



Revista MINERVA

Plataforma digital de la revista: <https://minerva.sic.ues.edu.sv>

Artículo Científico | Scientific Article

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

Effectiveness of *Bacillus subtilis* Cohn (1872) and *Trichoderma harzianum* Rifai (1969) on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder & Hansen, in tomato seeds (*Solanum lycopersicum* var. CENTA Cuscatlan)

Judith Reyes-Bonilla¹, Carla Quintanilla-Villegas¹,
Zoila Guerrero-Mendoza² Moisés López-Torres³

Correspondencia
moisesuliseslopez@gmail.com

- 1 Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Universidad de El Salvador.
- 2 Docente asesora interna, Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Universidad de El Salvador.
- 3 Asesor externo, Gerente de Soporte Técnico, DIAGRI S.A de C.V, El Salvador, C.A.

RESUMEN

La marchitez vascular causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol), disminuye la producción y calidad del cultivo de tomate. En la actualidad el biocontrol con *Trichoderma harzianum* (Th) y *Bacillus subtilis* (Bs) tiene gran potencial, pues su capacidad ha sido demostrada desde hace tiempo al inhibir fitopatógenos; por otra parte, el biocebado es una herramienta que mejora la germinación, vigor, emergencia homogénea y desarrollo de las plántulas. El objetivo de esta investigación fue determinar la efectividad de las cepas comerciales *Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum* sobre un aislamiento de Fol en semillas de tomate var. CENTA CUSCATLAN a nivel *in vitro* e *in vivo*. Se evaluó el comportamiento de los biocontroladores a dos concentraciones y con biopolímeros para inhibir el crecimiento *in vitro* de Fol, estimular la germinación de

DOI:10.5377/revminerva.v7i3.18906

Enviado: 28 de octubre de 2023
Aceptado: 16 de enero de 2024

Palabras clave: marchitez, Fol, *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum*, biocebado.

Keywords: Wilt, Fol, *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum*, Biopriming.



Este contenido está protegido bajo la licencia CC BY
(<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

las semillas y el desarrollo de las plantas de tomate. Los resultados demostraron la capacidad antagonista de los biocontroladores. En el bioensayo *in vitro* se comprobó que T9 (*Th* 10⁸ esp/ml⁻¹ + Al) incrementó el número de semillas germinadas, mientras que en el ensayo *in vivo* T6 (*Th* 10⁶ esp/ml⁻¹ + Ga) destacó por tener mayor porcentaje de germinación, pero T8 (*Bs* 10⁸ esp/ml⁻¹ + Ga) redujo el tiempo de germinación. Las variables fenológicas: largo de raíz, largo del tallo, largo total, peso fresco y peso seco fueron superiores con T5 (*Th* 10⁶ esp/ml⁻¹ + Al), mientras que T4 (*Bs* 10⁶ esp/ml⁻¹ + Ga) favoreció el aumento del diámetro del tallo. Este estudio es un esfuerzo por contribuir a la aplicación de tecnologías innovadoras y métodos de biocontrol para desarrollar un sistema de producción agrícola sostenible, estratégico frente a las actuales condiciones climáticas; además de ser la primera investigación y reporte de *Fol* en El Salvador.

ABSTRACT

Vascular wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*), decreases the production and quality of the tomato crop. Currently, biocontrol with *Trichoderma harzianum* (*Th*) and *Bacillus subtilis* (*Bs*) has great potential, since its capacity has been demonstrated for a long time to inhibit phytopathogens; on the other hand, biopriming is a tool that improves germination, vigor, homogeneous emergence and seedling development. The objective of this research was to determine the effectiveness of the commercial strains *Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum* on a *Fol* isolate in tomato seeds var. CENTA CUSCATLAN at an *in vitro* and *in vivo* level. The behavior of the biocontrollers at two concentrations and with biopolymers to inhibit the *in vitro* growth of *Fol*, stimulate seed germination and the development of tomato plants was evaluated. The results demonstrated the antagonistic capacity of the biocontrollers. In the *in vitro* bioassay it was verified that T9 (*Th* 10⁸ esp/ml⁻¹ + Al) increased the number of germinated seeds, while in the *in vivo* assay T6 (*Th* 10⁶ esp/ml⁻¹ + Ga) stood out for having greater germination percentage, but T8 (*Bs* 10⁸ esp/ml⁻¹ + Ga) reduced the germination time. The phenological variables: root length, stem length, total length, fresh weight and dry weight were higher with T5 (*Th* 10⁶ esp/ml⁻¹ + Al), while T4 (*Bs* 10⁶ esp/ml⁻¹ + Ga) favored the increase in stem diameter. This study is an effort to contribute to the application of innovative technologies and biocontrol methods to develop a sustainable agricultural

production system, strategic in the face of current climatic conditions; besides being the first investigation and report of *Fol* in El Salvador.

INTRODUCCIÓN

La marchitez vascular, producida por *Fol*, es una de las enfermedades más devastadoras en todas las regiones del mundo donde se cultiva el tomate (Marlatt et al., 1996), prospera en una diversidad de condiciones ambientales (Cai et al., 2003). Hasta el momento existen pocas investigaciones en cuanto a *Fol* y su manejo en el cultivo de tomate en Centro América. En el caso de El Salvador no hay registros sobre la existencia de este patógeno (CABI, 2021; CABI & EPPO, 2011). El control de la marchitez es muy difícil, sobre todo cuando las condiciones ambientales son favorables al hongo, pues se disemina por medio del agua de superficie, implementos agrícolas, insectos, plántulas contaminadas, semilla infectada entre otros (Dixon & Tilston, 2010). Debido a que se establece como endófito en células y tejidos vasculares, se dificulta su control (Hossain et al., 2013). Las plantas afectadas por la marchitez vascular muestran amarillamiento, que comienza por las hojas inferiores que, finalmente, mueren; la base del tallo adquiere un color oscuro y los haces vasculares se tornan de color pardo oscuro; la médula permanece sana y, la infección en el fruto, se detecta por la decoloración del tejido vascular (Jones, 1991).

En el desarrollo sostenible de la agricultura moderna, la utilización del biocontrol constituye una alternativa viable para asegurar la producción de alimentos sanos (Funes-Aguilar & Monzote, 2006; López-Bucio et al., 2015; López-Mondéjar et al., 2011). En este aspecto, se presentan microorganismos antagonistas como *Trichoderma* spp (Perniola et al., 2014), y bacterias del género *Bacillus* spp. (Martin & Travers, 1989; Meadows et al., 1992) numerosos estudios demuestran que estas bacterias poseen gran potencial como biocontroladoras de organismos patógenos (Castillo-Reyes et al., 2015; López & Pazos, 2005; Méndez-Úbeda, 2018).

Por otra parte, las semillas constituyen el punto de partida que marca el futuro de la cosecha por lo que su sanidad es cuestión de primer orden. La demanda

del mercado mundial de semillas recubiertas con tratamientos biológicos está en pleno auge (Markets and Markets, 2018). El biocebado es útil para el biocontrol de patógenos en cultivos ya que reduce los costos de los pesticidas, aumenta la productividad de las plantas e induce resistencia al estrés (Fernando et al., 2020). La inoculación de semillas es una forma rentable de administrar a gran escala microbios en campo (John et al., 2010; O'Callaghan, 2016) asegurando así la colonización del agente microbiano en la rizosfera de la planta promoviendo el crecimiento vegetal (Raj et al., 2004; Sarkar et al., 2020).

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento e identificación

Los aislamientos se obtuvieron de plantas de tomate afectadas por *Fusarium* spp, provenientes de parcelas en Estacion Experimental San Andres y Zapotitán, del CENTA, departamento de La Libertad. En seguida se trasladaron al Laboratorio de Parasitología Vegetal, donde se cultivaron en placas con PDA (Cardona-Piedrahita & Castaño-Zapata, 2019; Carrillo-Fasio et al., 2003; Reyes-Zambrano et al., 2020; Rojas, 2011). Al final de 7 días de incubación aparecieron colonias con crecimiento micelial algodonoso blanquecino, las cuales se identificaron según las claves de Barnett & Hunter (1998); Burgess & Trimboli (1986); Finch & Finch (1971); Leslie & Summerell (2006). Las cepas se identificaron con código FM1, FM2 y FM3; luego se purificaron mediante repiques sucesivos (Dickinson & Lucas, 1987; Santiago et al., 2017).

Cultivos puros de las cepas, se enviaron a identificar al Laboratorio de Biología Molecular "CENEM" de la empresa MICSA y a la Universidad de Florida. De forma análoga se conservaron en agua destilada tres veces esterilizada (ADTE), glicerol al 10 %, tubo inclinado y en papel filtro; también se reprodujeron en matrices de arroz para su posterior formulación siguiendo las metodologías de Fernández-Larrea (1997); Gómez et al. (2014); Michael-Aceves et al. (2005); Sandoval & Belesansky (2020); Sivila & Álvarez (2013); Troya & Vaca-Granda (2014).

Prueba de patogenicidad

La capacidad infectiva de los *Fusarium* spp. se evidenció, al ser inoculados en plántulas sanas de tomate (Córdova, 2003; Retana et al., 2018), para esto se aplicaron los métodos de inoculación de Carmona (2019) e Inami et al. (2012) que comprenden:

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

La suspensión de conidios 10^5 con/ml⁻¹, se determinó con cámara de Neubauer ajustando la concentración final con la fórmula sugerida en Peña & Páez (2014): $C1V1 = C2V2$. Las plantas control se inocularon solo con Agua Destilada Estéril (ADE) (Carrillo-Fasio et al., 2003) y luego se fertilizaron a los 15 dds (días después de la siembra) con una solución de 1g/L⁻¹, 30-15-30 (NPK). Los tratamientos se asignaron al azar, con 3 repeticiones y mantuvieron a temperatura ambiente promedio de 27 °-30 °C. La respuesta de las plantas a la inoculación del patógeno se determinó en función de la escala de Marlatt et al. (1996) modificada por Gayosso et al. (2021):

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

Aplicación de los bioformulados

Los experimentos se realizaron con biopreparados comerciales, que son a base de esporas de *Trichoderma harzianum* "Rikoderma®" y de la bacteria *Bacillus subtilis* "Radicillus®", éstos se cultivaron en medios de cultivo PDA y Agar Nutriente, las placas se incubaron de forma invertida a temperatura ambiente durante siete días hasta el desarrollo de colonias fúngicas de color verdoso. En el caso de la bacteria después de 48 h con colonias de color crema mucoides (González, 2016; Guédez et al., 2012; López & Pazos, 2005; Santiago et al., 2017).

