UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

MAESTRÍA EN AGRICULTURA SOSTENIBLE

Evaluación de microorganismos antagonistas y sustancias naturales en el control de enfermedades foliares en tomate

Tesis en Opción a la Título Académico de Maestro en Ciencias en Agricultura Sostenible: Mención "Sanidad Vegetal". 12naEdición

MAESTRANTE:

Ing. Angel Rolando Robles Carrión

TUTOR:

Dr. Cs. Lidcay Herrera Isla

2011

“Es en la lucha donde se reconoce la valentía y el valor de una persona, y en la victoria donde se conoce su dignidad”
Tomado de Gotas de Esperanza del Padre Juca

Dedicado a dos personas

JESUCRISTO: Por ser el hijo de Dios todo poderoso y por morir en la cruz para salvarnos del pecado.

RAFAELCORREA: Por su valentía y por no claudicar jamás en sus ideales, por forjan un Ecuador más justo; donde las personas vivan y sean tratadas como seres humanos y por los hechos sucedidos el 30 de septiembre de 2010. ¡SIGUE ADELANTE, QUE TU PUEBLO TE APOYA!

A mis queridos y entrañables padres: Miguel Robles y Reinelda Carrión

A mis hermanos: Elid, María Esther, Wilson y de manera muy especial a mi hermanita del alma Amparito

A Johncito y Génesis por ser mis sobrinos y las personitas que yo más quiero en la vida

A mis abuelitas: Mercedes Robles y Esther Ochoa

A Teresita Ordoñez

A la Secretaria de Educación Superior Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT)

A Ing. Sandrita Artieda, mi analista de fortalecimiento

De manera especial a Liudmila

A Dios todo poderoso y a la Virgen María por ser mis guías y mis maestros durante el trajinar de mi vida diaria.

A mis queridos padres, que me dieron la vida y sin su apoyo no hubiera alcanzado mi formación profesional.

A la Secretaria de Educación Superior Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT), por hacer mi sueño realidad de estudiar en exterior

A la Universidad Nacional de Loja – Ecuador por ser la primera institución que me formó profesionalmente.

A todos los docentes de la 12na edición de la Maestría en Agricultura Sostenible.

En especial a mi tutor Dr. Cs Lidcay Herrera Isla, por especial apoyo y asesoramiento desde el inicio hasta la culminación de mi tesis.

A Orlando y María del Organopónico “El Minero”, por haberme permitido la realización del trabajo de campo de mi tesis.

A mis compañeras y amigas de la 12na edición de la Maestría en Agricultura Sostenible: Idania, Mayra, Teresita y de manera especial a Arline por ayudarme en los momentos más difíciles de mi vida.

A Zady y Pepe, por ayudarme y cuidarme en mis momentos más apremiantes de mi estancia en Cuba.

A Teresita Ordoñez, por ser la persona que siempre me inculcó respeto y constancia de terminar siempre lo que se empieza.

A RAFAEL CORREA PRESIDENTE DE ECUADOR, por creer y fortalecer el talento humano de muchos ecuatorianos y por ser una de las personas que más admiro por su tenacidad y lucha diaria por cambiar las injusticias de la vida.

A todos mis familiares que de una u otra forma me apoyaron para culminar con éxitos mis estudios de maestría.

RESUMEN

Se realizó la evaluación de varios microorganismos antagonistas y sustancias naturales en el control de enfermedades foliares en tomate. El experimento consistió en utilizar plantas de tomate Esem-2 de procedencia canadiense, a las cuales se les aplicó: *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Burkholderia cepacia*, *Trichoderma viride*, Quitosana, Tebuconazol más Triadimenol, y al testigo se le aplicó agua destilada. Se presentan tablas y figuras donde se muestra el efecto de los diferentes tratamientos en el control de enfermedades foliares en tomate. Los análisis estadísticos presentaron diferencias significativas entre los tratamientos. Se identificaron las enfermedades fúngicas causadas por: *Alternaria solani*, *Stemphylium solani*, *Passalora fulva*, *Phytophthora infestans*, *Corynespora cassiicola*, *Cercospora* sp., y bacterianas causadas por: *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Se determinó el desarrollo de las enfermedades en los cuatro períodos de evaluación. *A*. *solani* alcanzó el 50,00%, *S*. *solani* el 54,07%, *P*. *fulva* el 49,03%, *X*. *campestris* pv. *vesicatoria* el 46,67% y *P*. *infestans*, *C*. *cassiicola*, *Cercospora* sp., menos del 10,00% de afectación. Los tratamientos más efectivos para el control de las principales enfermedades foliares del tomate en los cuatro períodos de evaluación fueron: *B*. *cepacia*, *T*. *viride* y Quitosana. El mayor rendimiento del tomate se obtuvo con aplicación de la bacteria *B*. *cepacia*. Se encontró actividad bioinsecticida de la bacteria *B*. *cepacia* con la dilución de 1/10 sobre *Myzus persicae*. Este resultado constituye en primer reporte de la utilización de esta bacteria en el control biológico de áfidos.

