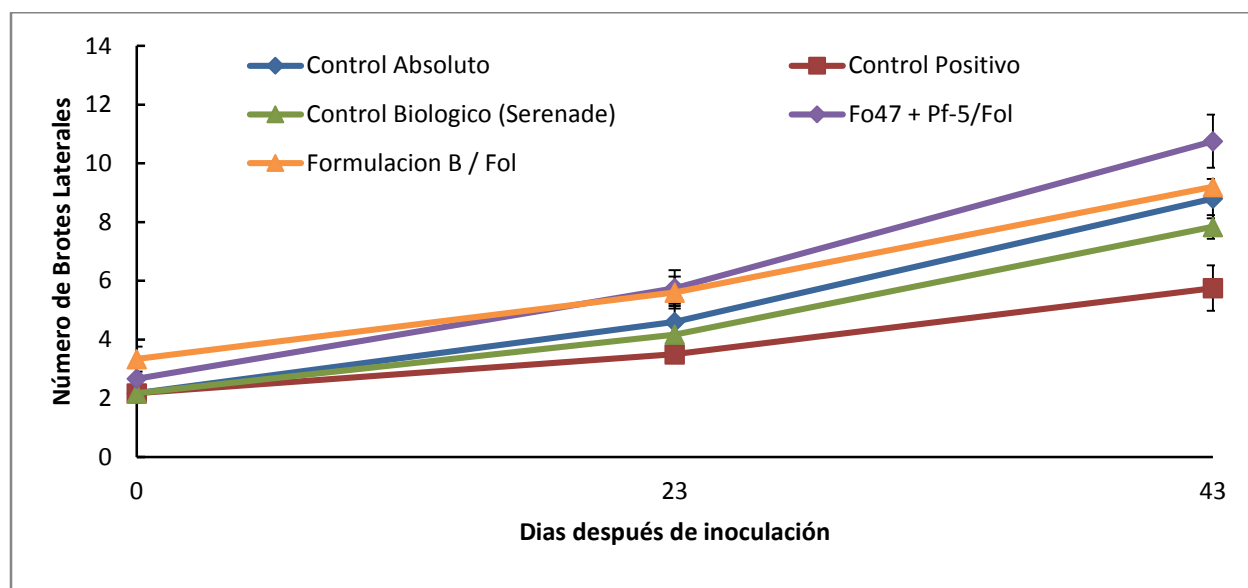


Figura 50. Número de brotes laterales de plántulas de tomate infectadas con Fol, y tratadas con combinaciones de microorganismos benéficos. El experimento se llevó a cabo en invernadero, y cada punto (+ES), representa la media de 6 repeticiones.

Cuadro 6. Comparación de medias para la variable Número de brotes laterales de plántulas de Tomate expuestas a distintos tratamientos. Las medias seguidas por la misma letra o símbolo no difieren significativamente ($P=0.05$, Duncan's New MRT).

Tratamientos	Dias					
	0		23		43	
Control Absoluto	2.1	b	4.4	ab	8.7	a
Control Positivo Fol	2.1	b	3.5	b	5.5	b
Control Biológico (Serenade)	2.2	b	4.1	ab	7.8	a
Fo47 +Pf-5 / Fol	2.6	ab	5.6	a	10.6	a
Formulación B / Fol	3.3	a	5.5	a	9.2	a
LSD $P=0.05$ (% mean diff)	0.76 - 0.81 (13%)		1.17 - 1.38 (16%)		1.74 - 2.45 (14%)	
Standard Deviation	0.18t		0.08t		0.08t	
CV	10.64t		12.9t		10.77t	

Grosor de Tallo, Flores, Frutos

Las variables de grosor de tallo, número de flores y frutos de plántulas no presentaron diferencias significativas en ninguna de las evaluaciones entre los tratamientos aplicados (Cuadros 7, 8 y 9).

Cuadro 7. Comparación de medias para la variable Grosor de tallo de plántulas de Tomate expuestas a distintos tratamientos. Las medias seguidas por la misma letra o símbolo no difieren significativamente (P=.05, Duncan's New MRT).

Tratamientos	Dias					
	0		23		43	
Control Absoluto	0.873	a	1.636	a	2.0695	a
Control Positivo Fol	0.817	a	1.267	a	1.8255	a
Control Biologico (Serenade)	0.802	a	1.695	a	1.9995	a
Fo47 +Pf-5 / Fol	0.812	a	1.38	a	1.6642	a
Formulacion B / Fol	0.84	a	1.63	a	2.055	a
LSD P=.05 (% mean diff)	0.1916 (24%)		0.3281 (25%)		0.29234 - 0.30350	
Standard Deviation	0.1591		0.2681		0.03651t	
CV	19.2		20.3		9.76t	

Cuadro 8. Comparación de medias para la variable Número de Flores de plántulas de Tomate expuestas a distintos tratamientos. Las medias seguidas por la misma letra o símbolo no difieren significativamente (P=.05, Duncan's New MRT).

Tratamientos	Dias					
	0		23		43	
Control Absoluto	0	a	0	a	0	a
Control Positivo Fol	0	a	0	a	0.4	a
Control Biologico (Serenade)	0	a	0	a	0	a
Fo47 +Pf-5 / Fol	0	a	0	a	0.4	a
Formulacion B / Fol	0	a	0	a	0	a
LSD P=.05 (% mean diff)	.		.		0.34 - 0.45 (297%)	
Standard Deviation	0.00t		0.00t		0.10t	
CV	0.0t		0.0t		239.91t	

Cuadro 9. Comparación de medias para la variable Número de Frutos de plántulas de Tomate expuestas a distintos tratamientos. Las medias seguidas por la misma letra o símbolo no difieren significativamente (P=.05, Duncan's New MRT).

Tratamientos	Dias					
	0		23		43	
Control Absoluto	0	a	0	a	0	a
Control Positivo Fol	0	a	0	a	0.3	a
Control Biologico (Serenade)	0	a	0	a	0	a
Fo47 +Pf-5 / Fol	0	a	0	a	0.6	a
Formulacion B / Fol	0	a	0	a	0	a
LSD P=.05 (% mean diff)	.		.		0.65 - 0.94 (560%)	
Standard Deviation	0.00t		0.00t		0.19t	
CV	0.0t		0.0t		452.07t	

7.6 Resultados *In-vivo* en Invernadero

Resultados Primer ensayo en Invernadero

Incidencia

El porcentaje de incidencia no mostró diferencia en las primeras 4 evaluaciones después de la inoculación que causó la enfermedad en las plantas; sin embargo, para la quinta evaluación, las diferencias entre los controles, absoluto y positivo, eran bastante notorias. Para la última evaluación, se manifestaron diferencias significativas para los tratamientos que contenían los biocontroles Fo47 y Pf-5, incluyendo el tratamiento de cultivo puro, como en producto formulado (Formulación B), el cual presentó un nivel de incidencia 45.7 y 47% menor que el control positivo (Fol) respectivamente (Figura 51, Cuadro 10).

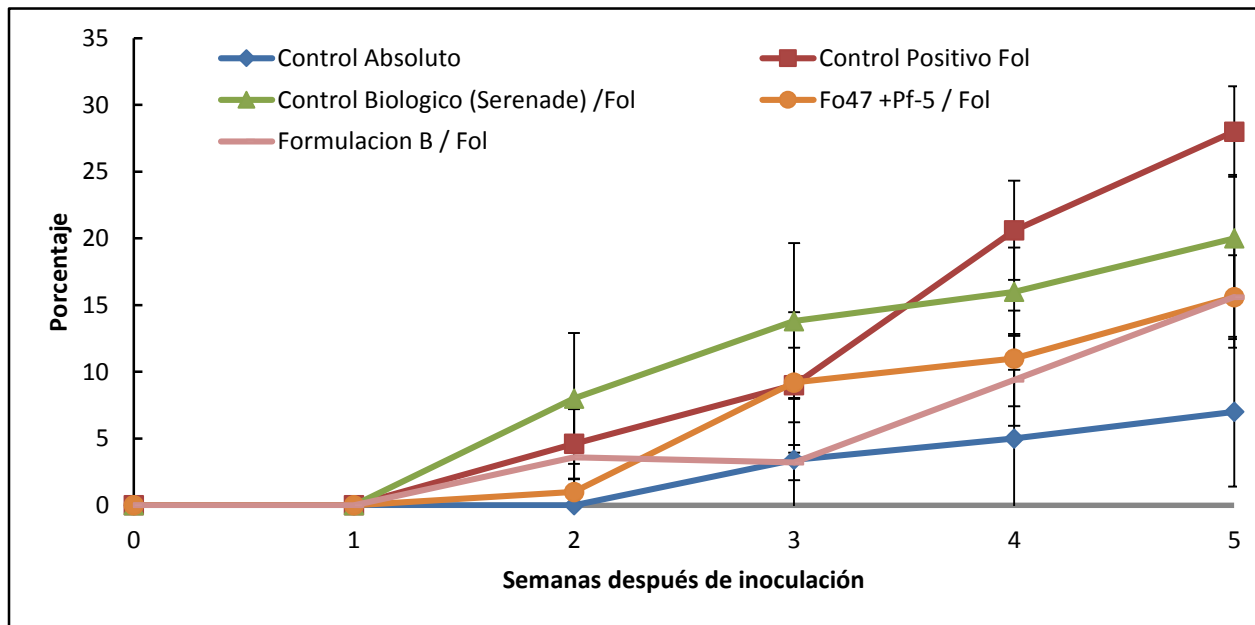


Figura 51. Porcentaje de Incidencia de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* en plantas de tomate. Cada punto representa la media (\pm SE) de 5 repeticiones.

Cuadro 10. Comparación de medias para la variable Porcentaje de Incidencia de Infección por *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* en plantas de Tomate. Las medias seguidas por la misma letra o símbolo no difieren significativamente (P=.05, Duncan's New MRT).

