

**Compatibilidad de fungicidas químicos, biológicos y de origen vegetal sobre el hongo benéfico *Trichoderma harzianum*, controlador de *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate (*Solanum lycopersium*).**

**ANGIE PAOLA RODRIGUEZ PRIETO**

**FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE BOGOTÁ JORGE TADEO LOZANO  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES E INGENIERÍA  
PROGRAMA DE BIOLOGÍA AMBIENTAL  
BOGOTÁ  
2019**

**Compatibilidad de fungicidas químicos, biológicos y de origen vegetal sobre el hongo benéfico *Trichoderma harzianum*, controlador de *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*).**

**Angie Paola Rodriguez Prieto**

Trabajo de formación para la investigación para optar al título de

Biólogo Ambiental

**Director**

**Cindy Alejandra Garzón Espinosa**

Bióloga Ambiental, M.Sc. en Ciencias Ambientales  
Coordinadora laboratorio Entomología.  
Centro de Bio-Sistemas. UJTL

**Codirector**

**Paola Andrea Escallón Vanegas**

Microbióloga industrial.  
Coordinadora laboratorio Microbiología  
Centro de Bio-Sistemas. UJTL

**FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE BOGOTÁ JORGE TADEO LOZANO  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES E INGENIERÍA  
PROGRAMA DE BIOLOGÍA AMBIENTAL  
BOGOTÁ  
2019**

**NOTA DE ACEPTACIÓN**

---

---

---

---

---

---

**Cindy Alejandra Garzón Espinosa**

---

**Jurado**

---

**Jurado**

## **Dedicatoria**

*El camino por la universidad es solo un paso en este proceso de aprendizaje continuo, cosas buenas y cosas malas suceden en el transcurso. Yo me quedo con todo lo hermoso que amé, viví y aprendí de esta maravillosa ciencia llamada biología.*

*Este trabajo de investigación lo dedico principalmente a mis padres por su apoyo incondicional, por hacer todo lo posible para ayudarme a salir adelante y por enseñarme a nunca rendirme. También a mis hermanos que siempre estuvieron presente en este proceso dándome ánimos y ayudándome en todo lo que fue posible. Finalmente, a mi querido que siempre me apoyó, me motivó creyó en mí y en mis capacidades.*

## **Agradecimientos**

*Agradezco principalmente a mi directora Alejandra y a mi codirectora Paola quienes me han apoyado y guiado completamente en este proceso, recalcando todo lo que he aprendido de ellas, toda la confianza depositada en mí, y su manera afectuosa de enseñar y corregir.*

*También agradezco a la Universidad Jorge Tadeo Lozano, principalmente al Centro de Bio-sistemas y a sus funcionarios que hicieron parte de este proyecto.*

*A mi familia y a mi querido por toda la confianza y apoyo brindado, y en general a todas las personas que de alguna manera ayudaron a que este trabajo de investigación saliera adelante.*

**Resumen:** El cultivo de tomate (*Solanum lycopersium*) es de importancia comercial en Colombia, no obstante, su rendimiento se ve afectado por la incidencia de plagas y enfermedades como *Fusarium oxysporum* el cual genera daños de hasta el 60% en la producción del cultivo. Para el manejo de esta enfermedad es común el uso de diferentes tipos de origen de fungicidas químicos, extractos vegetales y/o biológicos como *Trichoderma harzianum*. Sin embargo, el uso de estos productos fitosanitarios se hace sin considerar el efecto que producen sobre hongos biocontroladores como *T. harzianum*. Es por esto, que el presente estudio tuvo como objetivo evaluar la compatibilidad de fungicidas químicos, biológicos y de origen vegetal utilizados para el control de *F. oxysporum* en cultivos de tomate, sobre el hongo benéfico *T. harzianum*. Para tal fin, se determinó la eficacia de ocho fungicidas sobre *F. oxysporum* en condiciones de laboratorio, y se analizó el efecto de estos productos sobre *T. harzianum* evaluando en medio de cultivo PDA el porcentaje de inhibición *in vitro*. Posteriormente, se realizó la clasificación de cada uno de los agroinsumos en las categorías de compatibilidad de la IOBC. Así, se determinaron los fungicidas más compatibles con el controlador biológico y los más eficaces contra el hongo fitopatógeno. Con base en esto, se realizaron tres pruebas *In vivo* donde se verificó el control de *F. oxysporum* por parte de *T. harzianum* al integrarlo con los productos fitosanitarios escogidos, observando porcentaje de daño en tallo y foliar en plantas de tomate infestadas con el patógeno. Adicionalmente se determinó visualmente el estado general de las plantas analizadas, y a través de los datos tomados, la incidencia y severidad para cada prueba. Los resultados indicaron que los fungicidas más eficaces frente al hongo fitopatógeno fueron los químicos (flutriafol, prochloraz, pyrimethanil y mancozeb+cymoxanil+ hidróxido de cobre) generando porcentajes de inhibición mayores a 90% y los más compatibles con el hongo benéfico fueron los extractos vegetales y fungicidas biológicos con porcentajes de inhibición menores a 19% (extracto de cítricos, *Melaleuca alternifolia*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus pumilis*). La eficacia por parte de los agroquímicos se debe a sus mecanismos de acción que afectan no solo membranas celulares, también funciones enzimáticas de obtención de energía y reproducción. La compatibilidad con los extractos vegetales se atribuye a la resistencia del hongo benéfico a algunos fungicidas y porque los extractos tienen alta volatilidad lo que disminuye el efecto que puedan generar a *T. harzianum*, y con las dos especies de *Bacillus* sp. se debe a una interacción positiva que se da entre bacterias y hongos. Los productos fitosanitarios elegidos para las pruebas *in vivo* fueron: Extracto de cítricos (extracto vegetal), *Bacillus subtilis* (fungicida biológico) y flutriafol (fungicida químico). Al comparar el efecto controlador sobre el hongo patógeno de los tres fungicidas mencionados, al integrar el hongo benéfico evaluado a través de tres pruebas, se encontró que la prueba tres con el tratamiento *B. subtilis*

+ *T. harzianum* mostró los mejores resultados en control de la enfermedad generando los menores porcentajes de severidad foliar de 0 a 3%, de tallo a 10% y de estado general de 5 a 8% lo que puede atribuirse a la interacción positiva de los microorganismos y un efecto sinérgico en el control de la enfermedad, de esta manera se propone para un manejo integrado de la marchitez vascular en plantas de tomate.

**Palabras clave:** Compatibilidad, eficacia, fungicidas, *Solanum lycopersium*, *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma harzianum*.

**Abstract:** The cultivation of tomatoes (*Solanum lycopersium*) is of commercial importance in Colombia, however its yield is affected by the incidence of pests and diseases such as *Fusarium oxysporum* which generates damages of up to 60% in crop production. For the management of this disease it is common to use different types of chemical fungicides, plant and / or biological extracts such as *Trichoderma harzianum*. However, the use of these phytosanitary products is made without considering the effect they produce on biocontroller fungi such as *T. harzianum*. This is why the present study aimed to evaluate the compatibility of chemical, biological and plant-based fungicides used for the control of *F. oxysporum* in tomato crops, on the beneficial fungus *T. harzianum*. For this purpose, the efficacy of eight fungicides on *F. oxysporum* under laboratory conditions was determined, and the effect of these products on *T. harzianum* was analyzed by evaluating the percentage of *in vitro* inhibition in PDA culture medium. Subsequently, the classification of each of the agro-inputs in the compatibility categories of the IOBC was carried out. Thus, the fungicides most compatible with the biological controller and the most effective against the phytopathogenic fungus were determined. Based on this, three *in vivo* tests were performed where the control of *F. oxysporum* by *T. harzianum* was verified by integrating it with the selected plant protection products, observing percentage of stem and leaf damage in tomato plants infested with the pathogen. Additionally, the general state of the plants analyzed was determined visually, and through the data taken, the incidence and severity for each test. The results indicated that the most effective fungicides against the phytopathogenic fungus were the chemicals (flutriafol, prochloraz, pyrimethanil and mancozeb + cymoxanil + copper hydroxide) generating inhibition percentages greater than 90% and the most compatible with the beneficial fungus were the plant extracts and the biologicals fungicides with inhibition percentages lower than 19% (*citrus extract*, *Melaleuca alternifolia*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilis*). The effectiveness of agrochemicals is due to their mechanisms of action that affect not only cell membranes, but also enzymatic functions of obtaining energy and reproduction. Compatibility with plant extracts is attributed to the fungus's resistance to some

fungicides and because the extracts have high volatility which decreases the effect that they may generate on *T. harzianum*, and with the two species of *Bacillus* sp. It is due to a positive interaction between bacteria and fungi. The phytosanitary products chosen for the in vivo tests were: Citrus extract (vegetable extract), *Bacillus subtilis* (biological fungicide) and flutriafol (chemical fungicide). When comparing the controlling effect on the pathogenic fungus of the three fungicides mentioned, when integrating the beneficial fungus evaluated through three tests, it was found that test three with the treatment *B. subtilis* + *T. harzianum* showed the best results in control of the disease generating the lowest percentages of foliar severity of 0 to 3%, of stem to 10% and of general condition of 5 to 8% which can be attributed to the positive interaction of microorganisms and a synergistic effect in the control of the disease , in this way it is proposed for an integrated management of vascular wilt in tomato plants.

**Keywords:** Compatibility, efficacy, fungicides, *Solanum lycopersium*, *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma harzianum*.

<b>CONTENIDO</b>	
<b>Páginas</b>	
<b>1.INTRODUCCIÓN</b>	<b>12</b>
<b>2.JUSTIFICACIÓN</b>	<b>13</b>
<b>3.MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE</b>	<b>14</b>
<b>3.1. MARCO TEORICO</b>	<b>14</b>
<b>3.1.1. Generalidades del tomate (<i>Solanum lycopersium</i>):</b>	<b>14</b>
<b>3.1.2. Enfermedades asociadas al cultivo de Tomate</b>	<b>15</b>
<b>3.1.2.1. <i>Fusarium oxysporum</i></b>	<b>16</b>
<b>3.1.3. <i>Trichoderma harzianum</i></b>	<b>18</b>
<b>3.1.4 Compatibilidad</b>	<b>19</b>
<b>3.2 ESTADO DEL ARTE</b>	<b>19</b>
<b>3.2.1 Compatibilidad de fungicidas con <i>Trichoderma harzianum</i></b>	<b>19</b>
<b>4. DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS</b>	<b>22</b>
<b>4.1. Planteamiento del problema de investigación</b>	<b>22</b>
<b>4.2. OBJETIVOS</b>	<b>22</b>
<b>4.2.1 Objetivo general</b>	<b>22</b>
<b>4.2.2. Objetivos Específicos</b>	<b>22</b>
<b>5. HIPÓTESIS</b>	<b>22</b>
<b>6. VARIABLES</b>	<b>23</b>
<b>7. METODOLOGÍA</b>	<b>23</b>
<b>7.1 Eficacia de los fungicidas sobre <i>Fusarium oxysporum</i> en condiciones <i>in vitro</i></b>	<b>25</b>
<b>7.2 Compatibilidad de fungicidas sobre <i>T. harzianum</i> en condiciones de laboratorio</b>	<b>26</b>
<b>7.3. Comparación del control de <i>F. oxysporum</i> en plantas de tomate al integrar los tres tipos de origen de fungicidas más compatibles con <i>T. harzianum</i></b>	<b>28</b>
<b>8. RESULTADOS</b>	<b>35</b>
<b>9. DISCUSION DE RESULTADOS</b>	<b>52</b>
<b>10. CONCLUSIONES</b>	<b>61</b>
<b>11. RECOMENDACIONES</b>	<b>62</b>
<b>12. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>62</b>

<b>Lista de tablas</b>	<b>Páginas</b>
<b>Tabla 1.</b> Variables medidas en cada procedimiento realizado.	<b>23</b>
<b>Tabla 2.</b> Generalidades de los fungicidas seleccionados para el estudio	<b>24</b>
<b>Tabla 3:</b> Tratamientos para la evaluación del control de <i>F. oxysporum</i> con los productos más compatibles con <i>T. harzianum</i> y más efectivos frente al fitopatógeno.	<b>29</b>
<b>Tabla 4:</b> Descripción de las tres pruebas a realizar para evaluar el control de <i>F. oxysporum</i> con los productos más compatibles con <i>T. harzianum</i> y más efectivos frente al fitopatógeno	<b>30</b>
<b>Tabla 5:</b> Escala de daño o porcentaje de área afectada (Townsend & Heuberger, 1946).	<b>35</b>
<b>Tabla 6.</b> Porcentaje de inhibición de los ocho fungicidas evaluados sobre <i>Fusarium oxysporum</i> .	<b>36</b>
<b>Tabla 7.</b> Porcentaje de inhibición de los fungicidas evaluados sobre <i>Trichoderma harzianum</i> y clasificación en los niveles de compatibilidad de la IOBC (Boller, 2005).	<b>38</b>
<b>Tabla 8.</b> Incidencia de <i>F. oxysporum</i> en plantas de tomate de la prueba 1.	<b>43</b>
<b>Tabla 9.</b> Concentración de <i>T. harzianum</i> y <i>F. oxysporum</i> en el sustrato de los tratamientos evaluados a los 16 días en la prueba 2.	<b>44</b>
<b>Tabla 10.</b> Porcentaje de Incidencia de la enfermedad de <i>F. oxysporum</i> en plantas de tomate en la prueba 2.	<b>46</b>
<b>Tabla 11.</b> Concentración de <i>T. harzianum</i> y <i>F. oxysporum</i> en sustrato de los tratamientos evaluados a los 30 días en la prueba 3.	<b>47</b>

<b>Lista de diagramas y gráficas</b>	<b>Páginas</b>
<b>Diagrama 1.</b> Procedimiento de lavado para montaje de material vegetal.	<b>31</b>
<b>Gráfico 1.</b> Porcentaje de severidad de la enfermedad evaluada en el tallo de plantas de tomate en la prueba 1.	<b>41</b>
<b>Gráfico 2.</b> Porcentaje de severidad de la enfermedad evaluada en la zona foliar de plantas de tomate de la prueba 1. Las letras sobre las líneas indican el agrupamiento dado en la prueba de Tukey.	<b>42</b>
<b>Gráfico 3.</b> Porcentaje de severidad de la enfermedad evaluada al nivel del estado general de plantas de tomate en la prueba 2.	<b>45</b>
<b>Gráfico 4.</b> Porcentaje de severidad de la enfermedad evaluado a nivel del tallo de las plantas de tomate de los tratamientos a los 30 días de evaluación en la prueba 3.	<b>49</b>
<b>Gráfico 5.</b> Porcentaje de severidad de la enfermedad evaluado a nivel foliar en plantas de tomate estudiadas por 30 días en la prueba 3.	<b>50</b>
<b>Gráfico 6.</b> Porcentaje de severidad de la enfermedad evaluado a nivel del estado general de plantas de tomate estudiadas durante 30 días en la prueba 3.	<b>51</b>
<b>Gráfico 7.</b> Porcentaje de incidencia de la enfermedad en plantas de tomate de los tratamientos evaluados por 30 días en la prueba 3.	<b>52</b>

<b>Lista de figuras</b>	<b>Páginas</b>
<b>Figura 1.</b> Morfología de <i>Fusarium oxysporum</i> a nivel macro y micro. <b>(A)</b> Macroconidios. <b>(B)</b> Microconidios. <b>(C)</b> Clamidosporas. <b>(D)</b> Colonia de <i>F. oxysporum</i> en los primeros estados de desarrollo. <b>(E)</b> Colonia de <i>F. oxysporum</i> en estado avanzado de desarrollo. Fuente: Leslie & Summerell, 2008; Renata et al, 2018.	<b>17</b>
<b>Figura 2.</b> Morfología de <i>Trichoderma harzianum</i> a nivel macro y micro. (A) ilustración de la vista microscópica. (B) Vista macroscópica de la colonia de <i>T. harzianum</i> en estado avanzado de desarrollo. Fuente: Rodríguez Batista & Gato Cárdenas (2010); Autor.	<b>19</b>
<b>Figura 3.</b> Montaje experimental para determinar la eficacia que un fungicida sobre <i>F. oxysporum in vitro</i> .	<b>26</b>
<b>Figura 4.</b> Niveles de compatibilidad de agroinsumos sobre controladores biológicos. Tomado de IOBC (2005).	<b>28</b>
<b>Figura 5.</b> Escala para medir decoloración vascular. Fuente: Estupiñan et al, 2007.	<b>33</b>
<b>Figura 6.</b> Clasificación de estado vital de plantas de tomate.	<b>34</b>
<b>Figura 7.</b> Control de calidad realizado a un producto comercial con ingrediente activo <i>T. harzianum</i> usado en el presente estudio para las pruebas de compatibilidad.	<b>37</b>
<b>Figura 8.</b> Montajes del material vegetal de plantas de tomate de la prueba 1. (A) Montaje realizado al inicio de la evaluación en los medios PDA y Komada. (B) Montaje realizado al final de la evaluación en el medio Komada.	<b>40</b>
<b>Figura 9.</b> Montajes de sustrato de planta de tomate de la prueba 1. En la parte superior se muestra el montaje realizado en medio PDA y en la parte inferior el montaje en medio Komada (KOM) cada uno con su respectiva dilución. En rosa (PDA) y blanco (KOM) se diferencia <i>F. oxysporum</i> y en verde (PDA) <i>T. harzianum</i> .	<b>40</b>
<b>Figura 10.</b> Montaje de sustrato de plantas de tomate de los tratamientos evaluados en la prueba 2. En la parte inferior se indica el tratamiento evaluado y en el costado izquierdo la dilución correspondiente a cada caja de petri con medio PDA.	<b>44</b>

**Figura 11.** Montaje de material vegetal de plantas de cada tratamiento evaluado en la prueba 3. **47**

**Figura 12.** Montaje de sustrato de plantas de tomate de cada tratamiento evaluado a los 30 días en la prueba 3. **48**

## 1. Introducción:

El tomate (*Solanum lycopersium*) es una planta dicotiledónea de importancia comercial a nivel mundial. En Colombia es una de las siete hortalizas de mayor importancia debido a la producción y rendimiento que tiene en el país. Sin embargo, comparado con otros países el rendimiento es menor. Una de las razones que justifica esta problemática es la incidencia de enfermedades que son provocadas por los cambios climáticos en las regiones de cultivo (Jaramillo et al, 2006; Jaramillo et al, 2007; Morales et al, 2009).

Una de las enfermedades que afecta este cultivo es la marchitez vascular, producida por *Fusarium oxysporum*, un hongo saprófito que puede crecer y sobrevivir por largos períodos en la materia orgánica del suelo y en la rizósfera de varias especies vegetales; lo cual permite que este sea patógeno de plantas, siguiendo un patrón de infección (Fravel et al, 2003). *F. oxysporum* ingresa por la raíz e invade el sistema vascular en el tallo de las plantas. No obstante, la irrupción se diferencia en cultivos con resistencia como a los susceptibles al lugar de entrada preliminar del patógeno, debido a la obstrucción de los vasos por geles y a la degradación de calosa y tilosas. Por un lado, en los cultivos susceptibles, la colonización sigue (distribución secundaria) cuando los geles y calosas son destituidos por acción de enzimas pectolíticas del patógeno, lo que genera finalmente que se detenga el crecimiento de las tilosas. Por otro lado, en los cultivos con resistencia, flavonoides del tipo de las catequinas y sus productos de oxidación inmovilizan las enzimas, de manera que la distribución secundaria es finalmente recluida en los lugares preliminares de infección (González & Pereira, 2012).

Este patógeno ha demostrado gran variabilidad genética y amplia distribución, haciendo que su manejo resulte difícil. De esta manera, para su tratamiento es necesario el uso de diversos fungicidas químicos, de origen vegetal y biológicos (González & Pereira, 2012). Uno de los microorganismos usados para este fin es *Trichoderma* sp. Durante varios años, se ha demostrado su potencial para el tratamiento de enfermedades fitopatógenas.

Este hongo actúa como antagonista de hongos como *f. oxysporum* a través de mecanismos de acción como micoparasitismo, competencia por espacio y nutrientes, persistencia en el medio ambiente y producción de metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas. A estos, se le atribuyen los cambios estructurales a nivel celular en los organismos con los que interactúan, tales como vacuolización, granulación, desintegración del citoplasma y lisis celular (Ezziyyani et al, 2004; García et al, 2006). Especies como *Trichoderma harzianum* muestran marcada actividad de micoparasitismo donde inicialmente detiene al patógeno a distancia; en seguida, inicia la secreción de antibióticos y enzimas como  $\beta$ -1,3-glucanasa, quitinasa, proteasa y celulasa degradadoras de la pared celular, lo que

le ayuda a competir eficientemente por nutrientes y espacio, reduciendo y destruyendo así la colonia del patógeno (Ezziyyani et al, 2004).

Sin embargo, a pesar de que se ha demostrado la eficiencia del control por parte de este hongo benéfico, en algunos casos se utilizan en conjunto varios tipos de origen de fungicidas para la eliminación de la marchitez vascular sin tener consideración sobre su afinidad o compatibilidad, lo cual es necesario. Esto, debido a los efectos negativos que se pueden generar sobre el controlador biológico *T. harzianum* (Tanzini et al, 2001) por ejemplo, afectando el desarrollo y tiempo de crecimiento del microorganismo, la germinación, la concentración de conidios; e inhibiendo el crecimiento principalmente por parte de fungicidas químicos y en algunos casos de extractos vegetales como neem y orégano (Lucena et al, 2011; Tapwal et al, 2012).

Por tal razón, el presente estudio evaluó la compatibilidad de fungicidas químicos, biológicos y de origen vegetal usados comúnmente para el control de *Fusarium oxysporum* en cultivos de tomate, sobre el hongo benéfico *Trichoderma harzianum*. Esto con el fin de proporcionar información relevante sobre el manejo integrado de la marchitez vascular y optimizar así, la aplicación de fungicidas en cultivos de tomate que usen como controlador biológico este hongo benéfico.

## **2. Justificación:**

El tomate es una hortaliza de importancia comercial y económica en el mundo, para 2017 la producción mundial fue de 182.301.395 toneladas (Faostat, 2019). Por su parte, en Colombia, ésta se encuentra entre las ocho hortalizas que mayor producción generan (Morales et al, 2009; Faostat, 2019). Además, para 2015 el país ocupaba el puesto 32 (Cámara de Comercio de Bogotá CCB, 2015) de producción de tomate en el mundo, y para 2017 paso a ocupar el puesto 29 con una producción anual de 714.314 toneladas (Faostat, 2019). Para el mismo año, Colombia exportó 208 toneladas a nivel mundial. Sin embargo, el rendimiento promedio medido hasta 2017, solo alcanza 34 Ton/ha, lo que representa un rendimiento menor de este cultivo en comparación del presentado en otros países como por ejemplo Brasil (69 Ton/ha), Chile (63 Ton/ha) y China (58 Ton/ha) (Morales et al., 2009; Faostat, 2019).

La principal causa del bajo rendimiento de este cultivo es atribuida a las condiciones climáticas que dominan las regiones de siembra, pues los cambios extremos de humedad y temperatura que generan dichos escenarios, favorecen el establecimiento de plagas y enfermedades que afectan la productividad de los cultivos (Jaramillo et al, 2006). Organismos como artrópodos, bacterias, nematodos, virus y hongos pueden afectar el desarrollo de plantas de tomate (Ruiz et al, 2011). Una de las principales enfermedades que genera efectos negativos en este cultivo es la marchitez vascular causada por *Fusarium oxysporum*. Según González & Peteira (2012), este hongo produce pérdidas en el rendimiento del cultivo de hasta 60%. Dicho agente tiene un amplio rango de distribución en al menos 32 países, y

se distingue por su alta virulencia que se da hasta en organismos con genes de resistencia.

Teniendo en cuenta la incidencia de enfermedades y el bajo rendimiento que esto genera en los cultivos de tomate, los productores tienden a usar mayor cantidad de plaguicidas a fin de mejorar la productividad, lo cual conlleva a un aumento en los costos de producción y disminución de la rentabilidad. Adicionalmente lo anterior conlleva, a que se genere contaminación ambiental principalmente por el uso de plaguicidas de síntesis química que generalmente son los más usados para tratar plagas y enfermedades como la marchitez vascular (Jaramillo et al, 2007). Al respecto, en Colombia para 2017 se usaron 37.698,5 toneladas de pesticidas químicos de los cuales 8.101,1 fueron fungicidas y bactericidas (Faostats, 2019). Sobre los datos nacionales de agroinsumos para 2019 se tiene que en total se encuentran registrados 2.543 hasta la fecha, de los cuales 1.022 son fungicidas y de ellos 332 son para cultivos de tomate (Instituto Colombiano Agropecuario, 2019).

Por otro lado, una alternativa para el tratamiento de estas plagas y enfermedades son los bioinsumos. Este tipo de plaguicidas han aumentado en los últimos años su registro y por consiguiente su uso. En Colombia a diciembre de 2018 se encontraban registrados ante el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) 303 bioinsumos, los cuales se clasifican como: inoculantes biológicos, agentes biológicos de control de plagas y productos de origen vegetal. Estos a su vez pueden clasificarse según el tipo de ingrediente activo del producto en: Extractos vegetales, microorganismos y otros (esta última categoría incluye nematodos, micorrizas, compuestos orgánicos, etc.). De la totalidad de bioinsumos registrados, 149 son a base de microorganismos, de estos, 25 productos son para cultivo de tomate. En cuanto a productos de origen vegetal se encuentran registrados 38 de los cuales, siete son para el cultivo de la hortaliza mencionada (Instituto Colombiano Agropecuario, 2019). Esto confirma el aumento del uso y registro de productos biológicos para el cultivo de *Solanum lycopersium*.

Por otro lado, se conoce que los distintos tipos de productos fitosanitarios (químicos, biológicos y extractos vegetales) son usados en conjunto, lo que puede generar efectos adversos entre ellos como afectar la composición del producto, perturbar en igual o incluso mayor medida a controladores biológicos que a organismos objeto de tratamiento y también generar efectos letales como la muerte o subletales como afectar el comportamiento, desarrollo y crecimiento haciendo que su función benéfica se vea deteriorada (Vinuela, 2011).

