



**ENSAYO BAJO CONDICIONES DE INVERNADERO DE UN PRODUCTO DE
Bacillus sp. EN PLANTAS DE TOMATE (*Solanum lycopersicum*)**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ D.C Octubre de 2018**



**ENSAYO BAJO CONDICIONES DE INVERNADERO DE UN PRODUCTO DE
Bacillus sp. EN PLANTAS DE TOMATE (*Solanum lycopersicum*)**

Presentado por:

CAROLINA STEFANNY VALENCIA ARTEAGA

LIGIA CONSUELO SÁNCHEZ, MSc

Asesora

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

TRABAJO DE GRADO

BOGOTÁ D.C Octubre de 2018

Agradecimientos

En el presente trabajo quiero manifestar mis más sinceros agradecimientos a:

La Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, en primer lugar, por brindarme las herramientas necesarias para forjarme como una profesional íntegra en la bacteriología, por permitirme vivir una de las mejores experiencias de vida en sus instalaciones y, sobre todo, por enseñarme que la vida es un viaje de constante aprendizaje y esto es solo el comienzo de grandes logros.

La profesora Ligia Consuelo Sánchez, por brindarme la confianza de trabajar a su lado, por tenerme tanta paciencia y enseñarme a nunca desfallecer en el proceso por más difícil que parezca o se tornen las situaciones. Gracias por el apoyo incondicional, por siempre tener una bella palabra y un oportuno consejo.

También quiero agradecer el apoyo constante de Estefanía Castañeda, egresada de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, también fue pilar fundamental para la culminación de este trabajo.

En últimas quisiera agradecer a todas y cada una de las personas que hicieron parte del proceso de formación en la Universidad, a los docentes por brindarme de la mejor manera su conocimiento en las áreas, a mis compañeros de estudio, a mis padres, hermanos y amigos que siempre me apoyaron a la realización de mis sueños, mil gracias.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

1. OBJETIVOS.....	12
1.1. OBJETIVO GENERAL.....	12
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
2. ANTECEDENTES.....	13
3. MARCO REFERENCIAL.....	18
3.1. Generalidades del tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>).....	18
3.2. Importancia del tomate.....	22
3.3. Plagas y enfermedades en el tomate.....	23
3.4. <i>Fusarium oxysporum</i>	24
3.5. Manejo de fitopatologías por control biológico.....	27
3.6. <i>Bacillus subtilis</i>	28
4. DISEÑO METODOLÓGICO.....	30
4.1. Universo, población, muestra.....	30
4.2. Hipótesis, variables, indicadores.....	30
4.3. Técnicas y procedimientos.....	31
FASE # 1: Verificación de la viabilidad de <i>Bacillus subtilis</i>.....	31
FASE # 2: Aislamiento de <i>Fusarium oxysporum</i> y pruebas de antagonismo.....	31
FASE # 3: Bioensayos bajo condiciones de invernadero.....	33
5. RESULTADOS.....	36
FASE # 1: Verificación de la viabilidad de <i>Bacillus subtilis</i>.....	36
FASE # 2: Aislamiento de <i>Fusarium oxysporum</i> y pruebas de antagonismo.....	37
FASE III: Bioensayos bajo condiciones de invernadero.....	39
6. DISCUSIÓN.....	52
7. CONCLUSIONES.....	55
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Descripción botánica de la planta de tomate.....	18
Figura 2. <i>Fusarium oxysporum</i>	25
Figura 3. Modelo de la prueba de antagonismo dual dos a dos.....	32
Figura 4. Aislamiento de <i>Bacillus subtilis</i> UCMC – TB2 en agar sangre.....	36
Figura 5. Aislamiento de <i>Fusarium oxysporum</i> en agar PDA.....	37
Figura 6. <i>Fusarium oxysporum</i> con azul de lactofenol al microscopio.....	38
Figura 7. Prueba de antagonismo <i>in vitro</i> agar PDA.....	39
Figura 8. Tratamiento T1 – control positivo a los 12 días después de la siembra.....	41
Figura 9. Tratamiento T2 a los 12 días de siembra.....	42
Figura 10. Plántula T4 a los 45 días de siembra.....	43
Figura 11. Plántula T1 a los 45 días de siembra.....	43
Figura 12. Plántula del tratamiento T3 a los 12 días después de la siembra....	45
Figura 13. Rizósfera de los testigos # 2 (A), # 3 (B), # 1 (C), # 4 (D).....	46
Gráfica 1. Lectura de la escala de severidad de las cuatro plantas de tomate del tratamiento # 1 – control positivo a los 45 días de sembradas.....	45
Gráfica 2. Lectura de la escala de severidad de las cuatro plantas de tomate del tratamiento # 2 –control negativo a los 45 días de sembradas.....	46
Gráfica 3. Lectura de la escala de severidad de las cuatro plantas de tomate del tratamiento # 3 a los 45 días de sembradas.....	46
Gráfica 4. Lectura de la escala de severidad de las cuatro plantas de tomate del tratamiento # 4 a los 45 días de sembradas.....	47
Gráfica 5. Lectura de la escala de severidad en las plantas de tomate de los 4 tratamientos a los 45 días de sembradas.....	47
Gráfica 6. Promedio de la longitud en cm por las plantas de cada tratamiento.....	48
Gráfica 7. Promedio de la longitud de las raíces en cm por las plantas de cada tratamiento.....	49
Gráfica 8. Promedio de la longitud de la filósfera en cm por las plantas de cada tratamiento.....	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos evaluados en el bioensayo.....	34
Tabla 2. Medidas iniciales en centímetros (cm) del largo total de la plántula (filósfera + rizósfera).....	40
Tabla 3. Medidas iniciales en centímetros (cm) del largo de la raíz.....	40
Tabla 4. Medidas iniciales en centímetros (cm) del largo de la filósfera.....	40
Tabla 5. Lectura de la escala de severidad a los 45 días de sembradas las plántulas de tomate bajo condiciones de invernadero.....	43
Tabla 6. Medidas al finalizar el bioensayo en centímetros (cm) del largo total de la planta (filósfera + rizósfera).....	48
Tabla 7. Medidas al finalizar el bioensayo en centímetros (cm) del largo de la raíz.....	48
Tabla 8. Medidas al finalizar el bioensayo en centímetros (cm) del largo de la filósfera.....	49



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

**ENSAYO BAJO CONDICIONES DE INVERNADERO DE UN PRODUCTO DE
Bacillus spp. EN PLANTAS DE TOMATE (*Solanum lycopersicum*)**

RESUMEN

La marchitez vascular es una fitopatología que afecta a millones de hectáreas de cultivo de tomate a nivel mundial cada año. Esta enfermedad causada por el hongo *Fusarium oxysporum* se ha convertido en el causante de enormes pérdidas económicas en el sector agrícola. Mediante este trabajo se pretende presentar una alternativa para el control de la enfermedad, por medio del uso de un producto de *Bacillus subtilis*. Se realizó un bioensayo bajo condiciones de invernadero durante 45 días con plántulas de tomate, para observar la actividad antagonista que *B. subtilis* tiene frente a *F. oxysporum*. Al finalizar el bioensayo se observó que efectivamente las plántulas que habían sido inoculadas con el hongo y el posible antagonista tuvo solo el 10% de afectación en el follaje a comparación de las plántulas que habían sido inoculadas con el hongo, las cuales se vieron afectadas en el follaje en un 50% – 70%. A partir de los

resultados obtenidos se puede concluir que la cepa de *Bacillus subtilis* UCMC – TB2 posee la capacidad antagónica frente a *F. oxysporum* tanto *in vitro* como *in vivo*, gracias a la producción de Iturina A, Fengicina y otros metabolitos con acción antibiótica. A través de este proyecto se pretende dar a conocer alternativas para el control de fitopatologías mediante el uso de microorganismos y sus metabolitos, los cuales generan una mínima cantidad de contaminación y no tienen efectos adversos sobre el cultivo ni son nocivos para el consumo humano.

PALABRAS CLAVE: *Bacillus subtilis*, *Fusarium oxysporum*, actividad antagónica, marchitez vascular.

Carolina Stefanny Valencia Arteaga

Ligia Consuelo Sánchez, Msc Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

INTRODUCCIÓN

La alta demanda de hortalizas como el tomate (*Solanum lycopersicum*) a nivel mundial y nacional ha incentivado la búsqueda de nuevas alternativas para implementar en las metodologías y tecnologías usadas actualmente con el fin de mejorar la producción en términos de costos y, así, garantizar la calidad del producto desde la siembra hasta la compra y consumo del fruto.

El tomate es una de las hortalizas de más cuidado para su cultivo, ya que debido a su fragilidad y susceptibilidad, se convierte en el blanco de diferentes plagas como pulgones, mosca blanca, orugas de mariposas, entre otros, que no solo se alimentan de la planta y su fruto, lo cual afecta la producción, sino que también, algunos de ellos son vectores de agentes patógenos como bacterias, hongos, virus o parásitos.

Debido a las grandes pérdidas económicas en los cultivos de tomate por causas fitopatológicas, el hombre en su necesidad de encontrar soluciones a dichos problemas, implementó el uso de pesticidas y plaguicidas de una manera indiscriminada, lo cual no solo afectó las propiedades naturales y calidad del suelo, sino también del fruto, además de un desequilibrio ambiental, lo que permitió el desarrollo de una resistencia inducida por parte de diferentes agentes patógenos, de los cuales hoy en día muchos son inmunes a un amplio espectro de agentes químicos para su control.

A través de los años, se ha demostrado científicamente la capacidad antagonista y de biocontrol por parte de algunas especies de microorganismos que permite controlar la reproducción y el crecimiento del agente patógeno. De esta manera, se disminuye su población en número y así su efecto devastador sobre la planta.

Esta metodología no solo se destaca por su acción de control sino también por las garantías que ofrece, pues reduce la contaminación ambiental sin alterar las propiedades químicas y biológicas de la planta, ni de su fruto.

Una de las enfermedades más comunes y agresivas en el tomate es la marchitez vascular, fitopatología causada por el hongo *Fusarium oxysporum*. Este microorganismo es protagonista en la agricultura debido a las elevadas pérdidas económicas ocasionadas en los cultivos de tomate a nivel mundial. Por esta razón, el objetivo de este trabajo es evaluar la actividad antagonista de un producto de *Bacillus subtilis* frente a *F. oxysporum in vivo* bajo condiciones de invernadero con el fin de implementar una nueva alternativa para el control de la marchitez vascular y así disminuir las pérdidas anuales generadas por esta fitopatología en cultivos de tomate.

En el presente trabajo se realizaron pruebas *in vitro* e *in vivo* en plantas de tomate bajo condiciones de invernadero, en las cuales se evaluó y confirmó la acción antagónica de la cepa de *B. subtilis* UCMC – TB2 frente a *F. oxysporum*. Obteniendo como resultados en las pruebas *in vivo* la evidencia del control que ejerce la cepa de *B. subtilis* UCMC – TB2 sobre el patógeno, ya que las plantas inoculadas con el patógeno y tratadas con el producto del *B. subtilis* presentaron solo el 10% de afectación en el área foliar, mientras que las plantas inoculadas solo con el hongo llegaron a presentar una afectación del 70% en el área foliar a los 45 días del estudio. Lo anterior permitió concluir que posiblemente hubo una acción antagónica de la cepa *B. subtilis* UCMC – TB2 frente a *F. oxysporum* mediada por metabolitos secundarios como la Iturina A y fengicinas.

1. OBJETIVOS

1.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antagonista de un producto de *Bacillus subtilis* frente a *Fusarium oxysporum in vivo* bajo condiciones de invernadero.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer la viabilidad del producto de *Bacillus subtilis in vitro*.
- Determinar la actividad antagonista del producto de *Bacillus subtilis in vitro*.
- Establecer la viabilidad del producto de *Bacillus subtilis in vivo*.

2. ANTECEDENTES

La marchitez vascular en el tomate ha generado a lo largo de la historia grandes pérdidas en el sector agrícola, disminuyendo hasta en un 60% su producción.¹ Debido a su alto impacto es que se han generado diversos estudios de esta enfermedad ayudando a dilucidar un poco más acerca del patógeno, su acción y posible control. A raíz de estos estudios se ha podido conocer un poco más sobre el problema a solucionar en este trabajo y con ello se ha permitido realizar el planteamiento de una estructura acorde y eficaz para el estudio. A continuación, se conocerá un poco más acerca de ellos.