Tratamientos	Semanas											
	0		1		2		3		4		5	
Control Absoluto	0	a	0	a	0	a	1.9	a	3.5	b	6.6	c
Control Positivo Fol	0	a	0	a	2.8	a	7.9	a	20	a	27.6	a
Control Biologico (Serenade) /f	0	a	0	a	2.4	a	8.3	a	15.2	a	18.9	ab
Fo47 +Pf-5 / Fol	0	a	0	a	0.4	a	5.7	a	10.1	ab	15	bc
Formulacion B / Fol	0	a	0	a	0.8	a	2	a	8.2	ab	14.6	bc
LSD P=.05 (% mean diff)					2.90 - 4.74 (210%)		6.77 - 7.58 (76%)		8.05 - 11.15 (44%)		8.14 - 11.62 (31%)	
Standard Deviation	0				0.48t		0.42t		1.11t		0.94t	
CV	0				158.51t		57.64t		33.29t		23.28t	

Severidad

La variable de severidad de la enfermedad mostró datos muy homogéneos hasta la cuarta evaluación, cuando el tratamiento de la Formulaci3n B presentaba una diferencia significativa a todos los dem3s tratamientos, excepto al control absoluto, el cual no fue inoculado con Fol. Para la siguiente semana hasta el final del ensayo no existi3 diferencia significativa con el control absoluto, pero la formulaci3n B continu3 presentando los niveles de severidad m3s bajo comparado con los dem3s tratamientos inoculados con el pat3geno (Figura 52, Cuadro 11)

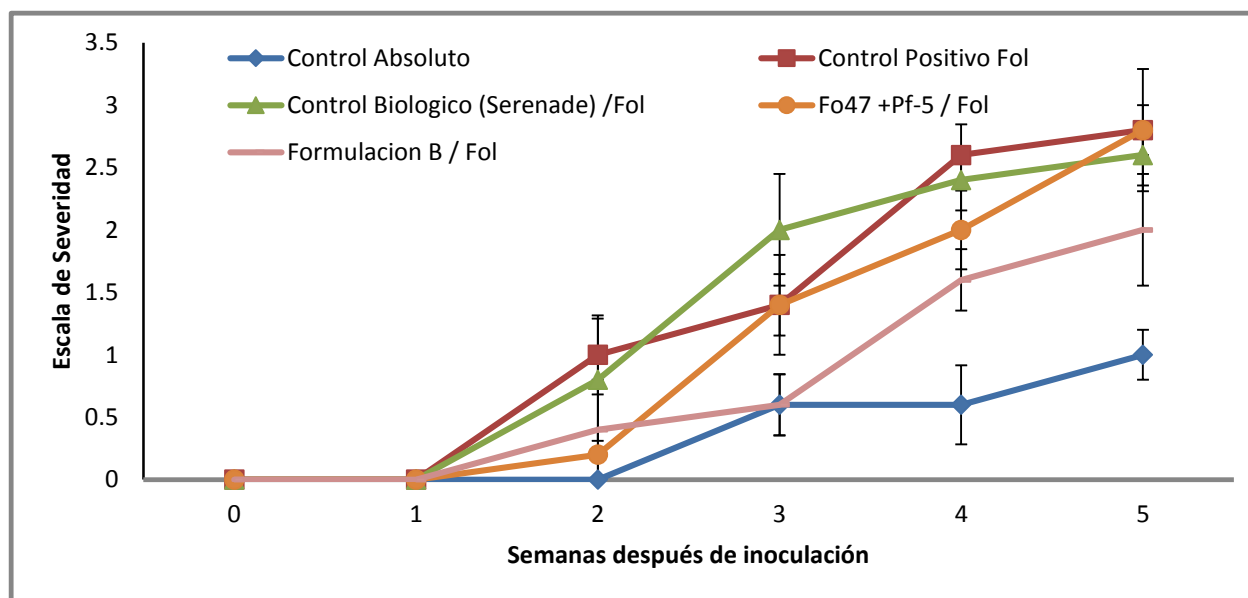


Figura 52. Evaluaci3n de Severidad (0-4) de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* en plantas de tomate. Cada punto representa la media (\pm ES) de 5 repeticiones.

Cuadro 11. Comparación de medias para la variable Severidad de Infección por *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* en plantas de Tomate. Las medias seguidas por la misma letra o símbolo no difieren significativamente (P=.05, Duncan's New MRT).

Tratamientos	Semanas											
	1		2		3		4		5		6	
Control Absoluto	0	a	0	a	0	a	0.4	b	0.5	b	1	b
Control Positivo Fol	0	a	0	a	0.8	a	1.4	ab	2.6	a	2.8	a
Control Biológico (Serenade) /Fol	0	a	0	a	0.3	a	1.9	a	2.4	a	2.6	a
Fo47 +Pf-5 / Fol	0	a	0	a	0	a	1.3	ab	1.9	a	2.8	a
Formulacion B / Fol	0	a	0	a	0.1	a	0.4	b	1.6	a	2	a
LSD P=.05 (% mean diff)					0.75 - 0.80 (186%)		0.98 - 1.22 (57%)		0.58 - 0.99 (33%)		0.97 (44%)	
Standard Deviation	0		0		3.12t		2.43t		0.11t		0.73	
CV	0		0		140.7t		43.3t		25.11t		32.81	

Altura

La altura de las plantas, mostró diferencias entre los tratamientos, sin embargo, no fueron estadísticamente significativas en la mayoría de las evaluaciones realizadas, excepto en la penúltima semana, cuando se detectaron diferencias significativas en comparación con control positivo.

En la última evaluación de las plantas, se observó que los tratamientos que contenían a los biocontroles fueron en promedio 9% más altos que el control absoluto, siendo el tratamiento que contenía a los biocontroles Fo47, Pf-5 y el patógeno Fol el que mostró la máxima altura de planta. (Figura 53, 54 y 55, Cuadro 12).

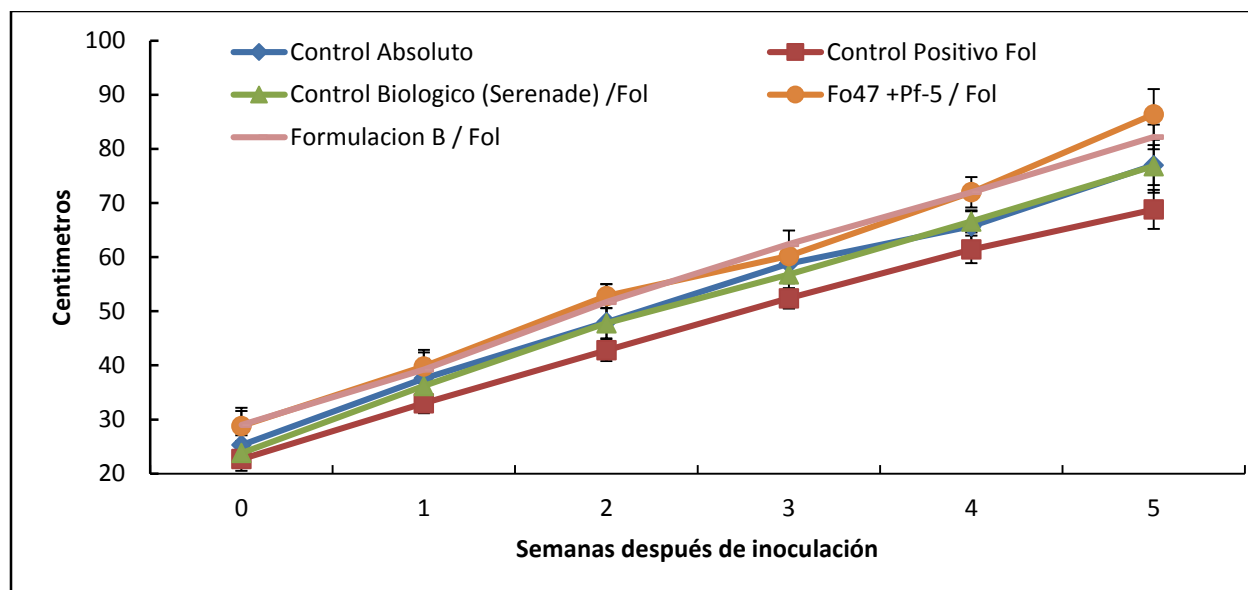


Figura 53. Altura de plantas de tomate infectadas con Fol, y tratadas con combinaciones de microorganismos benéficos. El experimento se llevó a cabo en invernadero, y cada punto (+-ES), representa la media de 5 repeticiones.

Cuadro 12. Análisis de varianza para la variable Altura de plantas de Tomate expuestas a distintos tratamientos. Las medias seguidas por la misma letra o símbolo no difieren significativamente ($P=0.05$, Duncan's New MRT).

Tratamientos	Semanas											
	1		2		3		4		5		6	
Control Absoluto	25.3	a	37.6	a	47.66	a	58.6	a	65.59	ab	76.8	a
Control Positivo F	22.7	a	33	a	42.7	a	52.3	a	61.29	b	68.6	a
Control Biologico	23.8	a	36.2	a	47.63	a	56.7	a	66.54	ab	76.5	a
Fo47 +Pf-5 / Fol	28.8	a	39.8	a	52.7	a	60.2	a	71.89	a	86.1	a
Formulacion B / Fc	29	a	39.2	a	51.49	a	62.3	a	71.99	a	82.1	a
LSD $P=0.05$ (% mean)	9.363 (36%)		10.17 (28%)		9.679 - 9.709 (10%)		8.02 - 8.15 (7%)		7.355 - 7.535 (6%)		11.62 - 12.05 (8%)	
Standard Deviation	6.983		7.59		0.521t		0.40t		0.339t		0.50t	
CV	26.94		20.41		7.46t		5.19t		4.12t		5.66t	



1

2

3

4

5

Figura 54. Plantas de Tomate sometidas a distintos tratamientos. T1. Control absoluto, T2. Control positivo (Fol), T3. Control Biológico (Serenade Soil™, T4. Fo47+Pf-5 / Fol, T5. Formulacion B.



Frutos

Figura 55. Plantas de tomate infectadas con el patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (izquierda) tratada con la formulación B a base de Fo47 y Pf-5, (derecha) tratada con el control químico comercial Actigard™

El número de frutos se mantuvo muy homogéneo en todos los tratamientos durante las evaluaciones, desde la inoculación, hasta la quinta semana, a partir de la cual el tratamiento de la formulación B, fue estadísticamente diferente a todos los tratamientos, incluyendo al control absoluto, ya que presentó un 45.5% más de frutos cuando se compara con el control positivo (Fol) (Figura 56, Cuadro 13).