Es por eso que, considerando la importancia del tomate en Colombia, la incidencia de enfermedades como la marchitez vascular que afecta el rendimiento del cultivo, el uso en conjunto de fungicidas químicos y extractos vegetales con controladores biológicos como *Trichoderma harzianum* y al efecto adverso de estas aplicaciones; se destaca la importancia de realizar estudios de compatibilidad de los tres tipos de

productos fitosanitarios ya que, de esta manera, se proporcionaría una herramienta útil para los productores de tomate con el fin de que realicen un eficiente manejo integrado de la marchitez vascular teniendo en cuenta qué productos pueden ser usados junto con *T. harzianum*.

### **3. Marco teórico y estado del arte:**

#### **3.1. Marco teórico**

##### **3.1.1. Generalidades del tomate (*Solanum lycopersium*):**

El tomate es una planta dicotiledónea, que pertenece al orden Solanales y a la familia Solanaceae. La situación del género no ha sido clara pues inicialmente se reconocía dentro del grupo *Lycopersicon* pero se propuso el cambio al género *Solanum* pasando de denominarse *Lycopersicon esculentum* a *Solanum lycopersium* (López, 2006). Por lo que es común que se mencione de ambas maneras en diferentes textos, aunque se refieran a la misma planta. Para el presente proyecto se usará el nombre de *S. lycopersium*.

Esta hortaliza es una de las especies más cultivadas en el mundo, tiene una amplia cantidad de especies silvestres relacionadas y proporciona numerosas cualidades alimenticias (Jaramillo et al, 2013). El tomate es rico en vitaminas A, B1, B2, B6, C, E y de minerales como fósforo, potasio, magnesio, manganeso, zinc, cobre, sodio, hierro y calcio. Posee un alto valor nutricional por su aporte de proteínas, hidratos de carbono, fibra, ácido fólico entre otros (Jaramillo et al, 2006). Su consumo proporciona estímulos al sistema inmune y se recomienda para el manejo de enfermedades como reumatismo, parálisis, gota, arteriosclerosis, diabetes, úlceras del estómago, tuberculosis, y estreñimiento. Además, influye en la disminución del riesgo de padecer cánceres (Jaramillo et al, 2007).

A pesar de las excepcionales características mostradas, esto no la hace menos susceptible a ser afectada por la incidencia de diversos tipos de plagas y enfermedades. El tomate es atacado por más de 100 patógenos como hongos, bacterias, virus y nematodos, que generan daños a una o varias de sus estructuras (Sandoval, 2004), causando pérdidas económicas en los cultivos.

##### **3.1.2. Enfermedades asociadas al cultivo de tomate**

Entre las enfermedades generadas por hongos se destacan las siguientes (tomadas de Jaramillo et al, 2013):

###### **Pudrición de plántulas:**

Generada por *Pythium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp., *Phytophthora* sp. y *Sclerotium* sp. Esta enfermedad aparece por altas temperaturas entre los 18 y 24 °C en semilleros con altas densidades de siembra que poseen poca luminosidad,

alta humedad y en los suelos es generada por textura pesada y mal drenaje. Algunos de los efectos que genera son debilitamiento de las plantas por aferración a las raíces; puede también ocasionar estrangulamiento del cuello, necrosis del tallo y muerte de las plántulas de tomate.

**Gota, tizón tardío:**

Producido por *Phytophthora infestans*. Se da en lugares con temperaturas entre 15 y 22 °C y humedad relativa mayor de 80%. Cuando la incidencia de la enfermedad es alta, las esporas del hongo son de fácil dispersión. Los síntomas son observados en tallos (manchas grandes cafés con coloración verde alrededor), en hojas (manchas cafés con verde y leve crecimiento blanco en el centro) y en frutos.

**Mancha de Alternaria o tizón temprano:**

Generada por *Alternaria solani* y/o *Alternaria alternata*. El hongo se favorece por zonas húmedas y cálidos. Es diseminado por lluvia y viento. Genera lesiones en hojas y tallos, proporcionando laceraciones oscuras, profundas con anillos claros y puede generar la muerte de las plántulas. En campo, los síntomas son observados en las hojas más viejas con lesiones color café oscuro. Cuando estas crecen provocan amarillamiento general en la hoja.

**Carate:**

Generada por *Phoma andina* var. *Crystalliniformis*. Esta patología se da en humedad relativa mayor al 70% y temperaturas entre 22 y 18 °C. Los síntomas son observados en el cuello con una mancha marrón a negra o puntos negros. Además, hay descomposición de tejido y marchitez generalizada finalizando en la muerte de la planta.

**Moho gris:** Producida por *Botrytis cinérea*. El desarrollo del patógeno se favorece por altas densidades de siembra, alta humedad relativa, continuidad de lluvias y temperaturas de 15 a 22 °C. Afecta tallo, flores y fruto. Se reconoce por aparición de lesiones café-oscuro en el ápice con anillos concéntricos en el haz de la hoja y moho café en el envés.

**Moho blanco:**

Generado por *Sclerotinia sclerotiorum*. Se produce en grandes densidades de siembra y alta humedad. El patógeno puede afectar tallos, peciolos y a veces frutos identificándose por pudriciones acuosas. Al afectar los tallos también ocasiona interrupción del transporte de agua y nutrientes.

**Cenicilla o Mildeo Polvoso:**

Generada por *Oidium* sp. El patógeno se favorece por épocas cálidas y baja humedad relativa, se dispersa por viento. La sintomatología se observa en tallos, peciolos y en las hojas más viejas por aparición de puntos circulares blanquecinos que van estableciendo en distintos lugares de la planta y generan clorosis en la hoja.

**Antracnosis:**

Producida por *Glomerella cingulata* (anamorfo *Colletotrichum gloeosporioides*). Se produce en temperaturas medias de 15 a 20 °C, con alta humedad relativa, altas densidades de siembra, riego por aspersión, entre otras. Se reconoce por lesiones redondas, profundas negras en el fruto. En condiciones de alta humedad las lesiones empeoran y se llenan de micelio blanco en los bordes.

**Fumagina:** Producida por *Cladosporium* sp. La patología se favorece por temperaturas de 20 y 25 °C y alta humedad relativa, altas densidades de siembra y presencia de insectos. Las lesiones se observan en las hojas con un moho verde-negrucado que envuelve la lámina foliar evitando que la planta realice adecuadamente la fotosíntesis. Los daños por esta enfermedad se presentan en las hojas de tomate con un moho de color verde a negro que cubre la lámina foliar el cual evita una adecuada fotosíntesis de la planta. También afecta pedúnculos y frutos de vegetal.

**Marchitez vascular:**

Producida por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Este patógeno habita normalmente el suelo de los cultivos, sobreviviendo en residuos de cosechas anteriores en forma de micelio o clamidosporas. Este hongo puede dispersarse por medio del agua principalmente cuando se realiza riego por gravedad y por presentar suelos contaminados. La patología es frecuente cuando los suelos son mal drenados, son ácidos y de textura liviana permitiendo la penetración directa del hongo por las raíces de la planta, donde se establece y crece en los vasos del xilema generando taponamiento.

**3.1.2.1. *Fusarium oxysporum*****Características**

*Fusarium oxysporum* es un organismo diverso a nivel de especie, conformando alrededor de 120 distintas formas especiales (*formae specialis*). Esto se fundamenta en el modo de infección que el patógeno genera en un hospedante en particular. Dichas formas especiales a su vez se subdividen en razas, que se diferencian según la destreza del patógeno de afectar distintos haplotipos en un hospedante. Este hongo es un patógeno facultativo que es capaz de permanecer y resistir en la materia orgánica y al mismo tiempo invadir la planta cuando esta tiene algún desequilibrio (Renata et al, 2018).

Según lo indican De Granada et al (2001) el hongo genera tres clases de esporas que son:

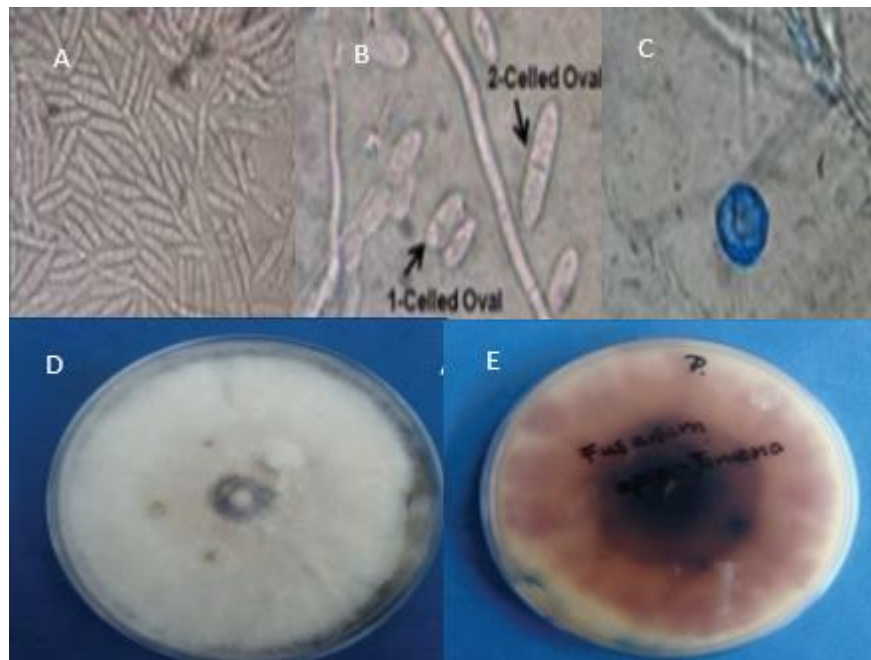
**Microconidias:** Son en general unicelulares, no tiene septas, y pueden ser hialinas, elipsoidales a cilíndricas, rectas o curvadas; se producen sobre fiálides laterales,

cortas, sencillas o en los conidióforos con pocas ramificaciones. Estas estructuras poseen un largo de 5- 12  $\mu\text{m}$  y 2,5- 3,5  $\mu\text{m}$  de ancho (Figura 1A)

Macroconidias: Exhiben paredes delgadas, en forma de huso, alargadas, medianamente curvas, con varias células septadas transversalmente con la célula basal alargada y la célula apical reducida; tienen de largo de 27 a 46  $\mu\text{m}$  y de ancho 3.0 a 4.5  $\mu\text{m}$  (Figura 1B)

Clamidosporas: Se producen por medio de la acumulación de material de algunas partes de las hifas y de las conidias y son de paredes gruesas. Pueden generarse solas o en pares, terminales o intercalares: tienen un diámetro de 5 a 15  $\mu\text{m}$ . Estas estructuras le permiten al hongo sobrevivir en ambientes que no son favorables (Figura 1C)

La colonia en medio de cultivo PDA muestra un crecimiento de apariencia algodonosa de coloración blanquecina-rosa al inicio del desarrollo(Figura 1D), y posteriormente con la conformación del micelio, cambia su coloración a púrpura en la parte central y una tonalidad más clara hacia los bordes como se indica en la figura 1E (Renata et al, 2018).



**Figura 1.** Morfología de *Fusarium oxysporum* a nivel macro y micro. **(A)** Macroconidios. **(B)** Microconidios. **(C)** Clamidosporas. **(D)** Colonia de *F. oxysporum* en los primeros estados de desarrollo. **(E)** Colonia de *F. oxysporum* en estado avanzado de desarrollo. Fuente: Leslie & Summerell, 2008; Renata et al, 2018.

### **Ciclo de enfermedad**

Las hifas del hongo penetran directamente a las raíces, atraviesan la corteza y la epidermis e ingresan a los vasos del xilema siendo esta la manera más común de entrada del patógeno, aunque, las hifas pueden también penetrar por medio de las heridas realizadas mecánicamente o por nematodos, o insectos. Al encontrarse dentro de la planta, el hongo se moviliza con dirección al tejido vascular por colonización intracelular a los vasos del xilema y los ataca cuando se encuentran en madurez. El patógeno coloniza por crecimiento del micelio o a través de transporte pasivo de microconidios. Este último favorece una colonización no uniforme, lo que puede generar que el material de propagación superficialmente sano termine afectado (Valencia et al, 2001).

### **Sintomatología**

Esta inicia con el retraso en el crecimiento y marchitez foliar, lo que es seguido por quemazón en las hojas, secamiento total y esclerocios de coloración negra dentro de tallos. Para las plantas adultas, los síntomas se generan durante el periodo entre floración y maduración del fruto; En principio, las hojas más viejas se tornan amarillentas, (color que frecuentemente se da en un solo lado de la planta) comenzando con marchitez en las horas más cálidas del día y después de este periodo, el proceso continua hasta que la planta se seca completamente. Adicionalmente, las hojas también pueden presentar encrespamiento bajo y los pecioloos pueden oscurecerse (Jaramillo et al, 2013).

### **Tratamientos para control de *Fusarium oxysporum***

Para el control de esta enfermedad se utilizan distintos fungicidas químicos como prochloraz, bromuconazol, benomyl y carbendazim, entre otros (Amini & Sidovich, 2010). Adicionalmente, se utilizan productos fitosanitarios de control biológico que actúan por mecanismos como antibiosis, competencia por espacio o por nutrientes, inducción de resistencia, etc. Los microorganismos utilizados para el control de este patógeno son: *Trichoderma* spp. (*T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii* y *T. hamatum*); *Pseudomonas* sp. (*Pseudomonas fluorescens*) y *Serratia plymuthica* (Jaramillo et al, 2013). De los anteriores, una de las especies efectivas para el control de *Fusarium oxysporum* y la más estudiada es *Trichoderma harzianum*.

#### **3.1.3. *Trichoderma harzianum***

Es una de las especies más comunes del género *Trichoderma* sp. y la más estudiada dada su capacidad controladora en diferentes hongos fitopatógenos.

#### **Las características del género:**

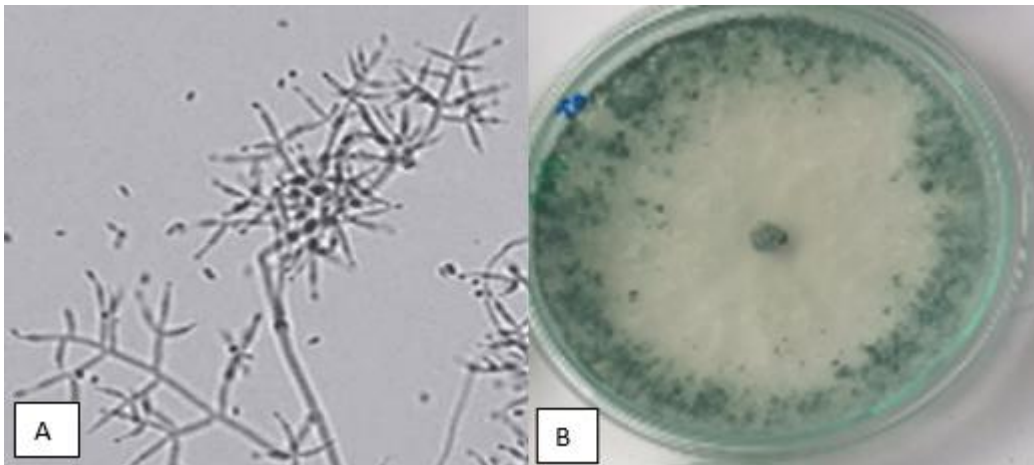
Hongo aeróbico, que muestra características óptimas de crecimiento en amplios rangos de temperatura, oscilando entre 15 y 30 °C, con un óptimo de 25 °C. En

algunas especies, temperaturas superiores a 30 °C restringen el crecimiento y desarrollo del hongo, haciendo que este inicie la formación de clamidosporas. El hongo se desarrolla en suelos con pH desde 5,5 a 8,5, aunque sus valores óptimos se muestran en ambientes ligeramente ácidos entre 5,5-6,5. El género muestra alta capacidad competitiva y de antibiosis debido a la producción de enzimas líticas (Castro & Rivillas, 2007; Martínez et al, 2013; Michel et al, 2001).

#### **Características de la especie:**

*T. harzianum* es un hongo que tiene estructuras del tipo conidias hialinas uniceluladas, ovoide en conidióforo hialino largo no verticilado (Figura 2). Puede generar clamidosporas en sustratos naturales, cualidad importante pues dichas estructuras aumentan la sobrevivencia en el suelo en condiciones adversas.

Las colonias en medio de cultivo PDA crecen formando uno a dos anillos concéntricos produciendo conidios de coloración verde oscuro (Shah et al, 2012). Es saprofito del suelo y de la madera, mostrando rápido crecimiento. Es utilizado para el control biológico, siendo principalmente efectivo contra *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp., y *Pythium* sp. y *T. harzianum*; se destaca por su habilidad para colonizar sustratos de manera rápida, también por inducir resistencia sistémica adquirida en plantas y además contribuye al crecimiento vegetal (Martínez et al, 2013). Esta especie tolera rangos de temperatura de 30°C a 38°C, pero su óptimo de crecimiento se da a los 20°C.



**Figura 2.** Morfología de *Trichoderma harzianum* a nivel macro y micro. (A) ilustración de la vista microscópica. (B) Vista macroscópica de la colonia de *T. harzianum* en estado avanzado de desarrollo. Fuente: Rodríguez & Gato (2010); Autor.

#### **3.1.4. Compatibilidad.**

Teniendo en cuenta que en cultivos de tomate se utilizan plaguicidas de diferente origen es importante conocer la compatibilidad entre ellos. La compatibilidad se define como la toxicidad aguda de un plaguicida sobre una plaga y sobre el agente

de control biológico (Stark et al, 2007). Esto es importante ya que, según lo reporta Lucena (2011), se realizan combinaciones de estrategias de control sin conocer su afinidad y esto puede generar entre otras cosas recombinación genética que conlleva a desarrollo de variabilidad del hongo o patógeno a tratar. Dicha variabilidad se puede expresar en factores fisiológicos, patogénicos y también sobre la respuesta que muestren hacia los plaguicidas, generando un control más complejo (Pérez et al, 2003).

En este sentido, la respuesta que genere *Trichoderma* sp. va a cambiar según las combinaciones de su especie o cepa y los fungicidas que se usen con este. Por lo que, para desarrollar un programa eficiente de manejo de enfermedades, es fundamental la compatibilidad de los bioagentes potenciales con fungicidas botánicos y químicos. Esto con el fin de conservar la capacidad controladora de los productos usados y establecer medidas para su uso eficiente (Tapwal et al, 2012; Martínez et al, 2013).

## **3.2. Estado del arte**

### **3.2.1. Compatibilidad de fungicidas con *Trichoderma harzianum***

Teniendo en cuenta que uno de los microorganismos usados para el control de enfermedades como *Fusarium* sp. en cultivos de tomate es *Trichoderma* sp., ha surgido la necesidad de evaluar su compatibilidad con otros fungicidas ya que, se ha evidenciado que la actividad controladora de este hongo benéfico puede verse afectada por las combinaciones de microorganismos y productos fitosanitarios químicos y de origen vegetal (Martínez et al, 2013; Ortellado & Fuente, 2013).

Algunos de los efectos negativos evidenciados al usar diferentes fungicidas con *Trichoderma* sp. son la inhibición del crecimiento del micelio, cambios en los bordes, en la coloración de las colonias y en la textura del micelio. Algunos productos fitosanitarios también afectan la actividad enzimática del hongo benéfico y otros generan efectos negativos en la germinación, concentración de conidios y tiempo de crecimiento del micelio (Stefanova, 2006).

Al respecto, Durán et al (2007), evaluaron la sensibilidad *in vitro* de tres cepas de *Trichoderma* sp. aisladas de semillas de soya frente al fungicida fludioxonil 2,5% + metalaxil-m 1%. Para esto se realizaron mediciones del diámetro de la colonia después de 24 horas y se determinó la inhibición de crecimiento micelial, encontrando que el fungicida provoca un fuerte efecto adverso en el crecimiento de la colonia de las cepas evaluadas a una dosis letal media inferior a la recomendada para campo, indicando de esta forma que no es compatible con el hongo.

Por su parte, Muiño et al (2010), evaluaron la compatibilidad de tres fungicidas sobre cuatro cepas de *Trichoderma* sp. Para ello midieron el diámetro de la colonia del hongo y calcularon el porcentaje de mortalidad usando la fórmula de Abbott. También determinaron el porcentaje de germinación de conidios para los ingredientes activos zineb, mancozeb y thiram. Finalmente se realizó una prueba para observar el efecto de estos fungicidas sobre la actividad del hongo en campo, encontrando que el zineb provoca poca mortalidad incluso en las concentraciones más altas mientras que, el thiram y el mancozeb provocan mortalidad considerable. En cuanto a la germinación de conidios, los fungicidas evaluados provocaron inhibición total de la germinación a las 48 horas y parcial para zineb, lo cual indica que estos fungicidas provocan retención del proceso germinativo. Finalmente se encontró que los fungicidas no generan efectos negativos sobre la acción de *Trichoderma* sp. en las condiciones naturales en campo.

De igual manera Martínez et al (2013) reportan que en ensayos *in vitro* los fungicidas propiconazol + piroquilon, carbendazim y tebuconazol + triadimenol, generaron inhibición completa sobre el crecimiento de dos cepas de *T. asperellum*, mientras que azoxistrobina solo produjo efecto en el crecimiento, aunque provocó disminución considerable de la esporulación de las cepas evaluadas. En cuanto a la germinación de conidios se encontró que propiconazol + piroquilon y tebuconazol + triadimenol generaron un efecto negativo en este factor en *T. asperellum* con una afectación de más de 90%, y carbendazim y azoxistrobina en alrededor de 60%.

En 2013, Ortellado & Fuente evaluaron la compatibilidad de *Trichoderma* sp. con cuatro fungicidas por medio de inhibición del crecimiento micelial y esporulación. Para lo que encontraron que el fungicida que mayor efecto inhibitorio provocó fue el carbendazim + thiram con un promedio de 23,08%, y el de menor efecto fue el carboxin + thiram ya que inhibió un promedio 4,91% del hongo. En cuanto al efecto en la esporulación, tebuconazole alcanzó la mayor inhibición exhibiendo respuesta diferenciada de los aislados evaluados con un rango de 24% a 89%. Por otro lado, carboxin+thiram mostró el menor efecto inhibitorio con resultados similares al testigo en todos los casos (7%). Con lo anterior se encontró que el fungicida más compatible con el hongo es carboxin+thiram y el menos compatible es carbendazim+thiram.

Adicionalmente se han realizado experimentos de laboratorio para ensayar la posibilidad de combinar fungicidas y productos botánicos con *Trichoderma viride* determinando su compatibilidad por medio del porcentaje de inhibición de la colonia del hongo benéfico. De esta forma se ha encontrado, según Tapwal et al (2012) que solo el captaf y el cobre azul registran moderada compatibilidad con *T. viride* y que dithane, bavistin y ridomil no son compatibles a ninguna concentración. Adicionalmente, extractos de agua de productos botánicos (*Parthenium hysterophorus*, *Urtica dioeca*, *Polystichum squarrosus* y *Adiantum venustum*) son compatibles con *Trichoderma* sp. con porcentajes entre 90 y 100% de

compatibilidad. Solo *Cannabis sativa* muestra un efecto inhibitor sobre el crecimiento del hongo controlador. De manera similar, Vanita en 2010, informó que el aceite de gaulteria, el aceite de hierba de limón y su combinación en condiciones *in vitro* no inhibieron el crecimiento de *Trichoderma* sp., por lo que su resultado indica que los productos evaluados son compatibles con el hongo.

Sobre compatibilidad del hongo benéfico con fungicidas biológicos, Villacís-Aldaz et al (2016) evaluaron la compatibilidad y sobrevivencia de cuatro microorganismos benéficos en bioles de uso agrícola, de manera que encontraron que los géneros *Trichoderma* sp., *Metharhizum* sp. y *Beauveria* sp. mostraron aumento en las poblaciones al adicionarse juntos en los bioles lo que indica que estos organismos son compatibles y por lo tanto óptimos para uso en conjunto.

En cuanto a los estudios de compatibilidad realizados directamente sobre *Trichoderma harzianum*, Méndez (2003) reportó que *T. harzianum* y *Purpureocillium lilacinum* aplicados juntos sobre varios tipos de hortalizas aumentan la absorción de nutrientes a través del mejoramiento y desarrollo radicular, además promueve la disponibilidad de nutrientes necesarios para la planta y protege el sistema radicular del ataque de hongos patógenos y plagas, este estudio muestra que la interacción entre los dos organismos evaluados es benéfica y por lo tanto pueden ser usados conjuntamente por lo cual se infiere compatibilidad entre los hongos.

Al evaluarse la compatibilidad de *Lippia origanoides* (orégano silvestre) y *Azadirachta indica* A. Juss. (neem) con *Trichoderma harzianum* a través del crecimiento micelial (CM) en centímetros (cm) y los días que tardó *T. harzianum* en formar el micelio y las esporas, los estudios indican que hay compatibilidad del hongo benéfico con *A. indica* y *L. origanoides* al 0,37%, reportándose este último como más compatible. Sin embargo, se observan cambios morfológicos de la colonia del hongo. Además, el antagonista no muestra crecimiento en el medio con *L. origanoides* al 0,75%. En cuanto al tiempo de formación de micelio, *T. harzianum* con los extractos mencionados tarda dos días más que el control, excepto en la concentración más alta del ensayo con orégano donde no hubo crecimiento. Sobre la formación de esporas de *T. harzianum* hay mayor retraso en el tratamiento con orégano a 0,37% tomando 11 días para formarlas. Finalmente, los resultados indican que los extractos mencionados son medianamente compatibles con el hongo. Pero se debe tener en cuenta la concentración a la cual se utilicen pues en altas concentraciones estos extractos pueden generar efectos adversos en el hongo benéfico (Lucena et al, 2011).

Sobre los fungicidas químicos, González et al (2015) evaluaron siete productos fitosanitarios sistémicos y dos de contacto observando los efectos causados en el crecimiento radial de *T. harzianum*. Para lo cual encontraron que los fungicidas sistémicos que se derivan de los benzimidazoles fueron más tóxicos que los de contacto. También se encontró que los fungicidas folpet (ftalimida), mancozeb

(ditiocarbamato) y zineb (ditiocarbamato) generaban un efecto inhibitorio sobre el crecimiento del micelio del hongo. Adicionalmente, se clasificó a zineb como muy tóxico, y a mancozeb y folpet como moderadamente tóxicos. Lo que indica entonces que estos fungicidas mencionados son poco compatibles con el hongo benéfico.