En California, Estados Unidos, Cai G. et al., en 2003 realizaron un estudio para la identificación, caracterización de la patogenicidad, raza y grupo de compatibilidad vegetativa (VCG) de *Fusarium oxysporum* en una granja. Para su trabajo realizaron 39 aislamientos del patógeno, en plantas de tomate cultivadas al aire libre que presentaron los síntomas de marchitez vascular. De los 39 aislamientos, 22 eran VCG 0030, 11 eran VCG 0031, y 6 en el recién descrito para ese momento VCG 0035. También se encontró que de VCG 0030, 13 eran raza 3, y 9 eran raza 2, de VCG 0031 eran 7 de raza 2, 1 de la raza 1 y 3 eran no patógenos, de VCG 0035 todas eran raza 2. Dentro de sus estudios moleculares y resultados obtenidos sugirió que la raza 3 en California, se pudo haber desarrollado a partir de la raza 2.¹²

La raza 3 no tenía una amplia distribución geográfica, tal como lo describe el estudio realizado en Brasil por Reis A. et al., en 2005, el cual describe el primer reporte que hizo de esta raza en el país brasileño. Realizaron 7 aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en plantas que

presentaban la sintomatología característica de la marchitez vascular, seguido a esto, ellos realizaron pruebas de virulencia en las cuales utilizaron cultivares diferenciales, susceptibles a todas las razas (Ponderosa), resistente a la raza 1 (IPA-5), resistente a las razas 1 y 2 (Floradade), y por último uno resistente a la raza 3 (BHRS-2,3) aún no descrita en Brasil. Todos fueron altamente virulentos para Ponderosa, IPA-5 y Floradade y solo pudieron infectar unas pocas plantas con BHRS-2,3. Adicional realizaron un ensayo en *Lycopersicon pennellii*, obteniendo resultados que confirmaban la presencia de una nueva raza 3, encontrada en los 7 aislamientos realizados.¹³

Hacia el 2008 en Culiacán, Sinaloa, México, Asencio A. et al. realizaron un estudio de variabilidad genética de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Asencio A. et al., 2008) en el cual encontraron la presencia de las razas 1, 2 y 3. En el estudio se recolectaron 100 muestras de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) con síntomas de marchitez vascular, en las cuales se aisló el patógeno y se identificaron las razas. Realizaron la identificación de razas mediante cultivares diferenciales sin genes de resistencias (Bonny Best), resistentes a la raza 1 (Manapal), resistentes a la raza 2 (Walter) y resistentes a la raza 3 (I3R3). Resultados en los cuales se encontró que todos los genotipos utilizados eran susceptibles a la raza 1, 16 resistentes a la raza 2 y 4 resistentes a la raza 3.¹

Jaimes C, en el 2011 en Saltillo, México realizó un estudio basado en la actividad antagónica y el efecto como microorganismos promotores de crecimiento en plantas, de las cepas *Bacillus subtilis* y *Trichoderma asperellum* microencapsuladas para el control de dos fitopatógenos como

Fusarium oxysporum y *Rhizoctonia solani*. Realizó pruebas *in vitro* e *in vivo* en plantas de Chile, en las cuales manejó suspensiones a una concentración de 1×10^8 conidios/mL para los hongos y 1×10^8 UFC/mL en bacterias.³¹ En los resultados obtuvo que las microcapsulas de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma asperellum* aumentaron la concentración de clorofila en las plantas de Chile en comparación con el testigo de la planta sin inóculo, también observó el incremento en la longitud de las raíces y área foliar en todas las plantas que fueron tratadas con las microcapsulas.³¹

Diferentes estudios se han realizado a lo largo del tiempo y en distintos lugares, uno de ellos ha sido el que se hizo en Viovodina, al norte de Serbia, Ingjatov M. et al., en 2012, hizo una investigación que tuvo como objetivo determinar el causante de la marchitez en el tomate y la pudrición de la fruta. Para ello realizaron muestreo de plantas que presentaban síntomas característicos a la marchitez del tomate, como clorosis, hojas marchitas y secas, en diferentes localidades en la región de Viovodina. El aislamiento, determinación morfológica y pruebas de patogenicidad, el aislamiento se realizó en agar PDA, medio en el cual creció un hongo de micelio hialino, en cuanto a la observación microscópica encontraron macroconidias cortas, ovaladas con tres septas, características principales de *Fusarium* sp. Para las pruebas moleculares e identificación final realizaron una PCR, la cual convalidaron la presencia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en las plantas de tomate y también confirmaron así que este patógeno es el causal de la marchitez vascular en el tomate y pudrición del fruto.¹⁰

Enfermedades como la marchitez vascular en el tomate y otras plantas de importancia agrícola afectan indiscutiblemente la economía de un país, y más

cuando este depende en su mayoría por la producción en el campo. Colombia es uno de esos países que se ha visto afectado por la presencia del patógeno causal, es por eso que también se han adelantado diversas investigaciones acerca de esta problemática.

Castañeda E, en el 2015 en su tesis de maestría llamada “MICROENCAPSULACIÓN DEL *B. subtilis* POR GELIFICACIÓN IÓNICA COMO ALTERNATIVA PARA CONTROLAR EL *Fusarium sp.*” realizó la identificación fenotípica y molecular de la cepa *B. subtilis* UCMC – TB2, en la cual evidenció la presencia de los genes *ItuA* y *Sfp* encargados de la producción de metabolitos secundarios con acción antifúngica como la Iturina A y fengicina.²⁷ También realizó pruebas *in vitro* para la confirmación de la actividad antagonica de la cepa *B. subtilis* UCMC – TB2 microencapsulada en alginato de sodio y maltodextrina. En el estudio tuvo en cuenta variables como el pH, temperatura y el medio de cultivo para que el producto biológico de la cepa de *B. subtilis* estuviera en condiciones aptas para su adecuado desarrollo y producción de metabolitos secundarios con actividad antifúngica.²⁷ Demostró que la microencapsulación en alginato de sodio y maltodextrina fue la más adecuada para la protección de cepa en comparación de la microencapsulación con alginato de sodio o en conjunto con almidón.²⁷ Además también demostró un rendimiento en la acción antagonica frente a *Fusarium sp.* por parte de las cepas microencapsuladas.²⁷

Una de ellas se desarrolló en la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca (Castañeda E. et al., 2016) en la ciudad de Bogotá, en este caso se confirmó la capacidad antagonista de 4 especies del género *Bacillus spp.*, bacterias de

morfología bacilar, Gram positivas, anaerobias facultativas capaces de formar esporas, frente a *Fusarium* sp. mediante la producción de antibióticos que inhiben el crecimiento del hongo. Basados en los resultados obtenidos, pudieron considerar que esta fitopatología devastadora como lo es la marchitez del tomate se podría controlar por medio los metabolitos secundarios producidos por este género bacteriano y en futuros estudios llegar a la estandarización del método para su uso en el sector agrícola.⁴

3. MARCO REFERENCIAL

3.1. Generalidades del Tomate (*Solanum lycopersicum*)

Solanum lycopersicum planta de tomate más conocida por su fruto tomate, jitomate o tomatara, perteneciente a la familia de plantas Solanáceas, al igual que la papa, el ají, tabaco, entre otras.¹⁴ Es una planta herbácea perenne anual, de tallo semileñoso que se desarrolla de manera rastroso o erecta, dependiendo de su hábito de crecimiento, existen dos tipos de variedades de acuerdo a lo anteriormente mencionado, siendo las indeterminadas, aquellas plantas de crecimiento abundante, ilimitado y desordenado, en cambio las plantas de crecimiento determinado, son plantas arbustivas de poco crecimiento, limitado y contiene menor número de hojas.^{14,15,20}

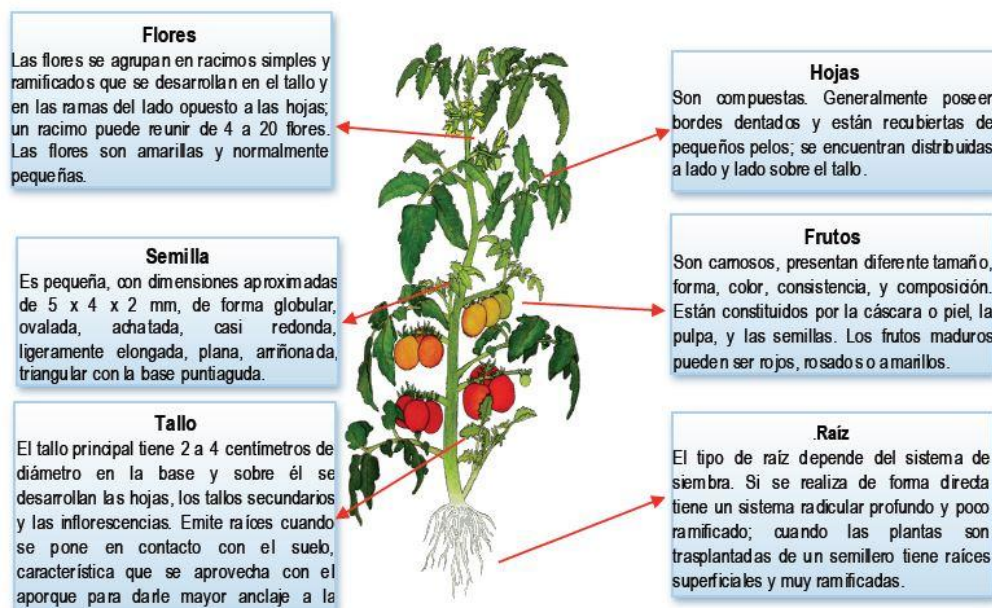


Fig 1. Descripción botánica de la planta de tomate. Fuente: Cámara de Comercio de Bogotá, 2015.¹⁴

Esta planta consta de un sistema radicular compuesto por una raíz principal de extensión corta pero ramificada en numerosas raíces secundarias, lo cual

le permite un mejor anclaje al suelo.^{15,14} La parte externa de la raíz llamada la epidermis, cuenta con la presencia de “pelos absorbentes” encargados de recoger los nutrientes del suelo e ingresarlos a la planta para su posterior paso al xilema.¹⁵

El tallo principal es de color verde, semileñoso, su grosor va de 2 a 4 cm, es veloso, está conformado en la parte externa por la epidermis y “pelos glandulares”, hacia la parte interna cuenta con la corteza, el xilema y tejido medular. El tallo es una continuación de la raíz, a partir de él se desarrollan los tallos secundarios, las hojas, flores y frutos.¹⁴ En la parte superior de la planta donde se están generando las nuevas hojas, el tallo suele ser más delgado.¹⁵

Las hojas son compuestas imparipinnadas, es decir que tienen laminares que poseen folíolos más o menos numerosos y que se ubican de manera apuesto o alterna al raquis, y siempre finalizan con un folíolo, lo cual hace que sea impares.¹⁵ La cantidad de hojas dependerá del tipo de variedad de acuerdo al hábito de crecimiento. Los folíolos son peciolados, lobulados con borde dentado, también se encuentran rodeadas de “pelos glandulares”.^{14,15,20}

Las flores son perfectas, cuenta con órgano reproductor masculino y femenino, son amarillas pequeñas, se agrupan en racimos de 4 a 20 flores por cada uno. La primera flor se desarrolla en la yema apical y las demás flores se ubican lateralmente por debajo de la primera flor.^{14,15}

Por último, el fruto consta de una epidermis, semillas, columela y tejido placentario, su composición química es de un 94 – 95 % de agua y el porcentaje restante es una mezcla de vitaminas como A, B1, B2, B6, C y E y

de minerales como fósforo, potasio, magnesio, manganeso, zinc, cobre, sodio, hierro y calcio. El tomate, es un fruto que puede ser de diferente tamaño, forma, peso, color y consistencia, dependiendo de la variedad de la planta. Generalmente son ovalados de color rojo cuando ya se encuentran maduros.^{14,15,20}

Dominio: Plantae

Subreino: Tracheobionta

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Orden: *Solanales*

Familia: *Solanaceas*

Género: *Solanum*

Especie: *Solanum lycopersicum*⁶

El ciclo del cultivo se encuentra determinado por la variedad y condiciones climáticas de la zona, además de la disposición de los recursos necesarios para su desarrollo.¹⁹ Diferentes etapas se presentan a lo largo del ciclo, iniciando por el brote de la semilla, pasando por la diferenciación del crecimiento que realiza la planta según su variedad, en determinado (crecimiento limitado) o indeterminado (crecimiento vegetativo continuo) hasta la producción de la cosecha.^{14,19}

El cultivo de tomata a lo largo de su crecimiento presenta diferentes etapas en su desarrollo. Cabe resaltar que cada etapa y tiempo, requerimiento de nutrientes y manejo del cultivo difieren de la variedad del cultivo y la zona en la que se encuentra cultivado.¹⁴

El desarrollo de la planta inicia con la germinación de las semillas, más o menos de 4 a 7 días después de sembrada. La germinación se da a partir de la formación de la raíz principal y la parte aérea de la planta. Seguido de la

germinación pasa a una etapa de crecimiento vegetativo, etapa en la cual la planta crece de manera rápida hasta los 70 días, produciendo flores y los primeros frutos. El fruto empieza a desarrollarse acumulando la mayor cantidad de materia seca posible, pasando después a la maduración la cual se logra a los 80 – 120 días después del transplante.¹⁴