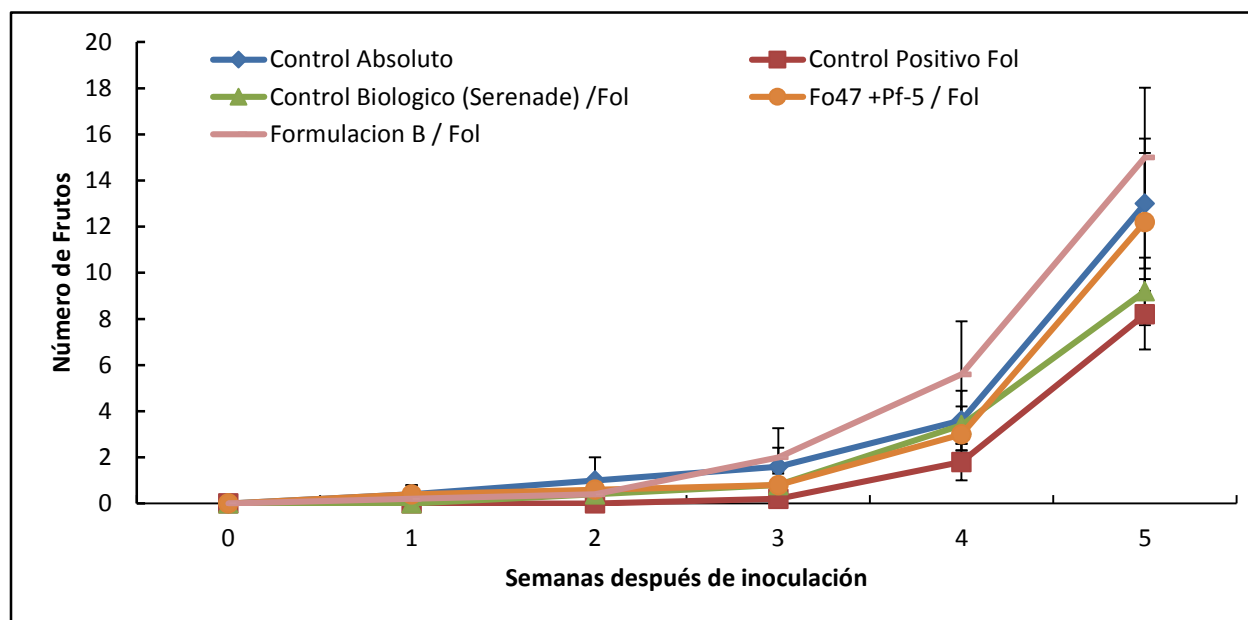


Figura 56. Número de frutos en plantas de tomate infectadas con Fol, y tratadas con combinaciones de microorganismos benéficos. El experimento se llevó a cabo en invernadero, y cada punto (\pm SE), representa la media de 5 repeticiones.

Cuadro 13. Análisis de varianza para la variable Número de frutos de plantas de Tomate infectadas con Fol, y tratadas con combinaciones de microorganismos benéficos. Las medias seguidas por la misma letra o símbolo no difieren significativamente ($P=0.05$, Duncan's New MRT).

Tratamientos	Semanas											
	0	1	2	3	4	5	6	0	1	2	3	4
Control absoluto	0	a	0.4	a	0.2	a	1.1	a	3	a	12.1	ab
Control positivo	0	a	0	a	0	a	0.1	a	1.3	a	7.6	b
Control biológico	0	a	0	a	0.1	a	0.5	a	3.1	a	8.8	b
Fo47 + Pf5 / Fol	0	a	0.4	a	0.2	a	0.6	a	2.7	a	10.9	b
Formulación B	0	a	0.2	a	0.1	a	1.3	a	3.9	a	17.6	a
LSD $P=0.05$ (% mean)			0.59 (393%)		1.45 - 99999.24 (320%)		1.36 - 1.67 (175%)		2.89 - 3.34 (70%)		4.24 - 6.18 (17%)	
Standard Deviation		0	0.43	4.09t		0.29t		0.29t		0.13t		
CV		0	285.45	237.64t		130.77t		51.93t		12.1t		

Grosor de Tallo, Número de brotes laterales y Flores

Para estas variables no hubo diferencia significativa en ninguna de las evaluaciones realizadas, pero cabe mencionar que en grosor de tallo los tratamientos que contenían los biocontroles Fo47 y Pf-5 mostraron los valores más altos.

El tratamiento a base de Fo47, Pf-5 y Fol consiguió alcanzar un 15% más brotes laterales que el control absoluto y un número de flores 87% mayor al control absoluto; por su parte la formulación B presentó un 58% más número de flores, en comparación con el control absoluto (Cuadros 14, 15 y 16).

Cuadro 14. Comparación de medias para la variable de grosor de tallo de plantas de Tomate infectadas con Fol, y tratadas con combinaciones de microorganismos benéficos. Las medias seguidas por la misma letra o símbolo no difieren significativamente (P=.05, Duncan's New MRT)

Tratamientos	Semanas											
	1		2		3		4		5		6	
Control Absoluto	2.5	a	2.736	a	2.911	a	2.843	a	2.584	a	3.05	a
Control Positivo Fol	2.3	a	2.812	a	2.917	a	3.028	a	2.62	a	3.029	a
Control Biológico (S)	2.12	a	2.608	a	2.793	a	2.964	a	2.631	a	2.891	a
Fo47 +Pf-5 / Fol	2.62	a	2.569	a	3.14	a	3.285	a	2.794	a	3.188	a
Formulacion B / Fol	2.48	a	2.544	a	2.712	a	3.472	a	2.75	a	3.05	a
LSD P=.05 (% mean dif)	0.671 (28%)		0.25313 (10%)		0.4128 - 0.4137 (7)		0.5264 - 0.5335 (8)		0.4046 - 0.4175 (7)		0.3720 - 0.3760 (6)	
Standard Deviation	0.5		0.1888		0.0833t		0.1034t		0.0859t		0.0741t	
CV	20.82		7.11		4.52t		5.44t		4.82t		3.94t	

Cuadro 15. Análisis de varianza para la variable de número de brotes laterales de plantas de Tomate infectadas con Fol, y tratadas con combinaciones de microorganismos benéficos. Las medias seguidas por la misma letra o símbolo no difieren significativamente (P=.05, Duncan's New MRT)

Tratamientos	Semanas											
	1		2		3		4		5		6	
Control Absoluto	8.2	a	14.6	a	24.8	a	25.7	a	27.7	a	38.1	a
Control Positivo Fol	7	a	14.2	a	21.9	a	22.3	a	27.8	a	35.7	a
Control Biológico (S)	7.4	a	15.4	a	23.2	a	24.2	a	30.1	a	42.6	a
Fo47 +Pf-5 / Fol	9.4	a	16	a	26.1	a	26.8	a	31.9	a	43.8	a
Formulacion B / Fol	10	a	15.2	a	25.3	a	27.9	a	32.4	a	37.9	a
LSD P=.05 (% mean dif)	3.00 (36%)		3.50 (24%)		4.59 - 4.63 (10%)		4.59 - 4.68 (9%)		5.28 - 5.33 (9%)		6.73 - 6.84 (9%)	
Standard Deviation	2.24		2.61		0.35t		0.34t		0.36t		0.40t	
CV	26.62		17.31		6.98t		6.73t		6.5t		6.31t	

Cuadro 16. Comparación de medias para la variable de número de flores de plantas de Tomate infectadas con Fol, y tratadas con combinaciones de microorganismos benéficos. Las medias seguidas por la misma letra o símbolo no difieren significativamente (P=.05, Duncan's New MRT)

Tratamientos	Semanas											
	1		2		3		4		5		6	
Control absoluto	2.6	a	4.2	a	6.3	a	9.8	a	10.6	a	12.2	a
Control positivo Fol	0	a	2.4	a	3.2	a	6.3	a	11.3	a	16.9	a
Control biológico (Se)	1.8	a	3	a	3.4	a	6.2	a	11.4	a	21.9	a
Fo47 + Pf5 / Fol	2.2	a	3	a	6.1	a	9.4	a	12.2	a	22.8	a
Formulación B / Fol	3	a	4.8	a	4.7	a	7.8	a	17.3	a	19.3	a
LSD P=.05 (% mean diff)	2.73 (142%)		3.78 (109%)		4.79 - 6.09 (60%)		3.00 - 3.17 (17%)		7.01 - 7.18 (19%)		11.90 - 13.09 (24%)	
Standard Deviation	2.03		2.82		5.55t		0.11t		0.16t		0.22t	
CV	105.91		81.07		44.43t		12.02t		13.89t		17.43t	

Análisis de Resultados en Peso Seco

Planta

El peso total de planta fue afectado por los tratamientos, obteniéndose reducción en la materia seca total en todos los tratamientos respecto al testigo, siendo este el tratamiento que mostro los valores más altos (Cuadro 17). Los tratamientos que mostraron mayor acumulación de materia seca fueron los que incluyeron los biocontroles en presencia del patógeno, aunque mostrando una disminución de 15.3% con respecto al control absoluto y la menor acumulación correspondió al control químico con una reducción del 75.8% en acumulación de biomasa. La formulación B produjo 10% más materia seca que el testigo comercial (Serenade Soil™) (Figura 57).

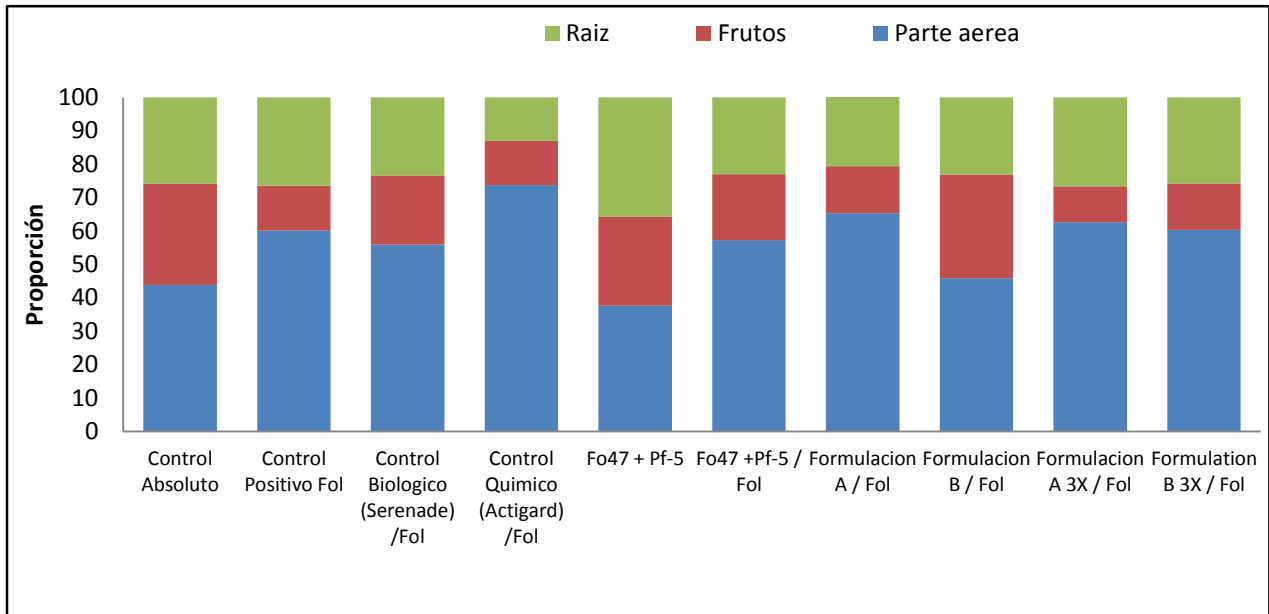


Figura 57. Porcentaje de materia seca en parte aérea, frutos y raíz de plantas de tomate infectadas con *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y tratadas con microorganismos benéficos.