Antagonismo *in vitro*

Se realizaron cultivos duales enfrentando a *Fol* contra *Th* de acuerdo a García et al. (2006); González (2016); Martínez-Scott (2016); Rojas et al. (2011); Tejera-

Hernández (2011). El antagonismo de *Bs* se determinó por el método de contacto directo descrito por Pérez & García (2019), que consistió en ajustar a la concentración 10^8 UFC/ml⁻¹, en seguida se sembró en PDA, y se colocó un tapón de *Fol*. Como testigos se dispusieron placas Petri inoculadas en el centro con un tapón del hongo fitopatógeno sin la presencia de los antagonistas, posteriormente, los cultivos se dispusieron al azar con tres repeticiones. Se midió el crecimiento radial de *Fol* cada 24 h (Sánchez et al., 2015) para determinar el porcentaje de inhibición, aplicando la ecuación que aparece en Rojas-Badía et al. (2017).

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

Dónde:

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

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

La capacidad antagónica se evaluó aplicando la escala empleada por Ezziyani et al., (2004) y modificada por Morán-Quintero (2007).

La tasa de crecimiento micelial del patógeno se determinó mediante la expresión sugerida por Mead et al. (1993).

$$Tc = \frac{Cf - Ci}{Tf - Ti}$$

Donde:

Cf: es el crecimiento final.

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

Tabla 1

Escala de evaluación de antagonismo *in vitro*, tomando en cuenta la invasión de la superficie, colonización y esporulación de *Th* sobre *Fol*

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

Tf: es el tiempo final.

Ti: es el tiempo inicial (día uno).

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

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

El tipo de interacción (Tabla 2) presentada por *Th* sobre el patógeno se evaluó, con la clasificación adaptada de Badalyan et al. (2004) y Molla et al. (2001).

Para evaluar la interacción a nivel del micelio, se realizaron preparados de la zona de contacto entre las colonias y se observó al microscopio compuesto con aumento de 100X (Corallo, 2012), donde se identificó la interacción de las hifas antagonistas de *Th* con las del patógeno (Guédez et al., 2012).

Bioensayo de la efectividad *in vitro*

Inóculos. Cultivos de *Fol* se recubrieron con 5 ml de ADE, luego se raspó la superficie con un asa. La suspensión se filtró con gasas estériles e introdujo en un Erlenmeyer con 100 ml de ADE, agregando 0.1 ml de Tween 20 al 0.1 %. La concentración de la suspensión se ajustó en cámara de Neubauer (Covacevich & Consolo, 2014); hasta 10^5 esp/ml⁻¹ con

Tabla 2

Características de los tipos de interacciones evaluados en enfrentamientos duales entre *Th* y *Fol*.

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

CIVI= C2V2, luego se sembró en placas con PDA. Mientras que las concentraciones de los antagonistas se obtuvieron de los bioformulados ajustando a las dosis 10^6 y 10^8 UFC/ml⁻¹ (González- Cárdenas et al., 2005; López, 2011; Müller, 2021; Rodríguez et al., 2005).

Desinfección de las semillas. Semillas de tomate var. CENTA CUSCATLÁN se desinfectaron superficialmente sumergiéndolas 3 min en alcohol 96 °, después 2 min en hipoclorito de sodio al 4 % luego se enjuagaron 5 veces con ADE, se filtraron con el colador y colocaron sobre una placa Petri con papel filtro absorbente (Rodríguez et al., 2008; Salinas-Ventura & Soriano-Bernilla, 2014).

Biocebado de semillas. Se aplicó recubrimiento con biopolímeros a base de almidón y goma arábiga al 25 % que se prepararon adaptando la metodología de Caballero et al. (2016) y Chin et al. (2021, 2022) con ciertas modificaciones. Se tomaron 6 ml de las suspensiones para mezclar con los respectivos biopolímeros, seguidamente las semillas de tomate estériles se recubrieron con la mezcla según la descripción de la Tabla 3.

Tratamientos del biocebado de semillas

Después se dejaron secar 30 min en cámara de flujo laminar, luego se distribuyeron 10 semillas por placa Petri de 9 cm con medio PDA previamente inoculado con 10^5 esp/ml⁻¹ de *Fol*. Se incubaron a temperatura ambiente en oscuridad dentro de una hielera de poliestireno (Müller, 2021). Se aplicó un DCA con tres repeticiones por tratamiento. El conteo de las plántulas se realizó todos los días a partir de la siembra hasta el término del día 7 y 15, en donde se obtuvo el porcentaje total de emergencia (ET) considerando como semillas germinadas aquellas en las que hubo protrusión radicular.

Bioensayo de la efectividad *in vivo*

Se efectuó en un invernadero ubicado dentro del CENTA contiguo a la Unidad Planta Sana. Las semillas de tomate se desinfectaron y biocebaron siguiendo el mismo protocolo descrito en el bioensayo *in vitro* (Pérez & García, 2019).

Inoculación del sustrato y semillas. Suelo estéril se inoculó con *Fol* 10^5 esporas/ml⁻¹, transcurridas 24 h se

biocebaron las semillas (Tabla 3). El testigo sano fueron 100 semillas sembradas en suelo estéril inoculadas con ADE. El testigo enfermo fue semillas en suelo infectado con el patógeno 10^5 esp/ml⁻¹. Finalmente se sembraron en las bandejas de germinación y llevaron al invernadero a una temperatura promedio de 27 °C (Eraso et al., 2014; Figueroa-Rivera et al., 2010; Gonzáles, 2016; Osorio & Guerrero, 2020). Los tratamientos se dispusieron en bloques completos al azar con 5 repeticiones. Se tomó como criterio la emergencia total de la plántula y se realizó el conteo diario hasta el día 10. A los 15 dds las plántulas se fertilizaron con una solución nutritiva (30 %N, 15 %P, 30 %K) a razón de 1g/L⁻¹. Los riegos se llevaron a cabo cada tercer día. A los 20 días de germinación las plántulas se trasplantaron en bolsas para almácigo de 15x23 cm y reinoculó el suelo estéril con una nueva suspensión de *Fol* 1×10^5 esp/ml⁻¹. Los tratamientos fueron 10 los cuales se dispusieron en un DCA con 3 repeticiones. Al término del décimo día, se obtuvo el porcentaje total de emergencia descrito por García et al. (2016).

$$\%E = \frac{\text{No. de plantas emergidas}}{\text{No. de semillas sembradas}} \times 100$$

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

$$IVG = \frac{P_1}{T_1} + \frac{P_2}{T_2} + \dots + \frac{P_n}{T_n}$$

P = número de semillas germinadas

T = tiempo en que germinaron y

n = día del último control.

El tiempo medio de germinación (TMG) de acuerdo con García et al. (1982):

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

donde: x1, x2, x10 son las semillas germinadas en el d 1, 2, ...10; d1, d2, ... d10 son los días de incubación, y

X10 es el número total de semillas germinadas en el día 10 cuando se realizó el conteo final de semillas germinadas.

A los 52 dds y 31 días después del trasplante se realizó un muestreo destructivo extrayendo el 50 % de cada repetición, para las respectivas evaluaciones de las variables fenológicas, longitud del tallo, longitud de la raíz, longitud total de la planta, diámetro del tallo, peso fresco y peso seco total. Las raíces se lavaron con agua para eliminar la tierra, seguidamente las plantas se secaron en un horno a 50 °C por 72 h y posteriormente se determinó su peso seco en una balanza analítica (Constanza-Corrales et al., 2010).

Análisis de datos

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

RESULTADOS

Caracterización morfológica

El aislado FM1 mostró características típicas de *Fusarium oxysporum* (Fo). El cultivo en PDA presentó colonias con micelio de color blanco tornándose violeta pálido con la esporulación (Figura 1A), micelio delicado y disperso en algunos cultivos mientras que abundante en otros, y producción de micelio aéreo (Leslie & Summerell, 2006). En la morfología microscópica se observaron microconidias ovaladas, sin septos, unicelulares formadas sobre fiálides cortas, macroconidias en forma de hoz compuestas por 4-6 septos con células apicales cortas ligeramente curvas y células basales puntiagudas con forma de gancho. Formación abundante de clamidosporas intercaladas en las hifas, apareciendo solas o en pares con paredes de aspecto rugoso, se forman en cultivos viejos cuando se agotan los nutrientes en el medio (Figura 1B-F).

Los aislados FM2 y FM3 crecieron como cultivos

algodonosos de color blanquecino a marrón con abundante producción de esporodoquios de color crema (Figura 2). A nivel morfológico presentaron macroconidias con 3-4 septos muy anchas y robustas formadas sobre esporodoquios largos, con célula apical redonda, pie recto y ligeramente redondeado. Microconidios anchos de forma ovalada con un septo, presentes en el micelio aéreo. De acuerdo a Barnett & Hunter (2006) y Leslie & Summerell (2006) estos caracteres morfológicos corresponden a *Fusarium solani* (Fs) que es muy común aislarlo en plantas de tomate.