El cultivo del tomate se puede dar al aire libre o también bajo condiciones de invernadero, siendo este último una de las mejores opciones para su siembra, gracias a las condiciones de seguridad y calidad que le brinda al cultivo. El invernadero es una estructura que consta de paredes y techo de material transparente, ya sea vidrio o de plástico (polietileno, material más usado para su construcción), que le garantiza al cultivo un ambiente controlado de temperatura y humedad, además de brindarle una protección fitosanitaria de focos de contaminación externa.^{15,19}

Su crecimiento óptimo se encuentra entre temperaturas de los 15 °C y 25 °C¹⁴, tolerando como máxima temperatura los 32 °C, ya que si se supera este valor la planta puede llegar a sufrir desordenes fisiológicos, deteniendo así la floración y producción del fruto; o por el contrario si la temperatura disminuye de manera significativa el cultivo se verá afectado por las heladas, ya que es susceptible a estos fenómenos y no resiste tales temperaturas en ninguna de las etapas de su crecimiento y desarrollo.^{14,18}

Los suelos ideales para su producción son aquellos entre una mezcla de limo, arena y arcilla, generalmente suelos aireados y con una porosidad que le permita el movimiento y retención del agua, además de favorecer el desarrollo del sistema radicular adecuadamente.^{14,18}

3.2. Importancia del tomate

El tomate es una hortaliza de importancia en la economía de la agricultura a nivel mundial, debido al incremento de su demanda y por ende el aumento en su producción, distribución y comercialización en el mercado global.²⁰ Gracias a las características de adaptación y desarrollo de la planta, se ha implementado el cultivo de tomate para el consumo fresco como para la industria en más de cien países, cada uno de ellos con una amplia variedad climática y de suelos.^{14,20}

En datos reportados por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), en 2013 se registró que el 62,0% de la producción total de tomate en el mundo se concentró en 5 países, donde China ocupó el primer lugar con el 30,9% de producción (50.000.000 ton), en segundo lugar India con el 11,2%(17.500.000 ton), en el tercer lugar Estados Unidos con el 7,7% (13.350.000 ton), Turquía en el cuarto lugar con 7,2% (11.350.000 ton) y en quinto lugar Egipto con 5,2% (8.625.219 ton) de producción mundial.²¹ Las estadísticas registradas por la FAO durante el 2003 y 2013 indicó que, China tuvo un crecimiento en la tasa promedio anual de producción de 5,8% y el país de la India, obtuvo un aumento en su tasa promedio anual de 9,1%.²¹

En Colombia, gracias a la diversidad de suelos y climas, se produce tomate casi en todos los departamentos, aun así el departamento con mayor producción de tomate a nivel nacional, según el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural es Norte de Santander, siendo el responsable del 29% del total de la producción nacional con 118.281 ton para el 2014 y en último lugar el departamento de Bolívar con 5 toneladas en el mismo año.^{14,25}

En las cifras de comercio exterior dadas por el DANE, indicó que en el 2013 hubo exportaciones de tomate desde Colombia por valor de 298.565 dólares, ocupando Cundinamarca el primer lugar con una participación del 52,8%, en segundo lugar Atlántico con el 37,9%, Bogotá en tercer lugar con el 6,3%, en cuarto lugar Santander con el 2,3% y como quinto lugar Risaralda con un 0,8% del total exportado.¹⁴

En las cifras reportadas por el DANE en el año 2017 en Colombia el tomate ocupó el segundo puesto de producción después de la papa con 382.609 toneladas cultivadas.³²

Además de ser importante en la economía por su alta demanda y comercialización, el tomate, también es el centro de atención debido al alto índice de susceptibilidad a enfermedades a lo largo de su crecimiento y desarrollo.¹ Existen diversas fitopatologías que afectan el cultivo, algunas transmitidas por vectores, otras adquiridas por medio del ambiente, además de las adquiridas por el mal manejo fitosanitario en los cultivos.¹⁴

3.3. Plagas y enfermedades en el tomate

El tomate además de ser importante en la economía por su alta demanda y comercialización, también es el centro de atención debido al alto índice de susceptibilidad a enfermedades a lo largo de su crecimiento y desarrollo.¹ Existen diversas fitopatologías que afectan el cultivo, algunas transmitidas por vectores, otras adquiridas por medio del ambiente, además de las adquiridas por el mal manejo fitosanitario en los cultivos.¹⁴

El control de plagas en los cultivos es un factor importante para garantizar la calidad del tomate, por lo tanto es de vital importancia el manejo y control

adecuado frente a las diferentes plagas como, áfidos (*Aphis* sp.), gusano cogollero (*Spodoptera* sp.), ácaros (*Polyphagotarsonemus latus*), minador (*Liriomyza trifolii*), entre otras.^{14,19}

3.4. *Fusarium oxysporum*

Los hongos del género *Fusarium* se encuentran ampliamente distribuidos a nivel mundial. La mayoría de las especies de este género se hallan como microorganismo saprofitos en el suelo, agua y aire.^{7,9} En la literatura científica se conocen más de 78 especies de este género y más de 120 *formae spacialis* y razas, muchas de ellas se consideran problema para la economía agrícola debido a la agresividad de colonización en los cultivos.^{7,9,33} También existen algunas especies capaces de infectar a humano y animales, en el caso de las fusariosis en humanos se han presentado en pacientes inmunocomprometidos.³⁵

Dominio: Fungi

Subreino: Dikarya

Filo: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Nectriaceae

Género: *Fusarium*

Especie: *Fusarium oxysporum* species complex³⁵

Las especies del género *Fusarium* son de crecimiento rápido y se caracterizan por la producción de tres tipos de esporas (macroconidias, microconidias y clamidiosporas).⁷ Las macroconidias son las más conocidas por su forma particular, son esporas hialinas de pared delgada, fusiformes, curvas, con septos de 3 a 5 transversalmente.⁷ Las microconidias son

esporas pequeñas, unicelulares, hialinas sin septos, de forma cilíndrica.⁹ Las clamidiosporas son quizás las esporas más importantes para el hongo, gracias a su resistencia a condiciones hostiles; presentan pared gruesa la cual le confiere tal resistencia hasta encontrar un ambiente favorable para el desarrollo del hongo.^{7,9,33}

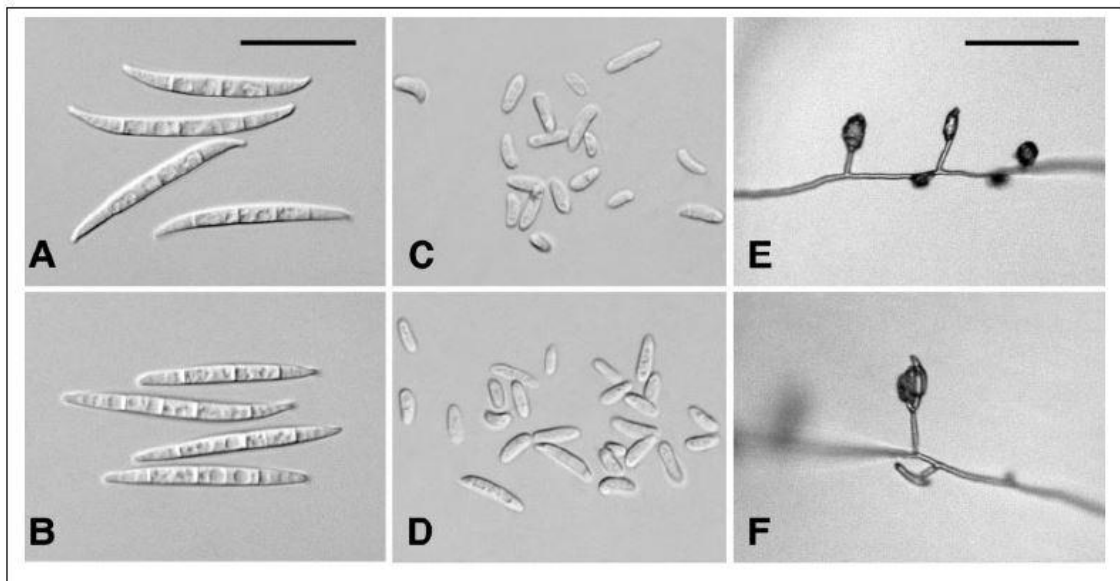


Fig 2. *Fusarium oxysporum*.

A – B: Macroconidia; **C – D:** Microconidia; **E – F:** Microconidia *in situ* on CLA. **A – D, scale bar = 25 μ m; E – F, scale bar = 50 μ m.** Fuente: Guarro J, 2012.³⁵

F. oxysporum tiene una distribución cosmopolita y son de gran importancia para el sector agrícola y el sector económico, debido a su impacto negativo sobre los diferentes cultivos. En la literatura se han reportado un gran número de plantas que se ven afectadas por la presencia de este hongo como lo es la papa, el tomate, el apio, la cebolla, el melón, entre otros ocasionando marchitez vascular, pudrición de la raíz, pudrición de frutos, granos y semillas.^{3,7}

En las plantas de tomate el hongo *F. oxysporum* es el agente causal de la fitopatología de la marchitez vascular, esta enfermedad se ha reportado en

más de 32 países con diferentes climas y condiciones ambientales.¹ La marchitez vascular se caracteriza por la clorosis de las hojas, generado por el bloqueo del paso de nutrientes de las raíces hacia toda la planta, debido a la presencia de una red densa de micelio en el tallo y raíces.⁷ También se observan síntomas como la pérdida prematura de las hojas como resultado de la necrosis del tejido vegetal, retraso en el crecimiento de la planta, entorchamiento de las hojas bajas, oscurecimiento del tallo y los sistemas de las raíces se ven atrofiados.^{1,7}

El ingreso del fitopatógeno principalmente se da por la raíz a partir de una herida, seguido al ingreso coloniza el tallo rápidamente atrofiando el sistema vascular de la planta.³ Se genera una distribución secundaria hacia la parte superior del tallo por medio de los haces vasculares, bloqueando el paso de nutrientes.³

La planta en respuesta a la colonización por el hongo, desencadena una serie de reacciones inmunológicas para el control del fitopatógeno. Un ejemplo de la respuesta por parte de la planta es la producción de geles de tilosa, encargados de impedir la distribución del hongo en su totalidad de la planta.³⁷

El hongo inicia la síntesis de enzimas pectolíticas que degradan los geles de tilosa, permitiendo así la diseminación de *F. oxysporum* a toda la planta.^{1,3,7}

En 1999, Olivain y Alabouvette realizaron un estudio con cepas de *F. oxysporum* transformadas con el gen *GUS* (glucoronidasa) para la identificación del tiempo que tardaba en el colonizar y producir los síntomas de marchitez vascular en la planta de tomate.³⁷ En el estudio se encontró que a los 15 días después del ingreso del patógeno al sistema vascular de la

planta él se extiende en su totalidad, llegando a invadir hasta los frutos dañando así el cultivo.⁷

3.5. Manejo de fitopatologías por control biológico

Control biológico o biocontrol, se define como la reducción de la densidad poblacional de un patógeno o de las actividades productoras de enfermedades generadas por él, en su estado activo o latente, mediante el uso de un organismo o de sus metabolitos, que ejerzan un control de manera natural.²⁷

A través de los años se ha observado el aumento del uso de agroquímicos para el manejo de plagas y control de enfermedades que afectan los cultivos; pero su uso indiscriminado ha desencadenado innumerables problemas.⁴ Algunos de los inconvenientes que se han desatado ha sido el aumento de la contaminación, afectando el equilibrio ecológico por la producción de residuos químicos al ambiente, la contaminación de aguas, principalmente fuentes hídricas cercanas a los lugares en donde se usa.^{4,6,27} Además de lo mencionado anteriormente, también el uso de sustancias químicas ha generado la presencia de resistencia inducida por especies de patógenos, reportándose en diferentes estudios como microorganismos tolerables a estas sustancias.^{1,6}

A raíz de la problemática mencionada, la comunidad científica ha buscado nuevas alternativas para el manejo adecuado de las plagas y enfermedades.¹ Es ahí cuando se habla de control biológico, ya que este método genera una cantidad mínima de residuos a comparación de los agroquímicos,

generalmente no se acumulan en la cadena alimenticia, lo cual disminuye el riesgo de contaminación, su acción es a largo plazo.²⁷

En la literatura científica se han reportado microorganismos con actividad de control frente fitopatógenos, algunas de estas especies estudiadas son bacterias del género *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp.⁶ También se han reportado hongos como *Trichoderma* spp., *Paecilomyces lilanaceus* que poseen actividad antagónica frente a patógenos de cultivos.³⁸

3.6. *Bacillus subtilis*

El género *Bacillus*, pertenece a la familia *Bacillaceae*, son bacterias en forma de bastón alargadas, Gram positivas, formadoras de endosporas con morfología oval, la cual les permite resistir a condiciones ambientales extremas e irradiaciones y se encuentran ampliamente distribuidas en el suelo.^{4,27,28} Este género bacteriano ha sido estudiado durante décadas, debido a la producción de más de dos docenas de antibióticos, siendo la Iturina A el más conocido.²⁸ Las especies más conocidas de este género son *B. cereus*, *B. brevis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* y *B. subtilis*.^{4,27,28}

Dominio: Bacteria

Filo: Bacili

Clase: Bacillale

Orden: Bacillales

Familia: Bacillaceae

Género: *Bacillus*

Especie: *Bacillus subtilis*³⁶

Bacillus subtilis, es quizás la especie más conocida y estudiada desde hace 50 años, ya que además de ser productora de antifúngicos también se considera una bacteria promotora de crecimiento.^{4,28} En la literatura científica no se ha reportado daños o efectos nocivos sobre el ser humano, animales, plantas, lo cual hace que se pueda usar en la agricultura como agente de control.^{4,27}

Se ha reportado que entre el 4 – 5% del genoma de *B. subtilis* codifica para la producción de sustancias con actividad antifúngica, pertenecientes a las familias de las iturinas, fengicinas y surfactinas.²⁷ Se ha demostrado de manera *in vitro* que *B. subtilis* presenta acción de control frente a más de 23 especies de microorganismos fitopatógenos.³⁹ El control que ejerce sobre ciertos patógenos se da a partir de la competencia por la absorción de los nutrientes disponibles en la rizósfera de la planta huésped, lo cual induce la producción y secreción de metabolitos secundarios con actividad antibiótica, que inhiben el crecimiento de bacterias, oomicetos y hongos fitopatógenos.³⁹

4. DISEÑO METODOLÓGICO

4.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN

Esta investigación es de tipo cuantitativo descriptivo.