Teniendo en cuenta los trabajos encontrados se puede evidenciar que, aunque se han realizado estudios sobre la compatibilidad de *Trichoderma* sp. con productos fitosanitarios, la mayoría son con fungicidas químicos. Además, son pocos los estudios que evalúan los efectos de extractos botánicos y fungicidas de origen biológico con el hongo benéfico. Adicionalmente no se encontraron estudios donde se analicen los tres tipos de origen de fungicidas en conjunto, a la vez que se verifique en condiciones *in vivo* el efecto generado sobre el control de un hongo patógeno como *F. oxysporum* al combinar *Trichoderma* sp. con dichos fungicidas. Es por eso que se destaca la importancia del presente estudio, el cual pretende contribuir con sus resultados a una opción adecuada de manejo integrado de *Fusarium* sp. en cultivos de tomate.

#### **4. Delimitación del problema**

##### **4.1. Problema de investigación:**

Dada la importancia del cultivo de tomate en Colombia, el bajo rendimiento de la producción causado por la incidencia de enfermedades como *Fusarium oxysporum*, y que para el control de este patógeno son usados fungicidas químicos, biológicos y extractos vegetales; es importante evaluar estrategias de manejo integrado basados en la compatibilidad de los diferentes tipos de origen de fungicidas a fin de garantizar la eficacia aportada por cada uno. En este sentido, el presente proyecto desea conocer ¿cuáles fungicidas químicos, biológicos y extractos vegetales son más eficaces sobre *F. oxysporum* y más compatibles con *T. harzianum in vitro*? Y ¿Cuál es el efecto de los tres tipos de origen de fungicidas sobre el control de *F. oxysporum* al ser integrados con *T. harzianum* evaluados *in vivo* en plantas de tomate?

##### **4.2. OBJETIVOS**

###### **4.2.1. Objetivo general:**

Evaluar la compatibilidad de fungicidas químicos, biológicos y extractos vegetales usados para el control de *Fusarium oxysporum*, sobre el hongo benéfico *Trichoderma harzianum*, con el fin de contribuir al conocimiento sobre el manejo integrado de enfermedades como la marchitez vascular en cultivos de tomate.

###### **4.2.2. Objetivos específicos:**

- Determinar la eficacia de fungicidas químicos, biológicos y extractos vegetales sobre *F. oxysporum* en condiciones *in vitro*.

- Estimar la compatibilidad de cada fungicida sobre *T. harzianum* en condiciones *in vitro*.
- Evaluar el control de *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate al integrar fungicidas químicos, biológicos y botánicos compatibles con *T. harzianum*, bajo condiciones semicontroladas.

## 5. HIPOTESIS

- Existe al menos un fungicida químico, un extracto vegetal y un biológico, compatible con *T. harzianum*.
- El control de *F. oxysporum* será mayor al integrar los fungicidas compatibles con *T. harzianum*.

## 6. VARIABLES

Las variables que se tendrán en cuenta en el presente proyecto para cumplir los objetivos propuestos se muestra en la tabla 1. En ella se pueden observar los parámetros que serán medidos en cada procedimiento a realizar.

**Tabla 1.** Variables medidas en cada procedimiento realizado.

<b>Procedimiento</b>	<b>Variable</b>
<b>Valoración del control de calidad de un producto comercial con ingrediente activo de <i>T. harzianum</i>.</b>	-Concentración de conidios (Conidios/ml) -Unidades formadoras de colonia (UFC) -Contaminación del producto (Presencia de otros organismos como bacterias u otros hongos)
<b>Medición de la eficacia de fungicidas en <i>Fusarium oxysporum in vitro</i></b>	-Radiocrecimiento de la colonia del hongo patógeno (cm)
<b>Estimación de la compatibilidad de los fungicidas con <i>Trichoderma harzianum in vitro</i></b>	-Radiocrecimiento de la colonia del hongo benéfico (cm)
<b>Evaluación del control de <i>F. oxysporum</i> al integrar los fungicidas químicos, biológicos y de origen vegetal más compatibles con <i>T. harzianum</i> en plantas de tomate.</b>	-Porcentaje de daño del tallo (%) -Porcentaje de daño foliar (%) -Estado vital aparente de la planta (número de 0 a 4) -Incidencia (%) -Severidad (%) -Concentración de <i>F. oxysporum</i> y/o <i>T. harzianum</i> en sustrato (UFC/g) - <i>F. oxysporum</i> y/o <i>T. harzianum</i> (Presencia o ausencia del hongo en el material vegetal)

## 7. Metodología:

### Área de estudio:

El presente trabajo se llevó a cabo en las instalaciones del Centro de Biosistemas Alberto Lozano Simonelli de la Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano ubicado en la ciudad de Chía Cundinamarca a diez kilómetros por la vía Bogotá Briceño, con coordenadas 4°53'06.5" N, 74°00' 47.9" W. Dentro de estas instalaciones los procedimientos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Microbiología Agrícola y Ambiental, el Laboratorio de Entomología y en el invernadero de control biológico.

### Fungicidas a evaluar

Para el presente proyecto se seleccionaron ocho fungicidas comerciales (Tabla 2) los cuales se emplean con frecuencia para el control de patógenos como *Fusarium* sp. en diferentes cultivos, incluyendo el de tomate. En la tabla se presentan los principales blancos biológicos y cultivos para los cuales son usados y que se encuentran registrados ante el ICA a septiembre y agosto de 2019. Adicionalmente se muestra el origen del fungicida, el ingrediente activo, grupo químico, la categoría toxicología a la que pertenecen y su dosis respectiva recomendada por las casas comerciales.

**Tabla 2.** Generalidades de los fungicidas seleccionados para el estudio

Origen del fungicida	Ingrediente Activo	Grupo químico	Dosis Comercial	Categoría toxicológica	Blanco biológico	Cultivo
Biológico	<i>Bacillus subtilis</i>	N/A	2 cc/L	III. Ligeramente tóxico	<i>Mycospharella fijensis</i> , <i>Ramularia oreola</i> , <i>Alternaria solani</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> , <i>Fusarium</i> sp.	Tomate, banano, algodón, rosa,
	<i>Bacillus pumilis</i>	N/A	3 cc/L	II. Altamente tóxico	<i>Sphaeroteca</i> sp., <i>Phytophthora infestans</i> , <i>Mycosphaerella fijensis</i> , <i>Alternaria spp.</i> , <i>Fusarium</i> sp,	Rosa, tomate, banano, tabaco, arroz.

<b>Extracto vegetal</b>	<i>Melaleuca alternifolia</i>	N/A	3,5 cc/L	III. Ligeramente tóxico	<i>Mycosphaerella fijensis, Alternaria solani, Sphaerotheca pannosa, Botrytis cinérea, Fusarium oxysporum.</i>	Tomate, uchuva, tomate de árbol, aji, ornamentales.
	Extracto de cítricos	a-cetolactonas (grupo químico del ácido ascórbico)	0,3 cc/L	III. Ligeramente tóxico	<i>Sphaerotheca pannosa, Botrytis cinérea.</i>	Rosa, Tomate
<b>Químico</b>	Mancozeb+ cymoxanil+ hidróxido de cobre	Ditiocarbamato+ acetamidas+ Compuestos cúpricos	2 g/L	III. Ligeramente tóxico	<i>Fusarium sp. , Phytophthora infestans, Peronospora destructor, Elsione veneta</i>	Papa, tomate, rosa, cebolla, frambuesa
	Pyrimethanil	Anilopyrimidinas	0,8 cc/L	III. Ligeramente tóxico	<i>Botrytis cinérea, Mycosphaerella fijensis, Sphaerotheca pannosa, Cladosporium echinulatum, Fusarium sp,</i>	Banano, Rosa, Clavel, Tomate, Cebolla
	Flutriafol	Triazoles	0,15 cc/L	II. Moderadamente tóxico	<i>Alternaria solani, Alternaria porri, Mycosphaerella fijensis, Hemileia vastatrix, Fusarium sp.</i>	Papa, cebolla, banano, Tomate, Uchuva, Café
	Prochloraz	Imidazol	0,6 cc/L	II. Moderadamente tóxico	<i>Botrytis cinerea, Cladosporium echinulatum, Sphaerotheca pannosa,</i>	Cebollín, puerro, clavel, rosa, crisantemo

					<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Fusarium</i> sp.,	
--	--	--	--	--	--	--

## Conservación de cepas

Las cepas de *Trichoderma harzianum* y *Fusarium oxysporum* usadas para las pruebas de compatibilidad y eficacia, se conservaron realizando un repique cada 15 a 20 días. Para esto se tomó micelio de una colonia crecida del hongo con un haza recta y se sembró en el centro del medio PDA para su posterior uso, este procedimiento se repitió hasta obtener de tres a cinco cajas por cada repique para asegurar la viabilidad de las cepas. Estos se mantuvieron en la nevera del Laboratorio de Microbiología a  $4\pm 1^\circ\text{C}$ .

### 7.1. Eficacia de los fungicidas sobre *Fusarium oxysporum* en condiciones *in vitro*

Para este ensayo se utilizó el hongo patógeno *Fusarium oxysporum* obtenido a partir del cepario del Laboratorio de Microbiología Agrícola y Ambiental del Centro de Biosistemas en Chía, el cual se había sido aislado de cultivos de tomate con incidencia de marchitez vascular.

Se preparó medio de cultivo PDA adicionando 39 g de este en un litro de agua destilada. Posteriormente se calentó a  $250^\circ\text{C}$  y con ayuda de un imán se agitó a velocidad de 500 rpm por 20 minutos. Una vez hirvió el litro del medio de cultivo, se dividió y se sirvió en ocho recipientes aforados de a 100 mililitros cada uno con un imán y se llevaron a la autoclave para esterilizar a  $121^\circ\text{C}$  por 15 minutos a una presión de 29 psi. Los medios se dejaron enfriar por 10 minutos y con velocidad constante de 250 rpm, se adicionaron a cada uno de los ocho frascos aforados uno de los fungicidas a evaluar según la dosis correspondiente que se muestra en la Tabla 2. Cada recipiente de 100 ml con producto se sirvió en cinco (5) cajas de Petri que corresponden a las repeticiones de los tratamientos a analizar.

Los medios se dejaron enfriar y gelificar por 30 minutos. Posterior a esto, se colocaron discos de 0,5 mm de diámetro del hongo *Fusarium oxysporum* que anteriormente se había aislado en medio PDA, en el centro de cada medio con fungicida (Figura 3). También se realizó un testigo, para el cuál se colocó el disco de 0,5 mm del hongo patógeno en cinco cajas de Petri con medio de PDA sin ningún otro producto adicionado. Los bioensayos se dejaron incubar a  $27\pm 1^\circ\text{C}$  por 8 días, transcurrido este tiempo se midió el radiocrecimiento del hongo. Esto se realizó con un calibrador tomando tres mediciones diferentes del diámetro del hongo por cada caja, teniendo al final 15 datos por cada tratamiento. Con dichos datos, se procedió a calcular el porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo de cada tratamiento

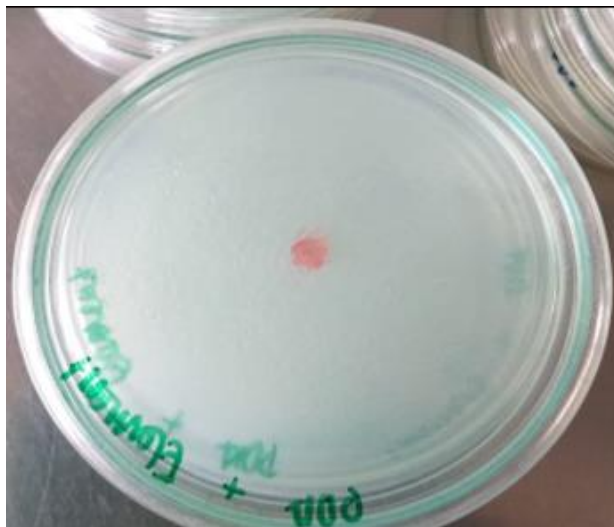
respecto al control a través de la aplicación de la fórmula de Abbott (1987) (Fórmula 1):

Fórmula 1= Abbott (mortalidad Corregida):

$$\% \text{Mortalidad corregida} = \left( \frac{\% \text{MTto} - \% \text{MTo}}{\% \text{MTo}} \right) \times 100$$

Dónde: MTto: Mortalidad en el tratamiento

MTo: Mortalidad en el Testigo Absoluto



**Figura 3.** Montaje experimental para determinar la eficacia de un fungicida sobre *F. oxysporum in vitro*

Para identificar el ingrediente activo más eficaz del extracto vegetal, el biológico y el químico se escogió el que mostrara el mayor porcentaje de inhibición sobre el hongo fitopatógeno, escogiéndose uno para cada tipo de origen de fungicida evaluado.

## **7.2. Compatibilidad de fungicidas sobre *T. harzianum* en condiciones *in vitro*.**

En este ensayo se pretendió determinar el efecto que los fungicidas de estudio generaban sobre el hongo benéfico. Para esto inicialmente se realizó un control de calidad al producto utilizado para el aislamiento del hongo benéfico con el fin de verificar que no existan otras variables que interfieran con los resultados. Posteriormente se realizaron las pruebas de compatibilidad de los fungicidas con el

hongo biocontrolador que indican si los ingredientes activos usados generan algún efecto adverso sobre *T. harzianum* o no.

### **Control de calidad**

Para este procedimiento se verificó la viabilidad y pureza de un producto comercial con ingrediente activo de *Trichoderma harzianum*. Esto con el fin de verificar que cumple con las condiciones adecuadas para poder ser utilizado y puede realizar su correspondiente función como biocontrolador fungico. Además, corroborar que no está contaminado con otro organismo que pueda alterar su funcionamiento. Para llevar a cabo esto, se escogieron los medios PDA, Agar Nutritivo y Rosa de Bengala, el fundamento de estos se presente a continuación:

#### **Medio PDA:**

Este medio se utilizó debido a que sus componentes (Papa deshidratada y dextrosa) permiten el crecimiento de levaduras y hongos, por lo tanto, permitió identificar si el producto estaba contaminado por otros hongos diferentes al deseado (Sandle, 2019).

#### **Medio Agar Nutritivo:**

Este medio debido a su contenido nutricional (pluripeptona y extracto de carne) proporcionan las fuentes de carbono y nitrógeno que permiten el crecimiento de bacterias, de esta manera se utilizó para observar si el producto estaba contaminado por estos organismos (Sandle, 2019).

#### **Medio Rosa de Bengala:**

Este medio se utilizó debido a que por sus componentes (Dextrosa, digerido enzimático de harina de soya, fosfato monopotásico, entre otras) principalmente rosa de bengala, permite el delimitamiento de los microorganismos evitando el crecimiento radial de mohos y levaduras para poderlos contar fácilmente. De esta manera se reportó la concentración del hongo, contando cuantas unidades formadoras de colonias se identificaron y en que dilución fue observado (Sandle, 2019).

Para realizar el control de calidad, se hicieron diluciones seriadas tomando 500  $\mu\text{L}$  del producto y adicionándolos a un tubo de 4,5 ml de agua estéril con solución salina 0,085%. Posteriormente se tomó del tubo anterior 500  $\mu\text{L}$  y se depositaron en un segundo tubo con las mismas características, este procedimiento se realizó dos veces más para tener un total de cuatro diluciones que van de  $10^0$  a  $10^{-4}$ . En seguida, se realizó una siembra masiva colocando 100  $\mu\text{L}$  de las diluciones  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  cada uno en los medios PDA, Agar Nutritivo y Rosa de Bengala. Seguido a

esto, los medios se incubaron a  $27\pm 1^{\circ}\text{C}$  por 8 días, y transcurrido este tiempo se evaluaron los resultados obtenidos según se indicó en el fundamento de los medios de cultivo usados.

Por otro lado, se tomaron 20  $\mu\text{L}$  de la dilución  $10^{-4}$  para verificar la concentración de conidios reportada en el producto utilizado. Para esto se utilizó la cámara de Neubauer, en esta se adicionaron 10  $\mu\text{L}$  a cada extremo de la cámara, se observó bajo el microscopio a 40x y se contaron los conidios observados dentro de la cuadrícula. Este procedimiento se realizó por triplicado para tener un total de seis datos. Estos se promediaron para tener un solo resultado al cual se le aplicó la siguiente fórmula (Formula 2):

Fórmula 2:

$$\text{Concentración de conidios} = \left( \frac{\sum \text{Conidios} \times \text{inversa de la dilución}}{1\text{mm} \times 1\text{mm} \times 0,1\text{mm} (25/25)} \right) \times \left( \frac{1000 \text{ mm}^3}{1\text{cm}^3} \right) \times \left( \frac{1\text{cm}^3}{1 \text{ ml}} \right) \times \left( \frac{\text{Conidios}}{1 \text{ ml}} \right)$$

### Prueba de Compatibilidad

Para los ensayos se utilizó el hongo benéfico *Trichoderma harzianum* aislado a partir de un producto comercial con este ingrediente activo como se indicó anteriormente.

Los medios fueron preparados como se describió en el numeral 7.1 disponiendo nuevamente cinco repeticiones para cada fungicida y adicionalmente un testigo sin ningún producto adicionando. Una vez preparados los medios, a cada uno se le adicionó un disco de 0,5 mm del hongo *Trichoderma harzianum* que anteriormente se había aislado en medio PDA. Los medios se incubaron a  $27\pm 1^{\circ}\text{C}$  por 8 días, transcurrido este tiempo se midió el radiocrecimiento de la colonia del hongo con un calibrador tomando tres datos por cada caja de Petri. Posteriormente se promediaron los datos para obtener un resultado por tratamiento al cual se le aplicó la fórmula 1.

La determinación de compatibilidad con el controlador biológico se realizó basándose en la metodología planteada por la IOBC (Boller, 2005). La Figura 4, explica los niveles de compatibilidad basados en el daño generado por un producto sobre los controladores biológicos. En este sentido, en condiciones de laboratorio, productos que generen una inhibición menor al 30% pueden ser considerados compatibles.

- **Field and semi-field test data:**

N* = harmless or slightly harmful (Reduction 0-50%)	M* = moderately harmful (Reduction 51-75%)	T* = harmful (Reduction > 75%)
--	---	-----------------------------------
- **Classification of laboratory test results**

Laboratory 1 (<30%)	N
Laboratory 2 (30-79%)	M (up to 79%)
Laboratory 3 (80-99%)	T
Laboratory 4 (>99%)	T

**Figura 4.** Niveles de compatibilidad de agroinsumos sobre controladores biológicos. Tomado de IOBC (Boller, 2005).

### **Selección de los fungicidas más eficaces sobre *Fusarium oxysporum* y más compatibles con *Trichoderma harzianum*.**

Se eligió el fungicida de origen vegetal, el biológico y el químico que fueran más eficaces para controlar el hongo patógeno y al tiempo fueran más compatible con el hongo benéfico. Se escogió uno para cada tipo de origen de fungicida considerando que cumpliera ambos criterios. Teniendo en cuenta que, de los cuatro fungicidas químicos evaluados, ninguno fue compatible debido a porcentajes de inhibición por encima del 90%, se decidió seleccionar el que presentara el valor más bajo entre ellos para poder incluirlo en las pruebas *in vivo*.

### **7.3. Evaluación del control de *F. oxysporum* en plantas de tomate al integrar los tres tipos de origen de fungicidas más compatibles con *T. harzianum*.**

Para este ensayo se utilizaron el fungicida biológico, el químico y el extracto vegetal seleccionados en el numeral 7.2. Con los estos, se realizaron tres (3) pruebas en el tiempo a fin de evaluar el control de la enfermedad al integrar *T. harzianum* con estos ingredientes activos.

#### **Tratamientos a evaluar por prueba:**

Los tratamientos evaluados para cada prueba se muestran en Tabla 3. Se tomó como unidad experimental una planta de tomate sembrada en materas de 11 cm de diámetro y 12 cm de altura con sustrato de turba + fibra de coco en relación 1:1. Para la prueba 1, las plantas tenían dos meses de crecimiento y se habían trasplantado al mes. Para cada tratamiento se tomaron seis (6) plantas que corresponden a las repeticiones. Para la prueba 2, las plantas tenían un mes y 15 días de crecimiento. Para cada tratamiento se tomaron siete (7) plantas que corresponden a las repeticiones. Finalmente, para la prueba 3, las plantas tenían un

mes y 8 días de crecimiento. Para cada tratamiento se tomaron cinco (5) plantas que corresponden a las repeticiones.

**Tabla 3.** Tratamientos para la evaluación del control de *F. oxysporum* con los productos más compatibles con *T. harzianum* y más efectivos frente al fitopatógeno.

Prueba	Tratamiento	Descripción
1 y 2	T0: Control	Plantas infestadas con <i>F. oxysporum</i> + <i>T. harzianum</i> .
	T1: Tratamiento 1	Plantas afectadas con <i>F. oxysporum</i> + <i>T. harzianum</i> + fungicida de origen vegetal (Extracto de cítricos)
	T2: Tratamiento 2	Plantas afectadas con <i>F. oxysporum</i> + <i>T. harzianum</i> + fungicida biológico ( <i>Bacillus subtilis</i> )
	T3: Tratamiento 3	Plantas afectadas con <i>F. oxysporum</i> + <i>T. harzianum</i> + fungicida químico (Flutriafol)
	T4: Tratamiento 4	Plantas afectadas con <i>F. oxysporum</i> + <i>T. harzianum</i> + fungicida químico + fungicida biológico + extracto vegetal
3	T0: Control absoluto	Plantas sanas (sin la enfermedad)
	T1: Control negativo	Plantas infestadas con <i>F. oxysporum</i>
	T2: Tratamiento 2	Plantas afectadas con <i>F. oxysporum</i> + <i>T. harzianum</i> + fungicida extracto vegetal (Extracto de cítricos)
	T3: Tratamiento 3	Plantas afectadas con <i>F. oxysporum</i> + <i>T. harzianum</i> + fungicida biológico ( <i>Bacillus subtilis</i> )
	T4: Tratamiento 4	Plantas afectadas con <i>F. oxysporum</i> + <i>T. harzianum</i> + fungicida químico (Flutriafol)
	T5: Tratamiento 5	Plantas afectadas con <i>F. oxysporum</i> + <i>T. harzianum</i> + fungicida químico + fungicida biológico + extracto vegetal

### Descripción de las pruebas

La descripción de las pruebas se muestra en la Tabla 4. Para cada una de ellas se indican características como: número de la prueba y su respectiva duración. Adicionalmente se mencionan las actividades que se realizaron en cada una de ellas, que son las siguientes: inoculación del patógeno *F. oxysporum*, aplicación de *T. harzianum*, aplicación fungicidas + *T. harzianum*, aplicación fungicidas, cantidad

de mediciones, mediciones realizadas, montaje material vegetal, montaje sustrato y análisis estadístico. Para cada actividad y característica se menciona la descripción y/o día en el que fue realizada (cronograma) cada prueba.

Para las pruebas 1 y 2 no se realizó la aplicación de fungicidas de manera individual si no que se hizo en conjunto con el hongo benéfico. Para la prueba 3 se hizo la aplicación del hongo benéfico y de los fungicidas de manera individual, no se hizo en combinación. También es importante resaltar que para la prueba 1, el análisis estadístico del daño foliar se hizo con los datos del día 40 y no con los del día 54 como en la mayoría. Esto debido a que al final de la evaluación los folíolos llegaron a 100% de daño, por lo tanto, en ese momento no se observaban diferencias significativas, de tal manera que se escogió un día cercano al final de la evaluación donde se evidenciaban diferencias importantes entre los tratamientos.

**Tabla 4.** Descripción de las tres pruebas a realizar para evaluar el control de *F. oxysporum* con los productos más compatibles con *T. harzianum* y más efectivos frente al fitopatógeno

Características de la prueba y actividades realizadas	Descripción y/o cronograma		
	1	2	3
Número de la prueba			
Duración prueba	56 días	56 días	30 días
Inoculación del patógeno <i>F. oxysporum</i>	Día 1	Día 1	Día 8
Aplicación <i>T. harzianum</i>	Día 8 y 16	Día 24	Día 1, 9, 15, 22 y 29
Aplicación fungicidas + <i>T. harzianum</i>	Día 24, 32 y 40	Día 32 y 40	No se realizó
Aplicación solo fungicidas	No se realizó	No se realizó	Día 12, 18 y 26
Cantidad de mediciones	6 mediciones, una por semana, iniciando desde el día 16 cuando se esperaba que el hongo fitopatógeno estaba establecido.	6 mediciones, una por semana iniciando desde el día 16 cuando se esperaba que el hongo fitopatógeno estaba establecido.	7 mediciones, dos semanales cada tres a cuatro días, iniciando en el día 12 cuando se esperaba que el hongo fitopatógeno estaba establecido.
Mediciones realizadas	Porcentaje de daño del tallo, porcentaje	Estado general de la planta, incidencia y	Porcentaje de daño de un

	de daño foliar (para 3 foliolos), incidencia y severidad de la enfermedad	severidad de la enfermedad.	foliolo del tercio medio, el estado vital de la planta, incidencia y severidad de la enfermedad. Adicionalmente, para la última medición se determinó el porcentaje de daño del tallo.
Montaje material vegetal	En el día 16 y 48	No se realizó	Día 30
Montaje sustrato	En el día 48	En el Día 16	Día 30
Análisis estadístico	Daño del tallo: se tomaron los datos del día 54 Daño foliar: Se tomaron los datos del día 40.	Estado general: se tomaron los valores hallados en el día 56.	Para el daño foliar, daño del tallo y estado general se tomaron los datos de la última medición.

### **Inoculación del patógeno:**

Este procedimiento se realizó para establecer la enfermedad de la marchitez vascular en las plantas de tomate donde se evaluarán los tratamientos.

Para esto, en primera instancia se observó el estado del hongo patógeno en el microscopio y sus estructuras por medio de la realización de una impronta, con el fin de verificar que el hongo utilizado corresponde a la especie de *F. oxysporum*. Esto se realizó con ayuda de cinta pegante transparente con la cual se tomó una muestra del micelio aéreo del hongo en medio PDA, haciendo un leve toque sobre este con la parte adherente de la cinta. Luego se colocó esta muestra sobre un portaobjetos al que previamente se le había colocado una gota de azul de lactofenol (este se utiliza como colorante). Finalmente, el portaobjeto se observó bajo microscopio en aumento 40 X.