Cuadro 17. Comparación de medias para los pesos secos de la parte aérea, frutos y raíces de plantas de Tomate infectadas con Fol, y tratadas con combinaciones de microorganismos benéficos. Las medias seguidas por la misma letra o símbolo no difieren significativamente (P=.05, Duncan's New MRT).

Tratamientos	Peso Seco (g)					
	Parte aerea		Frutos		Raíces	
Control Absoluto	23.685	a	10.353	a	16.698	a
Control Positivo	26.045	a	2.649	a	11.44	a
Control Biologico (Serenade)	27.388	a	8.251	a	10.515	a
Fo47 + Pf-5/ Fol	30.845	a	7.875	a	12.033	a
Formulacion B / Fol	25.788	a	11.859	a	13.678	a
LSD P=.05 (% mean diff)	8.0410 (30%)		11.2097 - 24.7991 (96%)		7.4555 (58%)	
Standard Deviation	5.2192		0.6652t		4.8392	
CV	19.51		71.67t		37.59	

Frutos

En el primer set de experimentos en el invernadero, en las variables de peso seco para frutos las plantas tratadas con el Control químico Actigard mostraron pesos similares a los del control positivo (Fol), mientras que las plantas tratadas con los microorganismo benéficos (Fo47 y Pf-5-5), mostraron 19% menos frutos, con respecto a las plantas no tratadas (Blanco). Fue notorio que las plantas tratadas con la formulación B e infectadas con el patógeno mostraron un incremento del 12.7% en su peso seco con respecto al blanco. Cuando los biocontroles se aplicaron en cultivo puro, produjeron una biomasa de fruto 21.5% menor, en comparación con el control absoluto; mientras que cuando se aplicaron con inertes en la formulación B, se produjo una biomasa de frutos de 12.7% mayor a la producida por el control absoluto (Cuadro 17).

Raíz

Las plantas infectadas únicamente con Fol presentaron una reducción del 31.5% de peso seco de raíz, en comparación al testigo absoluto, mientras que el tratamiento de control químico mostró una reducción del 80%. Por lo contrario, el tratamiento de aplicación de los biocontroles solamente, presentó un incremento de 11.2% en el peso seco de la raíz, con respecto al control absoluto.

La mejor respuesta de peso seco de raíz a los biocontroles en presencia del patógeno se dio con la formulación B, la cual mostró una reducción del 18.1% comparado con el control absoluto y un 19.6% de incremento al compararlo con el control positivo que contiene solo el patógeno. El testigo biológico comercial Serenade Soil™ presentó una reducción del peso seco de raíces con respecto al control absoluto (37%), y al control positivo (8.1%). Por otra parte, la formulación B fue superior al control biológico comercial, al producir 23.1% mayor masa radicular.

El incremento en la dosis de las formulaciones A y B, no influyó en significativamente en el peso de las raíces (Cuadro 17).

Relación Raíz/Parte aérea

La relación raíz/parte aérea de la planta seca muestra que la aplicación de los biocontroles induce una mayor proporción de materia seca en la raíz, en relación con la parte aérea. En presencia del patógeno la proporción disminuyó 16.6% en comparación al control absoluto, mientras que en los tratamientos de biocontroles incluyendo Fol, se disminuyó 27.4%; no obstante la formulación B no siguió esta tendencia, reduciendo la proporción solamente en 13.6%, con respecto al control absoluto.

El control químico (Actigard™) mostró una reducción del 68.3% con respecto al control absoluto.

Resultados Segundo Ensayo en Invernadero

Incidencia

El porcentaje de incidencia de infección en planta mostró diferencias significativas respecto al control positivo (Fol) hasta la cuarta evaluación, siempre con una tendencia de la formulación B a presentar resultados similares al control absoluto. Para la última evaluación, los tratamientos que incluían los biocontroles Fo47 y Pf-5 mostraron diferencia significativa con el control absoluto y el control positivo; para el tratamiento con Serenade Soil™ no se presentaron diferencias significativas con el control positivo (Figura 58, Cuadro 18).

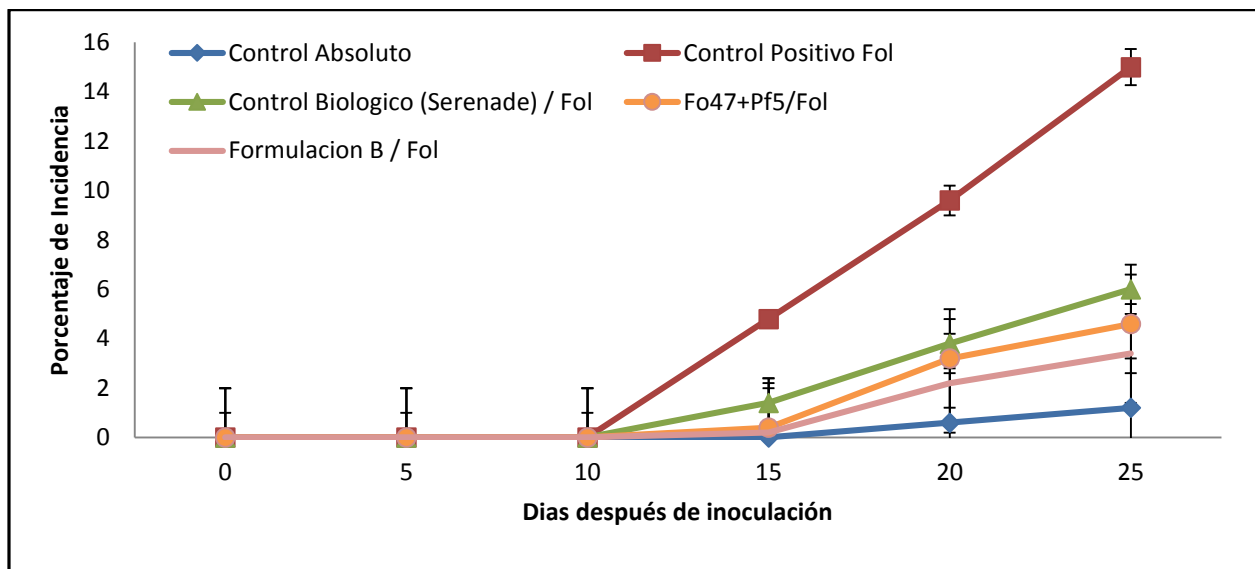


Figura 58. Porcentaje de Incidencia de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* en el segundo ensayo de plantas de tomate. Cada punto representa la media (\pm ES) de 5 repeticiones.

Cuadro 18. Comparación de medias para la variable Porcentaje de Incidencia de Infección por *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* en el segundo ensayo de plantas de Tomate. Las medias seguidas por la misma letra o símbolo no difieren significativamente (P=.05, Duncan's New MRT).

Tratamientos	Dias											
	0		5		10		15		20		25	
Control absoluto	0	a	0	a	0	a	0	b	0.3	b	0.7	c
Control positivo (Fol)	0	a	0	a	0	a	3.2	a	7.3	a	12.3	a
Control Biologico Serenade	0	a	0	a	0	a	0.5	ab	2.6	a	6.6	ab
Fo47 + Pf-5 / Fol	0	a	0	a	0	a	0.2	b	2.9	a	4.5	b
Formulacion B	0	a	0	a	0	a	0	b	2.2	ab	3.2	b
LSD P=.05 (% mean diff)	.		.		.		1.84 - 2.80 (188%)		2.01 - 5.00 (75%)		1.96 - 7.03 (46%)	
Standard Deviation	0		0		0.00t		5.02t		0.30t		0.24t	
CV	0		0		0.0t		139.85t		55.91t		33.82t	

Severidad

La severidad de la infección, al igual que la incidencia empezó a mostrar signos representativos de la enfermedad causada por el patógeno Fol a los 15 días después de la inoculación, sin presentar diferencias significativas entre tratamientos; a los 20 y 25 días; las diferencias significativas que se presentaron fueron solo con el control absoluto. El resto de los tratamientos, incluyendo el control positivo mostraron una severidad similar (Figura 59, Cuadro 19).

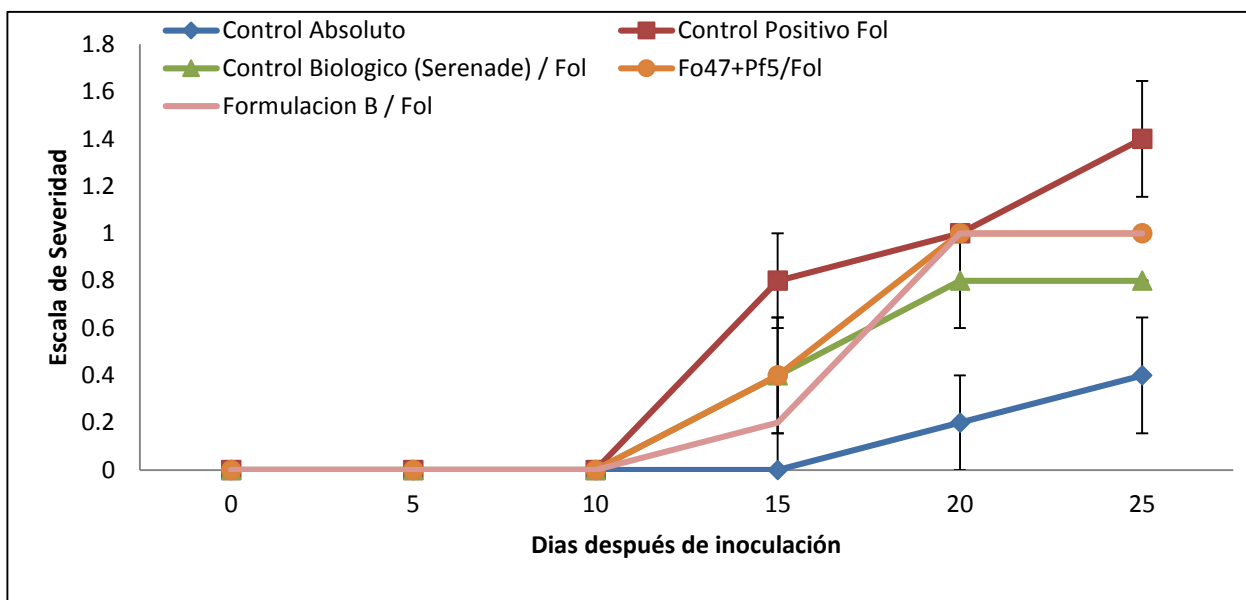


Figura 59. Severidad de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* en el segundo ensayo de plantas de tomate. Cada punto representa la media (\pm ES) de 5 repeticiones.