Universo: Microorganismos biocontroladores

Población: Bacterias del género *Bacillus*

Muestra: *Bacillus subtilis* UCMC – TB2 con actividad antagónica frente a *Fusarium oxysporum*.

4.2. Hipótesis: El uso de un producto de *Bacillus subtilis* en las plantas de tomate evita el desarrollo de la marchitez vascular, enfermedad generada por *Fusarium oxysporum*.

Variables:

- **Dependientes:** Concentración de los inóculos, efecto antagónico de la cepa *B. subtilis* UCMC – TB2 frente a *F. oxysporum* *in vitro* e *in vivo*,
- **Independientes:** Temperatura, humedad, tiempo de colonización e infección por el patógeno, número de días del estudio

Indicadores:

Número de plántulas afectadas por la marchitez vascular, presencia de signos y síntomas de la enfermedad marchitez vascular en las plántulas, efectividad de la acción antagónica de *Bacillus subtilis* frente a *Fusarium oxysporum*.

4.3. TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS

El ensayo se realizó mediante 3 fases, en las cuales se preservó siempre la viabilidad y calidad de las muestras utilizadas durante el proceso para la obtención de los resultados esperados.

FASE # 1: Verificación de la viabilidad de *B. subtilis*

Se realizó la recuperación de congelación (- 80 °C) de la cepa de *B. subtilis* UCMC – TB2 en caldo BHI, el cual se incubó a 37°C por 24 horas. Pasadas las 24 horas de incubación se realizó la siembra en Agar Sangre a partir del crecimiento en el caldo, y se incubó a 37°C por 24 horas. Posteriormente, se realizó la identificación fenotípica para su confirmación, por medio de métodos convencionales basados en las características observables como su morfología microscópica y de las colonias, y la prueba de catalasa

En estudios anteriores, Castañeda E. en el 2015 caracterizó molecularmente la cepa de *B. Subtilis* UCMC – TB2. Trabajo donde realizó la extracción de DNA, amplificación de la región completa de 16s rDNA, secuenciación y finalmente un análisis de alineamientos de secuencias por BLAST. Además de la amplificación de la región 16s rDNA, se realizó la amplificación por PCR de los genes codificantes para la producción de la Iturina como *ItuA* y *Sfp*.²⁷

FASE # 2: Aislamiento de *Fusarium oxysporum* y pruebas de antagonismo

A partir de plantas adultas de tomate del Centro de Biosistemas de la Universidad Jorge Tadeo Lozano que presentaron síntomas de marchitez vascular como clorosis, marchitamiento y entorchamiento en las hojas, tallos de color marrón oscuro, se tomaron muestras vegetales para el aislamiento

del patógeno. Mediante los postulados de Koch se confirmó la presencia de *Fusarium* sp. como patógeno en las plantas analizadas.

Se aisló el patógeno en agar PDA y Agar Extracto de Malta, para la observación de las macroconidias se incubó a 25°C por 8 días. Seguido al aislamiento, se realizó la identificación fenotípica por medio de claves taxonómicas.

Posteriormente, se realizaron pruebas de antagonismo dual dos a dos en medio PDA, por siembra masiva (*B. subtilis* UCMC – TB2) y por siembra micológica el hongo (*Fusarium oxysporum*) como se muestra en la Figura 3.

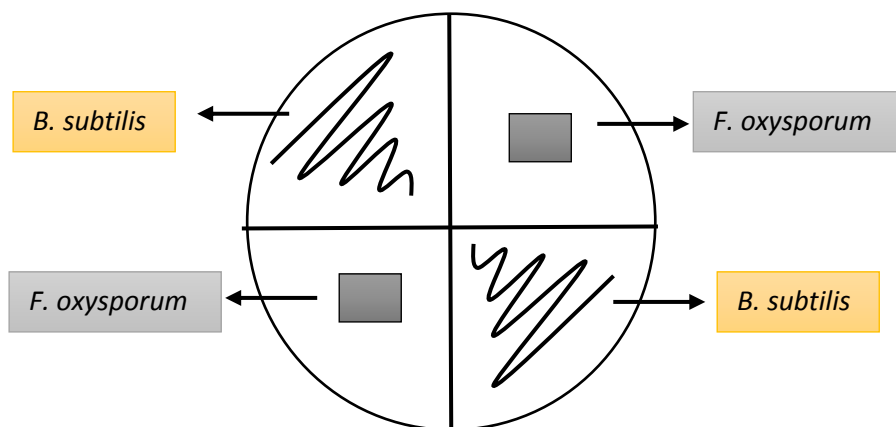


Fig 3. Modelo de la prueba de antagonismo dual dos a dos. Fuente: autor.

Los resultados se interpretaron de acuerdo al diámetro en centímetros del crecimiento del hongo en medio PDA (control) y la medida del diámetro del hongo en el enfrentamiento dual con *B. subtilis*. Las cajas se incubaron a 37 °C durante 8 días.

FASE # 3: Bioensayos bajo condiciones de invernadero

- 1. Inóculo del patógeno *F. oxysporum* (1×10^8 conidios/mL):** se adicionaron 10 mL de solución salina al 0.85% en el medio de cultivo

(PDA) donde se encontraba sembrado *F. oxysporum*, se mezcló hasta homogenizar la solución. Posteriormente, se filtró la mezcla con ayuda de una gasa estéril, seguido del recuento de conidios en cámara de Neubauer para el ajuste a la concentración deseada. A partir de la solución inicial se realizaron diluciones hasta conseguir una concentración de 1×10^8 conidios/mL. Se utilizó esta dilución, ya que en la literatura se reporta como la óptima para estos estudios.³¹

2. Producto del antagonista *B. subtilis* (1×10^8 UFC/mL): se realizó la siembra de la cepa *B. subtilis* UCMC – TB2 en caldo enriquecido con peptona, maltosa, sales, L - Asparagina y L – Ácido Glutámico. Se incubó a 37 °C durante 24 horas. Pasadas las 24 horas se realizó la microencapsulación de la cepa *B. subtilis* UCMC – TB2, debido a la reglamentación de patentes no se explicó en el documento el proceso de microencapsulación para la elaboración del producto.

3. Preparación de los controles y tratamientos

Posterior a la preparación de los microencapsulados y la suspensión del hongo se procedió a la infección y siembra de las plántulas en las bolsas para el estudio. En el ensayo se utilizaron plántulas de tomate chonto sensibles a la fusariosis, fueron compradas en el Centro de Biosistemas de la Universidad Jorge Tadeo Lozano a los 15-20 días de crecimiento. En el ensayo se manejaron 4 tratamientos (T1, T2, T3 y T4) y 4 réplicas por cada tratamiento. Para la inoculación de las suspensiones se realizaron heridas con un bisturí en el tallo, en las raíces primarias y secundarias de cada plántula.

Tabla 1. Controles y tratamientos evaluados en el bioensayo

	Número de plantas utilizadas por cada control y tratamiento	Contenido de cada tratamiento
T 1 – Control positivo	4	Plántula + suspensión de <i>F. oxysporum</i>
T 2 – control negativo	4	Plántula sin inóculo
T 3	4	Plántula + microencapsulados de <i>B. subtilis</i>
T 4	4	Plántula + suspensión de <i>F. oxysporum</i> + microencapsulados de <i>B. subtilis</i>

- **T 1 - Control positivo:** se sumergieron las plántulas previamente con heridas en la raíz y follaje, en la suspensión del patógeno *Fusarium oxysporum* con una concentración de 1×10^8 conidios/mL durante 15 minutos
- **T 2 – Control negativo:** para la preparación del control negativo se sumergieron las plántulas por 15 minutos en agua destilada estéril.
- **T 3:** Al momento de la siembra en las bolsas se les agregó 10 mg de los microencapsulados con una concentración del *B. subtilis* de 1×10^8 UFC/mL en las raíces.
- **T 4:** se sumergieron las plántulas de tomate en la suspensión del patógeno *Fusarium oxysporum* con una concentración de 1×10^8 conidios/mL durante 15 minutos. En el momento de la siembra en las bolsas se agregaron 10 mg de los microencapsulados con una concentración del *B. subtilis* de 1×10^8 en la raíz.

Después de la inoculación a cada una de las muestras del estudio, se procedió a la siembra de las plántulas en bolsas negras. El suelo utilizado en el estudio fue proporcionado por la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, el cual no se esterilizó, ni se le agregó fertilizantes, ni ningún tratamiento adicional, ya que se buscó realizar el estudio lo más parecido posible a los cultivos de tomate tradicionales bajo condiciones de invernadero.

Las plantas se ubicaron en el invernadero de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca durante 45 días, a las cuales se les agregó agua del grifo diariamente hasta humedecer el suelo en su totalidad en cada bolsa sin inundarla. En el estudio no se controlaron las variables de temperatura ni humedad.

Los datos se recopilaron y tabularon de acuerdo al porcentaje en la escala de severidad propuesta por el CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical).

0%	Planta sana
10%	No más del 10% del follaje se encuentra clorótico y/o marchito
25%	Hojas cloróticas y/o marchitas
50-70%	Hojas cloróticas y/o marchitas
100%	Planta muerta o afectada de manera severa. Presenta la mayor parte de su follaje clorótico, marchito y necróticas, además de presentar defoliación prematura

5. RESULTADOS

FASE # 1: Verificación de la viabilidad de *Bacillus subtilis* UCMC – TB2

En el caldo BHI se evidenció un óptimo crecimiento, ya que a las 24 horas después de la siembra se encontraba totalmente turbio. El aislamiento en Agar Sangre para *Bacillus subtilis* UCMC – TB2 permitió evidenciar las características macroscópicas propias de esta especie, como colonias rugosas con beta hemolisis y sus bordes extendidos sobre el medio. En la tinción de Gram se observaron bacilos Gram positivos largos con bordes redondeados.



Fig 4. Aislamiento de *Bacillus subtilis* UCMC – TB2 en agar sangre.

Fuente: Autor.

A partir de los estudios realizados por Castañeda E. en el 2015 de la secuenciación completa de la región 16s rDNA mediante los análisis por BLAST se encontró relación del 99% con *B. subtilis* ATCC 19217 (CP009749 GenBank), 99% con *B. subtilis* IHB B 7030 (KJ721204 GenBank) y 99% con *B. subtilis* Bs.916 (CP009611 GenBank) y una

homología del 100% con las cepas anteriormente nombradas.²⁷ En cuanto a la amplificación de los genes *ItuA* y *Sfp*, en la electroforesis se revelaron productos de PCR de 577pb y 268 pb, lo cual corresponde al tamaño esperado para los productos de amplificación de los genes *ItuA* y *Sfp* respectivamente.²⁷

FASE # 2: Aislamiento de *Fusarium oxysporum* y pruebas de antagonismo

A partir de las muestras vegetales de plantas adultas de tomate con presencia de los síntomas de marchitez vascular, recogidas en el Centro de Biosistemas de la Universidad Jorge Tadeo Lozano, se obtuvo el aislamiento de *Fusarium oxysporum*. A los 8 días de ser sembrado se observaron colonias con micelio aéreo, algodonoso, abundante de color blanco a púrpura.