Posteriormente se preparó el inóculo, esto a partir de tres (3) cajas de Petri que tenían el hongo *Fusarium oxysporum* con 8 días de crecimiento. A cada una de las cajas se les añadió 25 mL de agua destilada estéril y tres gotas de tween 100%. Luego se raspó cuidadosamente con una espátula metálica el micelio del hongo en

toda la caja, el contenido obtenido se traspasó a un recipiente de vidrio. Adicionalmente se realizó el conteo de los conidios en cámara de Neubauer para determinar la concentración del inóculo como se describió en 7.2, y asegurar que esta no fuera menor a  $1 \times 10^4$  que es la concentración mínima a la que se puede realizar la inoculación.

A cada planta se le aplicaron 2 mL del inóculo preparado directamente al sustrato cerca de la raíz con una micropipeta de 1 a 10 mL, esto se realizó de la misma forma para las tres pruebas.

#### **Aplicación de *Trichoderma harzianum*:**

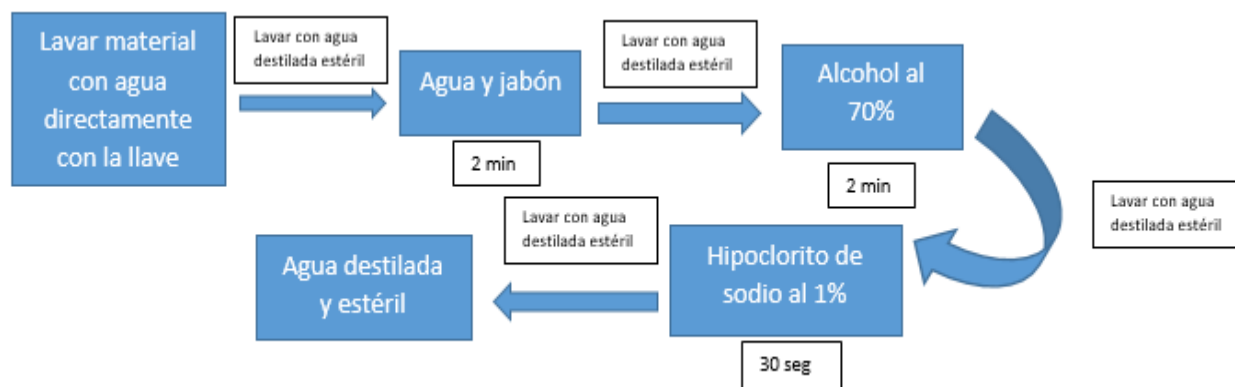
Se utilizó un producto comercial, que fue el mismo empleado en las pruebas de compatibilidad de los fungicidas para la obtención del hongo benéfico. El producto se preparó según la dosis comercial recomendada por el fabricante (1cc/L). A cada planta se le aplicaron 2 ml de la preparación directamente al sustrato cerca de la raíz con una micropipeta de 1 a 10 mL, esto se realizó de la misma manera para todas las aplicaciones de las pruebas 1 y 2, pero la para la prueba 3 se adicionaron 30 mL para la aplicación 2, 3, 4 y 5.

#### **Aplicación de fungicidas:**

Los tres fungicidas seleccionados fueron preparados según las dosis comerciales recomendadas por las casas comerciales (Tabla 2). A cada planta se le aplicaron 30 mL del fungicida correspondiente a cada tratamiento, la cantidad aplicada fue recomendada por uno de los productores de fungicidas. Para el caso del Tratamiento 4 se adicionaron en conjunto los tres tipos de origen de fungicidas según la dosis correspondiente de cada uno sobre 1 litro de agua.

#### **Verificación de la presencia de *Fusarium oxysporum* y *Trichoderma harzianum* en el tejido vegetal de plantas de tomate.**

Se realizó un montaje de material vegetal de una planta. Para lo cual se cortó de ella la base del tallo, se observó si tenía la coloración típica que el hongo genera al invadir el tallo (haces vasculares de coloración marrón). Posteriormente se cortó una sección de aproximadamente 3 mm de grosor del tallo cortado. Este se cortó en varios pedazos más pequeños y se depositaron en un vaso de vidrio para realizar el lavado del material. El procedimiento del lavado se muestra en el Diagrama 1.



**Diagrama 1.** Procedimiento de lavado para montaje de material vegetal.

Después del lavado, se dejó secar el material cerca de un mechero por 15 minutos para después colocar los trozos en forma de reloj en cajas de Petri con medio Komada (Este medio fue utilizado para este montaje debido a que sus componentes nutricionales ( $K_2HPO_4$ , KCL,  $MgSO_4 \cdot H_2O$ , L-asparagina, entre otros) permiten el crecimiento selectivo de especies de *Fusarium* sp.) (Sandle, 2019). El medio se llevó a incubar a una temperatura de  $27 \pm 1^\circ C$  por 8 días y transcurrido este tiempo se revisaron los resultados, reportando presencia del hongo al observar crecimiento de la colonia en alguno de los pedazos de material vegetal.

Adicionalmente se realizó una impronta (como se describió anteriormente) para observar el hongo patógeno bajo microscopio, tomando micelio del hongo con ocho días de crecimiento en el medio Komada.

Este montaje de material vegetal para la prueba 1 se realizó en una sola planta de las 35 que fueron evaluadas, y para la prueba 3 se hizo tomando una planta de cada uno de los tratamientos analizados, es decir que en total fueron seis. Para la prueba 2 no llevó a cabo debido a que las plantas estaban muy pequeñas.

### **Verificación de la presencia de *Fusarium oxysporum* y *Trichoderma harzianum* en sustrato de plantas de tomate.**

Para este montaje se tomó 10 g de sustrato de una planta de tomate y se depositaron en un frasco de 90 ml de solución salina 0,085%. Se homogenizó la mezcla y a partir de esta solución se realizaron diluciones seriadas de  $10^0$  a  $10^{-4}$ , tomando inicialmente 500  $\mu L$  de la mezcla anterior y disponiéndolos en un tubo de 4,5 ml de solución salina 0,085%.

Se depositaron 100  $\mu L$  de las diluciones  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  en los medios PDA y Komada rastrillando para homogeneizar la muestra de cada dilución en toda la caja, para cada medio se realizaron dos repeticiones. Se incubaron los medios a  $27^\circ C$

por 8 días y posterior a estos se evaluaron los resultados, contando la cantidad de colonias encontradas en la última dilución donde se observe su crecimiento.

Este montaje de sustrato se realizó para todas las pruebas, sin embargo, para la prueba 1 solo se tomó la muestra de una sola planta tomada al azar de todas las existentes, y para las pruebas 2 y 3 se tomó un puñado de sustrato de cada planta de cada tratamiento y se unificaron para obtener una sola muestra por tratamiento.





**Mediciones para determinar el control de los fungicidas frente *Fusarium oxysporum* al ser integrado junto con *T. harzianum* en plantas de tomate.**

Para cada planta se determinó el porcentaje de daño del tallo, porcentaje de daño foliar, estado general, incidencia y severidad de la enfermedad, no obstante, en cada prueba se realizaron unas variaciones sobre las mediciones realizadas.

**Control de la enfermedad a nivel del tallo:**

Se midió la coloración oscura desde la base de la planta hasta 10 cm arriba del tallo. El porcentaje fue determinado teniendo en cuenta que 10 cm es el 100%.

Para el caso de la prueba 3, este parámetro se midió teniendo en cuenta la coloración observada al final de la evaluación. Para esto se cortó por la mitad el tallo de cada planta y según su coloración se clasificó en la escala que se muestra en la Figura 5 (Estupiñán & Ossa, 2007). Teniendo en cuenta esto, se asignó un porcentaje de 0 a 100% dependiendo del grado de decoloración observado para cada tallo, este valor se asignó a consideración visual por el evaluador.

GRADO DECOLORACIÓN VASCULAR	DESCRIPCIÓN	CARACTERÍSTICAS
0	Ninguno	
1	Ligera	
2	Intermedia	
3	Severa	

**Figura 5.** Escala para medir decoloración vascular. Fuente: Estupiñán & Ossa, 2007.









### **Control de la enfermedad a nivel foliar:**

El porcentaje de daño se determinó a consideración visual por el evaluador a partir de la observación de coloración amarilla y marchitamiento del foliolo teniendo en cuenta que 100% de daño se estima cuando no se ve ninguna coloración verde, es decir que todo el foliolo es amarillo o está marchito.

Esto se realizó para la prueba 1 y 3, para la primera se escogieron y marcaron tres foliolos de cada planta, uno perteneciente al tercio bajo, uno del tercio medio y uno del tercio alto, los cuales fueron evaluados semanalmente. Para el caso de la prueba 3, solo se tomó un foliolo perteneciente al tercio medio.

### **Control de la enfermedad según el estado general de las plantas.**

Para cada planta se registró el estado general que presentaba, el cual fue determinado visualmente. Los niveles o estados de la clasificación están asociados a la severidad de la infección observada de manera general en cada planta como se indica en la Figura 6, en esta se muestran los cuatro estados que presentaron las planta, una ilustración de cómo se observaron dichos niveles y en la parte inferior la descripción de cada estado para determinar cómo clasificar a cada planta. Esta clasificación fue tomada y modificada de la escala del CIAT (1986).

Estado 1	Estado 2	Estado 3	Estado 4
			
			
<10% del follaje esta marchito y/o clorótico	Entre el 10 y 25% del área foliar está marchita o clorótica	Entre el 26 y 70% del follaje presenta marchitamiento o clorosis	la planta está muerta o severamente infectada, mostrando entre el 71 y 100% de su follaje marchito, con clorosis, necrosis y/o defoliación prematura

**Figura 6.** Clasificación de estado vital general de plantas de tomate.

**Incidencia de la enfermedad:**

Para la incidencia se evaluó el número de plantas por tratamiento con síntomas de la enfermedad utilizando la siguiente fórmula (Fórmula 3):

$$\text{Fórmula 3: Incidencia} \left( \left( \frac{\text{Número de plantas infectadas}}{\text{Número total de plantas}} \right) \times 100 \right)$$

Este parámetro se determinó para cada uno de los tratamientos en las tres pruebas.

**Severidad de la enfermedad:**

La severidad se determinó en las plantas analizadas tanto a nivel foliar, como del tallo y del estado general. Esto se realizó teniendo en cuenta la siguiente escala de daño (Tabla 5) o porcentaje de área afectada (% AFA):

**Tabla 5:** Escala de daño o porcentaje de área afectada (Townsend & Heuberger, 1943).

Severidad	%AFA
0	0
1	1 al 25
2	26 al 50
3	51 al 75
4	76 al 100

Posteriormente, los valores de la escala se convirtieron a porcentaje de daño (Severidad de la enfermedad) usando la Fórmula 4 sugerida por Townsend & Heuberger (1943) que se muestra a continuación:

Fórmula 4:

$$\text{Severidad (\%)} = \left( \frac{[\sum(\text{valor de la escala})(\text{No. de ind en esa escala})(100)]}{(\text{No. total de ind})(4)} \right)$$

Con base los datos obtenidos se realizó el análisis estadístico para ver las diferencias entre los tratamientos. Basado en esto, se realizó la comparación de datos para determinar en qué tratamiento fue mejor el control de la enfermedad.

### **Análisis de datos**

Para el análisis estadístico se utilizó el programa estadístico R, The R Foundation for Statistical Computing, Versión 3.6.1 (2019). En dicho programa se realizaron pruebas de normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilks. Con base en estos resultados se realizaron pruebas paramétricas o no paramétricas según sea el caso aplicando pruebas de comparación y análisis de varianza. Para las pruebas paramétricas se realizó Anova para determinar las diferencias entre los tratamientos y la prueba de Tukey para identificar donde están estas. Para las pruebas no paramétricas se utilizó la prueba de Kruskal-wallis para determinación de existencia de diferencias significativas y la prueba de Mann-Whitney agrupación entre tratamientos. Estas pruebas se realizaron para los datos de eficacia y compatibilidad de los fungicidas, y para los datos del daño tallo, daño foliar y estado.

## **8. RESULTADOS:**

### **8.1. Eficacia de los fungicidas sobre *Fusarium oxysporum* en condiciones in vitro.**

La tabla 6, presenta los porcentajes de inhibición generados por los ocho fungicidas sobre el hongo patógeno, con la aplicación de la fórmula de Abbott (Mortalidad corregida). A partir de lo anterior se determinó que en los fungicidas menos eficaces fueron T1 (*Bacillus pumilis*) con 2% y T3 (*Melaleuca alternifolia*) con 14%. Mientras que los que mayor porcentaje de inhibición generaron fueron: T6 (flutriafol) con 93%, T7 (mancozeb+ cymoxanil+ hidróxido de cobre) y T8 (prochloraz) con 99% cada uno.

**Tabla 6.** Porcentaje de inhibición de tratamientos evaluados sobre *Fusarium oxysporum*.

Tratamiento	Ingrediente activo (dosis)	Origen del fungicida	Porcentaje (%) de inhibición <i>Fusarium oxysporum</i>
<b>To</b>	N/A	N/A	0
<b>T1</b>	<i>Bacillus pumilis</i> (3 cc/L)	Biológico	2
<b>T2</b>	<i>Bacillus subtilis</i> (2 cc/L)		25
<b>T3</b>	<i>Melaleuca alternifolia</i> (3,5 cc/L)	Extracto vegetal	14
<b>T4</b>	Extracto de cítricos (0,3 cc/L)		20
<b>T5</b>	Pyrimethanil (0,8 cc/L)	Químico	77
<b>T6</b>	Flutriafol (0,15 cc/L)		93
<b>T7</b>	Mancozeb+ cymoxanil+ hidróxido de cobre (2g/L)		99
<b>T8</b>	Prochloraz (0,6 cc/L)		99

Con base en estos resultados, se identificó como fungicida vegetal más efectivo el Extracto de cítricos con 20%; como biológico el *Bacillus subtilis* con 25% y como químico el mancozeb+ cymoxanil+ hidróxido de cobre y prochloraz ambos con 99%.

Con los datos hallados de cada tratamiento sobre el radiocrecimiento del hongo fitopatógeno se realizó el análisis estadístico. Mediante la prueba de Shapiro-Wilks con una confianza del 95%, los datos evaluados no tienen una distribución normal (Valor-p= $5.147 \times 10^{-12}$ ), razón por la cual se procedió a realizar la prueba de Kruskal-Wallis confirmando la presencia de diferencias significativas entre los tratamientos analizados (Valor-p=0.002641). Finalmente, mediante la prueba de Mann-Whitney se confirmó que los únicos tratamientos que no tienen diferencias son el control (To) con *Bacillus pumilis* (T1); y prochloraz (T8) con mancozeb+ cymoxanil+ hidróxido de cobre (T7). Esto se debe a que el fungicida biológico mencionado genera un bajo porcentaje de inhibición (2%) sobre el hongo fitopatógeno logrando resultado similar al del control (0%), por otro lado los fungicidas químicos indicados generan el mismo porcentaje de inhibición de 99%.

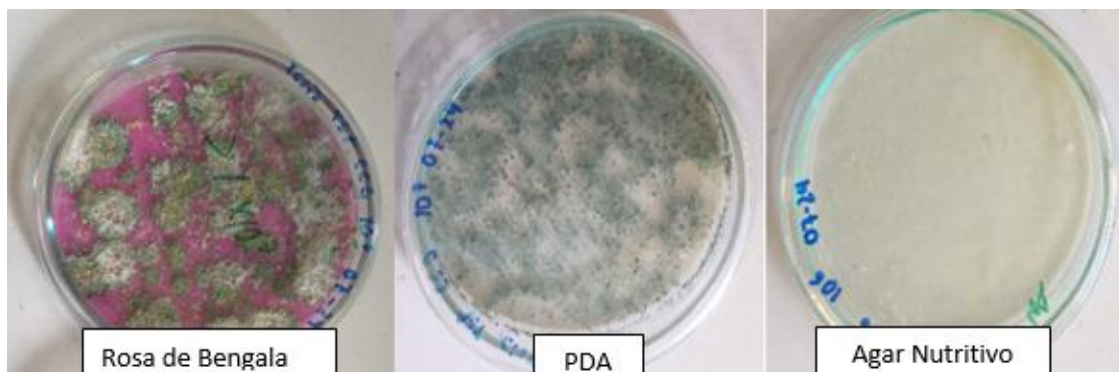
Los demás tratamientos son diferentes entre sí, ya que tienen valores-p menores a 0,05 con un rango de  $3,012 \times 10^{-6}$  a 0,0294. El menor valor corresponde al control con prochloraz (Valor-p=  $3,012 \times 10^{-6}$ ), lo que indica la mayor diferencia y esto se debe a que este fungicida químico fue uno de los que mayor inhibición generó al hongo fitopatógeno. El mayor valor se atribuye a *Melaleuca alternifolia* con el Extracto de cítricos (P-valor: 0,0294), lo cual indica que las diferencias entre los dos fungicidas son bajas, esto es debido a que la inhibición generada por los dos extractos es similar pues generan porcentajes de 14% y 20%, respectivamente.

Teniendo en cuenta los resultados hallados se concluye que tanto los extractos vegetales como los fungicidas biológicos generan efectos inhibitorios bajos (menores a 30%) sobre *F. oxysporum*, esto en comparación con los fungicidas químicos, que en general inhiben parcial o completamente al hongo patógeno con porcentajes inhibitorios de 77% a 99%.

## **8.2. Compatibilidad de fungicidas con *Trichoderma harzianum* en condiciones *in vitro*.**

### **Control de calidad**

La concentración de conidios encontrada en el producto utilizado fue de  $1,16 \times 10^9$  el cual fue cercano al reportado por el fabricante del producto ( $2,0 \times 10^9$ ). En cuanto a pureza, como se puede observar en la Figura 7, no hubo crecimiento de otros hongos diferentes al deseado en el medio PDA ni se observó crecimiento de bacterias en el medio Agar nutritivo. Finalmente, el conteo de UFC en el medio Rosa de Bengala indicó una concentración de  $> 1 \times 10^7$  de *T. harzianum*. Estos resultados indican que el producto está limpio y es viable, y por lo tanto cumple con las condiciones adecuadas para ser usado.



**Figura 7.** Control de calidad realizado a un producto comercial con ingrediente activo *T. harzianum* usado en el presente estudio para las pruebas de compatibilidad.

### Compatibilidad

El efecto de los fungicidas sobre el crecimiento de *T. harzianum* se muestra en la Tabla 7. A partir de esto se puede evidenciar que los fungicidas que menor porcentaje de inhibición generan sobre el hongo benéfico son el extracto de cítricos (1%) y *Bacillus pumilis* (4%). Por su parte, los que mayor efecto producen son el mancozeb+ cymoxanil+ hidróxido de cobre (98%), así como, pyrimethanil y flutriafol ambos con 99%.

**Tabla 7.** Porcentaje de inhibición de los fungicidas evaluados sobre *Trichoderma harzianum* y clasificación en los niveles de compatibilidad de la IOBC (Boller, 2005).

Tratamiento	Ingrediente activo	Origen del fungicida	Porcentaje (%) de inhibición <i>Trichoderma harzianum</i>	Clasificación de compatibilidad
<b>To</b>	N/A	N/A	0	N/A
<b>T1</b>	<i>Bacillus pumilis</i> (3 cc/L)	Biológico	4	N (inofensivo o ligeramente dañino/ Compatible)
<b>T2</b>	<i>Bacillus subtilis</i> (2 cc/L)		18	N (inofensivo o ligeramente dañino/ Compatible)
<b>T3</b>	<i>Melaleuca alternifolia</i>		12	N (inofensivo o ligeramente

	(3,5 cc/L)	Extracto vegetal		dañino/ Compatible)
<b>T4</b>	Extracto de cítricos (0,3 cc/L)		1	N (inofensivo o ligeramente dañino/ Compatible)
<b>T5</b>	Pyrimethanil (0,8 cc/L)	Químico	99	T (Dañino/ incompatible)
<b>T6</b>	Flutriafol (0,15 cc/L)		97	T (Dañino/ incompatible)
<b>T7</b>	Mancozeb+ cymoxanil+ hidróxido de cobre (2g/L)		98	T (Dañino/ incompatible)
<b>T8</b>	Prochloraz (0,6 cc/L)		99	T (Dañino/ incompatible)

Se determinó la compatibilidad de los fungicidas con *T. harzianum* clasificando el porcentaje de inhibición generado por cada uno sobre el hongo benéfico, a partir de la clasificación propuesta por la IOBC (Boller, 2005). En este sentido, se encontró que los fungicidas compatibles (Tabla 7) con *T. harzianum* fueron aquellos que generaron un porcentaje de inhibición inferior al 30% como el extracto de cítricos (1%), *Bacillus pumilis* (4%), *Melaleuca alternifolia* (12%) y *Bacillus subtilis* (18%), los cuales son catalogados como bioinsumos y extractos vegetales. Por su parte, los fungicidas incompatibles fueron flutriafol (97%), mancozeb+ cymoxanil+ hidróxido de cobre (98%), prochloraz (99%) y pyrimethanil (99%), siendo los cuatro de síntesis química. Con base en estos resultados, se determinó que el extracto vegetal más compatible fue el extracto de cítricos, el fungicida biológico más compatible fue *Bacillus pumilis* y el químico más compatible fue flutriafol; este último se escogió aunque su porcentaje inhibitorio fuera mayor a 90%, ya que fue el de menor porcentaje entre los cuatro ingredientes activos de síntesis química y era necesario seleccionarlo para la siguiente fase del proyecto.

Con los datos obtenidos de cada tratamiento sobre el crecimiento del hongo benéfico se realizó el análisis estadístico. Inicialmente se realizó la prueba de Shapiro-Wilks con 95% de confianza determinando que los datos no son normales (Valor-p=  $5,147 \times 10^{-12}$ ). Teniendo en cuenta este resultado se realizó la prueba de Kruskal-Wallis la cual estableció que existen diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (Valor-p=0,002747). Posteriormente se realizó la prueba de Mann-Whitney la cual indicó que casi todos los tratamientos son diferentes entre sí ya que la mayoría muestra valores-p mayores a 0,05, esto a excepción del control

con el extracto de cítricos (valor-p= 0.2869), pyrimethanil con prochloraz (valor-p= 0.176), y mancozeb+ cymoxanil+ hidróxido de cobre con prochloraz (valor-p= 0.5055) donde no hubo diferencias significativas. Esto se debe a que el extracto vegetal genera un porcentaje de inhibición bajo (1%) que es cercano al control (0%), por otro lado, a que los fungicidas químicos inhiben por completo el hongo benéfico generando porcentajes inhibitorios similares que son mayores a 90%.

Considerando lo anterior, los bioinsumos (extractos vegetales y biológicos) son compatibles con *T. harzianum* y pueden usarse en conjunto con el hongo benéfico. En contraste, los fungicidas químicos evaluados son incompatibles con el controlador biológico de estudio lo que indica que no deberían ser usados simultáneamente ya que afectarían por completo su actividad controladora.

### **Determinación de los fungicidas más eficaces sobre *F. oxysporum* y más compatibles con *T. harzianum*.**

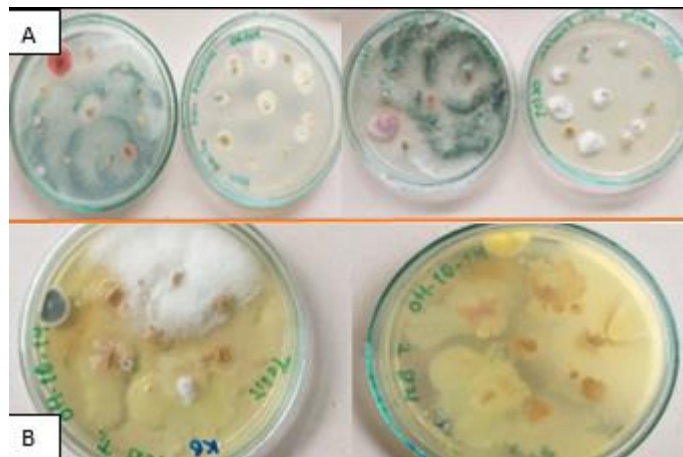
Teniendo en cuenta los resultados de las tablas 6 y 7 se eligió el extracto vegetal, el biológico y el químico que cumplieran los criterios de compatibilidad y eficacia para ser utilizados en las pruebas *in vivo*. En este sentido, los fungicidas elegidos fueron el extracto de cítricos, *Bacillus subtilis* y flutriafol.

### **8.3. Evaluación de control de *F. oxysporum* en plantas de tomate con *T. harzianum* y los fungicidas determinados como compatibles.**

#### **8.3.1. Prueba 1**

#### **Verificación de la presencia de *Fusarium oxysporum* y *Trichoderma harzianum* en el tejido vegetal de plantas de tomate.**

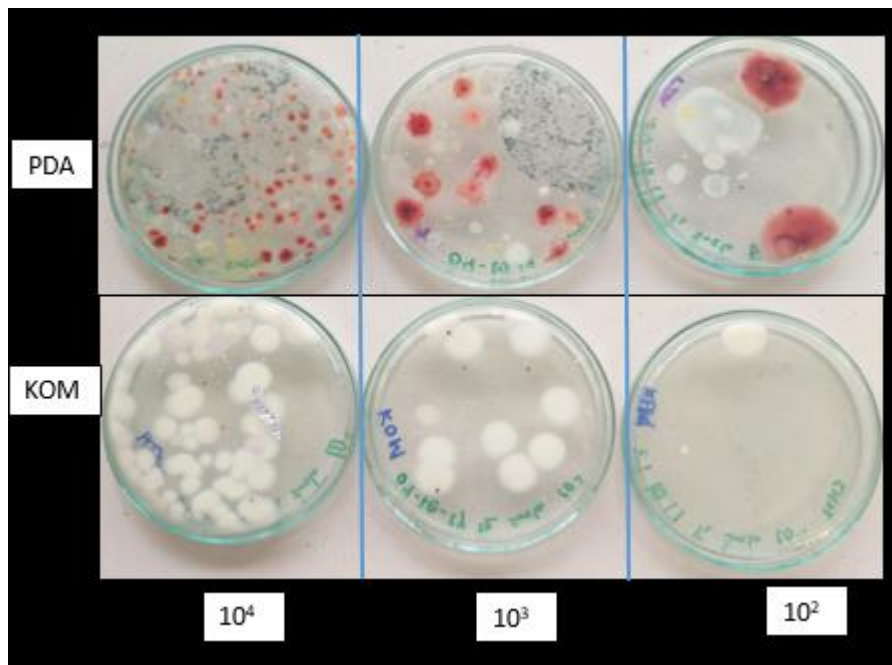
Los resultados del montaje del material vegetal (Figura 8) indicaron la presencia de *Fusarium oxysporum* y *Trichoderma harzianum* desde el inicio (A) hasta el final de la prueba (B). Por otro lado, se pudo observar que el crecimiento de *T. harzianum* en el tallo de la planta al final de la evaluación fue menor que al inicio y para *F. oxysporum* sucedió lo contrario, siendo mayor al final. Esto indica que no hubo control del hongo fitopatógeno por parte del hongo benéfico al terminar la prueba.