Palabras clave: tomate, microorganismos antagonistas, control biológico, sustancias naturales, enfermedades fúngicas

ABSTRACT

Several antagonist microorganisms and natural substances were evaluated in order to evaluate the control effect on the foliar diseases in tomato. The experiment consisted by means of the cultivar Esem-2 from Canada, the application of: *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Burkholderia cepacia*, and *Trichoderma viride*, Chitosan, Tebuconazol plus Triadimenol and as control distilled water. In tables and figures is observed the effect of treatments, where was founded significatily difference between them. Where identified as fungal diseases the caused by: *Alternaria solani*, *Stemphylium solani*, *Passalora fulva*, *Phytophthora infestans*, *Corynespora cassiicola*, *Cercospora* sp., and as bacterial disease by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. The rate of infection was evaluated in four periods. *A*. *solani* showed 50, 00%, *S*. *solani* 54, 07%, *P*. *fulva* 49, 03%, *X*. *campestris* pv. *vesicatoria* 46, 67% and *P*. *infestans*, *C*. *cassiicola*, *Cercospora* sp., least at 10, 00%. The most effective were: *B. cepacia T*. *viride* and Chitosan. The highest yield was obtained with the application of *B. cepacia* a bioinsecticida action was observed by the use of *B. cepacia* at 1/10 dilution on the aphid *Myzus persicae*, this results in the first report.

Key words: Tomato, antagonists microorganisms, biological control, natural substances, fungal diseases

ÍNDICE

PENSAMIENTO i

DEDICATORIA ii

AGRADECIMIENTOS iii

RESUMEN iv

ABSTRACT v

ÍNDICE vi

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN 1

CAPÍTULO 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 7

2.1. El cultivo de tomate 7

2.2. Importancia 7

2.3. Requerimientos edafoclimáticos 7

2.4. Enfermedades más importantes del tomate en Cuba 8

2.4.1. Tizón temprano causado por *Alternaria solani* Sorauer. 9

2.4.2. Mancha gris de la hoja causada por *Stemphylium solani* Webber 10

2.4.3. Moho de las hojas causado por *Passalora fulva* (Cooke) U. Braun y Crous 10

2.4.4. *Corynespora cassiicola* (Berk. &Curt.) Wei. 11

2.4.5. Tizón tardío causado por *Phytophthora infestans* Mont de Bary 12

2.4.6. *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dowson 13

2.5. Control Biológico 13

2.5.1. Introducción 13

2.5.2. Definición 15

2.6. Antagonistas microbianos como agentes de biocontrol en enfermedades de las plantas 15

2.6.1. Introducción 15

2.6.2. Mecanismos de acción 15

2.6.2.1. Antagonismo 16

2.6.2.2. Antibiosis 16

2.6.2.3. Competencia 17

2.6.2.4. Fungistasis 17

2.6.2.5. Resistencia sistémica adquirida 17

2.6.2.6. Micoparasitismo 18

2.6.3. Microorganismos como controladores biológicos de enfermedades 18

2.6.3.1. *Trichoderma* sp. 18

2.6.3.2. Bacterias como controladores biológicos de enfermedades 20

a. Bacterias del género *Pseudomonas* 21

b. Bacterias del género *Bacillus* 23

c. Bacterias del género *Burkholderia* 24

2.7. Quitosana 25

CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS 28

3.1. Generalidades 28

3.1.1. Localización del área de estudio 28

3.1.2. Diseño experimental empleado 29

3.1.3. Metodologías de evaluación de los tratamientos 31

3.1.3.1. Preparación del inóculo 31

3.1.3.2. Aplicación de los tratamientos 32

3.1.4. Procesamiento estadístico 31

3.2. Identificación de los principales agentes fitopatógenos 32

3.3. Evaluación del efecto antagonista de las bacterias y sustancias naturales sobre los principales agentes fitopatógenos foliares del tomate 34

3.3.1. *Alternaria solani* Sorauer 35

3.3.2. *Stemphylium solani* Webber 35

3.3.3. *Passalora fulva* (Cooke) U. Braun y Crous 36

3.3.4. *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dowson 36

3.4. Otros agentes fitopatológicos 37

3.5. Determinación del efecto de los tratamientos sobre el rendimiento en tomate 37

3.6. Efecto bioinsecticida de las especies bacterianas estudiadas sobre *Myzus persicae* (Sulzer) 38

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 40

4.1. Generalidades 40

4.2. Identificación de los principales agentes fitopatógenos 40

4.3. Evaluación del efecto antagonista de las bacterias y sustancias naturales sobre los principales agentes fitopatógenos foliares del tomate 40

4.3.1. *Alternaria solani* Sorauer 40

4.3.2. *Stemphylium solani* Webber 45

4.3.3. *Passalora fulva* (Cooke) U. Braun y Crous 49

4.3.4. *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dowson 54

4.4. Otros agentes fitopatológicos 58

4.5. Determinación del efecto de los tratamientos sobre el rendimiento en tomate 59

4.6. Efecto bioinsecticida de las especies bacterianas estudiadas sobre *Myzus persicae* (Sulzer) 61

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES 65

CAPÍTULO 6. RECOMENDACIONES 67

CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA 68

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

La crisis de la agricultura tradicional por la presencia de residuos tóxicos provenientes de los plaguicidas y fertilizantes minerales en los alimentos agrícolas, ha impulsado en las últimas décadas el avance vertiginoso de la agricultura ecológica; lo que ha forjado toda una corriente inclinada a mejorar su calidad biológica a través del uso sustentable de los recursos naturales disponibles en los agroecosistemas (Terry *et al*., 2005).