Pruebas de patogenicidad

Las plantas mostraron síntomas de marchitez al finalizar 30 ddi (días después de la inoculación) en

Figura 1

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

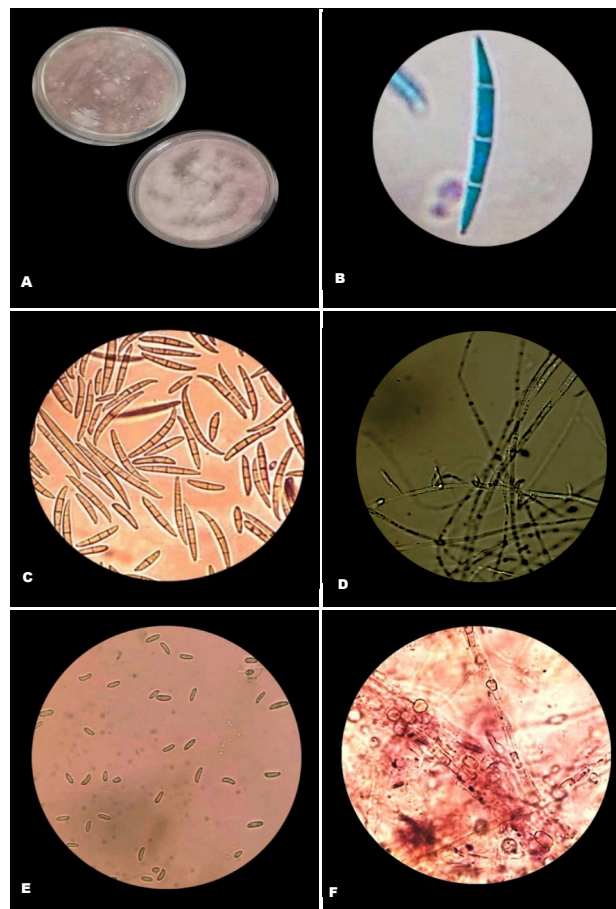
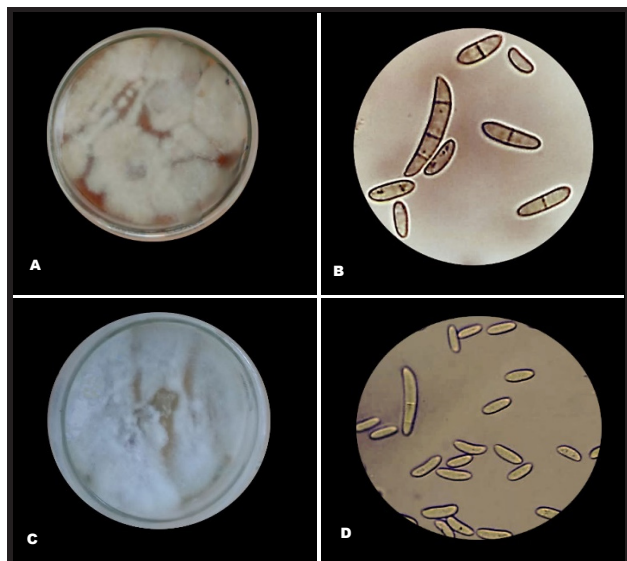


Figura 2

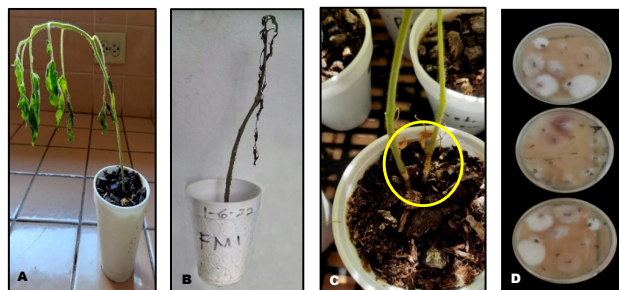
Estructuras propagativas de *Fusarium solani*. Cultivo de la cepa FM2 (A); macroconidias y microconidias (40X) (B); cultivo de la cepa FM3 (C); macroconidias y microconidias (40X) (D).



todos los métodos; por lo que en adelante se empleó la inoculación directa en el suelo por ser menos invasiva ya que no causa stress adicional a la planta y es igualmente eficiente. En la segunda prueba de patogenicidad, FM1 produjo los mismos síntomas de marchitez en donde la planta con el paso de los días presentó hojas inferiores amarillentas hasta que la marchitez se propagó hacia el ápice y hojas superiores ocasionando una marchitez general, las hojas infectadas se oscurecieron y la base del tallo mostró necrosis de color marrón causando finalmente la muerte de las plántulas a los 45 ddi. En la escala del 1 al 5 de Marlatt et al. (1996) modificada por Gayosso et al. (2021), las plantas presentaron escala 5 que corresponde a planta muerta. Con los postulados de Koch se confirmó que se trataba del *Fo* aislado de la muestra de San Andrés I codificada como FM1 (Figura 3) la sintomatología expresada exclusivamente en las plantas de tomate inoculadas con el aislamiento se asocia a la especificidad del hospedero, razón por la cual se define como *Fo*. Si bien es cierto que *Fo* tiene muchas formas especiales pero la forma especial “lycopersici”, afecta solo a plantas de tomate susceptibles a la marchitez vascular (Cardona-Piedrahita & Castaño-Zapata, 2019; Córdova-Zapata, 2003). Las cepas FM2 y FM3 no

Figura 3

A-B) Plantas con síntomas de marchitez vascular; C) Tallo con mancha marrón; D) Reaislamiento de *Fo*.



expresaron virulencia en ninguno de los ensayos por lo que fueron excluidas de los otros experimentos.

Identificación genética

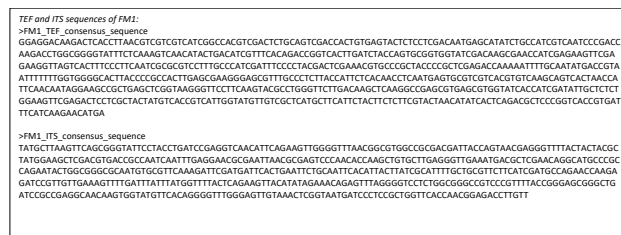
El análisis realizado por el Laboratorio CENEM y la Universidad de Florida consistió en la extracción de ADN, amplificación por PCR, secuenciación y análisis de identidad del marcador ITS1-5.8S-ITS2. Para el análisis de identidad de la secuencia de ADN obtenida, se utilizó la base de datos de nucleótidos del NCBI aplicando la herramienta Basic Local Alignment Search Tool para nucleótidos – BLAST@N 2.8.0+ (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine). La amplificación de la región ITS así como el factor de elongación de traducción 1-alfa (TEF-1 alfa) confirmaron que a nivel molecular el aislamiento FM1 se encuentra dentro de la especie *Fusarium oxysporum* con 100 % de similitud (Figura 4).

Conservación de *Fo*

Los métodos para la preservación del hongo fueron eficientes, ya que en el control de calidad el

Figura 4

Las secuencias del aislado FM1 codifican para *Fusarium oxysporum*.



hongo se desarrolló perfectamente en el medio de cultivo conservando las características del cultivo inicial. Respecto a la conservación y reproducción en matrices de arroz, solo se cosechó restos de micelio, de modo que el ingrediente activo del hongo se encontró dentro del polvo cosechado; porque al hacer la siembra en PDA el cultivo creció con abundante producción de macroconidios. Este método funciona para mantener activa la virulencia de *Fol* ya que en ensayos de patogenicidad se aplicó una suspensión de polvo cosechado, a plantas sanas de tomate causando marchitez más rápidamente y de mayor impacto que con una suspensión obtenida directamente de cultivos en placas Petri; siendo por lo tanto económica y viable esta forma para mantener activa la virulencia de *Fol* para pruebas de patogenicidad.

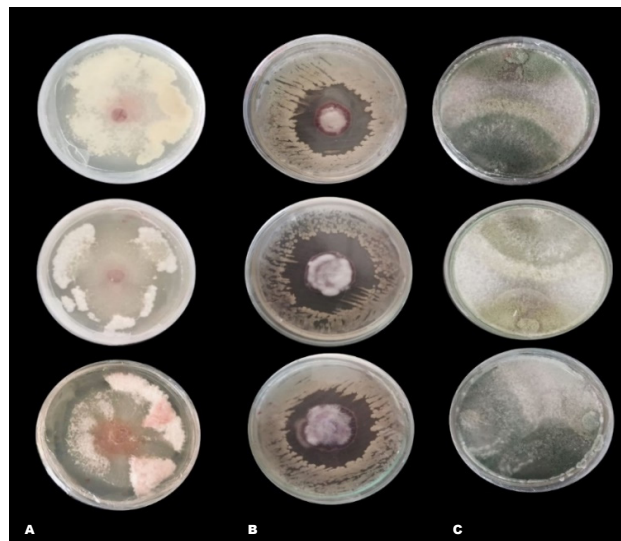
Antagonismo *in vitro*

Bs y *Th* fueron capaces de inhibir el crecimiento radial de *Fol* (Figura 5). El análisis de varianza detectó diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$). El porcentaje de inhibición (PI) en los tres días de evaluación varió desde 0 en el testigo hasta 65.3 %, 70.3 % y 72.7 % en *Bs*, siendo éste el mayor porcentaje que en la escala de inhibición de Bautista (2000) se agrupa dentro de antagonismo positivo; mientras que *Th* varió de 30.4 %, 39.7 % a 52.9 % y se ubica en la escala como antagonismo medio. Así mismo, los PI obtenidos a los 2, 6 y 8 días de enfrentamiento indican que a medida avanza el tiempo de enfrentamiento, aumenta la capacidad de biocontrol del antagonista frente al patógeno en referencia (Tabla 4). La comparación de medias para la tasa de crecimiento micelial (TC) muestra que *Fol* creció 0.4 cm/día^{-1} , en el tratamiento con *Th* 0.2 cm/día^{-1} , el menor crecimiento se obtuvo con el tratamiento *Bs* del orden de 0.1 cm/día^{-1} , lo cual concuerda con el mayor porcentaje de inhibición presentado por este microorganismo.

Th presentó grado 4 de antagonismo donde las colonias crecieron y esporularon sobre el patógeno *Fol*, en cuanto al tipo interacción descritos por Badalyan et al. (2004) y Molla et al. (2001), predominó el tipo C reemplazo (Figura 6), este se asocia con el rápido crecimiento de *Trichoderma* spp. y con

Figura 5

Inhibición del crecimiento de *Fol* *in vitro*. A) Control; B) *Bs*; C) *Th*.



mecanismos de micoparasitismo y antibiosis, en los cuales principalmente mediante la producción de enzimas líticas, *Trichoderma* spp. tiene la capacidad de usar al patógeno como sustrato de crecimiento, creciendo inicialmente sobre su micelio y finalmente reemplazándolo progresivamente gracias a la degradación de este (Hoyos-Carvajal et al., 2009).