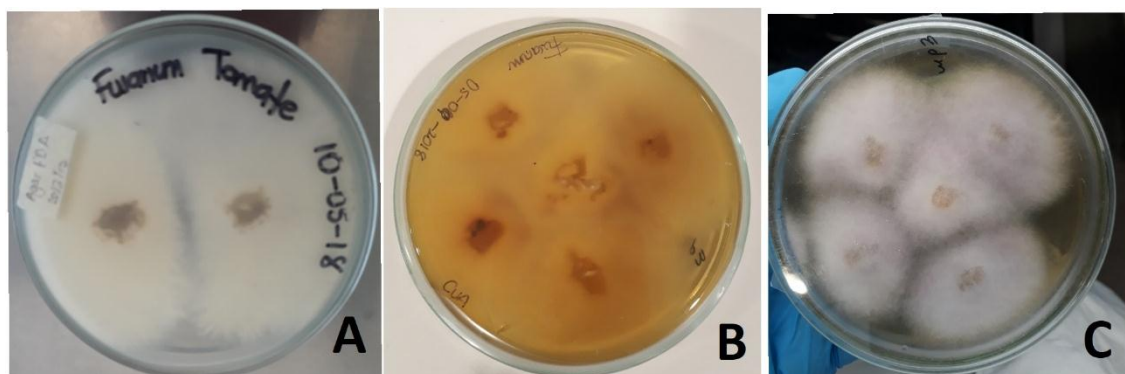


Fig 5. A) Aislamiento de *Fusarium oxysporum* en agar PDA. **B) y C)** Aislamiento de *Fusarium oxysporum* en agar Extracto de Malta. Fuente: Autor.

En las características micromorfológicas se observaron hifas delgadas hialinas septadas, con presencia de microconidias ovaladas pequeñas sin septos y macroconidias fusiformes con presencia de 3 a 5 septos (Fig 4.).

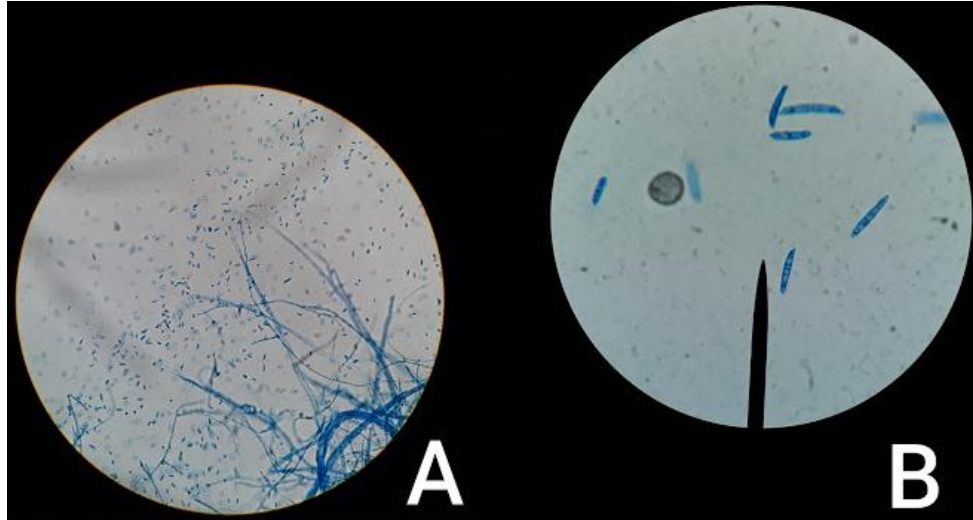


Fig 6. *Fusarium oxysporum* con azul de lactofenol al microscopio **A)** Microconidias, hifas delgadas hialinas observadas a 40x. **B)** Macroconidias fusiformes con 3 – 5 septos observadas al 100x. Fuente: Autor.

En las pruebas de antagonismo *in vitro* en medio PDA se observó la disminución del crecimiento del hongo por la presencia del *B. subtilis* donde el diámetro de crecimiento fue de 4cm y 4,2cm. En comparación con el control del hongo que se sembró en PDA y se incubó durante 8 días a 37 °C, al igual que las pruebas de antagonismo *in vitro*, el cual tuvo un diámetro de crecimiento de 9 cm y 9,5 cm lo cual permitió evidenciar que efectivamente la cepa de *B. subtilis* UCMC – TB2 ejerce una acción antagónica *in vitro* frente a *F. oxysporum* disminuyendo su crecimiento más del 50% tal como se observa en la Figura 7.

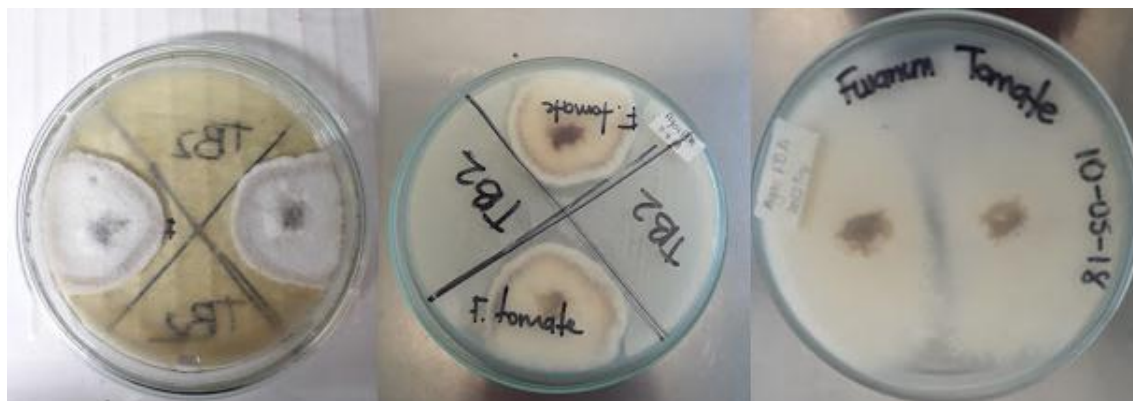


Fig 7. Prueba de antagonismo *in vitro* en medio PDA a los 8 días de incubación. Fuente: Autor.

FASE # 3: Bioensayo bajo condiciones de invernadero

En las instalaciones de los laboratorios de la Universidad Colegio Mayor se llevó a cabo el proceso de la preparación de la suspensión para el ensayo y su posterior inoculación. Se utilizó una concentración de 1×10^8 conidios/mL de *Fusarium oxysporum* y 1×10^8 UFC/mL de *Bacillus subtilis*. Inicialmente, se tabularon los datos sobre las medidas de las plantas (Tabla 1, Tabla 2 y Tabla 3). Luego de la preparación de los inóculos, se procedió a la infección de las plántulas de tomate y su siembra en bolsas con suelo se tomaron datos semanalmente de las observaciones en una tabla.

Tabla 2. Medidas iniciales en centímetros (cm) del largo total de la plántula (filósfera + rizósfera).

Tratamiento #1	Largo de la plántula (cm)	Tratamiento #2	Largo de la plántula (cm)	Tratamiento #3	Largo de la plántula (cm)	Tratamiento #4	Largo de la plántula (cm)
Plántula 1	14.5	Plántula 1	14.4	Plántula 1	14.4	Plántula 1	15.0
Plántula 2	14.6	Plántula 2	14.3	Plántula 2	14.5	Plántula 2	14.5
Plántula 3	14.6	Plántula 3	14.3	Plántula 3	14.4	Plántula 3	14.4
Plántula 4	14.5	Plántula 4	14.5	Plántula 4	14.4	Plántula 4	14.5
Promedio	14.55	Promedio	14.37	Promedio	14.42	Promedio	14.6

Tabla 3. Medidas iniciales en centímetros (cm) del largo de la raíz

Tratamiento #1	Largo de la raíz (cm)	Tratamiento #2	Largo de la raíz (cm)	Tratamiento #3	Largo de la raíz (cm)	Tratamiento #4	Largo de la raíz (cm)
Plántula 1	5.0	Plántula 1	5.0	Plántula 1	4.8	Plántula 1	5.0
Plántula 2	4.9	Plántula 2	4.8	Plántula 2	4.9	Plántula 2	5.2
Plántula 3	5.1	Plántula 3	5.0	Plántula 3	5.0	Plántula 3	5.2
Plántula 4	5.1	Plántula 4	5.0	Plántula 4	5.0	Plántula 4	5.1
Promedio	5.02	Promedio	4.95	Promedio	4.9	Promedio	5.12

Tabla 4. Medidas iniciales en centímetros (cm) del largo de la filósfera

Tratamiento #1	Largo de la filósfera (cm)	Tratamiento #2	Largo de la filósfera (cm)	Tratamiento #3	Largo de la filósfera (cm)	Tratamiento #4	Largo de la filósfera (cm)
Plántula 1	9.5	Plántula 1	9.4	Plántula 1	9.6	Plántula 1	10.0
Plántula 2	9.7	Plántula 2	9.5	Plántula 2	9.6	Plántula 2	9.3
Plántula 3	9.5	Plántula 3	9.3	Plántula 3	9.4	Plántula 3	9.2
Plántula 4	9.4	Plántula 4	9.5	Plántula 4	9.4	Plántula 4	9.4
Promedio	9.52	Promedio	9.42	Promedio	9.5	Promedio	9.47

Pasados cinco días después de la siembra, se observaron los primeros síntomas de marchitez vascular en las plántulas del tratamiento T1-Control positivo, como la presencia de clorosis en las hojas bajas de la planta.³ A los 12 días de la siembra, se observa el encrespamiento de las

hojas cloróticas (Ver fig 8), síntoma característico de la fitopatología marchitez vascular.³



Fig 8. Tratamiento 1 – Control positivo a los 12 días después de la siembra. Fuente: Autor.

Una de las plántulas del T2 – Control negativo a los 12 días presentó clorosis en dos hojas bajas (Ver fig 9.) mientras las otras tres plántulas presentaron los signos de clorosis a los 20 días.



Fig 9. Plántula T 2 – Control negativo a los 12 días de siembra. Fuente: Autor.

Pasados los 45 días de la siembra se observó una buena respuesta por parte del T4 en el cual se evidenció la acción antagónica por parte de la cepa de *B. subtilis* UCMC – TB2 microencapsulada frente a *F. oxysporum*. Las plántulas del T4 presentaron solo una afección del 10% en la escala del CIAT, lo que indicó que menos del 10% del área foliar de la planta manifestó clorosis (Ver fig 10). Mientras que las plántulas del T1 – Control positivo sí manifestaron clorosis y marchitamiento en el 70% de su follaje (Ver fig 11).



Fig 10. Plántula T4 a los 45 días de la siembra. Fuente: Autor.



Fig 11. Plántula T1 – control positivo a los 45 días de la siembra. Fuente: Autor.

Los resultados finales del bioensayo se recopilaron en una tabla con sus respectivas gráficas para su mejor comprensión.

Tabla 5. Lectura de la escala de severidad a los 45 días de sembradas las plántulas de tomate bajo condiciones de invernadero

Tratamiento #1	Escala de severidad	Tratamiento #2	Escala de severidad	Tratamiento #3	Escala de severidad	Tratamiento #4	Escala de severidad
Plántula 1	70%	Plántula 1	25%	Plántula 1	10%	Plántula 1	10%
Plántula 2	70%	Plántula 2	25%	Plántula 2	10%	Plántula 2	10%
Plántula 3	70%	Plántula 3	25%	Plántula 3	10%	Plántula 3	10%
Plántula 4	70%	Plántula 4	25%	Plántula 4	10%	Plántula 4	10%
Promedio	70%	Promedio	25%	Promedio	10%	Promedio	10%

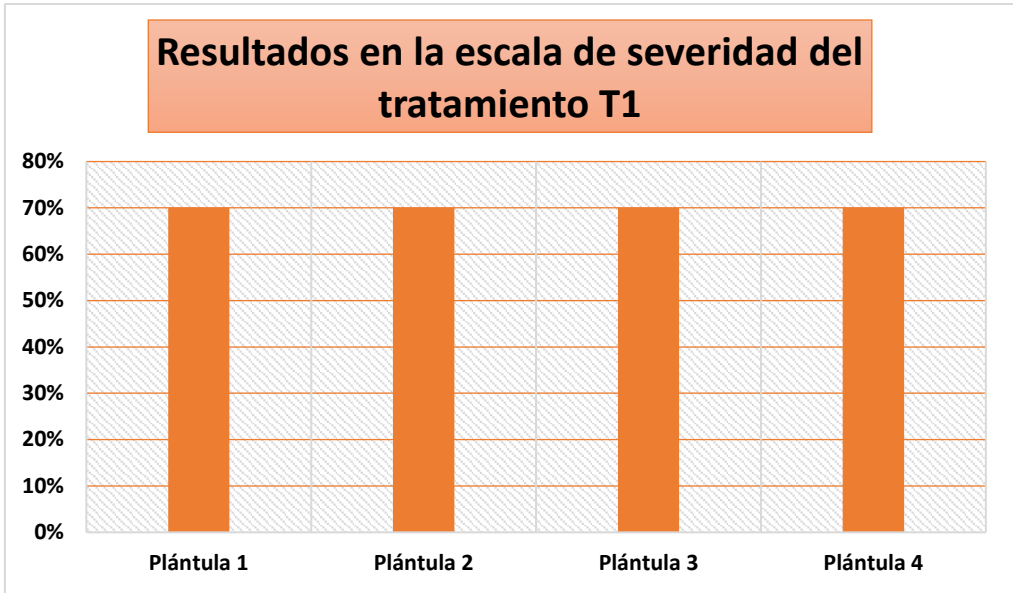
Los resultados a los 45 días de la siembra, presentados en la tabla 5, demostraron que todas las plantas del tratamiento T1 – Control positivo

manifestaron los síntomas de marchitez vascular al finalizar el bioensayo, reportándose que el 70% del follaje se encontraba clorótico, además de presentar caída de las hojas, efecto ocasionado por la necrosis. En el tratamiento T2 – Control negativo se observó una afectación del 25% del área foliar de las 4 réplicas posiblemente debido a la susceptibilidad y fragilidad de la planta, ya que a estas replicas no se les agregó ningún inóculo ni fertilizantes que ayudara a su crecimiento sano.