Cuadro 19. Análisis de varianza para la variable de Severidad de Infección por *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* en el segundo ensayo de plantas de Tomate. Las medias seguidas por la misma letra o símbolo no difieren significativamente (P=.05, Duncan's New MRT).

Tratamientos	Días											
	0		5		10		15		20		25	
Control absoluto	0	a	0	a	0	a	0	a	0.1	b	0.4	b
Control positivo (Fol)	0	a	0	a	0	a	0.6	a	1	a	1.4	a
Control Biologico Serenade	0	a	0	a	0	a	0.2	a	0.7	a	1	a
Fo47 + Pf-5 / Fol	0	a	0	a	0	a	0.2	a	1	a	1	a
Formulacion B	0	a	0	a	0	a	0	a	1	a	1	a
LSD P=.05 (% mean diff)							0.62 - 0.69 (182%)		0.33 - 0.45 (46%)		0.52 (55%)	
Standard Deviation	0		0		0.00t		2.81t		0.08t		0.38	
CV	0		0		0.0t		136.08t		34.23t		39.62	

Altura

La altura de planta presentó diferencias significativas solo en las evaluaciones de los días 10 y 15, en donde el tratamiento conformado por la formulación B fue significativamente más alto que el resto de los tratamientos. Para la última evaluación, se pudo observar que los tratamientos a base de los biocontroles presentaron un 21.8 y 30.6% mayor altura respecto al testigo, siendo los tratamientos: Fo47 y Pf-5 con Fol y la formulación B, respectivamente (Figura 60, Cuadro 20).

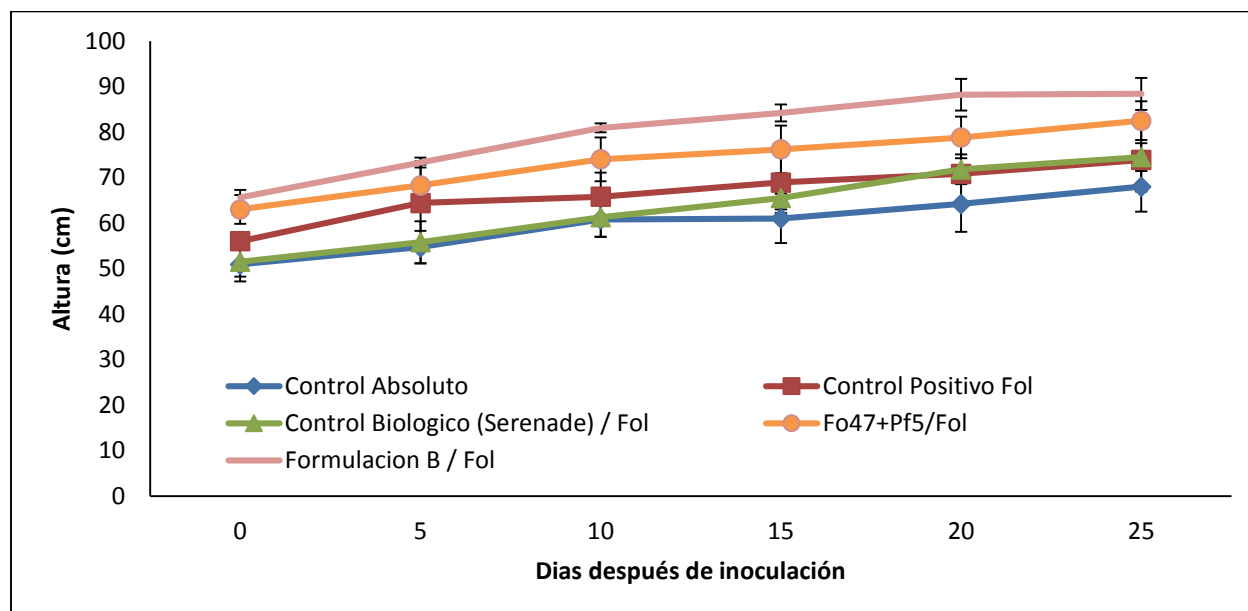


Figura 60. Altura de plantas de tomate infectadas con Fol, del segundo ensayo y tratadas con combinaciones de microorganismos benéficos. El experimento se llevó a cabo en invernadero, y cada punto (+-ES), representa la media de 5 repeticiones.

Cuadro 20. Análisis de varianza para la variable Altura del segundo ensayo de plantas de Tomate expuestas a distintos tratamientos. Las medias seguidas por la misma letra o símbolo no difieren significativamente (P=.05, Duncan's New MRT).

Tratamientos	Días											
	0		5		10		15		20		25	
Control absoluto	50.9	a	54.7	a	60.57	b	59.49	b	63.6	a	67.57	a
Control positivo (Fol)	56	a	64.4	a	65.41	b	68.43	ab	70.2	a	73.27	a
Control Biológico Serenade	51.5	a	55.8	a	60.97	b	65.33	b	71.6	a	74.37	a
Fo47 + Pf-5 / Fol	63	a	68.3	a	73.69	ab	75.83	ab	78.5	a	82.28	a
Formulación B	65.6	a	73.3	a	80.89	a	84.16	a	88.1	a	88.26	a
LSD P=.05 (% mean diff)	13.473 (24%)		19.251 (32%)		13.295 - 13.939 (10%)		15.197 - 16.178 (11%)		16.87 - 17.69 (12%)		16.100 - 16.556 (11%)	
Standard Deviation	10.049		13.97		0.603t		0.690t		0.74t		0.689t	
CV	17.51		22.98		7.28t		8.2t		8.56t		7.83t	

Grosor de tallo, Número de Brotes, Flores, Frutos

Para estas variables no se presentaron diferencias significativas en ninguna de las evaluaciones realizadas (Cuadro 21, 22, 23 y 24)

Cuadro 21. Comparación de medias para la variable grosor de tallo del segundo ensayo en plantas de Tomate expuestas a distintos tratamientos. Las medias seguidas por la misma letra o símbolo no difieren significativamente (P=.05, Duncan's New MRT).

Tratamientos	Días											
	0		5		10		15		20		25	
Control absoluto	1.876	a	2.08	a	2.108	a	2.251	a	2.287	a	2.387	a
Control positivo (Fol)	2.26	a	2.21	a	2.147	a	2.416	a	2.36	a	2.42	a
Control Biológico Serenade	2.252	a	2.09	a	2.199	a	2.446	a	2.492	a	2.578	a
Fo47 + Pf-5 / Fol	2.55	a	2.42	a	2.639	a	2.87	a	2.9	a	3.009	a
Formulación B	2.33	a	2.29	a	2.315	a	2.588	a	2.565	a	2.565	a
LSD P=.05 (% mean diff)	0.6387 (29%)		0.4669 (22%)		0.5354 - 0.5359 (10%)		0.5071 - 0.5161 (9%)		0.6011 - 0.6023 (10%)		0.5923 - 0.5949 (10%)	
Standard Deviation	0.4764		0.3388		0.1180t		0.1092t		0.1277t		0.1239t	
CV	21.14		15.4		7.08t		6.29t		7.35t		7.05t	

Cuadro 22. Comparación de medias para la variable de número de brotes laterales del segundo ensayo en plantas de Tomate expuestas a distintos tratamientos. Las medias seguidas por la misma letra o símbolo no difieren significativamente (P=.05, Duncan's New MRT).

Tratamientos	Días											
	0		5		10		15		20		25	
Control absoluto	11.2	a	12.2	a	13.1	a	14.9	a	17.1	a	19.7	a
Control positivo (Fol)	11	a	12.8	a	13.6	a	15.1	a	16.6	a	18.2	a
Control Biológico Serenade	12.4	a	14	a	16.8	a	17.6	a	22.5	a	25	a
Fo47 + Pf-5 / Fol	13	a	13.6	a	17.9	a	17.9	a	22	a	25.6	a
Formulación B	10.8	a	13	a	15.9	a	17.2	a	18.8	a	18.8	a
LSD P=.05 (% mean diff)	4.19 (36%)		4.77 (37%)		5.18 - 5.23 (17%)		5.55 - 6.02 (18%)		8.06 - 8.56 (21%)		7.80 - 7.88 (18%)	
Standard Deviation	3.13		3.46		0.49t		0.53t		0.69t		0.62t	
CV	26.78		26.34		12.2t		12.75t		15.58t		13.27t	

Cuadro 23. Comparación de medias para la variable de número de flores del segundo ensayo en plantas de Tomate expuestas a distintos tratamientos. Las medias seguidas por la misma letra o símbolo no difieren significativamente (P=.05, Duncan's New MRT).

Tratamientos	Dias											
	0		5		10		15		20		25	
Control absoluto	3.4	a	4.4	a	2.4	bc	2.8	a	4	a	5	a
Control positivo (Fol)	3.2	a	3.2	a	1.8	c	4	a	4.2	a	4.6	a
Control Biológico Serenade	5	a	5	a	4.6	ab	5.6	a	4.6	a	5.2	a
Fo47 + Pf-5 / Fol	5.2	a	4	a	4.2	ab	2	a	4.8	a	6.4	a
Formulación B	3.6	a	4.4	a	4.8	a	5.8	a	7	a	7	a
LSD P=.05 (% mean diff)	2.10 (52%)		1.99 (48%)		2.13 (60%)		4.04 (100%)		4.66 (95%)		4.63 (82%)	
Standard Deviation	1.57		1.48		1.59		3.01		3.47		3.45	
CV	38.44		35.32		44.55		74.63		70.58		61.2	

Cuadro 24. Comparación de medias para la variable de número de frutos del segundo ensayo en plantas de Tomate expuestas a distintos tratamientos. Las medias seguidas por la misma letra o símbolo no difieren significativamente (P=.05, Duncan's New MRT).