Bioensayo *in vitro*

En esta prueba se obtuvieron porcentajes de germinación muy bajos en los tratamientos, porque al sembrar las semillas en conjunto con *Fol* este colonizó completamente la caja de Petri cubriéndola con sus hifas e impidiendo la germinación de las semillas. A pesar de las circunstancias hubo diferencias entre algunos tratamientos. La gráfica (Figura 7) muestra que para el día 7 el menor porcentaje de germinación estuvo en T7 con solo 1 % y el mayor 60 % lo obtuvo

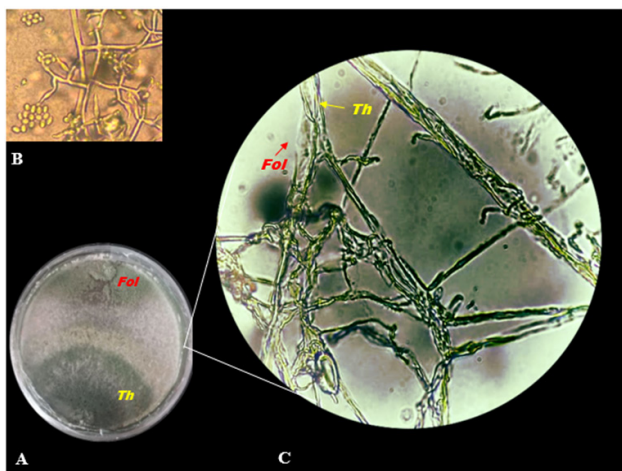
Tabla 4

Porcentaje de inhibición de *Th* y *Bs* sobre *Fol* ($\alpha = 0.05$; valor de $P = 4 \times 10^{-10}$, $F = 3994$) y tasa de crecimiento micelial por día en cm (TC). Medias con la misma literal entre columnas son iguales estadísticamente según Tukey ($P \leq 0.05$).

| N° | TRATAMIENTOS (T) Descripción | Antagonismo <i>in vitro</i> | | | TC |
|----|---------------------------------|-----------------------------|--------|--------|-------|
| | | Día 2 | Día 6 | Día 8 | |
| T1 | <i>Fol</i> | 0.0 a | 0.0 a | 0.0 a | 0.4 c |
| T2 | <i>Th</i> | 30.4 b | 39.7 b | 52.9 b | 0.2 b |
| T3 | <i>Bs</i> | 65.3 c | 70.3 c | 72.7 c | 0.1 a |

Figura 6

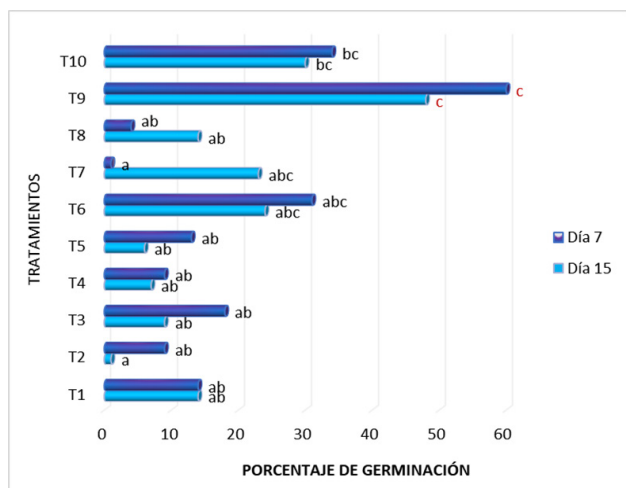
A) Interacción entre *Th* y *Fol*; esporulación (B); micoparasitismo (C). Las hifas de color verde de *Th* se enrollan sobre las hifas gruesas *Fol* (100X).



T9 que comparado al tratamiento testigo sano lo superó en 328 %. En el día 15 el número de plantas germinadas disminuye debido a que algunas plantas murieron por la resequead del medio, aun así, todos los tratamientos son similares entre sus medias a excepción de T2 y T9 con valores opuesto extremos (1 %, 48 %). Con el tratamiento T9 (*Th* 10⁸ + Almidón) algunas semillas lograron germinar porque *Th* 10⁸ esp/ml⁻¹ protegió la semilla de la invasión del patógeno por los metabolitos secundarios que este

Figura 7

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



tipo de antagonista libera al competir en el medio.

Bioensayo *in vivo*

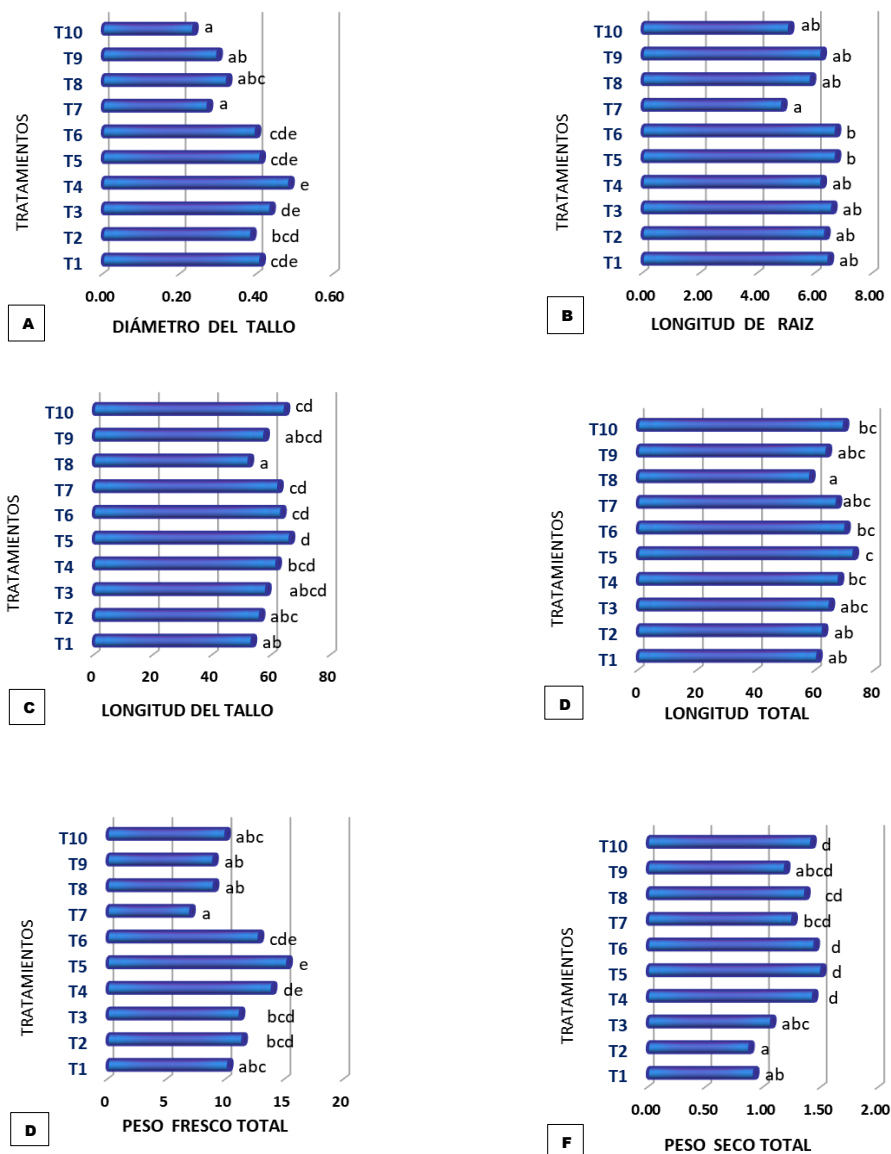
El análisis de varianza mostró efectos significativos entre tratamientos ($P < 0.05$). La prueba de Tukey, indicó que para el día 3 el T8 tuvo un 45 % de germinación y 125 % superior al testigo sano, la menor germinación se produjo en los tratamientos T5, T9 y T10 que no se diferencian de forma estadística. En el día 10 la situación cambia el mayor porcentaje de germinación lo obtiene T6 con el 100 % los demás tratamientos no difieren, pero con buenos porcentajes de 75 a 92 % (T3, T4, T5, T6, T9, T10), mientras que el menor se registró en T2 con 35 % y T1 con 56 %. Estos resultados demuestran que con T8 se alcanza mayor velocidad de germinación, pero T6 favorece un mayor número de semillas germinadas y que la combinación goma arábica más biocontroladores induce mayores porcentajes de germinación. Los valores del Índice de Velocidad de Germinación (IVG) fueron mayores en los tratamientos T3, T4, T5, T6, T7 y T10 con rangos que van desde 3.33-4.43 con respecto a Testigo enfermo que presenta un IVG muy bajo de 1.69. Con el tratamiento T8 se consigue un valor alto 5.12, esto demuestra que semillas de tomate var. CENTA CUSCATLÁN inoculadas con *Bs* 10⁸ esp/ml⁻¹ más goma arábica (T8) germinan a mayor velocidad con un aumento de 103 % en comparación al testigo sano con el IVG de 2.52 que no se diferencia de forma estadística del T2. El TMG indica el tiempo requerido para que germine el 50 % de las semillas. Los resultados demuestran que los tratamientos T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10 no presentan diferencias significativas entre ellos con valores de TMG de 4.44 – 6.21 (Tabla.5), únicamente el tratamiento T2 presentó diferencia significativa ($P \leq 0.05$), con el valor más alto 8.49. Esto demuestra que semillas infectadas con *Fol* tardan en germinar y se obtienen promedios bajos de germinación.

Variables fenológicas

El mayor diámetro del tallo lo consiguió T4 con 0.49 cm logrando aumentar en un 20 % el diámetro en comparación al testigo sano. Los diámetros de menor longitud estuvieron en T7 y T10 con 0.28-0.24 cm respectivamente (Figura 8). En la variable

Figura 8

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



fenológica longitud de raíz T5 y T6, no difieren de forma estadística, pero presentan el valor más alto y un aumento de 3.8 % y la menor longitud estuvo en T7, los demás tratamientos no difieren estadísticamente. En cuanto a la longitud del tallo, la comparación de medias indica que T5 (66.5) presentó la mayor longitud de tallo superando un 24 % al testigo sano, no así T8 con el menor valor (52.6). Así también en la longitud total T5 (73.2 %) presentó la mayor longitud de las plantas de tomate logrando

un aumento del 20 %. Ocurre lo opuesto con T8 que tuvo el menor valor (58.5), seguido de T1 y T2. Todos los tratamientos mostraron efecto sobre la variable biométrica peso fresco, pero T5 estadísticamente tuvo el mayor promedio superando en 49 % al testigo sano, todo lo contrario, resultado con T7, T8 y T9 al tener el menor peso. Mientras que en la variable peso seco T4, T5, T6, T10 son estadísticamente similares en sus medias, al aumentar el contenido de biomasa en las plantas de tomate.