**Figura 8.** Montajes del material vegetal de plantas de tomate de la prueba 1. (A) Montaje realizado al inicio de la evaluación en los medios PDA y Komada. (B) Montaje realizado al final de la evaluación en el medio Komada.

**Verificación de la presencia de *Fusarium oxysporum* y de *Trichoderma harzianum* en el sustrato de la planta de tomate evaluada.**

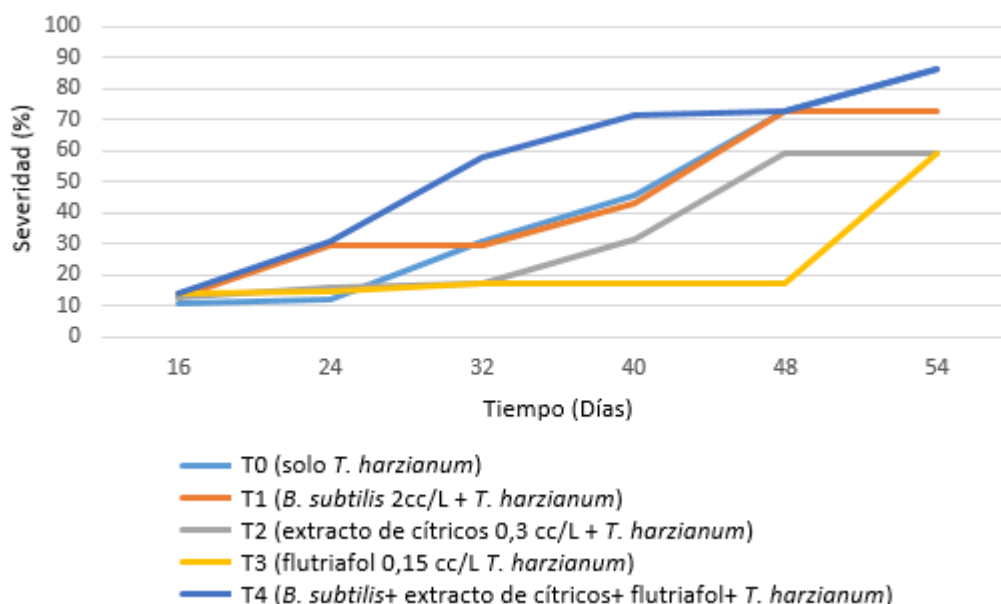
El montaje realizado en la muestra de sustrato de una planta tomada al azar al final del tratamiento (Figura 9) indicó que para *F. oxysporum* la concentración es de  $2 \times 10^5$  UFC/ g y para *T. harzianum* es de  $3 \times 10^5$  UFC/g. De esta manera se influye que la concentración del hongo benéfico en el sustrato era mayor que la del hongo patógeno.



**Figura 9.** Montajes de sustrato de planta de tomate de la prueba 1. En la parte superior se muestra el montaje realizado en medio PDA y en la parte inferior el montaje en medio Komada (KOM) cada uno con su respectiva dilución. En rosa (PDA) y blanco (KOM) se diferencia *F. oxysporum* y en verde (PDA) *T. harzianum*.

### Control de la enfermedad a nivel del tallo

El Gráfico 1 muestra la severidad de la enfermedad en el tallo de plantas de tomate de los tratamientos evaluados en la prueba 1. En el eje Y se encuentra el porcentaje de severidad y en el eje X el tiempo en el que fue evaluado este parámetro (54 días). Los tratamientos evaluados con su respectivo ingrediente activo y dosis se indican con colores en la parte inferior.



**Gráfico 1.** Porcentaje de severidad de la enfermedad evaluada en el tallo de plantas de tomate en la prueba 1.

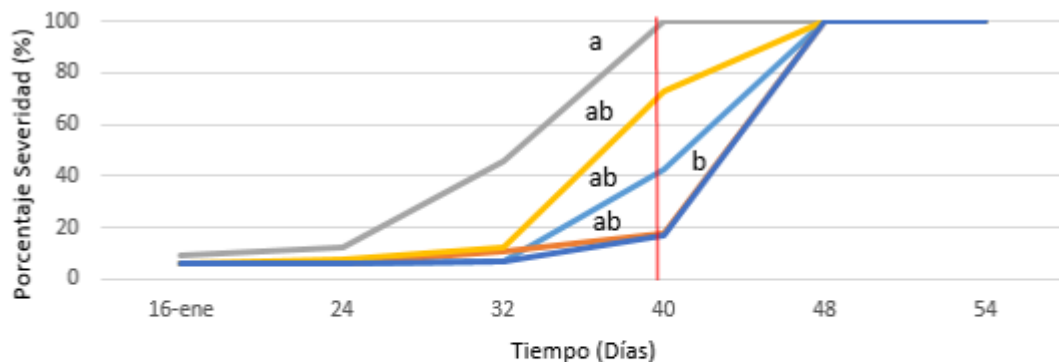
Al comparar el efecto de los tratamientos para controlar *Fusarium oxysporum* teniendo en cuenta la severidad en el tallo, se puede ver que el resultado fue variable para todos. Sin embargo, el tratamiento que mejores resultados mostró fue flutriafol + *T. harzianum* el cual generó el menor porcentaje de severidad del tallo desde el inicio hasta los 48 días y al final de la evaluación fue uno de los que menor porcentaje tuvo (59%). Esto seguido por extracto de cítricos + *T. harzianum* el cual mostró el mismo porcentaje de severidad que el tratamiento anterior hasta los 30 días (17%), después tuvo un aumento hasta los 48 días (59%) y al final de la evaluación el resultado se mantuvo siendo igual que el flutriafol.

En cuanto al resultado para el tratamiento de la combinación de los tres tipos de origen de fungicidas + *T. harzianum*, se encontraron los mayor porcentajes de severidad en este parámetro desde los 16 días (14%) hasta el final de la evaluación (86,3%). Para el caso del control (T0), el porcentaje de severidad fue el menor de todos los tratamientos desde los 16 hasta los 24 días (12%), después de esto tuvo un aumento constante hasta el final de la prueba donde tuvo el porcentaje más alto junto con la combinación de los tres tipos de origen de fungicidas.

El análisis estadístico de los datos del porcentaje de severidad en el tallo al final de la prueba indicó que los datos no tienen una distribución normal (Prueba de Shapiro-Wilks P-value =0,0003059), adicionalmente por medio de la prueba de Kruskal-Wallis no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (P-value=0,3453). Esto indica que el daño generado en el tallo de las plantas de cada fungicida al final de la prueba fue similar y no es estadísticamente diferente lo que se debe a que en ese momento de la evaluación al comparar el resultado del porcentaje obtenido en cada uno de los tratamiento, las diferencias no son mayores a 16%.

### Control de la enfermedad a nivel foliar:

En el gráfico 2, se muestra la severidad de la enfermedad evaluada en la parte foliar de los tratamientos evaluados. El eje Y indica el porcentaje de severidad y el eje X el tiempo en el que fue evaluado este parámetro que corresponde a 54 días. Los tratamientos analizados se muestran con colores en la parte inferior. La línea roja ubicada en el día 40 indica el momento a partir del cual las plantas empezaron a morir hasta llegar a un porcentaje de severidad del 100%, razón por la cual el análisis descriptivo y estadístico se hicieron hasta ese día.



- T0 (solo *T. harzianum*)
- T1 (*B. subtilis* 2cc/L + *T. harzianum*)
- T2 (extracto de cítricos 0,3 cc/L + *T. harzianum*)
- T3 (flutriafol 0,15 cc/L + *T. harzianum*)
- T4 (*B. subtilis*+ extracto de cítricos+ flutriafol+ *T. harzianum*)

**Gráfico 2.** Porcentaje de severidad de la enfermedad evaluada en la zona foliar de plantas de tomate de la prueba 1. Las letras sobre las líneas indican el agrupamiento dado en la prueba de Tukey.

Al comparar los resultados del control de los fungicidas sobre *F. oxysporum* considerando el porcentaje de severidad en los folíolos, se puede observar que el mejor tratamiento fue la combinación de los tres tipos de origen de fungicidas + *T. harzianum*, el cual mostró el menor daño foliar desde el día 16 (6%) hasta el día 40 (7%). De manera similar, *Bacillus subtilis* + *T. harzianum* mostró bajos porcentajes de daño en el día 16 (6%) y hasta el final (11%). Para el extracto de cítricos + *T. harzianum* se evidenciaron los porcentajes de severidad más altos a partir del día 24 (9%) hasta el día 40 (100%), adicionalmente fue el primero en llegar a 100% de daño foliar.

Al realizar el análisis estadístico de los datos se evidencio una distribución normal para estos (Prueba de Shapiro-Wilks valor-p=0,2999), mediante el análisis de varianza (ANOVA) se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (valor-p= 0.0162). Finalmente se efectuó una prueba de Tukey para identificar dichas diferencias. Los resultados se muestran en el Gráfico 2, donde las letras sobre cada línea indican el agrupamiento dado por esta prueba. De esta manera se muestra que dichas discrepancias se encuentran en el tratamiento de extracto de cítricos + *T. harzianum* y la combinación de los tres fungicidas + *T. harzianum* (agrupados con a y b respectivamente) ambos respecto a los demás tratamientos. En contraste, flutriafol + *T. harzianum*, *Bacillus subtilis* + *T. harzianum* y el control no muestran diferencias por lo tanto están agrupados bajo la misma letra (ab).

La incidencia de la marchitez vascular en las plantas de tomate se observó desde los 16 días hasta el final de la evaluación como se muestra en la Tabla 8 Los resultados indican que durante toda la prueba el 100% de las plantas evidenció la presencia de la enfermedad mostrando síntomas de la infección.

**Tabla 8.** Incidencia de *F. oxysporum* en plantas de tomate de la prueba 1.

Tratamientos	Tiempo (Días)				
	16	24	32	40	48
<b>T0 (Control)</b>	100%	100%	100%	100%	100%
<b>T1 (<i>B. subtilis</i> 2 cc/L + <i>T. harzianum</i>)</b>	100%	100%	100%	100%	100%
<b>T2 (Extracto de cítricos 0,3 cc/L + <i>T. harzianum</i>)</b>	100%	100%	100%	100%	100%
<b>T3 (Flutriafol 0,15 cc/L + <i>T. harzianum</i>)</b>	100%	100%	100%	100%	100%
<b>T4 (Combinación de ingredientes activos de los tres tipos de origen de</b>	100%	100%	100%	100%	100%

**fungicidas: *Bacillus subtilis* + extracto de cítricos + flutriafol + *T. harzianum*)**

### 8.3.2. Prueba 2.

#### Verificación de la presencia de *F. oxysporum* y *T. harzianum* en el sustrato de plantas de tomate.

La verificación de la presencia de los dos hongos en el sustrato de las plantas evaluadas realizado a los 16 días de evaluación (Figura 10 y Tabla 9) indica que en ese momento, el hongo benéfico se encontraba en mayor concentración que el hongo patógeno en los tratamientos control (T0) y extracto de cítricos + *T. harzianum* (T2). En contraste, en los tratamientos *Bacillus subtilis* + *T. harzianum* (T1) y flutriafol + *T. harzianum* (T3), fue mayor la concentración del hongo fitopatógeno. Finalmente, en el tratamiento de la combinación de los tres fungicidas + *T. harzianum* (T4), la concentración de los dos hongos fue la misma. Adicionalmente como se observar en la figura, el sustrato estaba contaminado con otros organismos no identificados que eran diferentes a los dos hongos de evaluación (microorganismos con coloración amarilla y blanca) lo que pudo ocurrir por el uso de un sustrato no estéril.

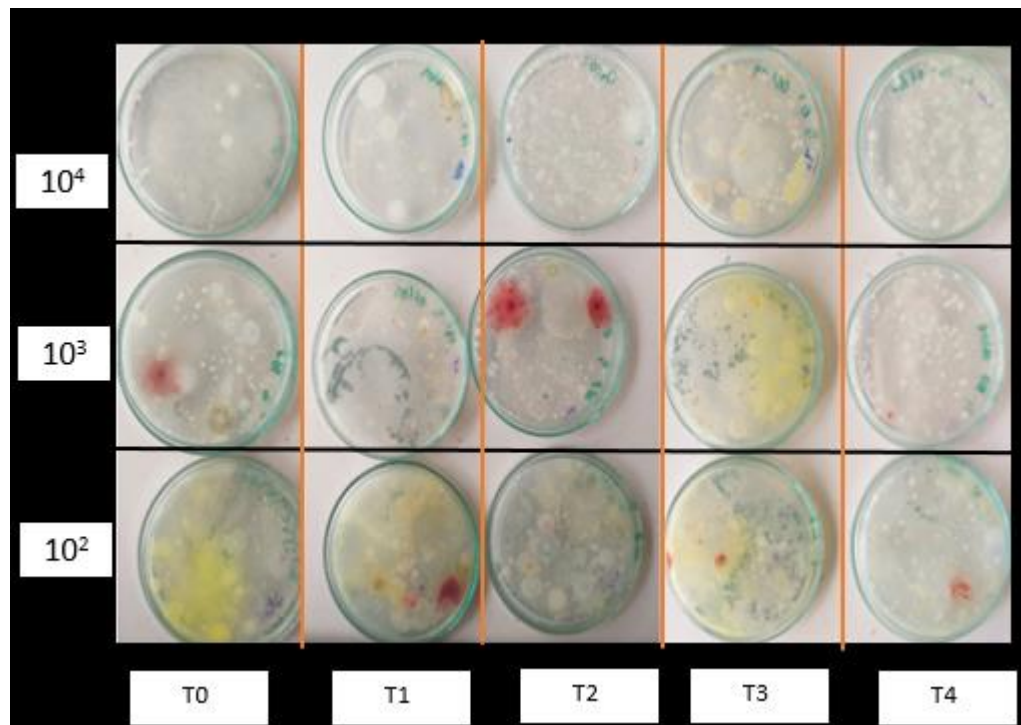
**Tabla 9.** Concentración de *T. harzianum* y *F. oxysporum* en el sustrato de los tratamientos evaluados a los 16 días en la prueba 2.

Tratamiento	Concentración de <i>T. harzianum</i> (UFC/g)	Concentración de <i>F. oxysporum</i> (UFC/g)
T0 (Control)	1x10 <sup>3</sup>	1x10 <sup>4</sup>
T1 ( <i>B. subtilis</i> 2 cc/L + <i>T. harzianum</i> )	1x10 <sup>4</sup>	2x10 <sup>3</sup>
T2 (Extracto de cítricos 0,3 cc/L + <i>T. harzianum</i> )	3x10 <sup>3</sup>	2x10 <sup>4</sup>
T3 (Flutriafol 0,15 cc/L + <i>T. harzianum</i> )	2x10 <sup>4</sup>	2x10 <sup>3</sup>
T4 (Combinación de ingredientes activos de los tres tipos de origen de fungicidas: <i>Bacillus subtilis</i> +	1x10 <sup>3</sup>	1x10 <sup>3</sup>

---

extracto de cítricos + flutriafol + *T. harzianum*)

---

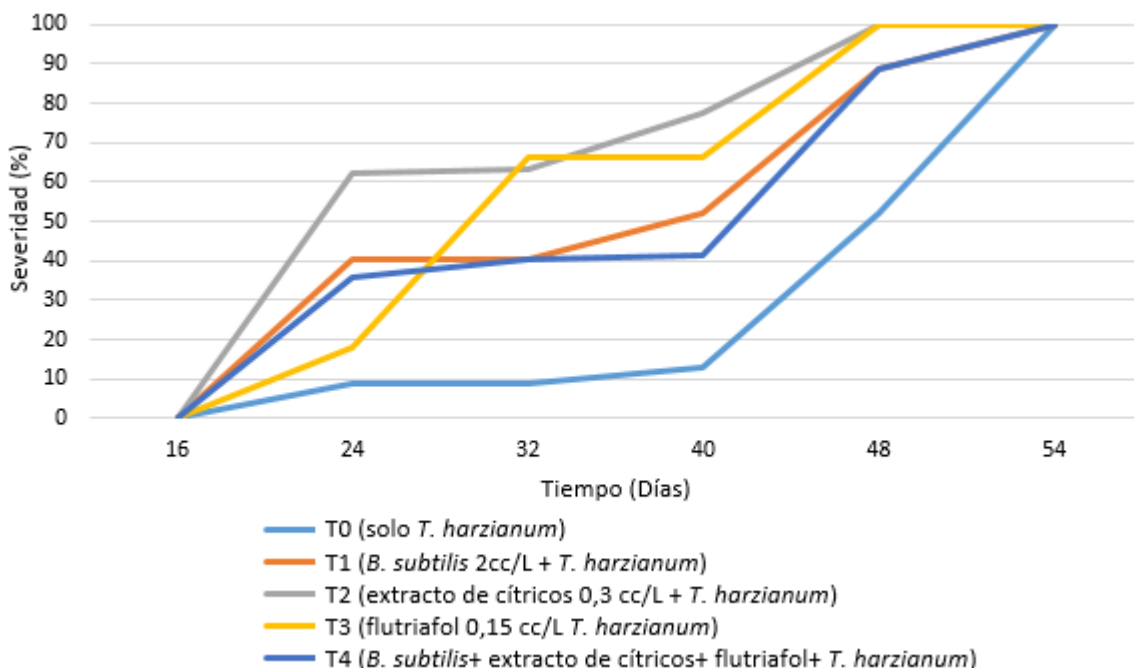


**Figura 10.** Montaje de sustrato de plantas de tomate de los tratamientos evaluados en la prueba 2. En la parte inferior se indica el tratamiento evaluado y en el costado izquierdo la dilución correspondiente a cada caja de petri con medio PDA.

### Control de la enfermedad según el estado general de las plantas.

Los resultados del control de los fungicidas sobre *F. oxysporum* considerando el porcentaje de severidad según el estado general de plantas de tomate se indica en el Gráfico 3. En el eje Y se encuentra el porcentaje de severidad y en el eje X el tiempo en el que fue evaluado este parámetro que corresponde a 54 días. Los tratamientos analizados se muestran con colores en la parte inferior. A partir de esto se observa que, el tratamiento que mejores resultados exhibió en este parámetro fue el control (T0) ya que mostró el menor porcentaje de severidad de la enfermedad desde los 16 días (0%) hasta los 48 días (58,9%). Por otro lado, los tratamientos que mostraron menor control de la enfermedad en esta variable fueron flutriafol + *T. harzianum* (T3) y el extracto de cítricos + *T. harzianum* (T2), los cuales presentaron

los mayores porcentajes de severidad durante el transcurso de la prueba, siendo este último el de mayor severidad entre los tratamientos (de 62 a 100%).



**Gráfico 3.** Porcentaje de severidad de la enfermedad evaluada al nivel del estado general de plantas de tomate en la prueba 2.

La estadística de los datos del control de la enfermedad a nivel del estado general de las plantas en el día 54, a través de la prueba de Shapiro-Wilk indicó que los datos no son normales (Valor-p=2.417e-05), adicionalmente la prueba de Kruskal-Wallis indicó que existen diferencias significativas entre los tratamientos (Valor-p=0,04301). Finalmente se realizó la prueba de Mann-Whitney para identificar en que tratamientos se encuentran las diferencias. Para lo cual se encontró que al final de la evaluación, dichas discrepancias se determinaron solo para el control y flutriafol + *T. harzianum* (valor-p=0,01139), los demás tratamientos son estadísticamente similares.

La incidencia de la enfermedad en las plantas de tomate se muestra en la Tabla 10, a través de esta se puede evidenciar que a los 16 días ningún tratamiento presentaba síntomas de la enfermedad. Sin embargo, a partir del día 24 hasta el final de la evaluación todos los tratamientos mostraron 100% de incidencia de la enfermedad, indicando que todas las plantas mostraban síntomas de infección de *F. oxysporum*.

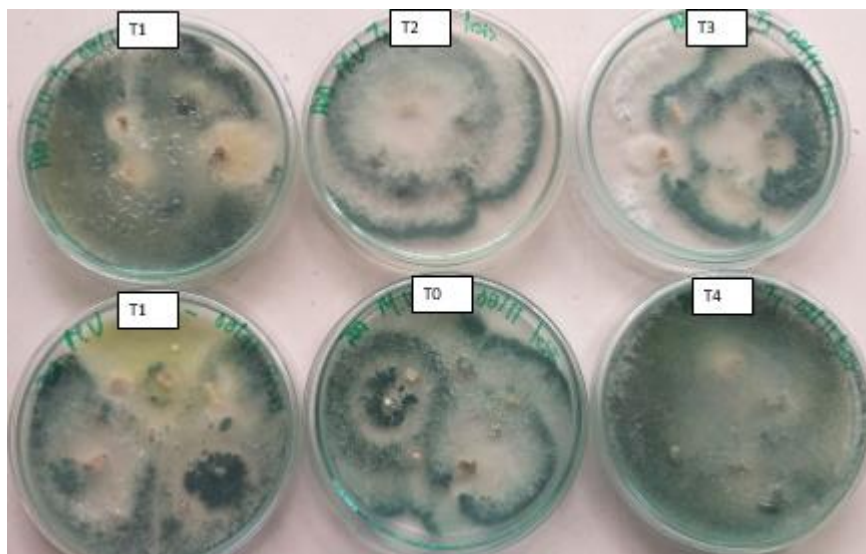
**Tabla 10.** Porcentaje de Incidencia de la enfermedad de *F. oxysporum* en plantas de tomate en la prueba 2.

Tratamientos	Tiempo (Días)				
	16	24	32	40	48
<b>T0 (Control)</b>	0%	100%	100%	100%	100%
<b>T1 (<i>B. subtilis</i> 2 cc/L + <i>T. harzianum</i>)</b>	0%	100%	100%	100%	100%
<b>T2 (Extracto de cítricos 0,3 cc/L + <i>T. harzianum</i>)</b>	0%	100%	100%	100%	100%
<b>T3 (Flutriafol 0,15 cc/L + <i>T. harzianum</i>)</b>	0%	100%	100%	100%	100%
<b>T4 (Combinación de ingredientes activos de los tres tipos de origen de fungicidas: <i>Bacillus subtilis</i> + extracto de cítricos + flutriafol + <i>T. harzianum</i>)</b>	0%	100%	100%	100%	100%

### Prueba 3.

#### Verificación de la presencia de *F. oxysporum* y *T. harzianum* en tejido vegetal de plantas de tomate.

El montaje del tejido vegetal de una planta tomada al azar de cada tratamiento de la prueba 3, evaluado a través del medio de cultivo PDA se muestra en la Figura 11. A través de esto se determinó que, tanto en el control (T0), como en *Bacillus subtilis* + *T. harzianum* (T3) y en la combinación de ingredientes activos de los tres tipos de origen de fungicidas + *T. harzianum* (T5) solo se encontraba el hongo benéfico. En cambio, en el control negativo (T1), en el extracto de cítricos + *T. harzianum* (T2) y en flutriafol + *T. harzianum* hubo presencia de los dos hongos. Sin embargo, aunque en los últimos tres se haya encontrado ambos hongos se observa que *T. harzianum* se encuentra en mayor proporción. Estos resultados indican que la incidencia de *F. oxysporum* de manera general, fue menor en los tratamientos evaluados y que por su parte, *T. harzianum* dominó en todos los tratamientos a pesar de que no debía haberse encontrado en el control absoluto ni en el control negativo. Es posible que lo anterior haya sucedido debido a que los tratamientos se encontraban muy cerca unos de otros.