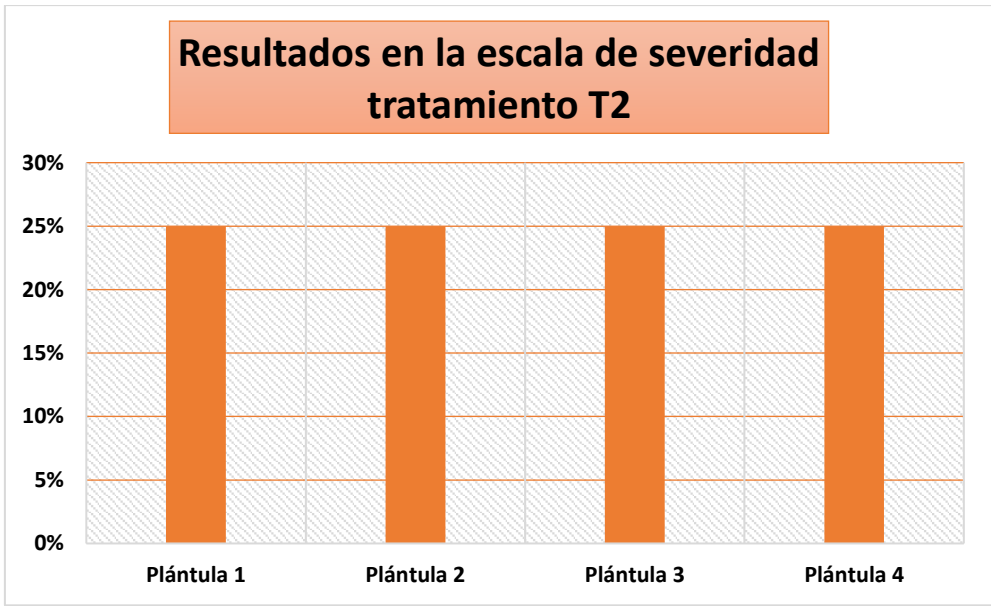
Las réplicas de los tratamientos T3 y T4 demostraron un comportamiento similar, en donde menos del 10% del área foliar fue afectada por la presencia de clorosis. Este fenómeno posiblemente se debió a la colonización por parte de “minadores” en el inicio del estudio, ya que todas las plantas utilizadas en el bioensayo presentaron una mancha blanca en algunas de sus hojas bajas (ver fig 10). Los resultados finales obtenidos demostraron que realmente la cepa de *B. subtilis* UCMC – TB2 tuvo acción biocontroladora frente al patógeno, evitando el desarrollo de *F. oxysporum* en la planta y por ende el desarrollo de la marchitez vascular.



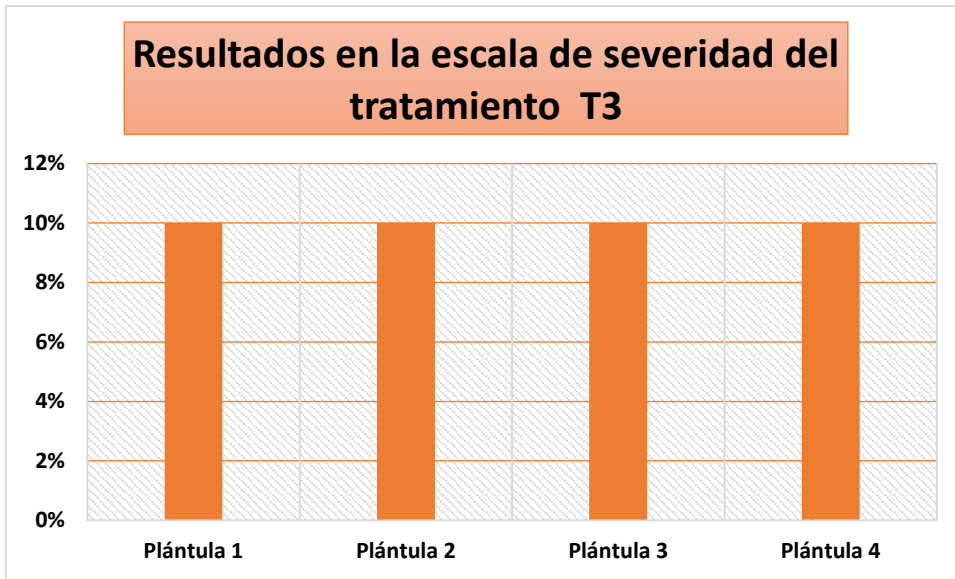
Fig 12. Plántula del tratamiento T3 a los 12 días después de la siembra. Fuente: Autor.



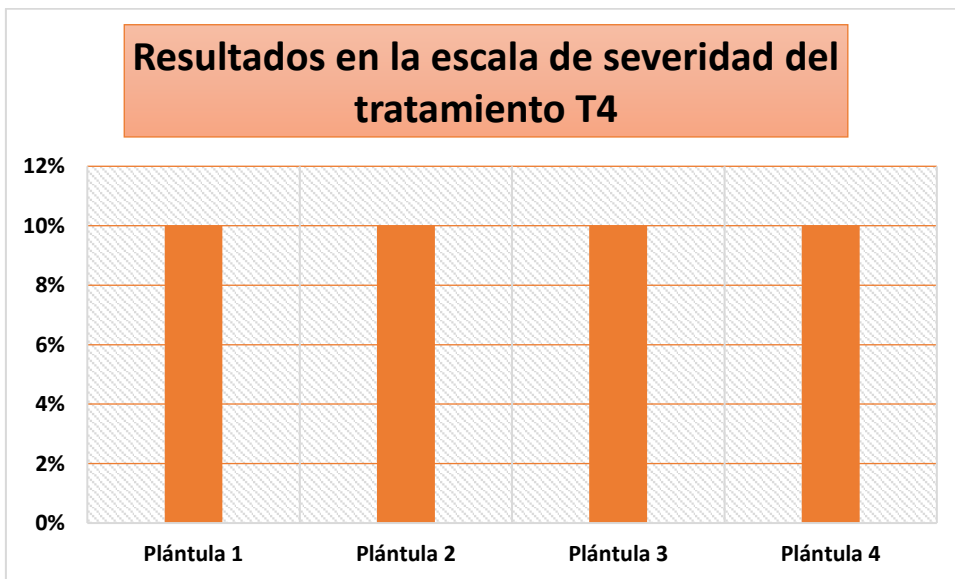
Gráfica 1. Lectura de la escala de severidad de las cuatro plantas de tomate del tratamiento T1 – control positivo a los 45 días de sembradas.



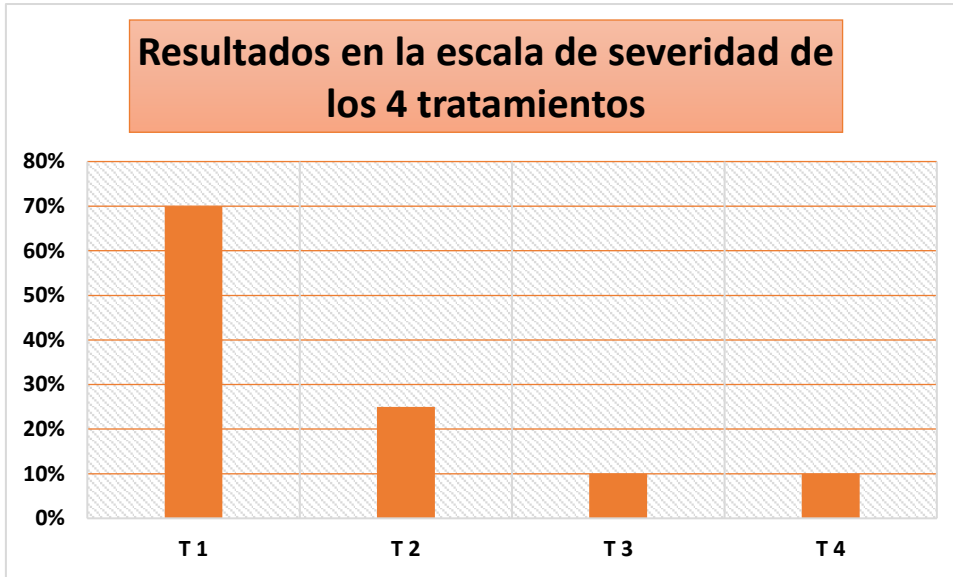
Gráfica 2. Lectura de la escala de severidad de las cuatro plantas de tomate del tratamiento T2 – control negativo a los 45 días de sembradas.



Gráfica 3. Lectura de la escala de severidad de las cuatro plantas de tomate del tratamiento T3 a los 45 días de sembradas.



Gráfica 4. Lectura de la escala de severidad de las cuatro plantas de tomate del tratamiento T4 a los 45 días de sembradas.



Gráfica 5. Promedio de la lectura de la escala de severidad en las plantas de tomate de los 4 tratamientos a los 45 días de sembradas.

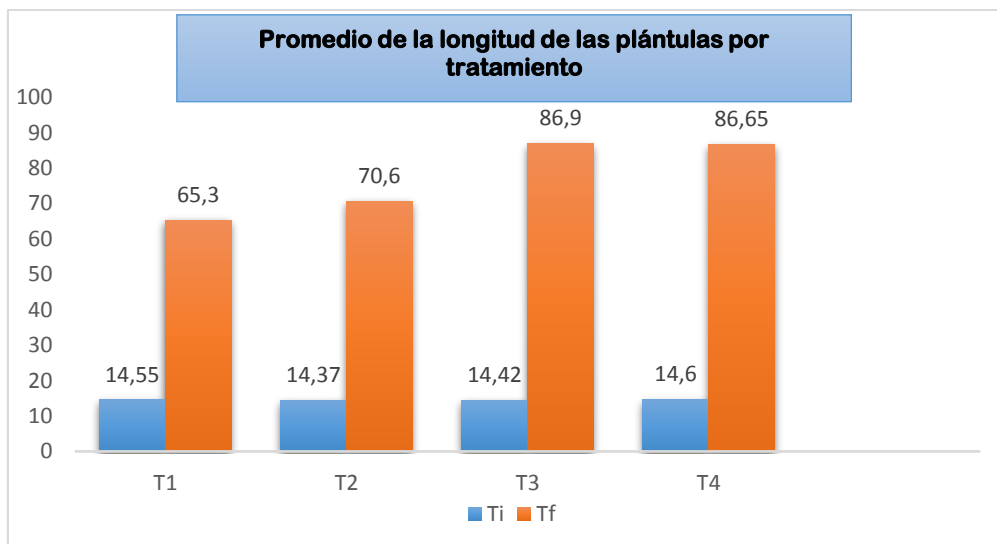
Además de la acción antagónica, también se observó el aumento en la longitud de las raíces y del área foliar de las plantas tratadas con la cepa de *B subtilis* UCMC – TB2 microencapsulada. En cuanto a la altura de la planta y el largo de la raíz, las plantas del tratamiento T1, presentaron menor tamaño tanto en la longitud de la filósfera como en la rizósfera, donde en promedio la filósfera fue de 56.2 cm y de la rizófera de 9.05 cm a comparación de los tratamientos T3 y T4, cuyas plantas presentaron mayor tamaño en la filósfera con un promedio de 69 cm y 67.3 cm respectivamente y un promedio de 17.9 cm y 19.2 cm en la rizósfera respectivamente (Ver tabla 6, tabla 7, tabla 8).



Fig 13. Rizósfera de los tratamientos # 2 (A), # 3 (B), # 1 (C), # 4 (D)

Tabla 6. Medidas al finalizar el bioensayo en centímetros (cm) del largo total de la planta (filósfera + rizósfera).