Debido a que el tomate es utilizado en la alimentación, se hace más necesario el esfuerzo tecnológico en cuanto a identificación, control de plagas y enfermedades, producción de semillas resistentes, nutrición y técnicas de cultivo adecuadas. Además, las enfermedades de las plantas son también las responsables de la creación y aplicación de nuevos productos químicos para su control. (Van Haeff *et al*., 1990).

En Cuba el tomate es una de las hortalizas de mayor consumo, se cultiva en zonas subtropicales y se ve afectado por numerosas enfermedades, las cuales influyen negativamente en el desarrollo morfofisiológico de la plantas, y por ende ocasionan una baja producción (Van Haeff *et al*., 1990; Torres *et al*., 2008).

El tomate es un cultivo de alto riesgo fitosanitario y las enfermedades que lo afectan son muy diversas, muchas de las cuales pueden ocasionar pérdidas muy severas si no se toman las medidas de control adecuadas. Entre las principales

enfermedades que atacan a esta hortaliza tenemos las causadas por hongos (*Stemphylium solani* Webber, *Passalora fulva (*Cooke) U. Braun y Crous, *Corynespora cassiicola*, *Phytophthora infestans* y *Alternaria solani* Sorauer), las bacterianas (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dowson, *Pseudomonas campestris*) y las virales, como el encrespamiento amarillo de las hojas del tomate (TYLCV), y el virus del mosaico del tabaco (TMV) (Mayea *et al*., 1983; Gato, 2006; Torres *et al*., 2008).

El control de estas enfermedades continúa siendo por métodos químicos con el objetivo equivocado de mantener una agricultura económicamente rentable y altos rendimientos; sin embargo, su uso trae efectos nocivos al ambiente y a la salud del hombre debido a la residualidad de sus componentes, además generan resistencia por parte de los microorganismos fitopatógenos (Michel-Aceves *et al*., 2008; Torres *et al*., 2008). De ahí la importancia en la búsqueda de agentes de control biológico como una alternativa viable al uso indiscriminado de los plaguicidas en la agricultura cubana.

El control biológico se refiere a la utilización de microorganismos benéficos para reducir la intensidad o actividades de microorganismos fitopatógenos productores de enfermedades, lograda por la manipulación del ambiente del microorganismo patógeno, del microorganismo antagonista (un microorganismo antagonista comprende cualquier organismo que interfiere en la supervivencia o desarrollo del microorganismo patógeno, o de los microorganismos patógenos que se quiere

controlar) (Pérez, 2004; Ezziyyani *et al*., 2006). Todo control biológico debe sustentarse en estudios previos en la zona en que se pretende introducir o realizar, para saber la real existencia de uno o varios microorganismos patógenos que sean los causantes de pérdidas económicas en los cultivos o afecten el desarrollo de este. Todo microorganismo tiene controladores biológicos en forma natural y cuando éstos fallan, o están ausentes, se produce el incremento excesivo de los organismos plagas, ya sean enfermedades, insectos, malezas, entre otros. (Pérez, 2004).

El control biológico con microorganismos antagonistas se realiza mediante varias interacciones directas entre los antagonistas y los microorganismos fitopatógenos vegetales; dichas interacciones se llaman mecanismos de acción. Los mecanismos de acción antagonista han sido ampliamente estudiados con el fin de controlar el desarrollo de los microorganismos fitopatógenos, entre ellos se puede mencionar: antagonismo, antibiosis, competencia, fungistasis, resistencia sistémica adquirida y micoparasitismo. (Michel-Aceves, 2001; Pérez, 2004; Bernal *et al*., 2006).

Los microorganismos antagonistas y sustancias naturales más utilizados en el control biológico de microorganismos fitopatógenos son: hongos del género *Trichoderma*, bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Burkholderia*, y productos naturales como el Quitosana (producto derivado de la desacetilación alcalina de la quitina, que es principal componente del exoesqueleto de

crustáceos) (Gato, 2006; Porras *et al*., 2009). El control biológico foliar en el tomate ha transcurrido de manera lenta, ya que en esa zona es más difícil de lograr el biocontrol, porque hay que tener en cuenta diversos factores como: el entorno debe ser el apropiado para el crecimiento del agente de biocontrol y que este sea capaz de actuar contra los microorganismos fitopatógenos; además se deben conocer el o los mecanismos de acción del microorganismo antagonista (Michel-Aceves, 2001).

Se conocen pocos casos exitosos de control biológico de microorganismos antagonistas y sustancias naturales utilizados contra diversos microorganismos fitopatógenos, entre los cuales se mencionan a Bernal *et al*. (2006), quienes utilizaron un complejo de bacterias antagonistas (*Pseudomonas fluorescens*, *P*. *aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Burkholderia cepacia* y *Serratia plymuthica*) en el control de *Stemphylium solani*, reduciendo la incidencia de la enfermedad a menos del 25% con la aplicación de *B*. *subtilis*. Además *Trichoderma* sp., ha demostrado ser un agente de biocontrol muy eficaz contra la pudrición del pimiento causado por *Phytophthora capsici*, reduciendo su afectación en un 65% (Ezziyyani *et al*., 2004).