**Figura 11.** Montaje de material vegetal de plantas de cada tratamiento evaluado en la prueba 3.

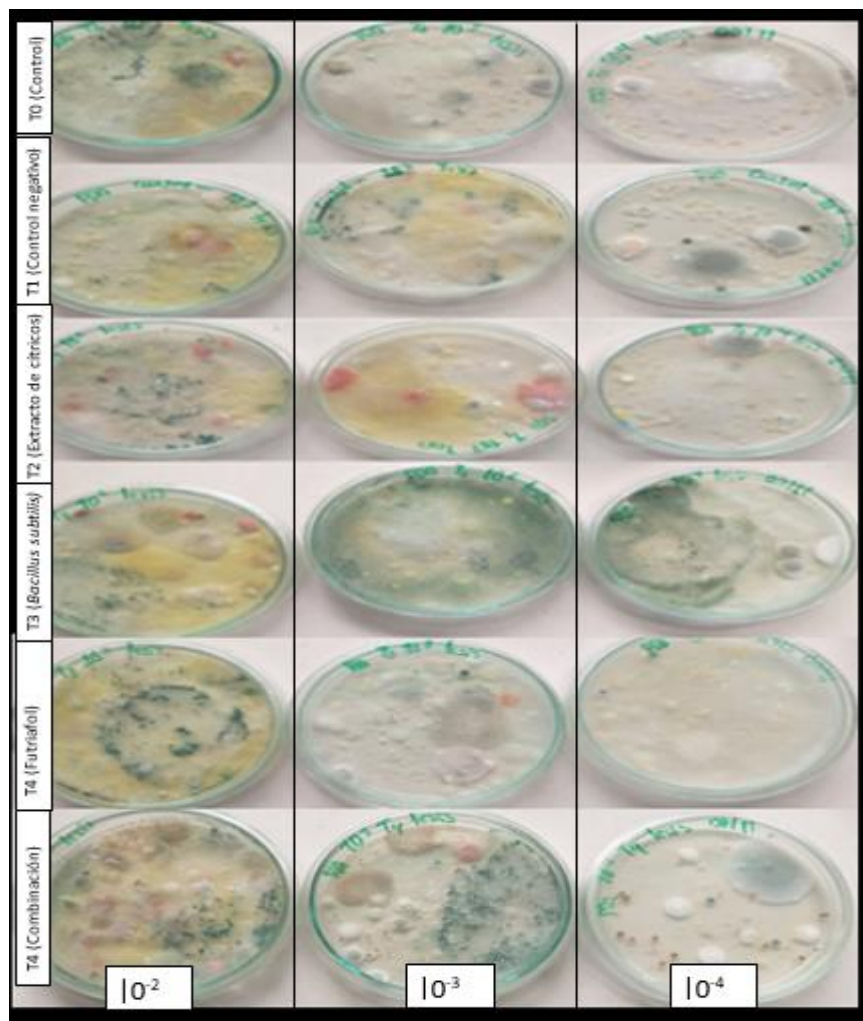
**Verificación de la presencia de *F. oxysporum* y *T. harzianum* en sustrato de plantas de tomate.**

Al determinar la concentración de los dos hongos en el sustrato de las plantas de cada tratamiento evaluado se observó que, el control negativo fue el que mayor concentración de *F. oxysporum* tuvo con respecto a los demás (Tabla 11). Por su parte los tratamientos con extracto de cítricos + *T. harzianum*, flutriafol + *T. harzianum* y la combinación de ingredientes activos de los tres tipos de origen de fungicidas + *T. harzianum* mostraron una cantidad similar del hongo patógeno ( $1 \times 10^4$  UFC/g), y el que menor concentración de *F. oxysporum* presentó fue el control ( $1 \times 10^3$  UFC/g). En cuanto al hongo benéfico, el tratamiento con *Bacillus subtilis* + *T. harzianum* fue el que mayor cantidad de este obtuvo ( $3 \times 10^5$  UFC/g) seguido de extracto de cítricos + *T. harzianum* ( $3 \times 10^4$  UFC/g). Por otro lado, el control negativo no tuvo presencia del hongo benéfico. A partir de este montaje se pudo evidenciar también que el suelo estaba contaminado ya que como se observa en la figura 8, hay crecimiento de otros organismos diferentes a los estudiados lo cual pudo deberse a que se usó un sustrato estéril.

**Tabla 11.** Concentración de *T. harzianum* y *F. oxysporum* en sustrato de los tratamientos evaluados a los 30 días en la prueba 3.

Tratamiento	Concentración de <i>T. harzianum</i> (UFC/g)	Concentración de <i>F. oxysporum</i> (UFC/g)
<b>T0 (Control absoluto)</b>	$4 \times 10^3$	$1 \times 10^3$

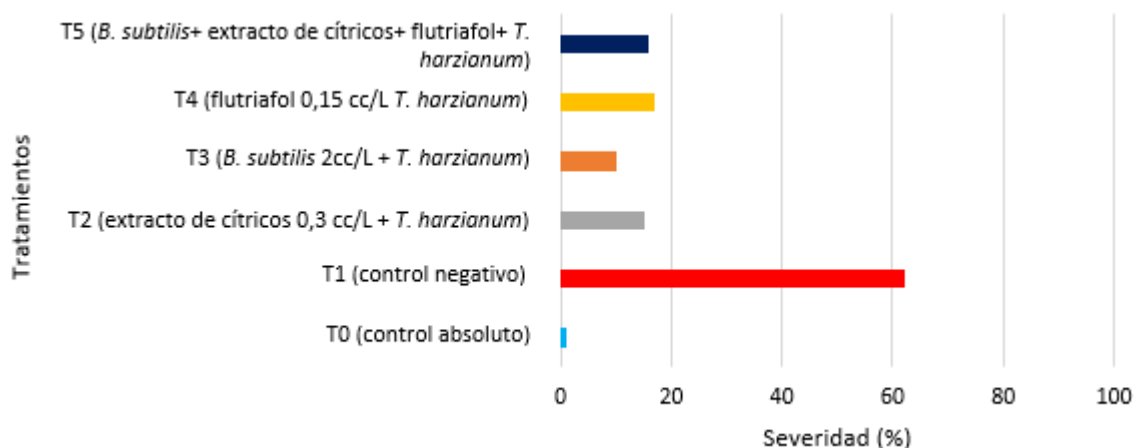
T1 (Control negativo )	0	1x10 <sup>5</sup>
T2 (Extracto de cítricos 0,3 cc/L + <i>T. harzianum</i> )	3x10 <sup>4</sup>	1x10 <sup>4</sup>
T3 ( <i>B. subtilis</i> 2 cc/L + <i>T. harzianum</i> )	3x10 <sup>5</sup>	2x10 <sup>3</sup>
T4 Flutriafol 0,15 cc/L+ <i>T. harzianum</i> )	1x10 <sup>4</sup>	1x10 <sup>4</sup>
T5 ( <i>Bacillus subtilis</i> + extracto de cítricos + flutriafol + <i>T. harzianum</i> )	1x10 <sup>4</sup>	1x10 <sup>4</sup>



**Figura 12.** Montaje de sustrato de plantas de tomate de cada tratamiento evaluado a los 30 días en la prueba 3.

### Control de la enfermedad a nivel del tallo

Al comparar el control de los fungicidas teniendo en cuenta la severidad causada por *F. oxysporum* en el tallo de las plantas evaluadas, se observó que el control absoluto tuvo el menor porcentaje de daño (1%) y el control negativo el mayor (62%) (Gráfico 4). Entre los tratamientos que contenían fungicidas se encontró que el que mejor resultado mostró fue *Bacillus subtilis* + *T. harzianum* generando el menor porcentaje de severidad (10%) y en el que mayor severidad se evidenció fue en flutriafol + *T. harzianum* (17%). Esto quiere decir que en este caso hubo un mejor control por parte del fungicida biológico que por el químico.



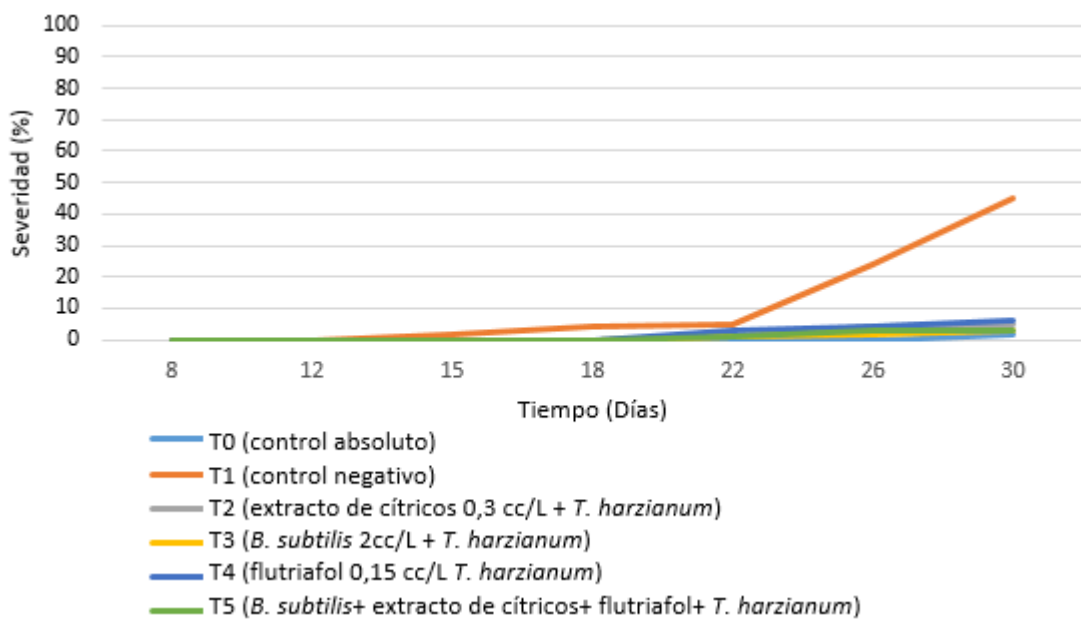
**Gráfico 4.** Porcentaje de severidad de la enfermedad evaluado a nivel del tallo de las plantas de tomate de los tratamientos a los 30 días de evaluación en la prueba 3.

El análisis estadístico de los datos indicó que estos no siguen una distribución normal (Shapiro-wilks valor-p =  $3.904 \times 10^{-5}$ ) y que existen diferencias entre los tratamientos (Kruskal-Wallis valor-p= 0.03692). La identificación de las diferencias a través de la prueba de Mann-Whitney señaló que, estas se encuentran entre el control absoluto y el control negativo al ser comparados con los demás tratamientos ya que exhiben valores p mayores a 0,05. Esto anterior con la excepción del control absoluto comparado con *B. subtilis* + *T. harzianum* (Valor-p= 0.05735). Adicionalmente las mayores diferencias se encontraron al comparar el control absoluto con el control negativo (Valor-p= 0.009467), con flutriafol + *T. harzianum* (Valor-p= 0.009467) y con la combinación de los tres fungicidas + *T. harzianum* (Valor-p= 0.009467). Los demás tratamientos no muestran diferencias entre sí.

Estos resultados indican que, si bien de manera general la comparación de los tratamientos con los fungicidas no muestra diferenciales significativas al controlar la enfermedad de la marchitez vascular, si se observa un leve contraste por parte del fungicida biológico (T3) ya que al no tener diferencias con el control está indicando que tuvo bajo porcentaje de daño en el tallo y por lo tanto muestra mayor control sobre *F. oxysporum* que los demás. Adicionalmente se pudo determinar que el control por parte del fungicida de extracto vegetal es similar al del químico y la combinación de ingredientes activos de los tres tipos de origen de fungicidas.

**Control de la enfermedad a nivel foliar:**

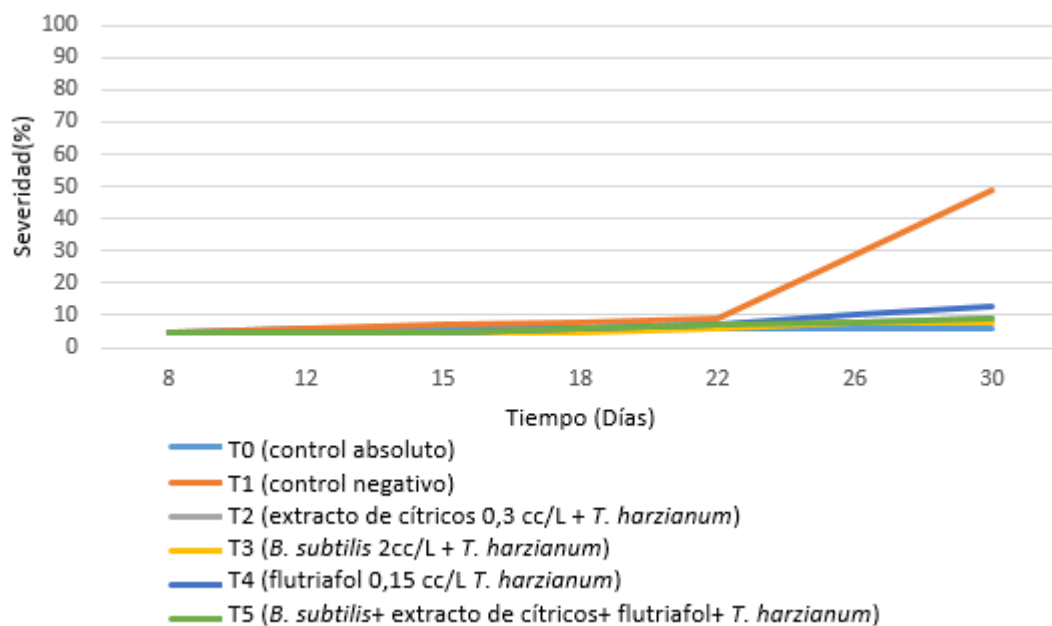
La comparación del control de la marchitez vascular por parte de los tratamientos evaluados considerando el daño foliar que se muestra en el Gráfico 5 indicó que, como se esperaba el control negativo mostró el mayor valor (45%) y el control absoluto el menor en todos los días de evaluación (de 0 a 2 %). Por otro lado, a través de la gráfica se puede observar que las diferencias entre los tratamientos en todo el tiempo de evaluación no son mayores a 3%, lo cual se pudo corroborar con el análisis estadístico que a través de la prueba de Kruskal-Wallis indico que no existían diferencias significativas entre ellos (Valor-p =0.8067). Estos resultados indican que el control de la enfermedad por parte de los tratamientos con fungicidas fue bueno mostrando porcentajes de daño foliar bajos parecidos al control con lo que se puede inferir que el extracto vegetal y el fungicida biológico son similares a los fungicidas químicos en cuanto a efectividad sobre *F. oxysporum*.



**Gráfico 5.** Porcentaje de severidad de la enfermedad evaluado a nivel foliar en plantas de tomate estudiadas por 30 días en la prueba 3.

### Control de la enfermedad según el estado general de las plantas.

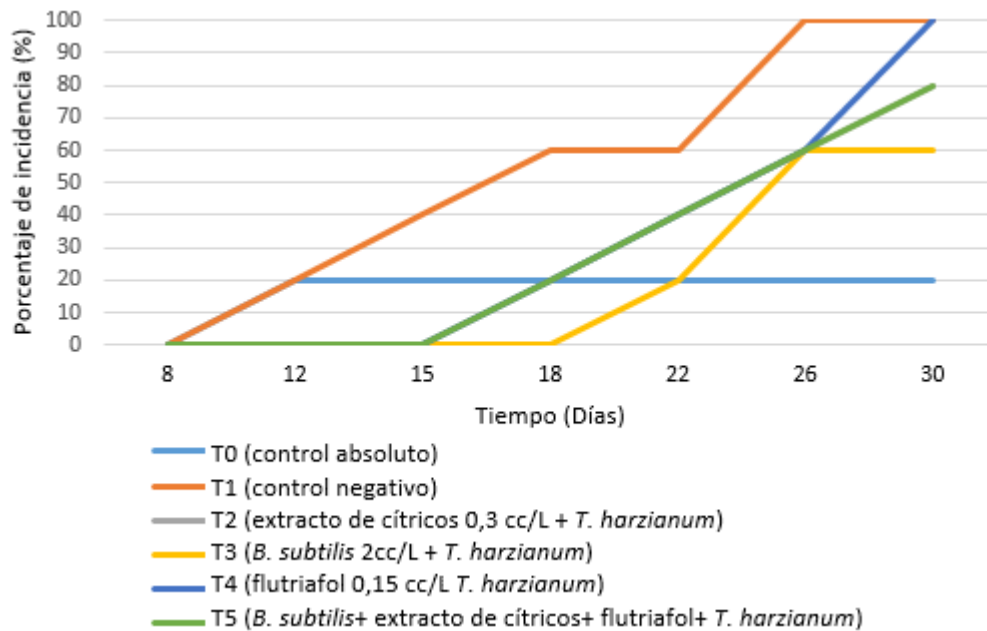
Al comparar los resultados de control de la enfermedad por parte de los tratamientos considerando el estado general de la planta que se muestra en el gráfico 6, se pudo observar que el control negativo mostró los mayores porcentajes de severidad (49%) y el control absoluto los menores durante el tiempo de evaluación (de 5 a 6%). Por otro lado, el control por parte de los tratamientos que tienen los fungicidas no mostró grandes diferencias entre ellos, lo cual pudo verificarse con el análisis estadístico. Este indicó que los datos no son normales (Prueba de Shapiro-Wilks valor-p = 0.003965) y a través de la prueba de Kruskal-Wallis se determinó que no existen diferencias significativas entre los tratamientos. (Valor-P= 0.05831).



**Gráfico 6.** Porcentaje de severidad de la enfermedad evaluado a nivel del estado general de plantas de tomate estudiadas durante 30 días en la prueba 3.

Por otro lado, al evaluar la incidencia de la enfermedad (Gráfico 7) se observó que los tratamientos con fungicida *Bacillus subtilis* + *T. harzianum* (T3) y la combinación de los tres fungicidas + *T. harzianum* (T5) mostraron los mejores resultados desde los 8 días (0%) hasta el día 15 (0%). Después de este tiempo, el fungicida biológico (T3) es el que muestra los menores porcentajes de incidencia hasta el día 22 (20%), lo cual es seguido de un aumento hasta el día 26 (60%) que se mantiene hasta el final de la evaluación (60%). Por su parte la combinación de los tres fungicidas + *T. harzianum* (T5) a partir del día 15 exhibe un aumento constante de la incidencia hasta el final de la evaluación (80%). En contraste, el control negativo (T1) fue el que mostró los mayores porcentajes en todos los días de evaluación (0, 20, 60 y

100%) y el control absoluto (T0) mantuvo el porcentaje de incidencia en 20% desde el día 12 hasta el final de la evaluación. Estos resultados indican que, teniendo en cuenta la incidencia de la enfermedad en los 30 días de evaluación, el tratamiento con *Bacillus subtilis* + *T. harzianum* fue el que mejor controló la enfermedad en comparación a los demás tratamientos.



**Gráfico 7.** Porcentaje de incidencia de la enfermedad en plantas de tomate de los tratamientos evaluados por 30 días en la prueba 3.

## 9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 9.1 Eficacia de los fungicidas sobre *Fusarium oxysporum* en condiciones *in vitro*

Los resultados obtenidos indican que los bioinsumos a base de extractos vegetales y de origen biológico producen porcentajes de inhibición menores al 30% sobre el crecimiento del hongo patógeno. Estos datos se han encontrado en otros trabajos como el de Rodríguez & Montilla (2002) en el que evaluaron un extracto de cítricos sobre *F. oxysporum* el cual inhibió al hongo con 24%, resultado que fue similar al extracto usado en el presente estudio con 20% (Tabla 5). Adicionalmente la investigación mencionada indica que la dosis tiene un efecto significativo en la reducción del hongo patógeno ya que a mayores dosis se generan los mejores efectos y a medida que se reduce la concentración asimismo se reduce el porcentaje de inhibición. Esto es una posible explicación de los bajos porcentajes de inhibición obtenidos para los fungicidas de extractos vegetales y los biológicos, ya que solo se evaluó una dosis y en el caso del extracto de cítricos fue baja (0,3

ml/L) en comparación a la investigación nombrada. Adicionalmente el modo de acción de los extractos vegetales se limita al rompimiento de la pared celular y el citoplasma del hongo, lo cual no es igualmente devastador que los fungicidas químicos ya que estos afectan además funciones enzimáticas de respiración, reproducción y obtención de energía (Alteo S.A.S, 2019).

Por su parte, el extracto de *Melaleuca alternifolia* generó una inhibición sobre el hongo patógeno menor al otro extracto evaluado la cual fue de 14%. Dicho resultado es contradictorio al de otros estudios en donde se han generado inhibiciones de 69,50% sobre *Fusarium oxysporum* (Barbosa & Meza, 2009). No obstante, el anterior estudio indica que el fungicida botánico es menos eficaz para controlar al hongo patógeno que los productos químicos, lo cual fue comprobado en este trabajo. Lo anterior puede estar asociado al modo de acción del ingrediente activo que, de manera similar al extracto de cítricos, interfiere con las estructuras de la pared y la membrana celular del hongo patógeno, y afecta su citoplasma. Esto, suprime la actividad de la respiración mitocondrial lo que en teoría le atribuye alta eficiencia en el control de enfermedades fúngicas. Sin embargo, el extracto muestra una desventaja y es que es altamente volátil lo cual hace que no perdure en el ambiente y su acción se vea limitada (Stockton LTD, 2018). Es probable que la diferencia en el tiempo de duración en el ambiente de los dos tipos de extractos genere las discrepancias en sus porcentajes de inhibición generados.

En cuanto a los estudios de eficacia asociados a especies de *Bacillus* sp. se ha demostrado que generalmente los porcentajes de inhibición producidos por estas bacterias sobre *Fusarium* sp. son mayores al 70% (Ariza & Sánchez, 2012; Rodriguez et al, 2016; Rodriguez et al, 2016), lo cual es contradictorio en comparación a lo encontrado en el presente estudio, ya que los porcentajes generados por las dos especies de *Bacillus* sp. evaluadas no superan el 25% y una de ellas solo obtuvo 2% de inhibición (Tabla 5). Estas discrepancias con la literatura pueden atribuirse a la dosis de evaluación, ya que se utilizaron dosis de 2 y 3 cc/L, que si bien son las indicadas por los fabricantes de los productos, son bajas comparadas a las de otros estudios (10 g/L en Somani & Arora, 2010). En relación a lo anterior, se ha determinado que este factor genera una respuesta diferencial para el porcentaje de inhibición, donde los mejores resultados inhibitorios se han encontrado a las mayores dosis (Liu et al, 2010; López, 2012; Mamani, 2017).

Por otra parte, se encontraron diferencias en los porcentajes de inhibición de las dos especies de bacterias, donde para *Bacillus subtilis* fue mayor con 25% y para *Bacillus pumilis* fue de 2%. Dichas discrepancias pueden deberse a divergencias en factores genéticos que hace que estas puedan exhibir distintas capacidades para generar toxinas e inhibir el crecimiento de los fitopatógenos (Mojica-Marín et al, 2009), lo cual se evidencia en sus mecanismos de acción. *B. pumilis* genera un aminoazúcar que bloquea el metabolismo celular y rompe las paredes celulares de

los patógenos. Mientras que *B. subtilis* produce lipopéptidos cíclicos antibióticos (CLPS) que interactúan con la membrana de las células diana del hongo patógeno cambiando su permeabilidad, composición y produciendo vesículas, de tal manera que restringen el crecimiento del micelio y el desarrollo del hongo fitopatógeno (Mojica-Marín et al, 2009; Bayer S.A, 2019).

Sobre los fungicidas químicos, se encontró que fueron altamente efectivos sobre el hongo fitopatógeno *in vitro* puesto que inhibieron a *F. oxysporum* con porcentajes de 77% a 99%, siendo mancozeb+ cymoxanil+ hidróxido de cobre y prochloraz los más efectivos entre ellos (Tabla 5). Resultados similares de inhibición se han encontrado en otros trabajos, reportando porcentajes de 62% a 100% sobre el mismo hongo en condiciones de laboratorio (Hibar et al, 2007; Song et al, 2004; Ivic et al, 2015). Dicha eficacia sobre *F. oxysporum* puede estar atribuida a los mecanismos de acción de los ingredientes activos químicos que en general erradican el hongo, al afectar procesos bioquímicos de respiración a nivel enzimático (mancozeb); anular la germinación de esporangios, la liberación de zoosporas y obstruir la producción de ácidos nucleicos (cymoxanil); evitar la germinación y destruir paredes celulares (hidróxido de cobre), alterar la biosíntesis del ergosterol ocasionando el colapso de las paredes celulares y la inhibición del desarrollo de las hifas (flutriafol y prochloraz), inhibir la biosíntesis de metionina que afecta la producción de proteínas y la división celular (pyrimethanil).Adicionalmente estos fungicidas tienden a persistir por largos periodos de tiempo en el ambiente, lo cual contribuye a su alta eficacia (Adama, 2015; Adama, 2016; Adama, 2019).

Teniendo en cuenta la literatura consultada y el presente estudio, se pudo confirmar que en la mayoría de los fungicidas químicos se observa mayor eficacia para controlar especies de *Fusarium* sp. en comparación con los extractos vegetales. Estas diferencias encontradas entre los tipos de origen de fungicidas se asocian en primera instancia a los contrastes en los mecanismos de acción que en el caso de los químicos afectan en mayor medida al hongo fitopatógeno pues no solo perturban membranas celulares, sino que también intervienen en funciones enzimáticas de obtención de energía, reproducción y respiración. Por su parte, se ha demostrado que el mecanismo en los extractos evaluados se reduce al rompimiento de membranas lo que puede generar efectos menos dañinos en los hongos. En segunda instancia, se puede atribuir a la persistencia que los ingredientes activos poseen, ya que los extractos vegetales tienen a durar menos tiempo en el ambiente por su alta volatilidad mientras que los químicos persisten por largo tiempo. Adicionalmente se debe resaltar que el resultado obtenido para las dos especies de bacterias evaluadas principalmente para *Bacillus subtilis*, difiere de lo encontrado en la literatura, por lo tanto es importante verificar este resultado.

Se concluyó también cuáles fueron los ingredientes activos más eficaces de cada tipo de origen del fungicida, estos fueron: Extracto de cítricos como fungicida botánico, *B. subtilis* como fungicida biológico, mancozeb+ cymoxanil+ hidróxido de cobre y prochloraz como fungicidas químicos. Las diferencias entre ingredientes activos del mismo origen de fungicida, se deben según lo mencionado anteriormente a discrepancias en tiempos de persistencia en el ambiente y a factores genéticos para el caso de los biológicos.

## **9.2 Compatibilidad de los fungicidas con *T. harzianum* en condiciones *in vitro*.**

Los resultados permitieron observar que los bioinsumos y extractos evaluados (extracto de cítricos, *Melaleuca alternifolia*, *Bacillus pumilis* y *Bacillus subtilis*) fueron compatibles con el hongo benéfico generando porcentajes de inhibición que no sobrepasan los 19% (tabla 7). Al comparar lo anterior con la literatura, se encontró que la mayoría de los extractos vegetales son altamente compatibles con las especies de *Trichoderma sp.* con inhibiciones menores a 35% lo cual es similar a lo encontrado en el presente estudio, sin embargo estos resultados son dependientes de las dosis evaluadas ya que a altas dosis los extractos tienden a generar mayor disminución en el crecimiento del hongo benéfico (Sarkar et al, 2008; Bagwang, 2010; Mukesh, 2014).