Tratamiento #1	Largo de la planta (cm)	Tratamiento #2	Largo de la planta (cm)	Tratamiento #3	Largo de la planta (cm)	Tratamiento #4	Largo de la planta (cm)
Planta 1	65.0	Planta 1	70.5	Planta 1	87.0	Planta 1	85.5
Planta 2	66.2	Planta 2	69.0	Planta 2	86.0	Planta 2	87.0
Planta 3	64.7	Planta 3	71.1	Planta 3	87.3	Planta 3	87.3
Planta 4	65.3	Planta 4	71.8	Planta 4	87.3	Planta 4	86.8
Promedio	65.3	Promedio	70.6	Promedio	86.9	Promedio	86.65

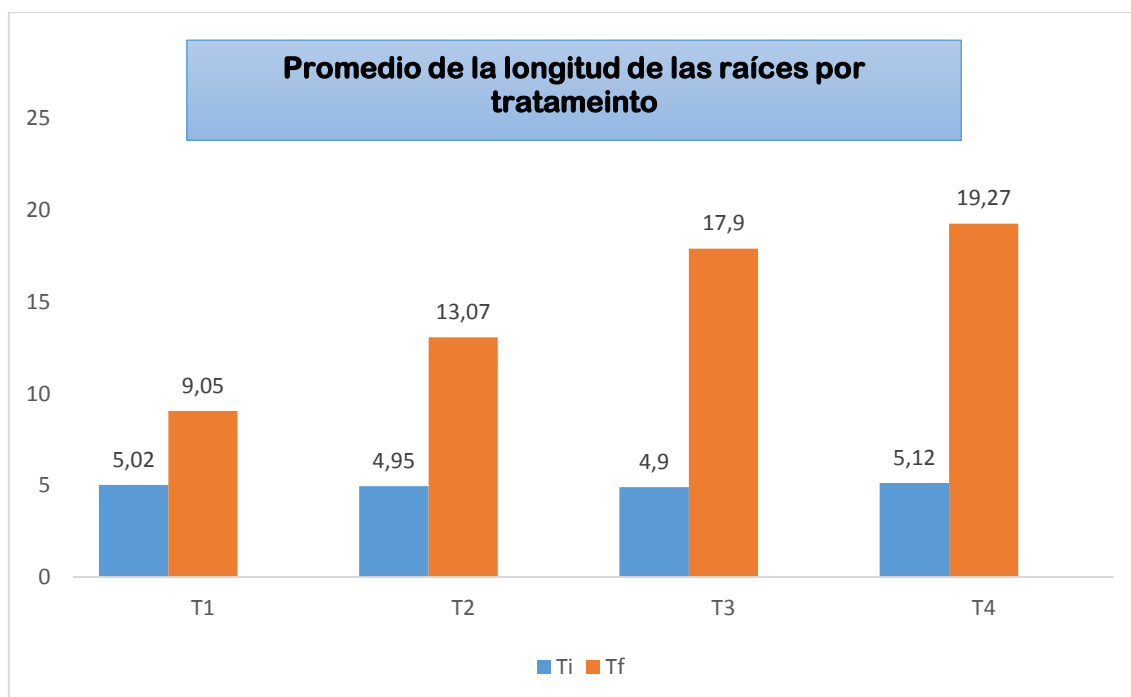


Gráfica 6. Promedio de la longitud en cm por las plantas de cada tratamiento. Ti: Promedio de la longitud total de la planta al inicio del experimento. Tf: Promedio de la longitud total de la planta a los 45 días del experimento.

En la gráfica 6 se observa que los tratamientos T3 y T4 registraron medidas mayores a 85 cm en la longitud total de las plantas, posiblemente gracias a la presencia del *B. subtilis*, en comparación de los tratamientos T1 y T2, los cuales no fueron tratados con la cepa de *B. subtilis* tuvieron medidas menos a 70 cm en sus réplicas.

Tabla 7. Medidas al finalizar el bioensayo en centímetros (cm) del largo de la raíz.

Tratamiento #1	Largo de la raíz (cm)	Tratamiento #2	Largo de la raíz (cm)	Tratamiento #3	Largo de la raíz (cm)	Tratamiento #4	Largo de la raíz (cm)
Planta 1	9.0	Planta 1	13.0	Planta 1	18.0	Planta 1	19.5
Planta 2	9.2	Planta 2	12.0	Planta 2	17.5	Planta 2	19.0
Planta 3	8.7	Planta 3	13.5	Planta 3	17.8	Planta 3	19.3
Planta 4	9.3	Planta 4	13.8	Planta 4	18.3	Planta 4	19.3
Promedio	9.05	Promedio	13.07	Promedio	17.9	Promedio	19.27

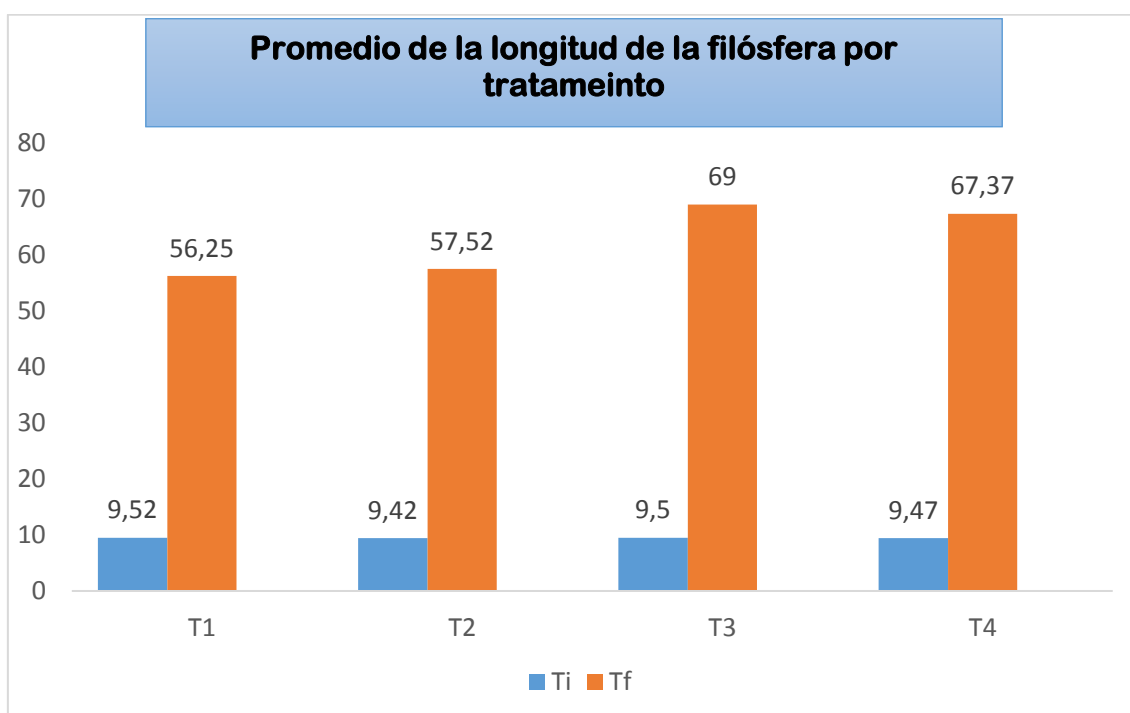


Gráfica 7. Promedio de la longitud de las raíces en cm por las plantas de cada tratamiento. Ti: Promedio de la longitud total de las raíces al inicio del experimento. Tf: Promedio de la longitud total de las raíces a los 45 días del experimento.

Las plantas de los tratamientos T1 y T2 registraron medidas menores a 12 cm en las raíces de las réplicas de cada tratamiento. Al comparar con los tratamientos T3 y T4 se observó que ellos registraron medidas mayores a 17 cm en la medición las raíces, es decir obtuvieron medidas de 5 cm por encima de los tratamiento T1 y T2.

Tabla 8. Medidas al finalizar el bioensayo en centímetros (cm) del largo de la filósfera.

Tratamiento #1	Largo de la filósfera (cm)	Tratamiento #2	Largo de la filósfera (cm)	Tratamiento #3	Largo de la filósfera (cm)	Tratamiento #4	Largo de la filósfera (cm)
Planta 1	56.0	Planta 1	57.5	Planta 1	69.0	Planta 1	66.0
Planta 2	57.0	Planta 2	57.0	Planta 2	68.5	Planta 2	68.0
Planta 3	56.0	Planta 3	57.6	Planta 3	69.5	Planta 3	68.0
Planta 4	56.0	Planta 4	58.0	Planta 4	69.0	Planta 4	67.5
Promedio	56.25	Promedio	57.52	Promedio	69.0	Promedio	67.37



Gráfica 8. Promedio de la longitud del área foliar en cm por las plantas de cada tratamiento. Ti: Promedio de la longitud total del área foliar al inicio del experimento. Tf: Promedio de la longitud total de la filósfera los 45 días del experimento.

En cuanto a los resultados obtenidos en la medición de la longitud de la fiósfera de las plantas del estudio, igualmente se observó una longitud mayor en los tratamientos T3 y T4 obteniendo mediciones por encima de 66 cm del área foliar, en cambio las plantas del control positivo T1 y control negativo T2 registraron longitudes hasta 58 cm del área foliar.

Las tres mediciones realizadas al finalizar el estudio demostraron que las plantas de los tratamientos inoculados con la cepa *B.subtilis* UCMC – TB2 presentaron mayor crecimiento en comparación con los tratamientos T1 y T2, los cuales no fueron tratados con la cepa del estudio.

6. DISCUSIÓN

B. subtilis es considerada una rizobacteria promotora de crecimiento, que estimula la germinación y mejora el desarrollo de las plantas. Se ha encontrado presente en el suelo y en las raíces de diferentes plantas sin causar ninguna fitopatología, al contrario, se han registrado efectos benéficos sobre las plantas que cuentan con la presencia de este microorganismo. Tal lo menciona Gómez S. et al., en su trabajo investigativo del 2017, donde proponen la alternativa de su uso como inóculo en los cultivos y así disminuir las dosis de fertilizantes utilizadas.²⁹

Los resultados obtenidos en este trabajo, aunque no era su objetivo de investigación, permitieron evidenciar la acción característica que posee *Bacillus subtilis* como bacteria promotora de crecimiento. Lo anterior mencionado también se obtuvo como resultado en el trabajo de Abril J et al., en el 2017, donde destacaron la acción del *B. subtilis* encontrando un aumento significativo ($p < 0,005$) de la longitud de las raíces y la altura de las plantas de pasto de guinea (*Megathyrsus maximus*) a los 62 días del estudio en los tratamientos inoculados con este microorganismo.³⁰ De igual manera, las plantas de tomate de los tratamientos T3 y T4 del presente estudio que fueron inoculados con el *B. subtilis* presentaron un aumento en la longitud de la raíz obteniendo un promedio de 17.9 cm y 19.27 respectivamente, y en cuanto a la filósfera se observó un registró una longitud de 69 cm y 67.37 cm, respectivamente.

Además de la inducción del crecimiento en las plantas, *B. subtilis* también presenta una acción inhibitoria sobre diferentes microorganismos patógenos que afectan la producción y desarrollo de los cultivos, posiblemente gracias

a la producción de antibióticos. Según Castañeda E., *B. subtilis* tiene la capacidad de biosintetizar metabolitos como la Iturina A, lipopéptido perteneciente a la familia de las Iturinas, que suprime el desarrollo y acción de patógenos como *Fusarium* sp. en las plantas.²⁷

A partir del estudio molecular realizado en el 2015 por Castañeda E, se demostró que la cepa de *B. subtilis* UCMC – TB2 poseía los genes *ItuA* y *Sfp*.²⁷ Lo cual indicaría que el hongo *F. oxysporum* fue inhibido por antibiosis en el tratamiento T4, debido a la producción de los metabolitos secundarios con actividad antifúngica como la Iturina A y fengicina generados por la cepa del estudio.²⁷ Tal como lo describe Castañeda E., en el artículo Evaluación del crecimiento de cuatro especies del género *Bacillus* sp., primer paso para entender su efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp.⁴

En el estudio se observó que las plantas de los tratamientos T3 y T4 presentaron clorosis en un 10% del área foliar. Esto se debe posiblemente a la presencia de “minadores”, moscas pertenecientes a la familia *Agromyzidae*.⁴⁰ Ya que a los 5 días de los trasplantes todas las plantas del estudio, presentaron manchas blancas en las hojas bajas muy similares a las ocasionadas por los “minadores”. Barranco P, en el 2003 señala que estos insectos producen daños a nivel de las hojas, disminuyendo la capacidad fotosintética y así ocasionando la caída prematura, lo cual ocurrió en las plantas T3 y T4.⁴⁰

El bioensayo se analizó durante 45 días por cuestión de falta de tiempo, lo ideal hubiera sido realizar las lecturas por más tiempo. Tal como lo indica Jaimes J, en el 2011 donde sugiere la realización de este tipo de ensayos por

un tiempo mayor a 60 días, con el fin de observar la respuesta completa *in vivo*.³¹

7. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos de la evaluación en el bioensayo bajo condiciones de invernadero, se pudo concluir que el producto microencapsulado de la cepa de *Bacillus subtilis* UCMC – TB2 presentó acción antagónica frente a *Fusarium oxysporum in vivo*, en plantas de tomate, posiblemente gracias a la producción de metabolitos secundarios con acción antifúngica como la Iturina A y fengicina.