De igual forma el uso de *Pseudomonas fluorescens*, *P*. *aeruginosa*, *B*. *cepacia*, utilizadas en el control de *Colletotrichum lindemuthianum* y *Botrytis cinerea* además de inhibir el grado de afectación de los microorganismos fitopatógenos en frijol y tomate, estimularon en la planta a la resistencia sistémica inducida.

Igualmente la utilización de *B*. *subtilis* y *B*. *amyloliquefaciens* en un suelo infectado con *Fusarium* sp., y *Phytophthora capsici*, redujeron el grado de afectación de las pudriciones en la raíz del cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.) e incrementaron la producción en un 270%. Por otra parte, en los últimos años el uso de sustancias naturales como la Quitosana ha resultado un agente de control de mayor uso en cultivos de gran importancia económica. Se ha utilizado con éxito en la reducción del grado de severidad de *Pyricularia grisea* en arroz, además se ha observado un incremento de las actividades enzimáticas que inducen la defensa de las plantas (Hernández-Rodríguez *et al*., 2004; Guillén-Cruz *et al*., 2006; Rodríguez-Pedroso *et al*., 2006).

Teniendo en cuenta la significativa importancia de contar con agentes biológicos para el control de enfermedades, y sin alterar el normal desarrollo del ecosistema natural y ambiental, nos planteamos la hipótesis y los objetivos.

Hipótesis:

Con la aplicación de varios microorganismos antagonistas y sustancias naturales, se puede controlar las enfermedades foliares en tomate.

Objetivo General:

Evaluar la utilización de varios microorganismos antagonistas y sustancias naturales, como una alternativa ecológica en el control de enfermedades foliares en tomate.

Objetivos Específicos:

1. Identificar las principales enfermedades foliares del tomate en condiciones de campo.
2. Determinar los tratamientos más eficientes en el control de las enfermedades foliares en tomate.
3. Evaluar el desarrollo de las principales enfermedades foliares del tomate, mediante la aplicación de varios microorganismos antagonistas y sustancias naturales.

CAPÍTULO 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. El cultivo de tomate

El origen de la especie *Solanum lycopersicum* L., se localiza en la región andina que se extiende desde el sur de Colombia hasta la parte norte de Chile, países donde se encuentran varias formas silvestres; probablemente desde allí fue llevado a Centroamérica y México donde se domesticó. Luego fue llevado por los españoles a Europa. A partir del año 1900 este cultivo se extendió al consumo humano (Van Haeff *et al*., 1990; Escalona *et al*., 2009).

2.2. Importancia

El tomate es la hortaliza más difundida en todo el mundo y la de mayor valor económico. Su demanda aumenta continuamente y con ella su cultivo, producción y comercio. El incremento anual de la producción en los últimos años se debe principalmente al aumento en el rendimiento y en menor proporción al aumento de la superficie cultivada. Se consume principalmente en fresco en ensaladas o cocido, y en menor escala se utiliza como encurtido (Torres *et al*., 2008; Escalona *et al*., 2009).

2.3. Requerimientos edafoclimáticos

El tomate es una especie que se cultiva en clima cálido, la temperatura media óptima para el desarrollo y la fructificación, es de 21 a 24 ºC, aunque puede

soportar un rango entre 15 a 30 ºC; temperaturas por encima de este intervalo afectan enormemente la fructificación, en cambio cuando es menor de15 ºC origina problemas en el desarrollo morfofisiológico y además puede llegar a producir frutos deformes, es decir la fecundación es defectuosa o nula. La humedad relativa óptima varía entre 60 y 80 %; un exceso de humedad en el suelo y de riego puede llegar a provocar la aparición de plagas y enfermedades y disminuir considerablemente el rendimiento. En general la planta de tomate necesita un período entre 3 y 4 meses entre su establecimiento y la cosecha del primer fruto (Van Haeff *et al*., 1990; Escalona *et al*., 2009).

2.4. Enfermedades más importantes del tomate en Cuba

Para que se pueda manifestar una enfermedad, se deben asociar tres factores, cuya importancia es relativa en cuanto a la susceptibilidad a un determinado microorganismo fitopatógeno y la severidad de su interacción. Un primer factor está asociado a la presencia de los microorganismos fitopatógenos en el medio, lo cual corresponde a la dinámica ecológica de los suelos en cuanto a la diversidad y a la regulación poblacional. Otro factor corresponde a la condición del hospedante, teniendo en cuenta sus etapas fenológica y metabólica. Al medio ambiente corresponde el tercer factor en este sistema, especialmente referido a las condiciones edafoclimáticas en las cuales establecemos los cultivos (Escalona *et al*., 2009).

Los problemas fitosanitarios constituyen la principal limitante del cultivo de tomate en el mundo y en Cuba, por su importancia destacan las causadas por hongos como: *Alternaria solani, Stemphylium solani*, *Passalora fulva*, *Corynespora cassiicola*, *Phytophthora infestans*, y las bacterianas como: *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Mayea *et al*., 1983; Gato, 2006).