Para el extracto de cítricos se encontró un porcentaje de inhibición de 1% (tabla 7) indicando que, de los fungicidas evaluados, este es el más compatible con el hongo benéfico. El resultado anterior es similar al encontrado por Infante et al (2013) donde no se generó ninguna inhibición por parte de un aceite esencial del cítrico *Citrus cinensis* evaluado sobre una especie de *Trichoderma sp.* De manera similar BioEco (2014) indica que *Melaleuca alternifolia* es altamente compatible con *Trichoderma sp.* generando porcentajes de inhibición que varían 0 a 30%, lo cual concuerda con el resultado de 12% hallado en el presente estudio para este extracto (tabla 7). La compatibilidad del hongo benéfico con los dos extractos posiblemente está asociado a la resistencia que *T. harzianum* exhibe a diferentes fungicidas lo cual está atribuido a su alta capacidad saprofítica competitiva que le permite crecer en diferentes sustratos (Chet & Inbar, 1994). Sumado a esto, como ya se mencionó, los mecanismos de acción de los extractos vegetales evaluados no generan efectos devastadores en los hongos y su alta volatilidad hace que dicho efecto se vea reducido en mayor medida, estos factores permiten que el hongo benéfico pueda desarrollarse sin mayor afectación.

En cuanto a las dos especies de *Bacillus sp.* evaluadas, se encontraron inhibiciones de 4% para *B. pumilis* y de 18% para *B. subtilis* (tabla 7) lo cual indica que ambas bacterias son compatibles con el hongo benéfico, pero que *B. pumilis* muestra mayor compatibilidad. Al comparar lo anterior con otros estudios, se ha encontrado

que en su totalidad las especies del género *Bacillus* sp muestran alta compatibilidad con distintas especies de *Trichoderma* sp. También se muestra que no solo no hay inhibición u antagonismo entre los dos microorganismos, si no que el hongo benéfico muestra un crecimiento óptimo en los bioensayos. (Abeyasinghe, 2009; Somani & Arora, 2010; Latha et al, 2011; Marwoto & Muharam, 2013; Ocaña et al, 2015). La compatibilidad entre los dos microorganismos sugiere una posible interacción positiva entre ellos (Zúñiga et al, 2019), dicho efecto positivo se ha evaluado principalmente entre *Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum*, indicando que se debe a que ambos organismos tienen diferentes mecanismos de acción y requerimientos nutricionales, por lo tanto. no tienen que competir para obtener recursos, ya que cada uno puede alimentarse de un modo y de una sustancia distinta permitiendo el desarrollo mutuo. Lo anterior representa una posible explicación a los resultados obtenidos (Guetsky et al, 2002).

Acerca de la inhibición del crecimiento del hongo benéfico, se encontró que pyrimethanil fue una de los fungicidas que más afectó a *T. harzianum* inhibiéndolo en 99%. Resultados similares se han encontrado en otros estudios donde determinan que el ingrediente activo nombrado es altamente tóxico para especies de *Trichoderma* sp. con porcentajes de inhibición que van del 55 al 100% (Villaseñor & Sandoval, 2004; Makatini, 2014). Prochloraz también reportó un alto porcentaje de inhibición (99%), que al comparado con la literatura concuerda completamente ya que se han evidenciado las mismas inhibiciones (99% a 100%) y se ha indicado que no es compatible con *T. harzianum* (Rivera, 2004; Roberti et al, 2006; Khalko & Pan, 2009). Los altos efectos inhibitorios de los fungicidas químicos mencionados pueden atribuirse a los mecanismos de acción que ya han sido descritos anteriormente y que de manera general erradican al hongo con el que entran en contacto, es decir que no son específicos para patógenos. Estos ingredientes activos no discriminan entre especies de hongos, por lo tanto, dado a que fueron altamente efectivos frente al hongo patógeno, de la misma manera era posible que inhibirán al hongo benéfico (Mason, 2015).

Para flutriafol se estableció una inhibición de 97% lo que indica que no es compatible con *T. harzianum*, al enfrentar lo anterior con otros estudios se han encontrado resultados contradictorios. Para el ingrediente activo se han determinado porcentajes de inhibición que varían de 41,11% y 53,78% a altas dosis, y a bajas concentraciones los porcentajes son bajos y suele ser compatible con el hongo benéfico. De esta manera se evidencia que la compatibilidad del fungicida es dependiente de la dosis evaluada y es posible que explique las discrepancias encontradas (Sharma & Singh, 2017; Caverio, 2011; Figueras-Roca et al, 1996). Por otra parte, si bien este fungicida se escogió para evaluarlo en la siguiente fase por mostrar un porcentaje de inhibición más bajo que los demás químicos evaluados,

no se puede dejar a un lado el hecho de que el valor es muy alto y puede ser altamente tóxico para el hongo benéfico.

En cuanto a mancozeb+ cymoxanil+ hidróxido de cobre se encontró un porcentaje de inhibición de 99% indicando que no es compatible con el hongo benéfico, lo cual no concuerda con lo consultado en la literatura debido a que los estudios revisados indican poca sensibilidad con especies de *Trichoderma* sp y también que existe compatibilidad. de los ingredientes activos, principalmente a bajas concentraciones (Mc Lean et al, 2000; Tewari et al, 2005; Bagwan et al, 2010; Sarkar et al, 2010; Sepúlveda, 2015; Valarmathi et al, 2013; Dhanya et al, 2017). Adicionalmente se ha determinado que el resultado de la compatibilidad es dependiente de la dosis evaluada, ya que a bajas concentraciones tienden a ser compatibles pero en altas dosis la inhibición varía entre 70 a 100% (Rivera, 2004; González, 2015; Dhanya et al, 2017). Hay que tener en cuenta que los trabajos consultados no evalúan los tres fungicidas en combinación, si no que en general se analizan individualmente o combinando solo dos de ellos. Considerando esto, es posible que la combinación de los tres agroquímicos genere algún tipo de variación en las propiedades de estos y por consiguiente en los resultados de la inhibición sobre el hongo benéfico, ya que como es mencionado por productores que generan fungicidas a base de estos ingredientes activos, al encontrarse mezcladas las tres sustancias cada una aportará un mecanismo de acción diferente, por lo tanto tiene más posibilidades de afectar al hongo en mayor medida ( Adama, 2016).

Teniendo en cuenta los estudios consultados y los resultados obtenidos, se puede concluir que no se corroboró la hipótesis planteada acerca de que existe al menos un ingrediente activo de cada tipo de origen de fungicida que sea compatible con el hongo benéfico, ya que, aunque si hubo compatibilidad por parte de los fungicidas biológicos y los extractos vegetales, ningún ingrediente activo químico fue compatible con el hongo benéfico. Además, se determinó que el *extracto de cítricos* y *B. pumilis* fueron los fungicidas más compatibles con el hongo benéfico, estos resultados se deben posiblemente a que *T. harzianum* muestra alta resistencia a algunos productos fitosanitarios, también a la alta volatilidad del extracto que genera que su efecto no sea pronunciado y a la interacción positiva que se ha demostrado entre la bacteria y el hongo. En cuanto a la nula compatibilidad de los ingredientes activos químicos, se determinó que puede estar asociado a que dichos agroquímicos son altamente eficaces para la erradicación de varios hongos y su efecto no es discriminatorio entre especies fúngicas, pudiendo de esta forma afectar al hongo benéfico de la misma manera que inhibió al hongo patógeno.

Adicionalmente se debe resaltar, en vista de las diferencias obtenidas de los resultados del presente estudio con la literatura, que es necesario evaluar de manera completa la compatibilidad *in vitro* para tener resultados más confiables que permitan indicar adecuadamente si un fungicida puede ser usado en conjunto con

*Trichoderma harzianum*. De manera que, se podría evaluar una primera fase de compatibilidad según la metodología propuesta por Sylla et al (2013), y después hacer una segunda fase donde se tengan en cuenta otros factores importante además del efecto en el crecimiento, como la germinación y los cambios morfológicos de la colonia.

### **9.3 Evaluación del control de *F. oxysporum* en plantas de tomate con *T. harzianum* y los fungicidas determinados como compatibles.**

El control de la enfermedad vascular en plantas de tomate al integrar *T. harzianum* a los cuatro tratamientos que contienen los diferentes tipos de origen de fungicidas de evaluación, mostraron resultados variables para las tres pruebas realizadas en el presente trabajo. Considerando esto, es importante recalcar que cada prueba fue diferente una de la otra y por lo tanto tuvo variantes en cuanto a la aplicación de los tratamientos y de la inoculación de los dos hongos de estudio. De esta manera, es posible que los resultados de cada ensayo se hayan visto influenciados.

Respecto a lo anterior, en la prueba 1 el hongo patógeno tuvo tiempo de establecerse por una semana pues en este tiempo no fue adicionado *T. harzianum* ni otro fungicida. Además, el hongo benéfico actuó por dos semanas sin la interacción con otro fungicida. Es posible que esto haya generado el difícil control de la enfermedad al final de la evaluación, lo que provocó la mortalidad de las plantas evidenciándose en severidades (gráfica 2) e incidencias de 100% (tabla 8). En cuanto a la prueba 2, el hongo fitopatógeno tuvo tiempo de establecerse por tres semanas y el hongo benéfico actuó por una semana sin la interacción con otro producto. Esto, al igual que la prueba 1 es probable que haya sido la causa de las mortalidades masivas al final del estudio evidenciadas en incidencia (tabla 10) y severidad de 100% (gráfica 3).

Adicionalmente para las dos pruebas mencionadas se aplicó *T. harzianum* y el fungicida correspondiente a cada tratamiento en el mismo día y al mismo tiempo. Sumado a eso, el hongo benéfico se aplicaba a una cantidad menor (2 ml) que cada fungicida (30 ml) en cada planta. En contraste, en la prueba 3 el hongo patógeno solo tuvo un día para establecerse. Además *T. harzianum* se aplicó tanto de manera preventiva (antes de la aplicación del patógeno a una cantidad de 2 ml) como curativa (un día después de aplicar el patógeno a una cantidad de 30 ml). En suma, los fungicidas de cada tratamiento no se adicionaban al tiempo con el hongo benéfico, se intercalaban las aplicaciones dejando entre tres a cuatro días para a cada uno. Finalmente, la cantidad aplicaba de *T. harzianum* y de los fungicidas correspondiente fue igual, de 30 ml. Es posible que el poco tiempo de establecimiento del patógeno y las diferencias de tiempo de aplicación de fungicidas y el hongo benéfico hayan generado un mejor tratamiento para la enfermedad de la marchitez vascular en la prueba 3.

## Prueba 1

Para el primer ensayo se encontraron resultados diferentes al evaluar la severidad de *F. oxysporum* a nivel del tallo y a nivel foliar. Para el primer parámetro (tallo) se observó un mejor control de la enfermedad por dos de los tratamientos que son: flutriafol + *T. harzianum* (T3) y el extracto de cítricos + *T. harzianum* (T2). En contraste, la combinación de los tres fungicidas + *T. harzianum* (T4) mostró menor reducción de la severidad de la enfermedad (Gráfico 1). Para el segundo parámetro (foliar) el mejor tratamiento fue la combinación de los tres fungicidas + *T. harzianum* y el menos eficaz fue el extracto de cítricos + *T. harzianum* (Gráfico 2).

Para dar una posible explicación a los resultados variables dados por los fungicidas en los dos parámetros evaluados, se debe tener en cuenta el patrón de infección de *F. oxysporum*. En este, el hongo comienza a penetrar en las raíces y coloniza el tallo de la planta, seguido a esto invade todo el sistema vascular llegando finalmente a afectar el área foliar. Lo anterior sucede en plantas con avanzado estado de infección del patógeno (Forero et al, 2015). Considerando esto, se puede inferir que, el fungicida va a mostrar una respuesta diferente tanto en el tallo como en las hojas dependiendo de su capacidad de trastocarse o de controlar efectivamente la enfermedad en ambas partes de la planta. De manera que, si un fungicida solo controla al hongo establecido en la raíz y no se trasloca en sentido acropetal, no podrá controlar el hongo establecido en los haces vasculares y se verá mayormente afectada el área foliar de la planta.

Sobre el extracto de cítricos + *T. harzianum* se obtuvo buen control de la enfermedad en el tallo, pero no hubo control en el área foliar. Este resultado se ha demostrado en otros estudios donde un extracto de cítrico evaluado en plantas de tomate infestadas con *F. oxysporum* muestra un efecto mayormente positivo cuando se aplica en suelo (reduce la marchitez en 85%) que cuando se aplica de manera foliar (42%). Esto sugiere una posible translocación del extracto desde la parte foliar hacia la base de la planta por los vasos del floema y desde la raíz hacia los vasos del xilema, lo cual puede ser una explicación de que el extracto pueda ser más efectivo en la parte del tallo que en el área foliar (Rodríguez & Montilla, 2002).

La anterior posible explicación de los resultados puede respaldarse teniendo en cuenta que se ha determinado que plantas infectadas con *F. oxysporum* tratadas con el fungicida nombrado no exhiben la generación de calosas en el tallo, y considerando que la deposición de calosas es una defensa constitutiva que la planta genera contra el ataque de un hongo fitopatógeno, dicha ausencia de las calosas está indicando que el extracto está controlando efectivamente el hongo fitopatógeno en ese lugar (Guédez et al, 2001; González, 2012; Villa-Martínez et al, 2015).

En cuanto a lo observado sobre flutriafol + *T. harzianum* (T3) que mostró buen control de la enfermedad en el tallo (gráfico 1), es posible que el ingrediente activo

químico haya actuado solo debido a que se manifestó en este estudio que a la dosis evaluada el fungicida no es compatible con el hongo benéfico. Adicionalmente, se ha demostrado que el fungicida químico en cuestión es un inhibidor del ergosterol que no es discriminatorio en especies de hongos. Por lo tanto, así como en condiciones de laboratorio fue efectivo para reducir a *Fusarium oxysporum* e incompatible con el hongo benéfico, es probable que de la misma manera afecte al hongo biocontrolador en campo (Mason, 2015). La eficacia para controlar la marchitez vascular *in vivo* del ingrediente activo nombrado encontrada en este estudio, también se ha demostrado en otros trabajos donde se indica que las plantas tratadas con el fungicida químico reducen significativamente la infección de la enfermedad producida por especies de *Fusarium* sp. (Ntushelo & Boshoff, 2002; Hibar, 2007; Shunzhang, 2009). Como ya se mencionó, el óptimo control del hongo fitopatógeno se debe a su mecanismo de acción por inhibir una gran variedad de objetivos dentro de la ruta biosintética de los esteroides y por su capacidad de traslocación que generalmente ocurre acropetalamente, es decir de manera ascendente desde su aplicación en el suelo (Mason, 2015).

En lo que respecta al tratamiento que combina los tres tipos de origen de fungicidas + *T. harzianum* (T4) se encontró eficacia en el control de la marchitez vascular a nivel foliar (gráfico 2), dicha eficacia generada puede explicarse por posibles efectos positivos dados por medio de la combinación de los fungicidas. Este resultado se ha obtenido en otros trabajos donde la combinación de productos fitosanitarios exhibe mayores efectos de control del hongo fitopatógeno como disminución de la severidad casi por cuatro veces, que dichos productos evaluados individualmente. Además, se ha observado una interacción positiva donde se mejora el funcionamiento de cada fungicida evaluado y afecta positivamente a la planta. Dicha eficacia puede atribuirse a que cada ingrediente activo tiene un mecanismo de acción diferente y por lo tanto su acción conjunta afectará al patógeno en mayor proporción y de diversas formas (Serrano et al, 2011; Camargo, 2019)

Teniendo en cuenta esto anterior, es posible que de manera similar en el presente trabajo haya ocurrido una interacción positiva entre los fungicidas y es por eso que se observaron mejores resultados en el control de la enfermedad a nivel foliar por parte del tratamiento cuatro. Sin embargo, es necesario realizar más estudios donde se combinen de diferentes formas los fungicidas mencionados para determinar si realmente existe interacción entre ellos. Lo anterior considerando que la interacción y la compatibilidad de productos de síntesis química con los productos biológicos, va a tender a variar dependiendo tanto de los ingredientes activos usados, las concentraciones que se evalúen y la metodología con la que esto se lleve a cabo (Ribas, 2010).

No obstante, se debe resaltar que a que al final de esta prueba se alcanzaron altos porcentajes de severidad tanto en el tallo como a nivel foliar en todos los

tratamientos, y por lo tanto se puede decir que no hubo control del hongo fitopatógeno al finalizar la evaluación lo cual se puede atribuir a que la enfermedad estaba muy avanzada en estas plantas. De esta manera es necesario replantear la metodología de esta prueba para replicas posteriores y no se recomienda utilizar esta para futuros estudios.

## **Prueba 2.**

En este ensayo solo se consideró la severidad evaluada en el estado general de la planta, para esto se concluyó que el mejor tratamiento fue el control (T0) y el menos eficaz el extracto de cítricos + *T. harzianum* (T2) (Gráfica 3). En lo que respecta al tratamiento de extracto de cítricos, es posible que, como ya se explicó anteriormente, éste sea más efectivo a nivel de tallo. De manera que si la enfermedad a tratar está avanzada, lo cual se pudo corroborar porque al final del ensayo todas las plantas murieron alcanzando el 100% de severidad foliar, entonces el tratamiento de la infección más arriba del tallo no podrá ser adecuadamente controlada, de esta manera la severidad en la parte foliar va a ser mayor. Teniendo en cuenta lo anterior era de esperar que el extracto haya mostrado menor eficacia debido a que en esta prueba solamente se evaluó una variable que en su mayoría está asociada a la parte foliar. Por otro lado, en este ensayo se demostró que el suelo estaba contaminado por otros microorganismos (como hongos y bacterias) lo cual pudo haber interferido en los resultados del parámetro evaluado.

En cuanto a la eficacia evidenciada por el tratamiento T0, se debe resaltar que este era un control de la enfermedad por parte del hongo benéfico ya que el bioensayo constaba de plantas infectadas con *F. oxysporum* tratadas únicamente con *T. harzianum*. Teniendo en cuenta esto, se comparó con estudios que estén asociado con lo anterior. Para lo que se encontró que la eficacia ha sido ampliamente estudiada en laboratorio tanto para el género como para la especie, indicando en casi todos los casos un eficiente control sobre *Fusarium oxysporum* que varía entre 30 y 65,91%. Dicha eficacia está asociada con los mecanismos de acción que tiene el hongo biocontrolador, que principalmente son dos: el primero es competencia por espacio y nutrientes donde coloniza más rápidamente el espacio que el patógeno. El otro es por parasitismo, donde enrolla sus hifas sobre el patógeno inhibiéndolo en 80% (Barbosa & Meza, 2009; Michel-Acevedes. 2009; Guédez et al, 2012). En suma, los estudios en campo son más reducidos, pero en su mayoría también muestran alta eficacia por parte del hongo benéfico evidenciada en porcentajes de incidencia de la enfermedad bajos y retardo en aparición de los síntomas (Borda & Arbeláez, 1993; Elias et al, 1993; Pérez et al, 2009). Considerando los estudios mencionados, se evidencia la eficacia que el hongo biocontrolador ha mostrado en diferentes bioensayos como el presente, la cual ha sido explicada a través de su mecanismo de acción observado *in vitro* que principalmente conlleva parasitismo y competencia por nutriente y espacio.

Por otro parte también se ha observado que dos productos comerciales distintos con ingrediente activo de *T. harzianum* muestran resultados diferentes en incidencia y severidad, indicando que la misma especie puede mostrar resultados desiguales en un mismo ensayo (Mora et al, 2001). Las discrepancias en el biocontrol de *Trichoderma harzianum* dependen de su interacción con los componentes bióticos del medio ambiente y del suelo (Bae & Knudsen, 2005). Esto representa una posible explicación al hecho de que en la prueba 1, T0 halla exhibido bajo control de la enfermedad pero que en la prueba 2 el control haya sido bueno.

Para finalizar, es importante resaltar que en esta prueba al igual que en la prueba 1, las plantas de todos los tratamientos alcanzaron el 100% de severidad, indicando que no hubo control de la enfermedad. Es por eso que se debe replantear la metodología de esta prueba para posteriores replicas.

### **Prueba 3.**

En este ensayo se observó un control óptimo de la enfermedad de la marchitez vascular en los tres parámetros analizados (tallo, área foliar y estado general de la planta) por parte de los tratamientos que contenían los fungicidas de evaluación (T2, T3, T4 Y T5). Adicionalmente se determinó mayor ocurrencia del hongo benéfico ya que dominó tanto en tejido vegetal como en suelo en todos los tratamientos.

Por otra parte, aunque estadísticamente no hubo diferencias entre los tratamientos en los distintos niveles de severidad (tallo, área foliar y estado) )de la enfermedad evaluados al final del estudio, se pudo observar que *Bacillus subtilis* + *T. harzianum* (T3) fue el tratamiento que destaco entre los demás ya que reveló menores porcentajes de severidad en el tallo (10%) que fueron cercanos al control absoluto(1%) (Gráfica 4). Adicionalmente evidenció menores porcentajes de severidad en área foliar (de 0 a 3%) y estado general (de 5 a 8%).

Es posible que dichos resultados se hayan dado por la interacción de *T. harzianum* con la bacteria, lo cual se ha demostrado en varios estudios indicando que la combinación de los dos microorganismos disminuye el porcentaje de infección y aumenta la tasa de supervivencia de la planta, también que disminuye la incidencia de la enfermedad entre 8 a 12% en comparación al efecto individual de cada microorganismo. Adicionalmente se menciona que el óptimo control de la enfermedad resultado de la combinación, revela una sinergia entre los microorganismos de control, la cual puede deberse a diferentes modos de acción de los antagonistas fúngico y bacterianos. Tal efecto sinérgico sugiere que existe una posible modulación en la actividad metabólica del hongo y la bacteria en co-cultivo que modificaría la generación de compuestos antifúngicos (Morsy et al, 2009; Somani & Arora, 2010; Zuñiga et al, 2019). Estas consideraciones son una posible explicación de los óptimos resultados encontrados para el tratamiento que combina a *B. subtilis* con *T. harzianum in vivo*.

Teniendo en cuenta la literatura citada y los resultados obtenidos en el presente estudio se puede concluir que para la prueba 3, la eficacia en el control de la enfermedad de la marchitez vascular principalmente evidenciada en el tratamiento de *B. subtilis* + *T. harzianum* se fundamenta en la interacción de los dos microorganismos que puede generar efectos sinérgicos entre los dos donde la bacteria ayude a incrementar la capacidad del hongo para inhibir los patógenos, obtener nutrientes minerales y modificar el crecimiento de las raíces de plantas permitiendo así un control eficiente de *F. oxysporum* en plantas de tomate (Cano, 2011).

Por otro lado, el análisis de sustrato al final de la evaluación indicó dominancia del hongo benéfico en todos los tratamientos (Figura 12 y Tabla 11). Este resultado puede indicar que la manera de aplicación de los fungidas y del biocontrolador que se planteó en la prueba 3, generó un óptimo control de la enfermedad y un menor efecto adverso sobre el hongo benéfico que pudo cumplir su función biocontroladora adecuadamente, lo que se verificó con los bajos porcentajes de severidad de la enfermedad evaluada a nivel foliar (grafica 4), de tallo (grafica 5) y del estado general de la planta (grafica 6). Considerando lo anterior, se puede concluir que la prueba 3 es la mejor manera de aplicación de los fungidas (de las evaluadas en el presente estudio) junto con el hongo benéfico y por lo tanto se sugiere para un manejo integrado de la marchitez vascular en plantas de tomate.

Lo anterior es importante ya que como se observó en este estudio las variaciones metodológicas en cuanto a aplicación de fungidas y el hongo benéfico son determinantes para obtener un adecuado control de la marchitez vascular. De manera que, la metodología planteada en la prueba 3 representa una opción importante para el control del hongo fitopatógeno que los productores de tomate pueden seguir para mejorar el rendimiento del cultivo. Y si para controlar la enfermedad utilizan un tratamiento con *B. subtilis* + *T. harzianum*, obtendrán mejores resultados, además al usar dos microorganismos que al utilizarse en conjunto potencian sus capacidades controladoras, también ayudan a reducir la contaminación ambiental ya que no sería necesario el uso de agroquímicos.

## 10. CONCLUSIONES

Los fungidas biológicos (*B. subtilis* y *B. pumilus*) y los extractos vegetales (*Melaleuca alternifolia* y extracto de cítricos) evaluados *in vitro* en el estudio fueron menos eficaces frente al control de *F. oxysporum* con respecto a los agroquímicos, pero completamente compatibles con *Trichoderma harzianum*. Lo contrario sucedió con los fungidas químicos (prochloraz, pyrimethanil, flutriafol y mancozeb+cymaxinil+ hidroxido de cobre) siendo eficaces contra el hongo patógeno en más de 90% y no compatibles con el hongo benéfico. Estos resultados pueden deberse a los mecanismos de acción de cada ingrediente activo, puesto que los de síntesis

química en general tienden a afectar al hongo benéfico hasta erradicarlo, ya que pueden perturbar no solo estructuras de la membrana celular sino que también sus funciones enzimáticas de obtención de energía, reproducción y respiración. En cambio, los extractos evaluados únicamente afectan la membrana celular y son más volátiles lo que hace que su eficacia sea menor. Además, se ha demostrado que la inhibición que se genere frente a *T. harzianum* y *F. oxysporum* es dependiente de la concentración a la que se evalúe el fungicida.

En cuanto a las tres pruebas realizadas *in vivo* se evidenciaron diferencias significativas entre ellas que pueden atribuirse a las variaciones en la metodología presentadas por cada una, las cuales se atribuyen a los tiempos de aplicación entre los fungicidas y el hongo benéfico. Al respecto, las variaciones dadas en las pruebas 1 y 2 están asociadas al avanzado estado de infección de las plantas lo que hizo difícil el control por parte los fungicidas, haciendo que su respuesta efectiva frente a la enfermedad no fuera igual en los parámetros evaluados.

Por otro lado, se destaca la prueba 3 con el tratamiento *B. subtilis* + *T. harzianum* que mostró los mejores resultados en control de la enfermedad generando menores porcentajes de severidad foliar de 0 a 3%, de tallo a 10% y de estado general de 5 a 8% y por lo tanto se propone como un manejo integrado de la marchitez vascular en plantas de tomate. Adicionalmente se resalta la importancia de realizar aplicaciones de los tipos de origen de fungicidas y del biocontrolador de manera separada, dejando tres días entre la aplicación de cada uno, esto teniendo en cuenta que fueron las variaciones dadas para la prueba tres y es posible que haya sido lo que generó los óptimos resultados evidenciados. En suma, se debe resaltar que se evidencian mejores resultados sobre el control de la enfermedad si se realizan aplicaciones preventivas y curativas, y no solo curativas, lo cual reducirá la incidencia y severidad de la enfermedad en el tiempo. Esto se debe tener en cuenta a la hora de tratar la enfermedad de la marchitez vascular, ya que como se observó en la prueba 3, se generarán óptimos resultados y puede ser útil para los productores de tomate para que mejoren el rendimiento del cultivo.