Tabla 5

Porcentaje de germinación *in vivo* en semillas de tomate biocebadas. Evaluación a los 10 días después de la siembra. ($\alpha=0.05$; valor de $p=6.91 \times 10^{-10}$; $F=18.3$). Letras distintas entre columnas indican diferencias significativas para Tukey ($P \leq 0.05$).

| Nº | TRATAMIENTOS (T) Descripción | Germinación | | | |
|-----|-----------------------------------|-------------|--------|----------|---------|
| | | Día 3 | Día 10 | IVG | TMG |
| T1 | Testigo sano | 20 b | 56 ab | 2.52 ab | 6.48 ab |
| T2 | Testigo enfermo | 9 ab | 35 a | 1.69 a | 8.49 b |
| T3 | Bs 10 ⁶ + Almidón | 9 ab | 77 bc | 3.55 abc | 5.43 a |
| T4 | Bs 10 ⁶ + Goma arábica | 5 ab | 82 bc | 3.45 abc | 6.11 a |
| T5 | Th 10 ⁶ + Almidón | 1 a | 84 bc | 3.33 abc | 5.94 a |
| T6 | Th 10 ⁶ + Goma arábica | 2 ab | 100 c | 4.01 bc | 5.87 a |
| T7 | Bs 10 ⁸ + Almidón | 18 ab | 92 bc | 4.43 bc | 5.38 a |
| T8 | Bs 10 ⁸ + Goma arábica | 45 c | 91 bc | 5.12 c | 4.44 a |
| T9 | Th 10 ⁸ + Almidón | 0 a | 75 bc | 2.94 ab | 6.21 a |
| T10 | Th 10 ⁸ + Goma arábica | 0 a | 81 bc | 3.43 abc | 6.02 a |

DISCUSIÓN

En esta investigación se aislaron *Fusarium* spp. de plantas de tomate con síntomas de marchitez; la capacidad infectiva se determinó mediante pruebas de patogenicidad, las cuales evidenciaron que el aislado FM1 coincidió con los síntomas que expresa *Fol*, ya que de esta manera Córdova-Zapata (2003); Jamil et al. (2021); Maurya et al. (2020) y Srivastava et al. (2010) demostraron en sus investigaciones la forma especial "*lycopersici*". Un factor clave para el desarrollo de la enfermedad es la temperatura de incubación, algunos estudios reportan que la temperatura óptima en el suelo para que *Fol* exprese la virulencia es de 28 °C, hasta un máximo de 33 °C y mínimo de 20 °C (Boix-Ruiz et al., 2015; Clayton, 1923; Ibrahim & Baghdadi, 2003). En este caso la temperatura ambiente promedio de los ensayos fue de 27-30 °C valores adecuados para la expresión de los síntomas de la enfermedad en las plantas de tomate CENTA-CUSCATLÁN.

Mediante la prueba de antagonismo dual se evidenció la eficacia de *Bs* al reducir la tasa de crecimiento micelial e inhibir 72.7 % el crecimiento *in vitro* de *Fol* a los 8 días de enfrentamiento, de igual forma Ramyabharathi et al. (2016) evaluaron la capacidad de *Bs* EPCO16, al inhibir en un 44 % el crecimiento micelial de *Fol*, gracias a los antibióticos que la bacteria produce. La habilidad de las especies de *Bacillus* para inhibir a *Fo* se ha reportado en muchas ocasiones (Jangir et al., 2018; Ramírez-Cariño et al., 2020; Xu

et al., 2020; Zhao et al., 2014). Para Zhu et al. (2020), las altas tasas de inhibición son proporcionales a una mejor formulación que se traduce en una mayor densidad celular con la consecuente producción de metabolitos secundarios. Uno de los mecanismos antagonísticos empleados por estas bacterias es la liberación de compuestos volátiles, tal como se evidenció en De la Cruz-López et al. (2022); He et al. (2020); Ramírez et al. (2022); Zhang et al. (2020). *Th*, redujo 52.9 % el crecimiento de las hifas de *Fol* en cultivo dual, y mostró hiperparasitismo creciendo por encima del micelio del patógeno reemplazándolo progresivamente, aunque la inhibición con este tratamiento fue menor; este modo de acción es algo distinto a lo que la cepa *Bs* pudo realizar. Un efecto similar se obtuvo en Babychan & Simon (2017); Cubilla-Ríos et al. (2019); Maurya et al. (2020). En las interacciones antagonísticas de *Trichoderma* spp. los mecanismos principales se basan en la competencia por nutrientes y espacio, el micoparasitismo, la antibiosis, secreción de metabolitos secundarios para el crecimiento y defensa vegetal (de Aguiar et al., 2014; Hernández-Melchor et al., 2019; Sandle, 2014; Vargas-Hoyos & Gilchrist-Ramelli, 2015), siendo el micoparasitismo el modo de acción mayormente empleado por estas especies, el cual inicia cuando el antagonista reconoce al hospedante y se une a las hifas mediante apresorios, posteriormente degrada la pared celular mediante la secreción de enzimas, principalmente quitinasas, β -1,3-glucanasas, celulasas, proteasas y fosfatasa (Qualhato et al., 2013).

Los resultados de este estudio indican la efectividad del biocebado de semillas con agentes de control biológico. En el bioensayo *in vitro* el biocebado con *Th* 10⁸ esp/ml⁻¹ y Almidón (T9) estimuló un 60 % la germinación de semillas de tomate. Un resultado distinto fue en el bioensayo *in vivo* ya que *Th* 10⁶ esp/ml⁻¹ más Goma Arábica (T6) logró que el 100 % de semillas germinaran, esto indica que el éxito de la germinación depende del tipo de microorganismo más el biopolímero empleado durante el biocebado y que se obtienen óptimos resultados con concentraciones bajas de producto, tal como ocurrió en el caso de *Th* 10⁶ esp/ml⁻¹ y Almidón (T5) que logró incrementos en las variables fenológicas: diámetro del tallo, largo de raíz, longitud del tallo, longitud

total, peso fresco y peso seco. *Trichoderma* spp es un hongo ampliamente utilizado para el recubrimiento de semillas por sus múltiples beneficios para controlar agentes patógenos (Ayyandurai et al., 2021; Gravel et al., 2007; Gupta et al., 2014; Hoyos, 2011).

Es conocido que los agentes de biocontrol activan la resistencia sistémica inducida (ISR) en plantas infectadas (Abdelrahman et al., 2016), esto se logra al liberar metabolitos secundarios (Keswani et al., 2016). La producción de metabolitos secundarios mediada por este agente juega un papel crucial en la fisiología vegetal, por ejemplo, el mecanismo directo por el cual *Th* promueve el crecimiento de las raíces, tallos y área foliar en plantas de tomate es a través de la inducción en los niveles de AIA y GA3 (Cai et al., 2015; Olowe et al., 2022), induce el crecimiento temprano en las plantas (Eltlbany et al., 2019) e incrementa la germinación de semillas de tomate y produce ácido harzianico (Vinale et al., 2013). La mejora en el crecimiento y rendimiento también está influenciada por la producción de sustancias antifúngicas como *Trichodermina* (Balode, 2010), endoquitinasas, β -glucosidasa, α -1,3-glucanasa (Monteiro et al., 2011). Este microorganismo tiene la capacidad de entrar en las raíces de las plantas y vivir como endófito lo que mejora aspectos como el peso fresco y seco de las plantas de tomate (Kleifeld & Chet, 1992) y facilita la absorción de nutrientes de la planta huésped (Chaudhary & Shukla, 2018; Iqbal & Mukhtar, 2020; Li et al., 2018) lo cual se logra cuando *Th* suprime la patogenicidad de *Fol* por lo que la planta puede absorber sin ningún problema los nutrientes.

CONCLUSIÓN

Se aisló una cepa infectiva de marchitez vascular en plantas de tomate var. CENTA CUSCATLÁN identificada molecularmente y mediante pruebas de patogenicidad como *Fol*. *Bs* presentó mayor porcentaje de inhibición sobre *Fol* (65.3-72.7 %), a los 2, 6 y 8 días de enfrentamiento, por el contrario, *Th* tuvo menor antagonismo *in vitro* (30.4-52.9 %) a los 2, 6 y 8 días de evaluación. Los biocontroladores y biopolímeros fueron efectivos para la germinación de semillas de tomate var. CENTA CUSCATLÁN. Un 60 % de germinación *in vitro* se logró en T9 (*Th* 10⁶ esp/ml⁻¹ + Almidón) y el 100 % de la germinación *in vivo* con T6

(*Th* 10⁶ esp/ml⁻¹ + Goma arábica). Las variables largo de raíz, largo del tallo, longitud total, peso fresco y peso seco aumentaron con el tratamiento T5 (*Th* 10⁶ esp/ml⁻¹ + Almidón) y T4 (*Bs* 10⁶ esp/ml⁻¹ + Goma arábica) favoreció incremento en el diámetro del tallo.

AGRADECIMIENTO

Se agradece y reconoce el apoyo de CENTA en la facilitación de materiales, equipos, tiempo de asesores, semilla, etc., para el desarrollo de esta investigación.

REFERENCIAS

- Abdelrahman, M., Abdel-Motaal, F., El-Sayed, M., Jogaiyah, S., Shigyo, M., Ito, S., & Tran, L.-S. P. (2016). Dissection of *Trichoderma longibrachiatum*-induced defense in onion (*Allium cepa* L.) against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cepa* by target metabolite profiling. *Plant Science*, 246, 128-138. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.02.008>
- Ayyandurai, M., Akila, R., Manonmani, K., Theradimani, M., & Vellaikumar, S. (2021). Phytostimulation and growth promotion activities of *Trichoderma* spp. On groundnut (*Arachis hypogaea* L.) crop. *Journal of Applied and Natural Science*, 13(4), 1172-1179. <https://doi.org/10.31018/jans.v13i4.2936>
- Babychan, M., & Simon, S. (2017). Efficacy of *Trichoderma* spp. Against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. (FOL) infecting pre-and post-seedling of tomato. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(4), 616-619.
- Badalyan, S. M., Innocenti, G., & Garibyan, N. G. (2004). Interactions between xylophilic mushrooms and mycoparasitic fungi in dual-culture experiments. *Phytopathologia Mediterranea*, 43(1), 44-48.
- Balode, A. (2010). Effect of trichodermin, biological product against *Botrytis* in horticultural crops. *Acta Horticulturae*, 877, 1583-1588. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.877.218>
- Barnett, H. L., & Hunter, B. B. (1998). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi* (4th ed.). The American Phytopathological Society.