En el bioensayo se evidenció la viabilidad del producto biológico de la cepa de *Bacillus subtilis* UCMC – TB2, puesto que las plantas del tratamiento T4 inoculadas con el patógeno y tratadas con las microcápsulas no manifestaron ningún síntoma de la enfermedad, lo que indica que el tratamiento fue el adecuado para el control del desarrollo de la enfermedad.

Además de la acción antagónica por parte de la cepa *Bacillus subtilis* UCMC – TB2, también se evidenció la capacidad que poseen las bacterias de este género como bacterias promotoras de crecimiento, pues tuvo acción inductora en el crecimiento de la filósfera y rizósfera de las plantas tratadas únicamente con la cepa de *B. subtilis* UCMC – TB2.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

¹Ascencio A, López A, Borrego F, Rodríguez A, Flores A, Jimenez F, et al. Marchitez Vascular del Tomate: I. Presencia de Razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen en Culiacán, Sinaloa, México. Revista Mexicana de Fitopatología. [Internet]. 2008 [citado 1 mar 2017]; 26(2): 114 - 120. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092008000200003

²DANE (Departamento Administrativo Nacional de Estadística). Encuesta Nacional Agropecuaria ENA 2015. [Internet]. 2016 [citado 1 mar 2017]: 5 – 7. Disponible en: https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/enda/ena/2015/boletin_ena_2015.pdf

³Gonzales I, Arias Y, Peteira B. Aspectos generales de la interacción *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*-tomate. Rev. Protección Veg. [Internet]. 2012 [citado 1 mar 2017]; 27 (1): 1 – 7. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522012000100001

⁴Castañeda E, Sánchez L. Evaluación del crecimiento de cuatro especies del género *Bacillus* sp., primer paso para entender su efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. Rev NOVA. [Internet]. 2016 [citado 9 oct 2017]; 13 (26): 53 – 65. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v14n26/v14n26a06.pdf>

⁵Alnuaimy A, AL-Janabi J, ALObaidi L, & Marjan, A. F. *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. Rev ChemTech. [Internet]. 2017 [citado 18 oct 2017]; 10

(6): 838 – 850. Disponible en:

[http://www.sphinxesai.com/2017/ch_vol10_no6/3/\(838-850\)V10N6CT.pdf](http://www.sphinxesai.com/2017/ch_vol10_no6/3/(838-850)V10N6CT.pdf)

⁶Jaramillo J, Rodríguez V, Guzmán M, Zapata M, Rengifo T. Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) en la producción de tomate bajo condiciones protegidas. FAO. [Internet]. 2007 [citado 9 oct 2017]. Disponible en:

<http://www.fao.org/docrep/010/a1374s/a1374s00.htm>

⁷Arbeláez G. Algunos aspectos de los hongos del género *Fusarium* y de la especie *Fusarium oxysporum*. Rev Agron. colom. [Internet]. 2000 [citado 18 oct 2017]; 17(1-3): 11 – 22. Disponible en:

<https://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/21538/22543>

⁸Torres D. Capote T. Agroquímico un problema ambiental global: uso del análisis químico como herramienta para el monitoreo ambiental. Rev Ecosistemas. [Internet]. 2004. [citado 18 oct 2017]; 13 (3): 2 – 6. Disponible en: <http://revistaecosistemas.net/index.php/ecosistemas/article/view/201>

⁹Fravel D. Olivain C. Alavoubette C. *Fusarium oxysporum* and its control. Rev New Phytologist. [Internet]. 2003. [citado 22 oct 2017]; 157 : 493 – 502. Disponible en: [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046-j.1469-8137.2003.00700.x/full](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1469-8137.2003.00700.x/full)

¹⁰Ignjatov M. Milosevic D. Nikolic Z. Gvozdanovic-Varga J. Jovicic, D. Zdjelar G. *Fusarium oxysporum* as causal agent of tomato wilt and fruit rot. Rev Pestic. Phytomed. [Internet]. 2012. [citado 22 oct 2017]; 27(1): 25 – 31. Disponible en: <http://arhiva.nara.ac.rs/handle/123456789/1419>

¹¹Ibrahim H. Effects of *Fusarium oxysporum* Infection on Chloroplast and Mitochondrial Functions in Resistant Soybean Plants. Rev CRW. [Internet].

2017. [citado 22 oct 2017]; 6(1): 86 – 92. Disponible en:
<http://www.curreweb.com/csi/csi/2017/86-92.pdf>

¹²Cai G. Gale L. Schneider R. Klister H. Davis R. et al. Origin of Race 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* at a Single Site in California. Rev Phytopatology. [Internet]. 2003. [citado 25 oct 2017]; 93 (8): 1014 – 1022. Disponible en:
<https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO.2003.93.8.1014>

¹³Reis A. Costa H. Boiteux L. Lopez C. First Report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 on tomato in Northwest Florida and Georgia. Rev Fitopatol. Bras. [Internet]. 2005. [citado 25 oct 2017]; 30(4): 426 – 428 Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/fb/v30n4/a17v30n4.pdf>

¹⁴Ávila E. Manual: Tomate. Rev Cámara de Comercio de Bogotá. [Internet]. 2015. [citado 10 dic 2017]; 1 – 56 Disponible en:
<http://bibliotecadigital.ccb.org.co/bitstream/handle/11520/14307/Tomate.pdf?sequence=1>

¹⁵Escobar H. Lee R. Manual de producción de tomate bajo invernadero. [Internet]. 2009. [citado 10 dic 2017]. Disponible en:
http://www.utadeo.edu.co/files/node/publication/field_attached_file/pdf-manual_produccion_de_tomate_-_pag.-web-11-15.pdf

¹⁶Santiago F. Mendoza J. Borrego M. Evaluación agronómica del tomate en invernadero: Criterios fenológicos y fisiológicos. Rev Agronomía Mesoamericana. [Internet]. 1998. [citado 10 dic 2017]; 9(1): 59 – 65. Disponible en: http://www.mag.go.cr/rev_meso/v09n01_059.pdf

¹⁷Smith A. The tomato in America; Early history, Culture and Coorery. Columbia S,C:University of South Carolina Press;1994

¹⁸Van Haeff J. Tomates. México: Ed. Trillas; 1997

¹⁹Jaramillo J. Rodríguez V. Guzmán M. Zapata M. El cultivo de tomate bajo invernadero (*Lycopersicon esculatum* Mill.). Colombia; 2006

²⁰Escalona V. Alvarado P. Monardes H. Urbina C. Martín A. Manual de cultivo de tomate (*Lycopersicon esculatum* Mill.). Chile; 2009

²¹FIRA. Tomate Rojo 2016. México: Panorama Alimentario; 2016

²²Perilla A. Rodríguez L. Bermúdez L. Estudio técnico-económico del sistema del sistema de producción de tomate bajo invernadero en Guateque, Sutatenza y Tenza (Boyacá). Rev ACCB. [Internet] 2011. [citado 25 feb 2018] 5(2): 220 – 232. Disponible en: http://revistas.uptc.edu.co/index.php/ciencias_hortícolas/article/view/1269/1265

²³Amaya L. Orozco A. Manejo poscosecha y comercialización del tomate de mesa (*Lycopersicom escuetum*). Colombia; 2001

²⁴Corpocauca. Alianzas de Paz para Producción y Comercialización de tomate bajo condiciones de Invernadero entre familias campesinas del Norte del Departamento del Cauca y Empresarios del Sur-occidente Colombiano. [Internet]. 2006. [Citado 25 feb 2018]. Disponible en: <http://www.observatorio.misionrural.net/alianzas/productos/tomate/caldono-quilichao/preinversionTOMATE.pdf>

- ²⁵Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Área sembrada y área cosechada del cultivo de tomate 2007 – 2014. Agronet. [Internet]. 2014. [citada 25 feb 2018]. Disponible en: <http://bibliotecadigital.agronet.gov.co/bitstream/11438/8539/1/Tomate.pdf>
- ²⁶Productores de Hortalizas. Plagas y enfermedades del tomate. [Internet]. 2006. [citada 06 mar 2018]. Disponible en: http://vegetablemdonline.ppath.cornell.edu/NewsArticles/Tomato_Spanish.pdf
- ²⁷Castañeda E. Microencapsulación del *B. subtilis* por gelificación iónica como alternativa para controlar el *Fusarium sp.* [Master's thesis]. Chía, Cundinamarca; 2015. 87 p.
- ²⁸Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. Rev. Molecular Microbiology. [Internet] 2005. [citado 18 Jul 2018] 56(4): 845 – 857 Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x>
- ²⁹Gómez S. Krieger S. Curti R. Herrando C. Aldana A. Evaluación *in vitro* del efecto promotor del crecimiento en plántulas de chíá. Rev. Agrotecnica. 2017. 25(29)
- ³⁰Abril J. Roncallo B. Bonilla R. Effect of inoculation with bacteria of the genus *Bacillus* on the growth of *Megathyrus maximus* Jacq, in conditions of water stress. Rev Agro. Noreste Argent. [Internet]. 2017 [citado 12 Agos 2018] 37 (1): 25 – 37 Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S2314-369X2017000100003&script=sci_arttext&tlng=en

³¹Jaimés J. Microencapsulación de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma asperellum* y su efecto antagónico sobre *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* y en el desarrollo de plantas de Chile (*Capsicum annuum*). [Master's thesis]. Saltillo, Coahuila, México; 2011. 60 p.

³² DANE (Departamento Administrativo Nacional de Estadística). Encuesta Nacional Agropecuaria ENA 2017. [Internet]. 2018 [citado 20 ago 2018]: 5 – 7. Disponible en: https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/enda/ena/2017/boletin_ena_2017.pdf

³³Leslie J. et al. The *Fusarium* Laboratory Manual. Manhattan, USA; 2006.

³⁴Acevedo Y. Taxonomía molecular de aislamientos de *Fusarium* obtenido a partir de muestras clínicas. [Master's thesis]. Medellín, Antioquia; 2013. 110 p.

³⁵Guarro J. Taxonomy and biology of fungi causing human infection. Rev Enferm Infecc Microbiol Clin. [Internet]. 2012 [citado 26 ago 2018]; 30(1):33–39. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-pdf-S0213005X11003016>

³⁶Cuervo J. Aislamiento y caracterización de *Bacillus* spp como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales. [Trabajo de grado]. Bogotá D.C; 2010. 35 p.

³⁷Olivain C, Alabouvette C. Process of tomato root colonization by a pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in comparison with a non-pathogenic strain. New Phytol. 1999; 141(3): 497-510.

³⁸Tovar J. Evaluación de la capacidad antagonista *in vivo* de aislamientos de *Trichoderma* spp. frente al hongo fitopatógeno *Rizhooctonia solani*. [Trabajo de grado]. Bogotá D.C; 2008. 81 p.

³⁹Layton C, Maldonado E, Monroy L, et al. *Bacillus* spp.; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. Rev NOVA. [Internet]. 2011. [citado 30 ago 2018]; 9 (15): 177 – 187. Disponible en: http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/NOVA16_ARTREVIS1_BACILLUS.pdf

⁴⁰Barranco P. Dípteros de interés agronómico: Agromícidos plaga de cultivos hortícolas intensivos. Rev. Entomología Aplicada. [Internet]. 2003 [citado 30 ago 2018]; 33: 293 – 307. Disponible en: http://sea-entomologia.org/PDF/BOLETIN_33/B33-054-293.pdf

⁴¹Jones J. Stall R. Zitter T. Plagas y enfermedades del tomate. The American Phytopathological Society. USA.

⁴²Guillén-Cruz R. Hernández-Castillo F. Gallegos-Morales G. *Bacillus* spp. como biocontrol en un suelo infestado con *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora capsici* Leonian y su efecto en el desarrollo y rendimiento del cultivo de Chile (*Capsicum annum*L.). Rev Mex de Fitopatología. 2006; 24(2): 105 – 114 p.

⁴³Layton C. Maldonado E. Monroy L. Constanza L. Sánchez L. *Bacillus* spp.; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. Rev NOVA; 2011. 15(9): 113 – 214 p.

⁴⁴Villarreal M. *et al.* The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. *Rev Mexicana de Fitopatología*; 2018. 36(1): 95-130 p.

⁴⁵Rodríguez E. Caracterización de aislamientos de *Fusarium* spp. obtenidos de zonas productoras de uchuva (*Physalis peruviana*) en Cundinamarca y Boyacá. [Master's thesis]. Bogotá D.C. 2013. 120 p.

⁴⁶Ariza Y. Sánchez L. Determinación de metabolitos secundarios a partir de *Bacillus subtilis* efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. *Rev NOVA*; 2012 18(10): 149 – 135 p.