## **11. RECOMENDACIONES**

Para posteriores réplicas de este estudio, se recomienda usar suelo o sustrato estéril para ubicar las plantas que van a ser evaluadas, evitando así la presencia de otros organismos que alteren los resultados. Si a pesar de esto, al realizar los bioensayos se encuentra presencia de otros organismos deben identificarse para determinar si es posible que estos estén generando interacción. También se sugiere realizar montajes de sustrato o suelo y vegetales cada semana para observar concentración y estado de los hongos de estudio.

Adicionalmente, analizar mayor cantidad de fungicidas para determinar su compatibilidad con el hongo benéfico y hacerlo a diferentes dosis y por más tiempo,

ya que estos resultados tienden a cambiar en el transcurso de los días de evaluación. Esto tanto *in vitro* como *in vivo*.

Por último, se recomienda realizar estas pruebas en campo, en cultivos reales ya que los resultados pueden variar dependiendo de las condiciones ambientales.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, W. S. (1987). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of the American Mosquito Control Association (USA)*.
- Abeysinghe, S. (2009). Effect of combined use of *Bacillus subtilis* CA32 and *Trichoderma harzianum* RUOI on biological control of *Rhizoctonia satani* on *Solanum melongena* and *Capsicum annum*. *Plant Pathol J*, 8, 9-16.
- Adama. (2015). Ficha técnica Mirage 45 EC. Obtenido de: [https://www.adama.com/documents/392363/396041/FT+Mirage+45+EC\\_12\\_0919](https://www.adama.com/documents/392363/396041/FT+Mirage+45+EC_12_0919). Consultado: 21/11/2019.
- Adama. (2015). Ficha técnica Compeer SC. Obtenido de: [https://www.adama.com/documents/392363/395128/FT+COMPEER+SC\\_tc\\_m104-53806.pdf](https://www.adama.com/documents/392363/395128/FT+COMPEER+SC_tc_m104-53806.pdf). Consultado: 21/11/2019.
- Adama. (2016). Ficha técnica Tirton. Obtenido de: [https://www.adama.com/documents/392363/6576465/TIRTON\\_FT](https://www.adama.com/documents/392363/6576465/TIRTON_FT). Consultado: 21/11/2019.
- Adama. (2019) Ficha técnica Supresor 500 SC. Obtenido de : [https://www.adama.com/documents/392363/10051349/FT+Supresor\\_1209\\_19](https://www.adama.com/documents/392363/10051349/FT+Supresor_1209_19). Consultado: 20/11/2019.
- Alteos S.A.S (2019). Ficha técnica CitruX 15% SC. Obtenido de: <http://doczz.es/doc/3939895/ficha-t%C3%A9cnica-citruX>. Consultado: 20/11/2019.
- Amini, J., & Sidovich, D. (2010). The effects of fungicides on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* associated with *Fusarium* wilt of tomato. *Journal of plant protection research*, 50(2), 172-178.
- Ariza, Y., & Sánchez, L. (2012). Determinación de metabolitos secundarios a partir de *Bacillus subtilis* con efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. *Nova*, 10(18), 149-155.

- Bae, Y. S., & Knudsen, G. R. (2005). Soil microbial biomass influence on growth and biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum*. *Biological Control*, 32(2), 236-242.
- Bagwan, N. B. (2010). Evaluation of *Trichoderma* compatibility with fungicides, pesticides, organic cakes and botanicals for integrated management of soil borne diseases of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *International Journal of Plant Protection*, 3(2), 206-209.
- Barbosa, R. J. F., & Meza, C. L. S. (2009). Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp *passiflorae* en maracuyá (*Passiflora edulis* Sims var. *flavicarpa*) del municipio zona bananera colombiana. *Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín*, 62(1), 4743-4748.
- Bayer S.A. (2019) Ficha técnica Sonata. Obtenido de: <https://www.cropscience.bayer.ec/~media/Bayer%20CropScience/Peruvian/Country-Ecuador-Internet/PAGIN%20WEB%20BAYER%20ECUADOR/PRODUCTOS/Fichas%20Tecnicas/SONATA.ashx>. Consultado: 20/11/2019.
- BioEco. (2014). Compatibilidad de tricho-eco cepa tr-02 ( *trichoderma* sp .) con diferentes agroquímicos. 02, 0–3.
- Boller, E. F., Vogt, H., Ternes, P., & Malavolta, C. (2006). Working document on selectivity of pesticides (2005). *Internal newsletter issued by the publication commission for the IOBC/wrps council and executive committee issue*, (40).
- Borda, F., & Arbeláez, G. (1993). Determinación del antagonismo del aislamiento T 95 de *Trichoderma harzianum* sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* en plantas de pepino cohombro. *Agronomía Colombiana*, 10(1), 45-51.
- Cámara de Comercio de Bogotá CCB. (2015). Manual Tomate. *Programa De Apoyo Agrícola Y Agroindustrial Vicepresidencia De Fortalecimiento*

- Camargo, G. S. M. (2019). Ação de *Trichoderma* sp. e *Bacillus subtilis* associado a fungicida em tratamento de semente na promoção da germinação de sementes de feijão.
- Cano, M. A. (2011). Interacción de microorganismos benéficos en plantas: micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. Una revisión. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 14(2), 15-31.
- Castro, Á., & Rivillas, C. (2007). *Trichoderma* spp. Modos de acción, eficacia y usos en el cultivo de café (Vol. 67).
- Cavero, P. A. S. (2011). Controle biológico de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet agente causal da sigatoka-negra da bananeira (*Musa* spp.) com *Trichoderma* spp.
- Chet, I., & Inbar, J. (1994). Biological control of fungal pathogens. *Applied biochemistry and biotechnology*, 48(1), 37-43..
- De Granada, E. G., De Amezcuita, M. C. O., Mendoza, G. R. B., & Zapata, H. A. V. (2001). *Fusarium oxysporum* el hongo que nos falta conocer. *Acta biológica colombiana*, 6(1), 7-25.
- Durán, E., Romero, M. Y. De, Romero, E., & Ramallo, J. (2007). Sensibilidad in vitro de cepas de *Trichoderma* aisladas de semillas de soja frente al fungicida maxim® xl, 22, 51–54.
- Dhanya, M. K., Anjumol, K. B., Murugan, M., & Deepthy, K. B. (2017). Compatibility of *Trichoderma viride* and *Pseudomonas fluorescens* with plant protection chemicals and fertilizers in cardamom. *Journal of Tropical Agriculture*, 54(2), 129.
- Elías, R., Arcos, O., & Arbeláez, G. (1993). Estudio del antagonismo de algunas especies de *Trichoderma* aisladas de suelos colombianos en el

control de *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*. *Agronomía Colombiana*, 10(1), 52-61.

- Estupiñán, R. H., & Ossa, C. J. A. (2007). Efecto del agente causal de la marchitez vascular de la uchuva (*Physalis peruviana* L.) el hongo *fusarium oxysporum schlecht*, sobre algunas solanáceas y otras especies cultivadas afectadas por formas especiales del microorganismo (Bachelor's thesis, Facultad de Ciencias).
- Ezziyyani, M., Sánchez, C. P., Ahmed, S. A., Requena, M. E., & Candela, M. E. (2004). *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). *Anales de Biología*, 26, 35–45
- Faostat. 2019. Cultivos. De :<http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>. Consultado: Octubre/15/2019. .
- Figueras-Roca, M., Cristani, C., & Vannacci, G. (1996). Sensitivity of *Trichoderma* isolates and selected resistant mutants to DMI fungicides. *Crop Protection*, 15(7), 615-620.
- Forero, R., Ortiz, E., de León, W., Gómez, J. C., & Hoyos-Carvajal, L. (2015). Analysis of resistance to *Fusarium oxysporum* in *Passiflora maliformis* L. plants. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 9(2), 197-208.
- Fravel, D., Olivain, C., & Alabouvette, C. (2003). *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phytologist*, 157(3), 493–502. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00700.x>
- García, R., Riera, R., Zambrano, C., & Gutiérrez, L. (2006). Desarrollo de un fungicida biológico a base de una cepa del hongo *Trichoderma harzianum* proveniente de la región andina venezolana. *Redalyc*, 10, 115–121.

- González, I., Arias, Y., & Peteira, B. (2012). General Aspects of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*-tomato interaction. *Revista Protección Vegetal*, 27(1), 1–7.
- González, L. C., Lorenzo Nicao, M. E., Muiño, B. L., Pérez, R. H., & Sánchez, D. G. (2015). Efecto in vitro de plaguicidas comerciales sobre *Trichoderma harzianum* cepa A- 34. *Revista de La Facultad de Ciencias Agrarias*, 47(2), 185–196.
- Guédez, C., Sanabria, M. E., Rodríguez, D., & Montilla, J. (2001). Histología de raíces de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) infectadas con *Fusarium oxysporum* y tratadas con citrex. In *Congreso Venezolano de Fitopatología (17, 2001, Maracay, Venezuela)*.
- Guédez, C., Cañizalez, L., Castillo, C., & Olivar, R. (2012). Evaluación in vitro de aislamientos de *Trichoderma harzianum* para el control de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 32(1), 44-49.
- Guetsky, R., Shtienberg, D., Elad, Y., Fischer, E., & Dinoor, A. (2002). Improving biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of disease suppression. *Phytopathology*, 92(9), 976-985.
- Hibar, K., Daami-Remadi, M., Ayed, F., & El-Mahjoub, M. (2007). *Fusarium* crown and root rot of tomato and its chemical control. *Int J Agric Res*, 2, 687-695.
- Infante, D., Martínez C. B., Sánchez, Y., & Pino, O. (2013). Efecto de aceites esenciales sobre cuatro cepas de *Trichoderma asperellum* Samuels. *Revista de Protección Vegetal*, 28(2), 153-157.
- Instituto Colombiano Agropecuario-ICA. (2019). *Productos registrados bioinsumos - Agosto 23 de 2019*. Obtenido de: <https://www.ica.gov.co/getdoc/2ad9e987-8f69-4358-b8a9-e6ee6dcc8132/productos-bioinsumos-mayo-13-de-2008.aspx>. Consultado: Octubre/17/2019.

- Instituto Colombiano Agropecuario-ICA. (2019). *Productos registrados plaguicidas químicos - septiembre 17 de 2019*. Obtenido de: <https://www.ica.gov.co/getdoc/d3612ebf-a5a6-4702-8d4b-8427c1cdaeb1/registrosnacionales-pqua-15-04-09.aspx>. Consultado: Agosto/17/2019.
- Ivic, D., Sever, Z., & Kuzmanovska, B. (2015). In vitro sensitivity of *Fusarium graminearum*, *F. avenaceum* and *F. verticillioides* to carbendazim, tebuconazole, flutriafol, metconazole and prochloraz.
- Jaramillo N. J., Rodríguez, V. P., Guzmán A. M., & Zapata, M. A. (2006). El cultivo de tomate bajo invernadero (*Lycopersicon esculentum*. Mill), 1–48.
- Jaramillo, J., Rodríguez, V., Guzman, M., Zapata, M., Rengifo, T. (2007). Manual Técnico: Buenas Prácticas Agrícolas en la Producción de tomate bajo condiciones protegidas.
- Jaramillo, J., Rodriguez, V., Gil, L., Garcia, M., Climaco, J., Quevedo, D., ... Guzman, M. (2013). Tecnología para el cultivo de tomate bajo condiciones protegidas. Tecnología para el cultivo de tomate bajo condiciones protegidas. <https://doi.org/10.21930/978-958-740-120-2>
- Khalko, S., & Pan, S. K. (2009). Phytotoxicity of some fungicides and their compatibility study with a potential biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *J Crop Weed*, 5, 151-153.
- Latha, P., Anand, T., Prakasam, V., Jonathan, E. I., Paramathma, M., Samiyappan, R. (2011). Combining *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Trichoderma* strains with organic amendments and micronutrient to enhance suppression of collar and root rot disease in physic nut. *Applied soil ecology*, 49, 215-223.
- Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2008). The *Fusarium* laboratory manual. *Blackwell Publishing*.

- Liu, D., Cai, J., Xie, C. C., Liu, C., & Chen, Y. H. (2010). Purification and partial characterization of a 36-kDa chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. colmeri, and its biocontrol potential. *Enzyme and Microbial Technology*, 46(3-4), 252-256.
- López, M. G. (2006). Biomecánica de la epidermis y la cutícula del fruto de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y su relación con el agrietado. *Univeridad de Málaga*, 180.
- López, S. M. (2012). *Bacillus* un género que alberga especies que cumplen diversos roles biológicos.
- Lucena, S. A., Osorio, D. U., Chópita, M. e. S., & Tamayo, M. J. (2011). Compatibilidad in vitro de extractos vegetales y *Trichoderma harzianum* y su efecto en el crecimiento de *Sclerotium rolfsii* sacc. y *Sclerotium cepivorum* berk. *Boletín Del Centro de Investigaciones Biológicas*, 45(3), 217–236.
- Makatini, G. J. (2014). *The role of sucker wounds as portals for grapevine trunk pathogen infections* (Doctoral dissertation, Stellenbosch: Stellenbosch University).
- Mamani, E. D. (2017). Dosis y número de aplicaciones de un formulado biológico (*Azotobacter salinestris*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Rhizophagus intraradices*) EN *Allium cepa* cv.'Century'. Obtenido de: <http://repositorio.unsa.edu.pe/handle/UNSA/4441>.
- Martínez, B., Infante, D., & Reyes, Y. (2013). *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Protección Vegetal*, 28(1), 1–11.
- Marwoto, B., & Muharam, A. (2013). Kompatibilitas *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, dan *Trichoderma harzianum* untuk mengendalikan *Ralstonia solanacearum* pada tanaman kentang. *Jurnal Hortikultura*, 22(2), 173-180.

- Mason, T. T. (2015). *Assessing direct and indirect effects of the fungicide flutriafol on arbuscular mycorrhizal fungi in controlling cotton root rot* (Doctoral dissertation).
- McLean, K.L. 2000. Application strategies for control of onion white rot by fungal antagonists. *New Zealand Journal of Crop and Horticulture Sciences*. 28(2): 115-122
- Méndez, J. (2003). Efecto de la aplicación de *Trichoderma harzianum* y *Paecilomyces lilacinus* en el rendimiento de lechuga orgánica en Zamorano.
- Michel AC, A., Rebolledo O, D., Lezama R, G., Ochoa ME, M., Mesina JC, E., & Samuels, G. J. (2001). Especies de *Trichoderma* en Suelos Cultivados con Mango Afectados por "Escoba de Bruja" y su Potencial Inhibitorio sobre *Fusarium oxysporum* y *F. subglutinans*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 19(2), 154–160.
- Michel-Aceves, A. C., Otero-Sánchez, M. A., Solano-Pascacio, L. Y., Ariza-Flores, R., Barrios-Ayala, A., & Rebolledo-Martínez, A. (2009). Biocontrol in vitro con *Trichoderma* spp. de *Fusarium subglutinans* (Wollenweb. y Reinking) Nelson, Toussoun y Marasas y *F. oxysporum* Schlecht., Agentes Causales de la " Escoba de Bruja" del Mango (*Mangifera indica* L.). *Revista mexicana de fitopatología*, 27(1), 18-26.
- Mojica-Marín, V., Luna-Olvera, H. A., Sandoval-Coronado, C. F., Pereyra-Alfárez, B., Morales-Ramos, L. H., González-Aguilar, N. A., ... & Alvarado-Gómez, O. G. (2009). Control biológico de la marchitez del chile (*Capsicum annum* L.) por *Bacillus thuringiensis*. *Phyton (Buenos Aires)*, 78(2), 105-110.
- Morales, F. J., Tamayo, P. J., Castaño, M., Olaya, C., Martínez, A. K., Velasco, A. C. (2009). Enfermedades virales del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en Colombia / viral diseases of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in Colombia. *Fitopatología Colombiana*, 33(1), 23–27.
- Mora, C., Rueda, A., Reily, J., & Bustamante, M. (2001). Control biológico de la pudrición radicular por *Fusarium oxysporum* en semilleros de café usando

endomicorriza y *Trichoderma harzianum* (Bachelor's thesis, Zamorano: Escuela Agrícola Panamericana).

- Morsy, E. M., Abdel-Kawi, K. A., & Khalil, M. N. A. (2009). Efficiency of *Trichoderma viride* and *Bacillus subtilis* as biocontrol agents against *Fusarium solani* on tomato plants. *Egyptian Journal of Phytopathology*, 37(1), 47-57.
- Muiño, B., Sáenz, M., Stefanova, M., Porras, Á., Díaz, I. (2010). Compatibilidad de *Trichoderma* spp. con plaguicidas y fertilizantes en el cultivo de tabaco. *Redalyc*, 15(73), 29. <https://doi.org/10.7818/ECOS.2014.23-2.11>
- Mukesh, M. (2014). Compatibility study of isolates of *Trichoderma* spp. with plant extracts. *Asian Journal of Bio Science*, 9(2), 242-245.
- Ntushelo, K., & Boshoff, W. H. P. (2002). Initial studies on fungicide evaluation for efficacy in the management of *Fusarium* head blight in wheat. *South African Journal of Plant and Soil*, 19(4), 211-212.
- Ocaña, D. P. N., Urbano, E., Chiriboga, C., Rueda, D., Manjunatha, B., Mulla, S. I., & Selvanayagam, M. (2015). Evaluation in vitro about the compatibility between *Trichoderma citrinoviride* spp. strain 19 and chemical, biological and organic fungicides to control *Botrytis cinerea*. *Der Pharmacia Lettre*, 7(10), 157–162.
- Ortellado, B., & Fuente, A. (2013). Compatibilidad in vitro de aislados nativos de *Trichoderma* spp. con fungicidas para el tratamiento de semillas, 15(1), 1–7.
- Pérez, L., Durán, J., Ramirez, R., & Sanchez, J. (2003). Compatibilidad fisiológica y sensibilidad a fungicidas de aislamientos de *Phytophthora capsici* Leo. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(1). Retrieved from <http://www.redalyc.org/html/612/61221103/>.

- Pérez, V. L., Batlle, V. A., Chacón, B. J., & Montenegro, M. V. (2009). Eficacia de *Trichoderma harzianum* a34 en el biocontrol de *Fusarium oxysporum* f. *Sp. cubense*, agente causal de la marchitez por fusarium o mal de Panamá de los bananos en Cuba. *Fitosanidad*, 13(4), 259-264.
- Retana, K., Coché, J. A. R., Castro, O., & Blanco, M. (2018). Caracterización morfológica y molecular de *Fusarium oxysporum* F. SP. Apii asociado a la marchitez del apio en Costa Rica. *Agronomía costarricense: Revista de ciencias agrícolas*, 42(1), 115-126.
- Ribas, P. P. (2010). Compatibilidade de *Trichoderma* spp. a princípios ativos de fungicidas comerciais aplicados na cultura do feijão.
- Rivera, C. J. (2004). Evaluación de sensibilidad in vitro de Tricho zam® (*Trichoderma harzianum*) a nueve fungicidas.
- Roberti, R., Badiali, F., Pisi, A., Veronesi, A., Pancaldi, D., & Cesari, A. (2006). Sensitivity of *Clonostachys rosea* and *Trichoderma* spp. as potential biocontrol agents to pesticides. *Journal of phytopathology*, 154(2), 100-109.
- Rodríguez B. D., & Gato C. Y. (2010). Métodos alternativos en la conservación de *Trichoderma harzianum* Rifai. *Fitosanidad*, 14(4), 241-246.
- Rodríguez, D. A., & Montilla, J. O. (2002). Disminución de la marchitez causada por *Fusarium* en tomate con extracto de *Citrus paradisi*. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*, 63, 46-50.
- Rodríguez S. J., Ríos R. Y., & Baró R. Y. (2016). Efectividad de cepas de *Azotobacter* sp. y *Bacillus* sp. para el control de especies fúngicas asociadas a hortalizas. *Cultivos Tropicales*, 37, 13-19.
- Ruiz, N. E., Ruiz, N. A., Guzmán, G. S., Pérez, L. J. (2011). Manejo y control de plagas del cultivo de tomate en Cintalapa, Chiapas, Mexico. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, 27(2), 129–137.

- Sandle, T. (2019). Selection and Application of Culture Media. *Biocontamination Control for Pharmaceuticals and Healthcare*, 103–123. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814911-9.00007-9>
- Sandoval, C. (2004). Manual Técnico Manejo integrado de Enfermedades en cultivos hidropónicos.
- Sarkar, S., Narayanan, P., Divakaran, A., Balamurugan, A., Premkumar, R. (2010). The in vitro effect of certain fungicides, insecticides, and biopesticides on mycelial growth in the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *Turkish Journal of Biology*, 34(4), 399-403.
- Sepúlveda, B. C. (2015). Efectividad del fungicida Hidróxido de cobre (Kocide® 2000), sobre el crecimiento de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary y *Trichoderma spp.* en condiciones in vitro.
- Serrano, L., Manker, D., Brandi, F., Cali, T. (2011). The use of *Bacillus subtilis* QST 713 and *Bacillus pumilis* QST 2808 as protectant fungicides in conventional application programs for black leaf streak control. In *VII International Symposium on Banana: ISHS-ProMusa Symposium on Bananas and Plantains: Towards Sustainable Global Production 986* (pp. 149-155).
- Shah, S., Nasreen, S., & Sheikh, P. A. (2012). Cultural and morphological characterization of *Trichoderma spp.* associated with green mold disease of *Pleurotus spp.* in Kashmir. *Res. J. Microbiol*, 7(2), 139-144.
- Sharma, D. & Singh, RP (2017). Compatibilidad de diferentes fungicidas con la cepa PBT-21 de *Trichoderma harzianum rifai*. *Pesticide Research Journal*, 29 (1), 42-47.

- Shunzhang, W. (2009). Laboratory Bioassay and Field Trial of Flutriafol for control of *Sphaerotheca fuliginea*. *Pesticide Science and Administration*, (10), 24.
- Somani, A. K., & Arora, R. K. (2010). Field efficacy of *Trichoderma viride*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* in consortium for control of *Rhizoctonia solani* causing black scurf disease of potato. *Indian Phytopathology*, 63(1), 23.
- Song, W., Zhou, L., Yang, C., Cao, X., Zhang, L., & Liu, X. (2004). Tomato *Fusarium* wilt and its chemical control strategies in a hydroponic system. *Crop protection*, 23(3), 243-247.
- Stark, J. D., Vargas, R., & Banks, J. E. (2007). Incorporating ecologically relevant measures of pesticide effect for estimating the compatibility of pesticides and biocontrol agents. *Journal of Economic Entomology*, 100(4), 1027-1032.
- Stefanova, M. (2006). Aplicación de *Trichoderma* y otros antagonistas. *Fitosanidad*, 10(2), 151–163.
- Stockton LTD. (2018). Ficha de datos de seguridad de Timorex Gold. Obtenido de: [https://www.adama.com/documents/392363/8733687/HS\\_TimorexGold\\_210319](https://www.adama.com/documents/392363/8733687/HS_TimorexGold_210319). Consultado: 20/11/2019.
- Sylla, J., Alsanius, B. W., Krüger, E., Becker, D., & Wohanka, W. (2013). In vitro compatibility of microbial agents for simultaneous application to control strawberry powdery mildew (*Podosphaera aphanis*). *Crop Protection*, 51, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.04.011>
- Tanzini, M. R., Setten, A., & Augusto, N. T. (2001). Compatibilidad de agentes tensoactivos con *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*, (59), 15–18.

- Tapwal, A., Kumar, R., Gautam, N., & Pandey, S. (2012). Compatibility of *Trichoderma viride* for Selected Fungicides and Botanicals. <https://doi.org/10.3923/ijpp.2012.89.94>
- Tewari, A.K., Razdon, V.K. and Kalha, C.S. (2005). Occurrence of cucurbit wilt and efficacy of fungal biocontrol agent against the causal pathogen. In: IJ & K State Science Congress, Feb., 7-9, 2005 at Jammu. pp.2010
- Townsend, G. R. & Heuberger, J. V. (1943). Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments. *Plant Dis. Report.* 24:340-343
- Valencia, H., Bautista, G., Orozco de Amézquita, M., Garcés de Granada, E. (2001). *Fusarium oxysporum* El Hongo Que Nos Falta Conocer. *Acta Biológica Colombiana*, 6(1), 7–21.
- Valarmathi, P., Kumar, P. S., Vanaraj, P., Ramalingam, R., & Gopal, C. (2013). Compatibility of copper hydroxide (Kocide 3000) with biocontrol agents. *IOSR-JAVS*, 3(6), 28-31.
- Villacís-Aldaz, L., Chungata, L., Pomboza, P., & León, O. (2016). Compatibilidad y tiempo de sobrevivencia de cuatro microorganismos benéficos de uso agrícola en biol. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 4(1), 39–45.
- Villa-Martínez, A., Pérez-Leal, R., Morales-Morales, H. A., Basurto-Sotelo, M., Soto-Parra, J. M., & Martínez-Escudero, E. (2015). Situación actual en el control de *Fusarium spp.* y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agronómica*, 64(2), 194-205.
- Villasenor, N. L., & Sandoval, B. C. (2004). *Compatibilidad de fungicidas de uso comun en el control de Botrytis cinerea Y Venturria inaequalis con tres cepas de Trichoderma spp* (Doctoral dissertation, Universidad de Talca (Chile). Escuela de Agronomía).

- Vinuela, E. (2011). La importancia de la compatibilidad de enemigos naturales y plaguicidas en los modernos sistemas productivos, *SICONBIOL*, Simposio de Control Biológico 1 (12) 84–88.
- Zúñiga, E. M., Merlos, J. B., Sánchez, B. C., Pérez-Pérez, R., & Avilés, M. C. (2019). Capítulo 2 Evaluación de metabolitos antifúngicos obtenidos en medio PD mediante el cultivo y co-cultivo de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma* spp. sobre el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium oxysporum*. *Seguridad alimentaria*. 7-15.