2.4.1. Tizón temprano causado por *Alternaria solani* Sorauer

Afecta principalmente a las hojas, tallos, flores y frutos, de manera principal al tomate y la papa. En las hojas se ven manchas circulares con anillos concéntricos de color pardo oscuro, alrededor se puede observar un halo clorótico amarillento, sobre el tejido necrosado se puede observar las conidiosporas del hongo semejante a un polvillo de color negruzco. La infección comienza por las hojas más viejas y pueden extenderse a todo el follaje, causando la defoliación total de la planta. En el tallo y las ramas aparecen manchas de color negro profundas que pueden extenderse por toda el área y llegar a producir la muerte de la planta. Los frutos cuando son atacados presentan lesiones similares alas de las hojas y se manifiesta cuando se aproximan a la madurez. Las condiciones de temperatura favorable para que se desarrolle la enfermedad varían desde 26 a 30 ºC (Agrios, 2005; Martínez *et al*., 2007).

2.4.2. Mancha gris de la hoja causada por *Stemphylium solani* Webber

Afecta principalmente a las hojas más viejas. Inicialmente aparecen pequeños puntos de color café negruzco en el envés de la hoja, que luego se expanden hasta alcanzar de unos 2 a 4 mm, de forma algo circular y rodeada de un halo amarillento. Asimismo cuando el grado de afectación es muy severo estas manchas se tornan de un color gris plateado. Al desarrollarse muchas lesiones, la parte afectada se vuelve amarillenta y posteriormente las hojas se caen y se produce la defoliación de la planta, dejando los frutos expuestos directamente al sol, los cuales no alcanzan un buen desarrollo, y por tanto se reduce considerablemente la producción (Agrios, 2005; Martínez *et al*., 2007).

Los frutos y los tallos no son afectados por este hongo. Generalmente para que se desarrolle esta enfermedad requiere una temperatura de 25 ºC y una alta humedad relativa (Agrios, 2005).

2.4.3. Moho de las hojas causado por *Passalora fulva* (Cooke) U. Braun y Crous

Es un microorganismo fitopatógeno que afecta a la parte foliar de la planta, pero también puede llegar a afectar a las flores y frutos. En las hojas aparecen en el haz manchas cloróticas de forma indefinida, en un grado de afectación más avanzado se forma en el envés un moho aterciopelado de color verde oliva donde se puede apreciar la fructificación del hongo, las hojas del estrato inferior son las

primeras en infectarse llegando a afectar a todo el follaje, y por ende causan la defoliación total de la planta. Este microorganismo fitopatógeno puede sobrevivir en el suelo por lo menos durante un año. Para que se desarrolle esta enfermedad se requiere una temperatura entre 20 a 25 ºC y una humedad relativa superior al 90% (Corpeño, 2004; Bernal, 2007; Martínez *et al*., 2007).

2.4.4. *Corynespora cassiicola* (Berk. &Curt.) Wei.

Este hongo generalmente ataca a las plantas adultas al inicio de la floración. Afecta principalmente hojas, tallos y frutos. En las hojas se observan pequeñas manchas puntiformes acuosas en los bordes, que gradualmente van aumentando de tamaño, y son de color marrón con un estrecho halo amarillento. Con el progreso de la enfermedad las lesiones causadas por este hongo se introducen rápidamente por las estomas de las hojas dando la apariencia de color grasienta. Las hojas infectadas se secan y permanecen unidas al peciolo. Cuando el grado de afectación es severo puede producir un atizonamiento, dando el aspecto de haber quemado el follaje de la planta (Agrios, 2005).

En los frutos aparecen manchas iguales a las hojas, cubiertas con una vellosidad negra, que progresivamente van aumentando de tamaño y con posterior hundimiento de la lesión, cuyo centro toma color blanco. El tejido adyacente del fruto, cerca de la zona infectada, se descompone rápidamente y provoca maduración prematura de los frutos y además esporulación sobre la mancha. Esta

enfermedad tiene muchos hospedantes, lo que hace difícil su control (Agrios, 2005).

2.4.5. Tizón tardío causado por *Phytophthora infestans* Mont de Bary

Afecta principalmente a hojas, tallos y frutos. En el follaje puede aparecer en cualquier fase de desarrollo del cultivo. En un principio toman la apariencia de manchas húmedas circulares o irregulares de color café oscuro, por lo general aparecen en las puntas o bordes de las hojas inferiores con el avance de la enfermedad; estas manchas se tornan de color parduscas y se agrandan tomando forma circular. En condiciones de prolongada humedad, todos los órganos más tiernos y aéreos de la planta se marchitan y se pudren con gran rapidez, desprendiendo un olor característico, además se puede observar el hongo en forma de moho blancuzco muy fino formado por la esporulación del mismo. En el tallo se observan las manchas de color gris verdoso de apariencia acuosa (Mayea *et al*., 1983; Agrios, 2005; Martínez *et al*., 2007).

En los frutos la enfermedad puede aparecer en cualquier estado de su desarrollo, aunque los frutos no maduros son los más susceptibles. En estos se observan manchas pardas vítreas, de forma irregular, con mucha frecuencia cerca del pedúnculo que se agrandan lentamente tomando el aspecto de arrugadas y de consistencia firme. Con el progreso de la enfermedad, y en poco tiempo, pueden llegar a cubrir toda la planta dando el aspecto de quemado o atizonado. Para que

la enfermedad se desarrolle debe existir una temperatura de 20 ºC y alta humedad (Corpeño, 2004; Martínez *et al*., 2007).