- Barnett, H. L., & Hunter, B. B. (2006). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi* (4th ed.). The American Phytopathological Society Press.
- Bautista, G. (2000). *Determinación de la asociación y antagonismo contra R. solani de aislamientos nativos de Pseudomonas fluorescens en un cultivo de papa Solanum phuroja en condiciones de invernadero* [Maestría de inter facultades en Microbiología]. Universidad Nacional de Colombia.
- Boix-Ruiz, A., Gálvez-Patón, L., de Cara-García, M., Palmero-Llamas, D., Camacho-Ferre, F., & Tello-Marquina, J. C. (2015). Comparison of analytical techniques used to identify tomato-pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Phytoparasitica*, 43(4), 471-483. <https://doi.org/10.1007/s12600-014-0444-z>
- Brown, R. F., & Mayer, D. G. (1988). Representing cumulative germination.1. A critical analysis of single—Value germination indices. *Annals of Botany*, 61(2), 117-125. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a087534>
- Burgess, L. W., & Trimboli, D. (1986). Characterization and Distribution of *Fusarium nygamai*, sp. Nov. *Mycologia*, 78(2), 223. <https://doi.org/10.2307/3793167>
- Caballero, W. A., Senés, P. J., & Toumanián, A. G. (2016). "Evaluación de la capacidad biocontroladora de *Trichoderma atroviride* en el cultivo de garbanzo (*Cicer arietinum* L.)" [Tesis Ingeniería]. Universidad Nacional de Córdoba.
- CABI. (2021). *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (*Fusarium* wilt of tomato). *CABI Compendium*, *CABI Compendium*, 24660. <https://doi.org/10.1079/cabicompendium.24660>
- CABI & EPPO. (2011). *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. [Distribution map]. *Distribution Maps of Plant Diseases*, Map 1111 (Edition 1). <https://doi.org/10.1079/DMPD/20113314317>
- Cai, F., Chen, W., Wei, Z., Pang, G., Li, R., Ran, W., & Shen, Q. (2015). Colonization of *Trichoderma harzianum* strain SQR-T037 on tomato roots and its relationship to plant growth, nutrient availability and soil microflora. *Plant and Soil*, 388(1-2), 337-350. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2326-z>
- Cai, G., Rosewich, L., Schneider, R. W., Klister, H. C., Davis, R. M., Elias, K. S., & Miyao, E. M. (2003). Origin of race 3 of *Fusarium oxysporum* f. Sp. *lycopersici* at a single site in California. *Phytopathology. Ecology and Population Biology*, 93(8), 1014-1022.
- Cardona-Piedrahita, L. F., & Castaño-Zapata, J. (2019). Comparación de métodos de inoculación de *Fusarium oxysporum* f. Sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder & Hansen, causante del marchitamiento vascular del tomate. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 43(167), 227. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.854>
- Carmona, S. L. (2019). *Identificación de un aislamiento de Fusarium oxysporum f. Sp. Lycopersici y respuesta fisiológica en tomate durante la infección frente a dos elicitores fúngicos* [Tesis Maestría]. Universidad Nacional de Colombia.
- Carrillo-Fasio, J. A., Montoya-Rodríguez, T. de J., Saúl, R., Cruz-Ortega, J. E., Márquez-Zequera, I., & Sañudo-Barajas, J. (2003). Razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Snyder y Hansen, en Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en el Valle de Culiacán, Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(2), 123-127.
- Castillo-Reyes, F., Hernández-Castillo, F. D., Gallegos-Morales, G., & Flores-Olivas, A. (2015). Efectividad in vitro de Bacillus y polifenoles de plantas nativas de México sobre Rhizoctonia-Solani*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6(3), 549-562.
- Chaudhary, T., & Shukla, P. (2018). Bioinoculant capability enhancement through metabolomics and systems biology approaches. *Briefings in Functional Genomics*, 18(3), 159-168. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elz011>
- Chin, J. M., Lim, Y. Y., & Ting, A. S. Y. (2021). Biopolymers

- for biopriming of *Brassica rapa* seeds: A study on coating efficacy, bioagent viability and seed germination. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 20(3), 198-207. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2021.01.006>
- Chin, J. M., Lim, Y. Y., & Ting, A. S. Y. (2022). Biopriming *Pseudomonas fluorescens* to vegetable seeds with biopolymers to promote coating efficacy, seed germination and disease suppression. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, S1658077X22000224. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2022.02.002>
- Clayton, E. E. (1923). The Relation of Temperature to the *Fusarium* Wilt of the Tomato. *American Journal of Botany*, 10(2), 71-88. <https://doi.org/10.2307/2435575>
- Constanza-Corrales, L., Consuelo Sánchez, L., Cuervo Andrade PhD, J. L., Bautista, D., Gonzáles, Lady, & Guevara, M. (2010). Evaluación del efecto biocontrolador de *Bacillus* spp., frente a *Fusarium* spp., bajo condiciones de invernadero en *Rosmarinus officinalis* L. *Nova*, 8(13), 63. <https://doi.org/10.22490/24629448.440>
- Corallo, B. (2012). *Selección de cepas de Trichoderma sp. Antagonistas del patógeno de sorgo* [Tesis de Grado, Universidad de la Republica (Uruguay)]. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/1392/1/uy24-16049.pdf>
- Córdova, I. M. (2003). *Biocontrol de Fusarium oxysporum f. Sp. Lycopersici por Trichozam® (Trichoderma harzianum) y Mycoral® (micorriza vesículo arbuscular) en el cultivo de tomate* [Tesis de Grado]. Universidad Zamorano.
- Córdova-Zapata, María. I. (2003). *Biocontrol de Fusarium oxysporum f. Sp. Lycopersici por Trichozam® (Trichoderma harzianum) y Mycoral® (micorriza vesículo arbuscular) en el cultivo de tomate* [Tesis de Grado]. Universidad Zamorano.
- Covacevich, F., & Consolo, F. (2014). *Herramientas para el estudio y manipulación de Hongos Micorrícicos Arbusculares y Trichoderma* (1ª). Universidad Nacional de Mar del Plata.
- Cubilla-Ríos, A. A., Ruíz-Díaz-Mendoza, D. D., Romero-Rodríguez, M. C., Flores-Giubi, M. E., & Barúa-Chamorro, J. E. (2019). Antibiosis de proteínas y metabolitos en especies de *Trichoderma* contra aislamientos paraguayos de *Macrophomina phaseolina*. *Agronomía Mesoamericana*, 30(1), 63-77. <https://doi.org/10.15517/am.v30i1.34423>
- de Aguiar, R. A., da Cunha, M. G., & Lobo Junior, M. (2014). Management of white mold in processing tomatoes by *Trichoderma* spp. And chemical fungicides applied by drip irrigation. *Biological Control*, 74, 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.03.009>
- De la Cruz-López, N., Cruz-López, L., Holguin-Meléndez, F., Guillén-Navarro, G. K., & Huerta-Palacios, G. (2022). Volatile organic compounds produced by cacao endophytic bacteria and their inhibitory activity on *Moniliophthora roreri*. *Current Microbiology*. *Current Microbiology*, 79(2), 35. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02696-2>
- Dickinson, C. H., & Lucas, J. A. (1987). *Patología vegetal y patógenos de plantas* (1º). Limusa.
- Dixon, G. R., & Tilston, E. L. (2010). Soil-Borne Pathogens and Their Interactions with the Soil Environment. En G. R. Dixon & E. L. Tilston (Eds.), *Soil Microbiology and Sustainable Crop Production*. Dixon, G.R.; Tilston, E.L (pp. 197-271). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-90-481-9479-7_6
- Domsh, K., Gams, W., & Anderson, T. (1980). *Compendium of soil fungi* (1-1 y 2). Academic Press.
- Dugan, F. M. (2006). *The Identification of Fungi: An Illustrated Introduction With Keys, Glossary, And Guide to Literature* (Spi Edición). The American Phytopathological Society.
- Eltlbany, N., Baklawa, M., Ding, G.-C., Nassal, D., Weber, N., Kandeler, E., Neumann, G., Ludewig, U., van Overbeek, L., & Smalla, K. (2019). Enhanced

- tomato plant growth in soil under reduced P supply through microbial inoculants and microbiome shifts. *FEMS Microbiology Ecology*, 95(9), fiz124. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiz124>
- Eraso, C., Acosta Rodríguez, J., Salazar González, C., & Betancourth García, C. (2014). Evaluación de cepas de *Trichoderma* spp. Para el manejo del amarillamiento de arveja causado por *Fusarium oxysporum*. *Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria*, 15(2), 237-249.
- Ezziyiani, M., Sánchez, C. P., Requena, M. E., Rubio, L., & Candela, M. E. (2004). Biocontrol por *Streptomyces rochei* –Ziyani–, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. *Anales de Biología*, 26, 69-78.
- Fernández-Larrea, O. V. (1997). *Microorganismos en el control fitosanitario en Cuba: Tecnologías de producción. III Encuentro Nacional de Agricultura Orgánica-ACAO*, Universidad Central de Las Villas.
- Fernando, B., Catara, V., Prohens, J., Yusen, S., Nigro, S., Hetforth, J., & Hamón, C. (2020). *BRESOV - Breeding for Resilient, Efficient and Sustainable Organic Vegetable production. D4.1*, 50.
- Figueroa-Rivera, M. G., Rodríguez-Guerra, R., Zulema, B., González-Chavira, M. M., & Pons-Hernández, J. L. (2010). Caracterización de Especies de *Fusarium* Asociadas a la Pudrición de Raíz de Maíz en Guanajuato, México. *REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA*, 28(2), 11.
- Finch, A. N., & Finch, H. C. (1971). *Los hongos comunes que atacan cultivos en América Latina* (Vol. 17). CEIBA.
- Funes-Aguilar, F., & Monzote, M. (2006). Sistemas agroecológicos y su papel en los países del Tercer Mundo. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 10(3), 5-28.
- García, J. I., Ruíz, N. A., Lira, R. H., Vera, I., & Méndez, B. (2016). *Técnicas Para Evaluar Germinación, Vigor y Calidad Fisiológica de Semillas Sometidas a Dosis de Nanopartículas*. 129-140.
- García, J., Monteith, L., & Squire, G. R. (1982). Time, Temperature and Germination of Pearl Millet (*Pennisetum typhoides* S. & H.). *Journal of Experimental Botany*, 33(133), 288-296.
- García, R., Riera, R., & Zambrano, C. (2006). Desarrollo de un fungicida biológico a base de una cepa del hongo *Trichoderma harzianum* proveniente de la región andina venezolana. *Fitosanidad*, 10(2), 115-121.
- Gayosso, O., Chávez-Aguilar, G., López-Benítez, A., Marroquín-Morales, J. Á., López-Aguilar, K., & Hidalgo-Ramos, D. M. (2021). Evaluación de la respuesta de diferentes genotipos de tomate a *Fusarium oxysporum* raza 3. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 12(3), 409-420. <https://doi.org/10.29312/remexca.v12i3.2284>
- Gómez, H., Zapata, A., Torres, E., & Tenorio, M. (2014). *Producción de hongos entomopatógenos*. Servicio Nacional de Sanidad Agraria.
- González, ángelica de la caridad. (2016). *Optimización del método de empleo del biopreparado cepa A-53 de Trichoderma harzianum Rifai, para el control de Phytophthora nicotianae Breda Haan, en el cultivo del tabaco* [Tesis de Diploma]. Universidad de La Habana.
- González-Cárdenas, J. C., Maruri-García, J. M., & González-Acosta, A. (2005). Evaluación de diferentes concentraciones de *Trichoderma* spp. Contra *Fusarium oxysporum* agente causal de la pudrición de plántulas en papaya (*Carica papaya* L.) en Tuxpan, Veracruz, México. *Revista UDO Agrícola*, 5(1), 45-47.
- Gravel, V., Antoun, H., & Tweddell, R. J. (2007). Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biology and Biochemistry*, 39(8), 1968-1977. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.02.015>
- Guédez, C., Cañizalez, L., Castillo, C., & Olivar, R. (2012). Evaluación in vitro de aislamientos de *Trichoderma harzianum* para el control de