Tratamientos	Dias											
	0		5		10		15		20		25	
Control absoluto	1.6	a	2.2	a	1.9	a	1.9	a	1.9	a	2.8	a
Control positivo (Fol)	2.2	a	2.6	a	2.1	a	2.6	a	3	a	3.1	a
Control Biológico Serenade	1	a	1.4	a	1.9	a	1.7	a	2.8	a	3.9	a
Fo47 + Pf-5 / Fol	2.4	a	2.8	a	3.1	a	3.7	a	3.9	a	4.9	a
Formulación B	1	a	1.4	a	2.2	a	1.8	a	1.8	a	1.8	a
LSD P=.05 (% mean diff)	1.78 (109%)		2.14 (95%)		2.37 - 3.03 (47%)		2.77 - 3.30 (51%)		2.53 - 2.71 (42%)		1.96 - 2.27 (29%)	
Standard Deviation	1.33		1.55		0.58t		0.64t		0.54t		0.41t	
CV	81.01		69.09		35.22t		38.22t		30.74t		21.35t	

7.7 Confirmación de presencia del patógeno en el sustrato

Las muestras del aislamiento del patógeno Fol, obtenidas del sustrato de las macetas que contenían las unidades experimentales (plantas de tomate) con sus respectivos tratamientos, presentaron resultados confirmando la presencia del patógeno en proporciones acordes con las variables de incidencia y severidad de la enfermedad anteriormente descrita.

Se determinó que los tratamientos que contenían a los microorganismos benéficos, obtuvieron un número mucho menor de colonias del patógeno, en comparación a los demás tratamientos.

El tratamiento a base de Fo47 y Pf-5 mostró un 3.44 Log₁₀ UFC menos que el control positivo, sin embargo, este no fue inoculado con el patógeno Fol; el tratamiento de la formulación B contó con la menor presencia de colonias del patógeno, considerando que esté fue inoculado con Fol, con un 2.65 Log₁₀ UFC menor que el tratamiento positivo.

El resto de los tratamientos, incluyendo el control biológico Serenade Soil™ y el control químico Actigard™, presentaron en promedio una reducción de 1.6 Log₁₀ UFC menor que el control positivo. (Figura 61y 62)

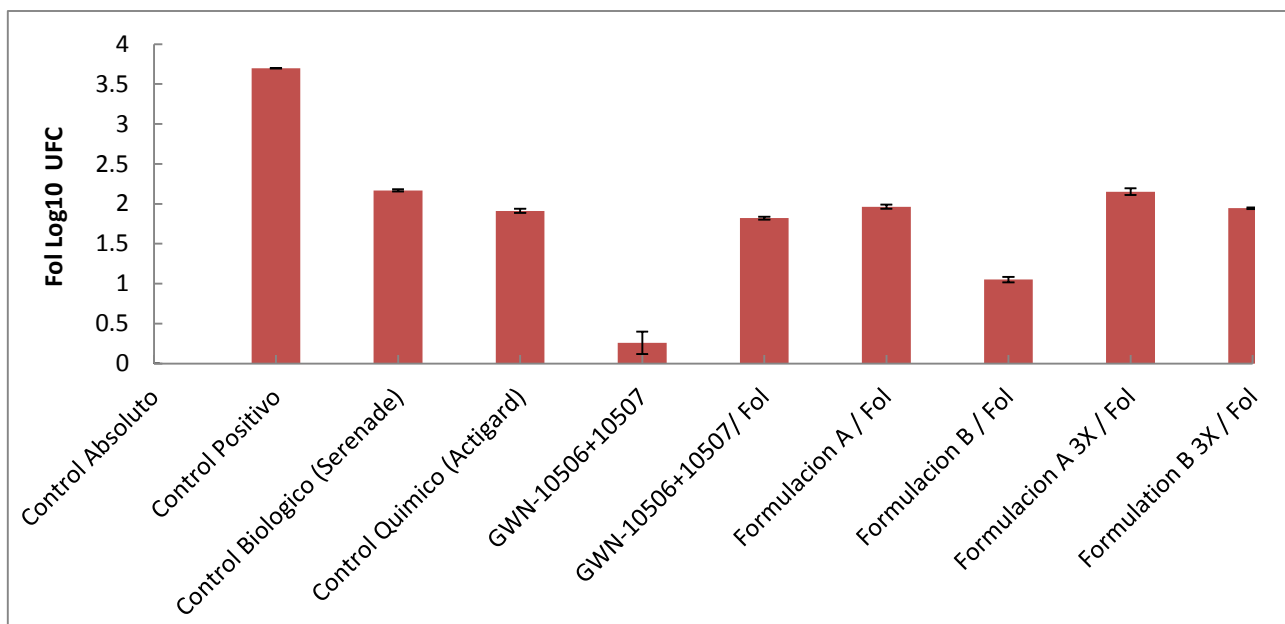


Figura 61. Presencia del patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en muestras de sustrato de macetas que contenían plantas de tomate tratadas con el patógeno y microorganismos benéficos. Cada punto representa la media (\pm SE) de 3 repeticiones.

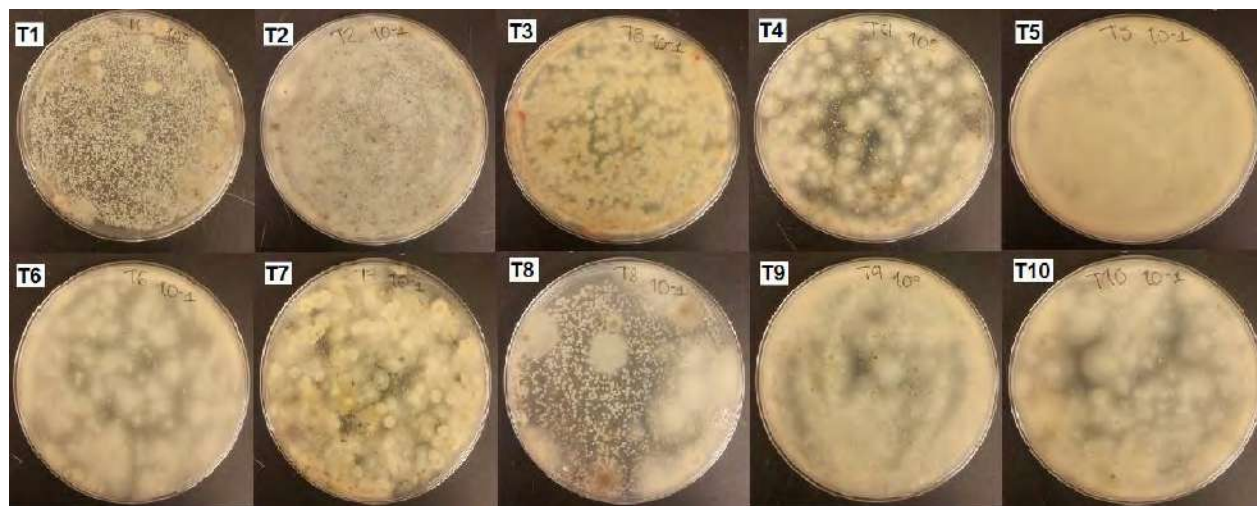


Figura 62. Cajas de Petri conteniendo el medio selectivo Komada en los distintos tratamientos mostrando el aislamiento del patógeno Fol, del suelo donde crecieron las plantas. T1. Control absoluto, T2. Control positivo (Fol), T3. Control biológico (Serenade Soil™), T4. Control químico (Actigard™), T5. Fo47+Pf-5, T6. Fo47+Pf-5 / Fol, T7. Formulación A / Fol, T8. Formulación B / Fol, T9. Formulación A 3X / Fol, T10. Formulación B 3X / Fol. Las mediciones se replicaron tres veces. Se presenta una imagen representativa de cada tratamiento.

10. DISCUSIÓN

El control biológico es considerado como una alternativa para reducir la enfermedad de la marchitez causada por *Fusarium*.

Varios investigadores han reportado que la cepa Pf-5 *Pseudomonas fluorescens* es efectiva para reducir la incidencia de varios patógenos de suelo ya que contiene una poderosa variedad de compuestos antimicrobianos, la capacidad de inducir resistencia sistémica en plantas y además tiene la característica de promover el crecimiento y por lo tanto, incrementar el valor económico del fruto (Aime, et al 2013, Gillardi, et al 2007, Kaur, et al., 2003, Sandhu, 2001, Srinivasan, et. al, 2009, Glick, 2014)

P. fluorescens redujo significativamente la marchitez por *Fusarium* con una disminución del 30-65 % de la enfermedad, pero no eran tan consistentemente eficaz como los aislados de *Fusarium* no patógenas (Larkin et al., 1998).

Alabouvette, 2004 ha estudiado la cepa no patogénica de *Fusarium oxysporum* Fo47 durante 30 años y ha encontrado que controla eficientemente los marchitamientos causados por *Fusarium* en melón, tomate, esparrago, lino, clavel y ciclamen; el mismo autor ha demostrado que esta cepa no patogénica cuando es aplicada en el suelo previamente o mezclada con una el patógeno protege a la planta contra esta forma especialis.

Se ha descubierto que la expresión de algunos genes relacionados con la defensa se sobre expresa en la raíz de tomate cuando la inoculación con Fo47 es seguido por la inoculación del patógeno Fol.

El uso de una cepa mutante resistente al fungicida químico benomyl permitió demostrar que Fo47 es adaptable en suelos de diferentes características físico-químicas, a diferentes temperaturas y distintos potenciales hídricos. Sin embargo, su introducción en el suelo no tiene efectos sobre las comunidades microbianas nativas, por lo que su utilización no presenta ningún riesgo en relación a los efectos sobre organismo no objetivo del suelo.

La asociación de las cepas de *Fusarium* no patogénico y *Pseudomonas spp* suprime el marchitamiento causado por *Fusarium* de manera más eficiente y consistente que de cada microorganismo antagonista separado (Lemanceau et al, 1992).

Kaur, et al., 2007 encontró que la combinación de tratamientos que incluyen *Fusarium* no patogénico y *Pseudomonas spp.*, funcionaron adecuadamente en reducir la enfermedad de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* presentando solo un porcentaje de incidencia de la enfermedad de 0-4%, comparado con el control positivo que presentó un 10%.

Se observó una mayor eficacia en controlar la enfermedad cuando los biocontroles Fo47 y Pf-5 se encontraban suspendidos en una formulación con inertes aprobados.