2.4.6. *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dowson

Los síntomas de esta enfermedad se reflejan en pequeñas manchas (3 mm) irregulares de color gris púrpura que presentan un halo amarillo estrecho y con la parte central de color negro fundamentalmente en el envés de las hojas. La infección en los frutos ocurre normalmente cuando están verdes, y aparecen en ellos pequeñas manchas oscuras, con halos de color blanco-verduzcos que se extienden hasta alcanzar un diámetro aproximado de 3 a 6 mm, poco después los halos desaparecen y las manchas cambian de color de pardo a negro. Cuando las manchas son numerosas pueden causar la deformación del fruto. La enfermedad se propaga fácilmente con temperaturas de 24-30 ºC junto con riego por aspersión o mucha lluvia, todo lo cual favorece el desarrollo de este microorganismo fitopatógeno (Corpeño, 2004; Agrios, 2005; Martínez *et al*., 2007).

2.5. Control biológico

2.5.1. Introducción

En los últimos años el control biológico de plagas y enfermedades en la agricultura ha adquirido gran importancia frente a los problemas fitosanitarios ocurridos por el uso indiscriminado de plaguicidas químicos en la agricultura, lo cual ha traído como consecuencia severos problemas de contaminación al medio ambiente y ha

generado la resistencia de plagas y enfermedades, así como la presencia de nuevas especies de microorganismos fitopatógenos con un grado de afectación más virulento (Bravo *et al*., 2006).

La mayoría de los microorganismos fitopatógenos tienen antagonistas biológicos o naturales que se pueden emplear como estrategia de lucha en un programa de control biológico. En los últimos años el empleo de bacterias y hongos antagonistas de enfermedades agrícolas ha cobrado una singular importancia, debido a que no solo actúan contra un grupo determinado de microorganismos fitopatógenos (como lo hacen los plaguicidas químicos), sino que se están utilizando para un grupo muy amplio de microorganismos fitopatógenos (Pérez, 2004; Mondino y Vero, 2006).

Aunque el control biológico no pretende reemplazar completamente los sistemas de control químico, puede ser utilizado junto con otras técnicas como parte de un sistema integrado de control. No hay que olvidar que el control biológico tiene unas propiedades y requerimientos muy distintos de los métodos de control tradicionales, y ha de ser puesto en práctica integrándolo con los métodos y con las estrategias de producción existentes actualmente. El control biológico depende de un funcionamiento efectivo del microorganismo antagonista apropiado para cada ecosistema particular planta-patógeno (Pérez, 2004).

2.5.2. Definición

Pérez (2004), define el control biológico como la utilización de microorganismos naturales o modificados, para reducir los efectos de organismos indeseables, favoreciendo al mismo tiempo el desarrollo de los microorganismos beneficiosos para las plantas. Los microorganismos antagonistas comprenden cualquier organismo que interfiere en la supervivencia o desarrollo de los microorganismo fitopatógenos (Ezziyyani *et al*., 2006).

2.6. Antagonistas microbianos como agentes de biocontrol en enfermedades de las plantas

2.6.1. Introducción

Varios tipos de microorganismos (hongos, bacterias y virus) se han descrito como agentes de control biológico de enfermedades en cultivos. Prácticamente todas las plagas y enfermedades son afectadas en alguna medida por organismos antagonistas. En muchos casos estos entes biológicos representan el factor más importante en la regulación de las poblaciones de microorganismos fitopatógenos en la naturaleza (Pérez, 2004; Ezziyyani *et al*., 2006; Mondino y Vero, 2006).

2.6.2. Mecanismos de acción

En la naturaleza existe una continua interacción entre los microorganismos fitopatógenos y sus antagonistas, de forma tal que ellos ayudan a la regulación natural de las enfermedades. En condiciones naturales los microorganismos están

en una proporción dinámica en la superficie de las plantas. No es fácil establecer con precisión los mecanismos que actúan en las interacciones entre los microorganismos antagonistas y los microorganismos fitopatógenos sobre la planta. En general los antagonistas tienen varios modos de acción y la combinación de estos es importante para poder elegir un antagonista ideal. Si estos poseen diversos modos de acción, se reducen los riesgos de que los microorganismos fitopatógenos adquieran resistencia, lo cual se logra mediante el uso de combinaciones de antagonistas con diferente modo de acción. Así, se han descrito varios mecanismos mediante los cuales los antagonistas ejercen su acción para controlar el desarrollo de microorganismos fitopatógenos (Michel-Aceves, 2001; Pérez, 2004; Mondino y Vero, 2006; Ezziyyani *et al*., 2006).

2.6.2.1. Antagonismo

Es una interacción entre microorganismos donde uno interfiere con el otro, es decir causa la pérdida o la actividad de uno de ellos. Esta es la base sobre la que se sustenta el verdadero control biológico de microorganismos fitopatógenos en las plantas (Pérez, 2004).