- Rhizoctonia solani, Sclerotium rolfsii y Fusarium oxysporum en plantas de tomate. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 32, 44-49.
- Gupta, Vijai. K., Schmoll, M., Herrera-Estrella, A., Upadhyay, R. S., Druzhinina, I., & Tuohy, María. G. (2014). *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2012-0-00434-6>
- He, C.-N., Ye, W.-Q., Zhu, Y.-Y., & Zhou, W.-W. (2020). Antifungal Activity of Volatile Organic Compounds Produced by *Bacillus methylotrophicus* and *Bacillus thuringiensis* against Five Common Spoilage Fungi on Loquats. *Molecules*, 25(15), 3360. <https://doi.org/10.3390/molecules25153360>
- Hernández-Melchor, D.J., Ferrera-Cerrato, R., & Alarcón, A. (2019). Trichoderma: Importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. *Chilean journal of agricultural & animal sciences, ahead*, 0-0. <https://doi.org/10.4067/S0719-38902019005000205>
- Hossain, M. M., Hossain, N., Sultana, F., Islam, S. M., Islam, M. S., & Bhuiyan, M. K. A. (2013). Integrated management of Fusarium wilt of chickpea (*Cicer arietinum* L.) caused by *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Ciceris* with microbial antagonist, botanical extract and fungicide. *African Journal of Biotechnology*, 12(29), 4699-4706. <https://doi.org/10.5897/AJB2013.12503>
- Hoyos, L. (2011). *Enfermedades de plantas: Control biológico*. Universidad Estatal de Colombia.
- Hoyos-Carvajal, L., Orduz, S., & Bissett, J. (2009). Genetic and metabolic biodiversity of *Trichoderma* from Colombia and adjacent neotropic regions. *Fungal Genetics and Biology*, 46(9), 615-631. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.04.006>
- Ibrahim, A. M. A., & Baghdadi, A. M. (2003). *Investigations On Fusarium oxysporum f. Sp. Lycopersici The Casual Agent Of Tomato Wilt (Lycopersicon esculentum Mill)* [Degree Thesis]. University of Khartoum.
- Inami, K., Yoshioka-Akiyama, C., Morita, Y., Yamasaki, M., Teraoka, T., & Arie, T. (2012). A Genetic Mechanism for Emergence of Races in *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Lycopersici*: Inactivation of Avirulence Gene AVR1 by Transposon Insertion. *PLOS ONE*, 7(8), 1-10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044101>
- Iqbal, U., & Mukhtar, T. (2020). Evaluation of Biocontrol Potential of Seven Indigenous *Trichoderma* Species against Charcoal Rot Causing Fungus, *Macrophomina phaseolina*. *Gesunde Pflanzen*, 72(2), 195-202. <https://doi.org/10.1007/s10343-020-00501-x>
- Jamil, A., Musheer, N., & Kumar, M. (2021). Evaluation of biocontrol agents for management of wilt disease of tomato incited by *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Lycopersici*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 54(19-20), 1722-1737. <https://doi.org/10.1080/03235408.2021.1938353>
- Jangir, M., Pathak, R., Sharma, S., & Sharma, S. (2018). Biocontrol mechanisms of *Bacillus* sp., isolated from tomato rhizosphere, against *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Lycopersici*. *Biological Control*, 123, 60-70. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.04.018>
- John, R. P., Tyagi, R. D., Brar, S. K., & Prévost, D. (2010). Development of emulsion from rhizobial fermented starch industry wastewater for application as *Medicago sativa* seed coat. *Engineering in Life Sciences*, 10(3), 248-256. <https://doi.org/10.1002/elsc.201000002>
- Jones, J. P. (1991). Fusarium wilt. En *Compendium of Tomato Diseases*. J. B. Jones et al. (pp. 15-16). APS Press (The American Pathological Society Press).
- Keswani, C., Bisen, K., Singh, V., Sarma, B. K., & Singh, H. B. (2016). Formulation technology of biocontrol agents: Present status and future prospects. En N. Arora, S. Mehnaz, & R. Balestrini (Eds.), *Bioformulations: For Sustainable Agriculture* (pp. 35-52). Springer, New Delhi. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2779-3_2

- Kleifeld, O., & Chet, I. (1992). *Trichoderma harzianum*? interaction with plants and effect on growth response. *Plant and Soil*, *144*(2), 267-272. <https://doi.org/10.1007/BF00012884>
- Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2006). *The fusarium laboratory manual* (1st ed). Blackwell Pub.
- Li, Y.-T., Hwang, S.-G., Huang, Y.-M., & Huang, C.-H. (2018). Effects of *Trichoderma asperellum* on nutrient uptake and Fusarium wilt of tomato. *Crop Protection*, *110*, 275-282. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.03.021>
- López, A. I. S., & Pazos, V. (2005). Aislamiento y selección de bacterias pertenecientes al género *Bacillus* con potencialidades para el control biológico en semilleros de tabaco. *Centro Agrícola*, *32*(3), 25-29.
- López, M. C. (2011). *Efecto antagónico de Bacillus spp. De la rizosfera de plantas del semidesierto Chihuahuense sobre hongos fitopatógenos de suelo y su efecto en el desarrollo del tomate (Solanum lycopersicum L.)* [Ingeniería en Agrobiología]. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
- López-Bucio, J., Pelagio-Flores, R., & Herrera-Estrella, A. (2015). *Trichoderma* as biostimulant: Exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. *Scientia Horticulturae*, *196*, 109-123. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.08.043>
- López-Mondéjar, R., Ros, M., & Pascual, J. A. (2011). Mycoparasitism-related genes expression of *Trichoderma harzianum* isolates to evaluate their efficacy as biological control agent. *Biological Control*, *56*(1), 59-66. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.10.003>
- Markets and Markets. (2018). *Market reports biological seed treatment market*. <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/nanophotonics-advanced-technologies-and-global-market-125.html>
- Marlatt, M. L., Correll, J. C., Kaufmann, P., & Cooper, P. E. (1996). Two genetically distinct populations of *Fusarium oxysporum*. F. Sp. *Lycopersici* race 3 in the United States. *Plant Disease*, *80*(12), 1336-1342.
- Martin, P. A. W., & Travers, R. S. (1989). Worldwide Abundance and Distribution of *Bacillus thuringiensis* Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, *55*(10), 2437-2442. <https://doi.org/10.1128/aem.55.10.2437-2442.1989>
- Martínez-Scott, M. M. (2016). Evaluación de aislados nativos de *Trichoderma* sp para el control de hongos fitopatógenos del suelo en tomate. *Revista de Ciencias Naturales y Agropecuarias*, *3*(6), 32-42.
- Maurya, S., Rai, D., Dubey, S., Kumar, P. M., & Prajapati, S. (2020). In vitro bioefficacy of *Trichoderma harzianum* and chitosan compound against *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Lycopersici*. *Indian Journal of Plant Protection*, *48*(4), 447-450.
- Mead, G. C., Hudson, W. R., & Hinton, M. H. (1993). Microbiological survey of five poultry processing plants in the UK. *British Poultry Science*, *34*(3), 497-503. <https://doi.org/10.1080/00071669308417605>
- Meadows, M. P., Ellis, D. J., Butt, J., Jarrett, P., & Burges, H. D. (1992). Distribution, Frequency, and Diversity of *Bacillus thuringiensis* in an Animal Feed Mill. *Applied and Environmental Microbiology*, *58*(4), 1344-1350. <https://doi.org/10.1128/aem.58.4.1344-1350.1992>
- Méndez-Úbeda, J. M. (2018). *Desarrollo a nivel de laboratorio de un bioplaguicida a base de Bacillus subtilis, para el control de hongos fitopatógenos en cultivos de interés agrícola* [Tesis Maestría]. Universidad Nacional de Ingeniería.
- Michael-Aceves, A. C., Reyes-De la Cruz, A. R., Otero-Sánchez, M. A., Rebollo-Domínguez, O. R., & Lezama-Gutiérrez, R. (2005). Potencial antagónico de *Trichoderma* spp. Sobre *Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr. F. Sp. *Lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen y *Sclerotium rolfsii* (Sacc.) in vitro e invernadero. *Revista mexicana de fitopatología*, *23*(3), 286-293.
- Molla, A. H., Fakhru'l-Razi, A., Abd-Aziz, S., Hanafi, M. M.,