El desarrollo de una formulación apropiada que permita el almacenamiento, la manipulación y la aplicación con éxito de los propágulos fúngicos determinará el éxito en aplicaciones agrícolas. Como *Fusarium* no patogénico es capaz de atacar en las primeras etapas de desarrollo de Fol, una aplicación en pre siembra en el suelo es el más adecuado para la aplicación del antagonista de hongos a su objetivo (Mamdouh M Nemat, et al 2008).

Ensayos in-vitro

Para estos ensayos se obtuvieron resultados similares a los expresados por Sarker, et al., 2013 en donde ambos biocontroles tuvieron una gran inhibición del patógeno cuando fueron evaluados por el método de cultivo dual, por medio de siembra en la superficie e incorporada.

En las evaluaciones de compuestos volátiles ambos antagonistas afectaron el crecimientos del patógeno, pero se confirmó que sobretodo Pf-5 destacó por inhibir el crecimiento de Fol en un 91% ya que como menciona Nowak-Thompson, et al, 1994 *P. flourescens* Pf-5 contiene varios compuestos que afectan el crecimiento del patógeno como metabolitos implicando oomycin A, l -carboxilato phenazine- , pyoluteorin 2,4 - diacetilfloroglucinol e hidrógeno de cianuro como factores que contribuyen a la supresión de enfermedades de las plantas .

Desarrollo de Formulaciones

Para determinar las concentraciones de las formulaciones para ambos microorganismos se determinó que cuando Fo47 se encontraba a 10^6 y Pf-5 a 10^8 UFC/ml, el hongo patógeno Fol presentó un crecimiento similar que a las mayores concentraciones también probadas en el ensayo. Ambos microorganismos sobrevivieron al ser co-inoculados en una misma caja de Petri establemente, además Lemanceau, et, al, 1991, y Kaur, et al 2007 realizaron inoculaciones conteniendo *F. oxysporum* y *P. flourescens*, utilizando las mismas concentraciones y obteniendo resultados similares.

Los componentes utilizados para el primer set de formulaciones fueron siguiendo los ingredientes recomendados por Shabana, et al 2002, quien realizó una formulación de propágulos fúngicos encapsuladas en una matriz de gluten de trigo conteniendo un cultivo de *Fusarium* benéfico y reportó resultados prometedores cuando la formulación era mantenida a una temperatura de 3 °C. Los resultados obtenidos mostraron un decline mínimo de Fo47 y Fol en la formulación líquida después de 30 días a una temperatura de 5°C.

Sin embargo, tomando en cuenta las necesidades de los agricultores, los cuales la mayoría de las veces no tienen acceso a equipos refrigerantes en el campo, se decidió desarrollar formulaciones con vida de anaquel a temperatura ambiente (~25 °C).

Para el segundo set de formulaciones A y B, se utilizaron ingredientes sencillos y comúnmente utilizados para las formulaciones biológicas comerciales de (*Bacillus spp.*, *Trichoderma spp.*, etc) que son utilizados solo como portadores de los microorganismos y todos están aprobados en la lista de productos orgánicos de EPA.

Ensayos in-vivo

Los ensayos en semillas de tomate mostraron que existe una relación entre el número de semillas germinados y el porcentaje de incidencia mostrada por la enfermedad Fol, en los cuales el tratamiento que contenía los biocontroles Fo47 y Pf-5 mostraron la germinación más alta y el porcentaje de semillas infectadas más bajo. Estos resultados concuerdan con los publicados por Kaur et al, 2007 en donde se realizaron ensayos con semillas inoculadas con el patógeno *Fusarium oxysporum* y biocontroles a base de

Fusarium no patogénico y *Pseudomonas flourescens* combinados e individualmente, y estos tratamientos fueron altamente efectivos contra la enfermedad al presentar solo un 15-30 y 20-35% de infección después de 30 y 60 días de la siembra respectivamente, comparado con el control positivo el cual mostró 100% de infección después de 30 días.

El siguiente estado fenológico de tomate en este estudio fue el análisis del comportamiento de los biocontroles en plántulas, utilizando el método de inoculación por inmersión de raíz; la incidencia y severidad no logró diferencias significativas, pero si una menor manifestación de la enfermedad, mostrando un comportamiento muy similar al presentado por el control biológico comercial Serenade Soil™. Probablemente esto se deba a que el estado inmaduro de la plántula se ve afectado fácilmente por la infección al estar en una fase más susceptible al ataque independientemente a los tratamientos previos con los microorganismos benéficos. Srinivasan, et al, 2009 obtuvo resultados significativos en la reducción de la enfermedad Fol, al utilizar el método de inmersión en raíz, pero en su investigación se realizaron dos aplicaciones de los microorganismos benéficos a los 0 y 7 días después de infección.

Los ensayos en invernadero con plantas adultas de tomate presentaron diferencias más claras en los dos ensayos realizados obteniendo diferencias significativas en los tratamientos conteniendo Fo47 y Pf-5, especialmente con la formulación B, la cual presentó una incidencia 47 y 74% menos que el tratamiento del control positivo Fol, en el primero y segundo ensayos respectivamente y una severidad más baja que todos los demás tratamientos. Yigit, et al 2007 realizó estudios en invernadero utilizando distintas cepas de microorganismos para control biológico contra la enfermedad Fol y encontró que la combinación más efectiva fue la que contenía *Fusarium* no patogénico y *Pseudomonas flourescens* la cual redujo la incidencia de la enfermedad en un 70.2%. Larkin, et al 1998 reportó que aislados de *Fusarium* no patogénico obtenidos de suelos supresivos a la marchitez por *Fusarium* fueron los antagonistas más efectivos y presentaron un control de la enfermedad significativo y consistente (50 a 80% reducción de la incidencia de la enfermedad) en varias repeticiones de los ensayos.

En el presente estudio se puede expresar que los resultados obtenidos en la disminución de la incidencia y severidad de la enfermedad se deben a un efecto sinérgico de ambos

microrganismos benéficos, ya que existe una combinación de mecanismos de biocontrol que cada uno provee para atacar a Fol. A su vez, Yigit, et al 2007 expresó el término sinergismo en su investigación realizada con plantas de Tomate infectadas y tratadas con Fo47 y Pf-5.

Las evaluaciones de las variables de análisis de crecimiento, mostraron diferencia significativa (>45%) en el número de frutos en las plantas tratadas con la formulación B; para las variables de altura, grosor de tallo, número de brotes laterales y número de flores no se presentaron diferencias significativas. Estos resultados concuerdan con los reportados por Srinivasan, et al., 2009, en donde utilizó cepas de *Pseudomonas* spp., como control biológico de Fol, y encontró que todas las plantas tratadas con los biocontroles tenían una altura y biomasa mayor.

Se realizaron evaluación poscosecha de peso fresco y peso seco de la parte aérea de la planta, raíces y frutos, no se reportaron diferencias significativas, sin embargo, se pudo observar que para los tratamientos que contenían los biocontroles se mostró que la mayor parte del peso total de las plantas fue destinada a la producción de frutos.

Los resultados de todos los ensayos mostrados reflejan que los tratamientos que incluyeron Fo47 y Pf-5 redujeron el porcentaje de incidencia, lo cual coincide con los resultados reportados por Alabouvette, año, quienes en ensayos en plántulas de tomate conteniendo tales biocontroles.

La combinación de los distintos mecanismos antagónicos de Fo47 y Pf-5, permite estar más cerca de las interacciones microbianas complejas responsables de la supresión suelo natural

Aunque el principal modo de acción de ambas cepas es por inducción de la resistencia sistémica, es obvio que este fenómeno implica el estado fisiológico de la planta y las fluctuaciones de las condiciones ambientales pudieran afectar la habilidad de la planta para expresar su resistencia al patógeno, inducidos por los biocontroles.

La limitada disponibilidad de medidas de control químico, el cual es el único control parcial que ofrece el revestimiento de semillas, así como las plantas adultas y la desinfección de suelos; Existe un interés muy limitado en la utilización de variedades de

tomate comercialmente resistentes. Lo anterior hace que las cepas de control biológico probadas en esta investigación sean consideradas como una medida de control adecuada y fiable, y para ser utilizadas en combinación con otros métodos de control.

11. CONCLUSIONES

La asociación de *F. oxysporum* no patogénico y *P. fluorescens* muestra efectos sinérgicos de parte de ambos microorganismos para controlar la enfermedad de marchitamientos por Fusarium en semillas, plántulas y plantas de Tomate.

Se observó una mayor sobrevivencia de ambos microorganismos cuando se encontraban suspendidos en una formulación sólida, conteniendo inertes aprobados por EPA, a las concentraciones de 10^6 para Fo47 y 10^8 para Pf-5, manteniéndose a temperatura ambiente.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abeysinghe, S. 2006. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicicummerinum*, the causal agent of root and stem rot of *Cucumis sativus* by non-pathogenic *Fusarium oxysporum*. *Ruhuna Journal of Science*, 1: 2-31.
- Agrios, N.G. 1991. *Fitopatología*. Ed. Limusa. México, D.F. 756 p.
- Alabouvette C, 1990. Biological control of *Fusarium* wilt pathogens in suppressive soils. In : HornbyD , ed . *Biology Control of Soil-borne Plant Pathogens*. Wallingford, UK: CAB International Publishing, 27–43.
- Alabouvette C, Lemanceau P, Steinberg C, 1993. Recent advances in the biological control of *Fusarium* wilts. *Pesticide Science* 37, 365–73.
- Benhamou, N. and C. Garand, 2001. Cytological analysis of defense-related mechanisms induced in pea root tissues in response to colonization by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* NP. *Phytopathology*, 91: 730-740.
- Benhamou, N., C. Garand and A. Goulet, 2002. Ability of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain NP to induce resistance against *Pythium ultimum* infection in cucumber. *Applied Environ. Microbiol.*, 68: 4044-4060.
- Blok W.J., Zwankhuizen M.J., Bollen GJ, 1997. Biological control of *Fusarium oxysporum* f.sp. *asparagi* by applying non-pathogenic isolates of *F. oxysporum*. *Biocontrol Science and Technology* 7, 527–41
- Borrero, C., Infantes, M. J., Gonzalez, E., Tello, J. C., Avilés, M., 2006. Relation between suppressiveness to tomato *Fusarium* wilt and microbial population sin different growth media. *Acta Horticulturae* in press.
- Bosland, P. W. 1988. *Fusarium oxysporum* a pathogen of many plant species.
- Cai, G., Gale, I.R., Scheider, R.W., Kistler, H.C., Davis, R.M., Elias, K.S., and Miyao, E.M. 2003. Origin of race 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* at a single site in California. *Phytopathology* 93:1014-1022.
- Cárdenas, V.J.O. 2000. Eficacia en el control químico de *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora capsici* en los cultivos de tomate, chile y sandía. Tesis de Maestría de la Facultad de Agronomía, de la Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa, México. 156 p.
- Cronin, D., Y. Moënné-Loccoz., A. Fenton, C. Dunne, D.N. Dowling, and F. O’Gara. Role of 2, 4-diacetylphloroglucinol in the interaction of the biocontrol pseudomonad strain F113 with the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1997b, 1357-1361.