2.6.2.2. Antibiosis

Michel-Aceves (2001) y Pérez (2004) definen a la antibiosis como un proceso de interacción entre organismos en el cual uno o más metabolitos son excretados (enzimas hidrolíticas, metabolitos secundarios volátiles y pequeñas moléculas tóxicas) por un organismo y tienen efecto dañino sobre uno o más organismos,

normalmente actúan en bajas concentraciones. Además, los antibióticos y otros productos tóxicos que son volátiles (como el cianuro de hidrógeno), son capaces de afectar el crecimiento de las células de los microorganismos fitopatógenos.

2.6.2.3. Competencia

La competencia surge cuando al menos dos organismos requieren para su funcionamiento del mismo alimento. El consumo de uno reduce la cantidad disponible del otro; al final se impone uno de ellos. La competencia por nutrientes y espacio dentro de su nicho ecológico se realiza en la superficie de la hoja, es el principal mecanismo involucrado en el control de bacterias fitopatógenas; en el caso de hongos es variable. La competencia es un modo de acción indirecto (Michel-Aceves, 2001; Pérez, 2004; Mondino y Vero, 2006).

2.6.2.4. Fungistasis

Consiste en imponer condiciones de inactividad especialmente para las esporas de hongos por limitación en los nutrientes (Pérez, 2004).

2.6.2.5. Resistencia sistémica adquirida

Consiste en una o varias moléculas (no necesariamente antagonistas de fitopatógenos) con la capacidad de inducir autodefensas en las plantas frente a la acción del cualquier microorganismo fitopatógeno. Existen dos tipos de resistencia: la constitutiva, propia de la planta y que se expresa en cualquier momento, y la inducida, expresada solo ante determinados estímulos. Las interacciones planta-patógeno son de dos tipos: compatible, cuando ocurre la

enfermedad, e incompatible, cuando la planta resiste. De ahí se sustenta la teoría del gen para el gen. (Pérez, 2004; Mondino y Vero, 2006).

2.6.2.6. Micoparasitismo

Es la acción antagónica entre dos hongos, el uno (hiperparásito) parasita al otro (micoparásito) a través de una síntesis de exoenzimas hidrolíticas para facilitar la degradación de la pared celular del hospedante. Un antagonista puede utilizar a un hongo como fuente de alimento. Basado en el micoparasitismo se dividen en dos grupos: biotrópicos, tienen un rango restringido de hospedantes, y necrotrópicos, matan a la célula antes o después de la invasión, excretan sustancias tóxicas y utilizan sus nutrientes (Michel-Aceves, 2001; Pérez, 2004).

2.6.3. Microorganismos como controladores biológicos de enfermedades

2.6.3.1. *Trichoderma* sp.

Varias investigaciones han demostrado que el control biológico a través del uso de hongos benéficos como *Trichoderma* es una alternativa potencial respecto al uso de fungicidas o fumigantes en la agricultura (Paredes-Escalante *et al*., 2009).

Agrios (2005), afirma que el género *Trichoderma* comprende un conjunto de especies sin fase sexual evidente (anamorfo). Pertenece a la Subdivisión *Deuteromycotina*. Clase *Hyphomycetes*. Orden *Hyphales* (*Moniliales*) y Familia *Moniliaceae*. Hasta el momento no se conoce que dicho hongo sea patógeno de

ninguna planta, exceptuando a *T*. *viride*; sin embargo, es capaz de controlar e hiperparasitar muchos hongos, nematodos y otros fitopatógenos, que atacan y destruyen los cultivos (Cueva, 2007). Actualmente se conoce las siguientes especies del género *Trichoderma*: *harzianum*, *hamatum*, *virens*, *koningii*, *viride*, *aureoviride*, *atroviride*, *pseudokoningii*, *polysporum*, *reesei*, *longibrachiatum*, *asperellum*, *lignorum*, *spirale* y *album* (Michel-Aceves, 2001; Cruz, 2007; Cobos, 2010).

El género *Trichoderma* es un grupo de hongos aislados del suelo que se reproducen asexualmente. Además, es un hongo filamentoso anamórfico, heterótrofo, aerobio facultativo, con una pared celular compuesta de quitina, de rápido crecimiento. De conidióforo hialino muy ramificado no verticilado, fiálides individuales o en grupos, conidios hialinos de una célula, ovoides, nacidos en pequeños racimos terminales. Muchas cepas crecen eficientemente en medios sólidos o líquidos y en un amplio rango de temperaturas, además son relativamente tolerantes a humedades bajas y tienden a crecer en suelos ácidos (Michel-Aceves, 2001; Cruz, 2007). Los mecanismos de acción antagonista con que actúa frente a los hongos fitopatógenos son: competencia por espacio y nutrientes, micoparasitismo, antibiosis, la secreción de enzimas y la producción de compuestos inhibidores (Infante *et al*., 2009).