- & Alam, Z. (2001). In-vitro compatibility evaluation of fungal mixed culture for bioconversion of domestic wastewater sludge. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(9), 849-856. <https://doi.org/10.1023/a:1013844306960>
- Monteiro, S., Grondona, L. M., Llobell, I., & Monte, A. (2011). In vitro antifungal activity of *Trichoderma harzianum*, *T. longibrachiatum*, *T. asperellum* and *T. atroviride* against *Botrytis cinerea* to strawberry. *Bull OILB/SROP*, 25, 253-256.
- Morán-Quintero, N. R. M. (2007). *Evaluación de cuatro cepas de Trichoderma harzianum para el control de Rhizoctonia solani en plántulas de pepino (Cucumis sativa)* [Tesis Ingeniería]. Universidad Zamorano.
- Müller, Román. G. (2021). *Trichoderma harzianum como herramienta en el manejo integrado de enfermedades de tomate* [Magister Scientiae, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales]. <https://doi.org/10.35537/10915/129788>
- O'Callaghan, M. (2016). Microbial inoculation of seed for improved crop performance: Issues and opportunities. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(13), 5729-5746. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7590-9>
- Olowe, O. M., Nicola, L., Asemoloye, M. D., Akanmu, A. O., & Babalola, O. O. (2022). *Trichoderma*: Potential bio-resource for the management of tomato root rot diseases in Africa. *Microbiological Research*, 257, 126978. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.126978>
- Osorio, B. S., & Guerrero, G. A. T. (2020). *Evaluación de planes de manejo de Fusarium oxysporum f. Sp en plantas de tomate, bajo condiciones controladas* [Tesis de Grado]. Universidad Nacional Abierta y a Distancia - UNAD.
- Peña, R. R., & Páez, J. E. (2014). *Guía para el cálculo de la concentración de inóculo*. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. <https://virtual.uptc.edu.co/ova/fito/archivo/guia1.pdf>
- Pérez, D., & García, P. (2019). Identificación del agente causal del marchitamiento en *Caesalpinia spinosa* "tara" y el efecto antagónico del aislado de *Bacillus* spp. Y *Trichoderma* sp. *Ecología Aplicada*, 18(1), 51. <https://doi.org/10.21704/rea.v18i1.1306>
- Perniola, O. S., Staltari, S., Chorzempa, S. E., & Gassó, M. M. A. (2014). Control biológico de *Fusarium graminearum*: Utilización de *Trichoderma* spp. Y biofumigación con parte aérea de *Brassica juncea*. *Rev. FCA UNCUYO*, 46(X), XXX-XXX.
- Qualhato, T. F., Lopes, F. A. C., Steindorff, A. S., Brandão, R. S., Jesuino, R. S. A., & Ulhoa, C. J. (2013). Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi: Evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology Letters*, 35(9), 1461-1468. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1225-3>
- Raj, S. N., Shetty, N., & Shetty, H. (2004). Seed bio-priming with *Pseudomonas fluorescens* isolates enhances growth of pearl millet plants and induces resistance against downy mildew. *International Journal of Pest Management*, 50(1), 41-48. <https://doi.org/10.1080/09670870310001626365>
- Ramírez, V., Martínez, J., Bustillos-Cristales, M. del R., Catañeda-Antonio, D., Munive, J., & Baez, A. (2022). *Bacillus cereus* MH778713 elicits tomato plant protection against *Fusarium oxysporum*. *Journal of Applied Microbiology*, 132(1), 470-482. <https://doi.org/10.1111/jam.15179>
- Ramírez-Cariño, H. F., Guadarrama-Mendoza, P. C., Sánchez-López, V., Cuervo-Parra, J. A., Ramírez-Reyes, T., Dunlap, C. A., & Valadez-Blanco, R. (2020). Biocontrol of *Alternaria alternata* and *Fusarium oxysporum* by *Trichoderma asperelloides* and *Bacillus paralicheniformis* in tomato plants. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 113(9), 1247-1261. <https://doi.org/10.1007/s10482-020-01433-2>
- Ramyabharathi, S., Rajendran, L., Karthikeyan, G., & Raguchander, T. (2016). Liquid formulation of endophytic *Bacillus* and its standardization for

- the management of Fusarium wilt in tomato. *Bangladesh Journal of Botany*, 45(2), 283-290.
- Retana, K., Ramírez-Coché, J. A., Castro, O., & Blanco-Meneses, M. (2018). Caracterización morfológica y molecular de *Fusarium oxysporum* f.sp. *Apii* asociado a la marchitez del apio en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 42(1). <https://doi.org/10.15517/rac.v42i1.32199>
- Reyes-Zambrano, S. J., Lecona-Guzmán, C. A., Gutiérrez-Miceli, F. A., Santana-Buzzy, N., Islas-Flores, I., Tzec-Simá, M., Barredo-Pool, F. A., Ruiz-Lau, N., & Ávila-Miranda, M. E. (2020). Microscopía electrónica de barrido y análisis enzimático en *Agave americana* durante la infección con *Fusarium oxysporum*. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 38(3). <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2005-3>
- Rodríguez, M., González, L., Fernández, M., & González, G. (2008). Evaluación de cepas de *Trichoderma* spp. Contra patógenos en semillas de frijol, lechuga, girasol y arroz. *Centro Agrícola*, 35(1), 11-15.
- Rodríguez, M., González, L., Fernández, M., & González, G. (2005). Efectividad de *trichoderma* spp. Para el control de hongos patógenos de la semilla y el suelo en el cultivo del frijol. *FITOSANIDAD*, 9(1), 37-41.
- Rojas, A. (2011). *Conceptos y práctica de microbiología general*. Universidad Nacional de Colombia. <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/8391/albertorojastrivino.2011.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Rojas, M. M., Tejera, B., Larrea, J. A., & Heydrich, P. M. (2011). *Aislamiento y caracterización de cepas de Bacillus asociadas al cultivo del arroz (Oryza sativa L.)*. 10.
- Rojas-Badía, M. M., Sánchez-Castro, D., Rosales-Perdomo, K., & Lugo-Moya, D. (2017). *Antagonismo de Bacillus frente a hongos fitopatógenos de cultivos hortícolas*. 32(2), 9.
- Salinas-Ventura, R., & Soriano-Bernilla, B. (2014). Efecto de *Trichoderma viride* y *Bradyrhizobium yuanningense* en el crecimiento de *Capsicum Annuum* en condiciones de laboratorio. *REBIOLEST*, 2(2), 13.
- Sánchez, A. D., Barrera, V., Reybet, G., & Sosa, C. (2015). Biocontrol con *Trichoderma* spp. De *Fusarium oxysporum* causal del "mal de almácigos" en pre y post emergencia en cebolla. *Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata*, 114(1), 61-70.
- Sandle, T. (2014). *Trichoderma*. En C. A. Batt & M. L. Tortorello (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology* (2 nd, pp. 644-646).
- Sandoval, M. C., & Belesansky, C. (2020). Producción artesanal del hongo antagonico *Trichoderma* Persoon en sustrato sólido. *Revista de Divulgación Técnica Agropecuaria, Agroindustrial y Ambiental. Facultad de Ciencias Agrarias*, 7(3), 55-64.
- Santiago, E., Guerrero, D., Vilchis, R., Martínez, J., Trejo, L., & Leyva, S. (2017a). *Efectividad in vitro de fungicidas biológicos, químicos y alternativos contra Botrytis cinerea (Pers.) de fresa (Fragaria x ananassa Duch.)*. 7.
- Santiago, E., Guerrero, D., Vilchis, R., Martínez, J., Trejo, L., & Leyva, S. (2017b). Efectividad in vitro de fungicidas biológicos, químicos y alternativos contra *Botrytis cinerea* (Pers.) de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Universidad Autónoma Chapingo, Depto. de Preparatoria Agrícola*, 7.
- Sarkar, D., Chattopadhyay, A., Singh, S., Devika, O. S., Pal, S., Parihar, M., Pal, S., Singh, H. B., & Rakshit, A. (2020). Modulation of Microbiome Through Seed Bio-priming. En C. Manoharachary, H. B. Singh, & A. Varma (Eds.), *Trichoderma: Agricultural Applications and Beyond* (pp. 209-218). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-54758-5_10
- Sivila, N., & Álvarez, S. (2013). *Tecnologías agroecológicas para la agricultura familiar. Producción artesanal de Trichoderma* (1ª). Universidad Nacional de Jujuy. Universitaria de Jujuy. Facultad de Ciencias Agrarias.

- Srivastava, R., Khalid, A., Singh, U. S., & Sharma, A. K. (2010). Evaluation of arbuscular mycorrhizal fungus, fluorescent *Pseudomonas* and *Trichoderma harzianum* formulation against *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Lycopersici* for the management of tomato wilt. *Biological Control*, 53(1), 24-31. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.11.012>
- Tejera-Hernández, B. (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC.*, 42(3), 131-138.
- Troya, C., & Vaca-Granda, L. (2014). Protocolo para la reproducción de cepas nativas de *Trichoderma* spp. En laboratorios artesanales. *Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca, Proyecto De Innovación Tecnológica Participativa Y Productividad Agrícola PITPPA*, 42.
- Vargas-Hoyos, H. A., & Gilchrist-Ramelli, E. (2015). Producción de enzimas hidrolíticas y actividad antagónica de *Trichoderma asperellum* sobre dos cepas de *Fusarium* aisladas de cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum*). *Revista Mexicana de Micología*, 42, 9-16.
- Vinale, F., Nigro, M., Sivasithamparam, K., Flematti, G., Ghisalberti, E. L., Ruocco, M., Varlese, R., Marra, R., Lanzuise, S., Eid, A., Woo, S. L., & Lorito, M. (2013). Harzianic acid: A novel siderophore from *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiology Letters*, 347(2), 123-129. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12231>
- Xu, W., Wang, K., Wang, H., Liu, Z., Shi, Y., Gao, Z., & Wang, Z. (2020). Evaluation of the biocontrol potential of *Bacillus* sp. WB against *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Niveum*. *Biological Control*, 147, 104288. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104288>
- Zhang, D., Yu, S., Yang, Y., Zhang, J., Zhao, D., Pan, Y., Fan, S., Yang, Z., & Zhu, J. (2020). Antifungal Effects of Volatiles Produced by *Bacillus subtilis* Against *Alternaria solani* in Potato. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1196. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01196>
- Zhao, Y., Selvaraj, J. N., Xing, F., Zhou, L., Wang, Y., Song, H., Tan, X., Sun, L., Sangare, L., Folly, Y. M. E., & Liu, Y. (2014). Antagonistic Action of *Bacillus subtilis* Strain SG6 on *Fusarium graminearum*. *PLoS ONE*, 9(3), e92486. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092486>
- Zhu, J., Tan, T., Shen, A., Yang, X., Yu, Y., Gao, C., Li, Z., Cheng, Y., Chen, J., Guo, L., Sun, X., Yan, Z., Li, J., & Zeng, L. (2020). Biocontrol potential of *Bacillus subtilis* IBFCBF-4 against *Fusarium* wilt of watermelon. *Journal of Plant Pathology*, 102(2), 433-441. <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00457-6>