- Duijff BJ, Recorbet G, Bakker PAHM, Loper JE, Lemanceau P. 1999. Microbial antagonism at the root level is involved in the suppression of Fusarium wilt by the combination of non-pathogenic Fusarium oxysporum NP and Pseudomonas putida 89(11):1073-9. doi: 10.1094/PHYTO.1999.89.11.1073
- Fenton AM, Stephens PM, Crowley J, O' Callaghan M, O'Gara F. Exploitation of gene(s) involved in 2,4- diacetylphloroglucinol biosynthesis to confer a new biocontrol capability to a Pseudomonas strain. Appl Environ Microbiol 41, 1992, 109-117.
- Gonzalez, P. 2006. Ensayo sobre Enfermedades del Tomate, Marchitamiento vascular del Tomate. Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay, http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/enfermedades/Fusarium_tom.html
- Gullino, M. L., Lento G., Garibaldi, A., 1986. Sensitivity to benomyl of Fusarium oxysporum f. sp. dianthi isolated in Italy over 17 years, Rivista di ortoflorofrutticoltura italiana, Vol. 70, No. 2, pp. 139-144.
- Gupta, C.P., A. Sharma, R.O. Dubey and D.K. Maheshwari, 2001. Effect of metal ions on growth of Pseudomonas aeruginosa and siderophore and protein production. Indian J. Exp. Biol., 39: 1318-1321.
- Gupta, S. and A.K. Dikshit. 2010. Biopesticides: An ecofriendly approach for pest control. Journal of Biopesticides 3(1 Special Issue):186 – 188. <http://www.jbiopest.com/users/LW8/page.php?intPagelD=208> [19 August 2012].
- Informacion tecnica sobre Fusarium: www.tecnun.es/asignaturas/Ecologia/Hipertexto/09ProdQui/111ProbPest.htm.
- Jimenez, D. F., (2003) Enfermedades del Tomate (Lycopersicon esculentum Mill) Ed. Limusa, Mexico, D. F. 102 p.
- Jones, J.B., Jones, J.P., Stall, R.E., and Zitter, T.A. 1991. Compendium of Tomato Diseases, American Phytopathological Society, St. Paul, MN, USA. 46 p.
- Juraske, R. and N. Sanjuan. 2011. Life cycle toxicity assessment of pesticides used in integrated and organic production of oranges in the Comunidad Valenciana, Spain. Chemosphere 82(7):956-962. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.10.081> diakses 30 Juli 2012.
- Kamilova, F. , Lamers G. and Lugtenberg, B. 2008 Biocontrol strain Pseudomonas fluorescens WCS365 inhibits germination of Fusarium oxysporum spores in tomato root exudate as well as subsequent formation of new spores. Environmental Microbiology 10: 2455-2461.
- Larkin, R.P. and D.R. Fravel, 1998. Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of Fusarium wilt of tomato. Plant Dis., 82: 1022-1028.

- Lemanceau P (1992). Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes: exemple des *Pseudomonas* spp. fluorescents. *Agronomie* 12:413-437.
- Leski, B., 1977. Occurrence and characteristics of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (Prill et Del) Snyd et Hans strains resistant to systemic fungicides. *Acta Agrobot.*, 30: 195-211.
- Olivain, C., Alabouvette, C., y Steinberg, C.,. 2004. Production of a mixed inoculum of *Fusarium oxysporum* NP and *Pseudomonas fluorescens* C7 to control fusarium diseases, *Biocontrol Sci. Technol.* 14(3), 227–238.
- Página web de EPA (Environmental Protection Agency): www.epa.gov
- Pagina web de la Compañía Gowan: www.gowanco.com
- Palleroni, N.J. (1984) *Pseudomonadaceae*. In *Bergey's Manual of Systematic Biology*. Kreig, N.R., and Holt, J.G. (eds). Baltimore: The Williams and Wilkins Co., pg. 141-199.
- SAGARPA. 2005., Análisis Agropecuario del Tomate. Boletín Informativo. Culiacán, Sinaloa, México. 9 p.
- Sánchez, C.M.A. 1998. Enfermedades causadas por hongos en tomate. pp. 17-28. En: O.J. Cruz, R. García E. y A. Carrillo F. (eds.). *Enfermedades de las Hortalizas*. Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa, México. 255 p.
- Shishido M, Miwa C, Usami T, Amemiya Y, Johnson KB. 2005. Biological Control Efficiency of *Fusarium Wilt* of Tomato by Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo-B2 in Different Environments. *Phytopathology*. 2005 Sep;95(9):1072-80.
- Showkat S, et al. 2012. Biological control of *Fusarium Oxysporum* and *Aspergillus* Sp.By *Pseudomonas fluorescens* Isolated from wheat Rhizosphere soil of Kashmir. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences* 9(IOSRJPBS), ISSN: 278-308 Volume 1, Issue 4, PP 24-32, www.iosrjournals.org13.
- Snyder, W.C. and Hans, H.N.: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) and. Prepared by Mui-Yun Wong. PP728 Soilborne Plant Pathogen Class Project, Spring, 2003.
- Soesanto, L., 2014. Biochemical characteristic of *Pseudomonas fluorescens* P60. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 2:19-26.
- Spadaro, D., and M.L. Guillino. 2003. State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. *International Journal of Food Microbiology* 91:185-194.
- Stutz, E., Defago, G., and Kern, H. Naturally occurring fluorescent pseudomonads involved in suppression of black root rot of tobacco. *Phytopathology* 76, 1986, 181-185.

- Tada, Y., Sakamoto, M. and Fujimura, T. *Theor. Appl. Genet* 80, 1990, 475-480.
- Tamietti, G., L. Ferraris, A. Matta and I.A. Gentile, 1993. Physiological responses of tomato plants grown in fusarium suppressive soil. *J. Phytopathol.*, 138: 66-76.
- Tramier, R., and Bettacchini, A., 1974. Mise en évidence d'une souche de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* résistant aux fongicides systémiques. *Ann. Phytopathol.* 6: 231-236
- Weller, D.M., J. M. Raaijmakers, B. B. McSpadden Gardener, and L. S. Thomashow. 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40:309-348.
- Aimé, S., Alabouvette, C., Steinberg, C., Olivian, C., 2013. The Endophytic Strain *Fusarium oxysporum* Fo47: A Good Candidate for Priming the Defense Responses in Tomato Roots. *Microbiology Soil and Environment MIAE database: www2.dijon.inra.fr/umrmse*, 918-926.
- Gilardi, G. 2007. Effect of Antagonistic *Fusarium* spp. and of Different Commercial Biofungicide Formulations on *Fusarium* Wilt of Lettuce. *Phytoparasitica* 35(5):457-465.
- Glick, B.R., 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiol. Res.* 169, 30–39.
- Hernández GMM, Jiménez–Garcés C., Jiménez–Albarrán FR., Arceo–Guzmán ME. 2007. Caracterización de las intoxicaciones agudas por plaguicidas: perfil ocupacional y conductas de uso de agroquímicos en una zona agrícola del estado de México, México. *Rev Int Contam Amb.* 23(4):159–167.
- Hernandez-León, R., Rojas-Solís, D., Contreras-Pérez, M. 2015. Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains. *Biological Control*, 81(2015) 83-92.
- ISTA, 1996. International Rules for Seed Testing. International Seed Testing Association. *Seed Science and Technology*, 24:39-42.
- Kaur, R., Kaur, J., Singh, R., Alabouvette, C., 2007. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cicero* by nonpathogenic *Fusarium* and Fluorescent *Pseudomonas*. *International Journal of Botany* 3 (1): 114-117.
- Komada, H. 1976. A new selective medium for isolating *Fusarium* from natural soil. *Proceedings of the American Phytopathological Society* 3:221
- Lara Porras, A.M. (2000). “Diseño Estadístico de Experimentos, Análisis de la Varianza y Temáticas Relacionadas: Tratamiento Informático mediante SPSS” Proyecto Sur de Ediciones.
- Lemanceau P., Alabouvette, C., 1991. Biological control of fusarium diseases by fluorescent *Pseudomonas* and non-pathogenic *Fusarium*. *Crop Protection* 0261-2194/91/0279-08.

- Mamdouh M. Nemat, Yasser M. Shabana, Mamdouh M Serag, Nemat M Hassan and Mohamed M El-Hawary. 2008. Granular formulation of Fusarium
- Miclea, R., Ruia, C. 2010. In vitro Control of the Fungus Botrytis cinerea Pers. with Plant Extracts Bulletin UASVM Agriculture 67 67(1)/2010
- Nowak-Thompson, B., Goul, S., Kraus, J., Loper, J., 1994. Production of 2,4-diacetylphloroglucinol by the biocontrol agent Pseudomonas fluorescens Pf-5. Can. J. Microbiol. 40: 1064-1066.
- oxysporum for biological control of faba bean and tomato Orobanche. Pest Manag Sci 64:1237–1249.
- Sarker, A. M., 2013. Efficacy of Some Rhizosphere Microorganisms in Controlling Fusarium Wilt of Tomato (*Lycopersicon esculentum*). The Agriculturist 11(2): 96-103(2013).
- Shabana Y. M., Muller-Stover, M, and Sauerborn, J, 2002. Granular Pesta formulation of Fusarium oxysporum f. sp. orthoceras for biological control of sunflower broomrape: efficacy and shelf-life. Biol. Control. 26 (2003) 189–201
- Srinivasan, K, Gilardi G., Garibaldi, A. and Gullino, M.L., 2009. Bacterial Antagonistic from Used Rockwool Soilless Substrates Suppress Fusarium Wilt of Tomato. Journal of Plant Pathology 91(1), 147-154.
- Validov, S. Z., Kamilova, F. D., Lugtenberg, B. J.J, 2011. Monitoring of pathogenic and non-pathogenic Fusarium oxysporum strains during tomato plant infection. Microbial Biotechnology 4(1), 82–88.
- Yigit, F., Dikilitas, M., 2007. Control of fusarium wilt of tomato by combination of fluorescent pseudomonas, non-pathogen fusarium and trichoderma harzianum t-22 in greenhouse conditions. Plant pathology journal 6 (2): 159-163.