Ezziyyani *et al*. (2004) manifiestan que *T*. *harzianum* controla a *Phytophthora capsici*, agente causal de la podredumbre de pimiento, aumentando los niveles de enzimas hidrolíticas β-1,3-glucanasa (lisis enzimática), ejerciendo una mayor

competencia por espacio y nutrientes e interacciona directamente con el microorganismo fitopatógeno (micoparasitismo), todo lo cual juega un rol importante en la reducción y destrucción del microorganismo fitopatógeno. Además, los géneros de *T*. *harzianum* y *longibrachiatum* han demostrado efectividad al reducir *in vitro* hasta un 65% las enfermedades causadas por *Alternaria solani* Sorauer y *Phytophthora infestans* Mont de Bary en tomate. También se ha demostrado que las especies del género *Trichoderma* tienen una amplia gama de hospedantes, y dentro de ellos se encuentran los hongos fitopatógenos, tales como: *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* sp, *Paracercospora fijiensis*, *Rhyzopus stolonifer*, *Mucor* spp., *Penicillium digitatum*, *Aspergillus niger* y *Pythium* sp., *Alternaria* sp., entre otros (Michel-Aceves *et al*., 2008; Cholango, 2009; Guédez *et al*., 2009; Guilcapi, 2009; Infante *et al*., 2009).

2.6.3.2. Bacterias como controladores biológicos de enfermedades

Las bacterias forman parte de la gran cantidad de microorganismos biológicos que existen como agentes de control de enfermedades fúngicas y bacterianas, tanto en la parte aérea como en la raíz de las plantas hospederas, y están presentes en la rizosfera, además favorecen el crecimiento y desarrollo de las plantas (Mondino y Vero, 2006).

A este grupo de bacterias antagonistas de enfermedades se le denomina PGPB (*Plant Growth Promoting Bacteria*), es decir aquellas asociadas a las plantas que

promueven el crecimiento de ellas. Dentro de los mecanismos para la promoción del crecimiento vegetal podemos encontrar: mecanismos directos, son aquellos en donde los microorganismos actúan sobre la planta, dentro de ellos podemos encontrar a los promotores del crecimiento vegetal (auxinas, giberelinas y citoquininas), y mecanismos indirectos, aquellos en donde el microorganismo es capaz de inhibir diferentes microorganismo fitopatógenos (hongos y bacterias) que interfieren con el desarrollo de la planta y son neutralizados por diversos mecanismos como: competencia por espacio o nutrientes, producción de metabolitos y antibióticos, secreción de diversas enzimas hidrolíticas que degradan la pared celular de los microorganismo fitopatógenos, producción de sideróforos (los producidos por estas bacterias tienen mayor afinidad por compuestos de hierro) y el incremento de la capacidad de respuesta sistémica de la planta frente a los microorganismo fitopatógenos. Dentro de este grupo se puede mencionar a las *Pseudomonas* (*aeruginosa*, *fluorescens*, *putida*), *Bacillus* y *Burkholderia*, que son las más usadas en el control de enfermedades en plantas (Mondino y Vero, 2006; Gato, 2006; Rodríguez *et al*., 2009).

a) Bacterias del género *Pseudomonas*

Las rizobacterias del género *Pseudomonas* han sido estudiadas como importantes agentes de biocontrol por su capacidad de inhibir el crecimiento de ciertos microorganismos fitopatógenos, como bacterias, hongos, nematodos y virus, los cuales pueden llegar a reducir considerablemente la producción de cultivos. Estos

organismos ejercen ciertos mecanismos de acción antagonista que involucran la producción de compuestos bacterianos como: sideróforos, ácido cianhídrico y antibióticos. Además, se ha comprobado que inducen un sistema de resistencia en las plantas que hace que puedan tolerar el ataque de diversos microorganismo fitopatógenos del suelo (Chaves, 2007).

P. *fluorescens* es un cocobacilo Gram negativo que se encuentra como saprófito en el suelo y es ampliamente conocido por ser una PGPR. Abunda en la superficie de las raíces, y es versátil en su metabolismo, además puede utilizar varios sustratos producidos por ellas mismas, y no establecen una relación simbiótica con la planta. Entre sus mecanismos de acción se encuentran el aumento de la toma de agua y nutrientes por la planta, la solubilización de fosfatos, la producción de reguladores del crecimiento vegetal y el control biológico de microorganismo fitopatógenos, la producción de sideróforos, la antibiosis y la inducción de resistencia a la planta, mediante la producción de ácido salicílico, el cual actúa como una molécula de señalización que activa la “resistencia sistémica inducida” (RSI) (Gato, 2006; Rodríguez *et al*., 2009).

La especie *P*. *aeruginosa* fue aislada por primera vez de muestras ambientales. Debido a que las colonias son pigmentadas, tiene el color característico de azul-verdoso hidrosoluble debido a la producción de pigmentos. Además, es un bacilo Gram negativo aerobio, muy versátil metabólicamente, pudiendo utilizar más de 80 compuestos orgánicos como fuentes de carbono y energía. Es oxidasa positiva y puede crecer a temperaturas superiores a 42 °C. Dicha bacteria produce toxinas

como la piocianina, puede colonizar una amplia variedad de cultivos y ser antagonista de diversas enfermedades fúngicas (Gato, 2006; Ruiz, 2007).

b) Bacterias del género *Bacillus*

El género *Bacillus* se caracteriza por ser bacterias Gram positivas, no patogénicas, con propiedades antagonistas, son de forma bacilar, aerobias estrictas o anaerobias facultativas, en condiciones estresantes forman una endospora que es termorresistente a los factores físicos (desecación, radiación, ácidos y desinfectantes químicos), es decir tiene la capacidad de formar esporas que sobreviven y permanecen metabólicamente activas bajo condiciones adversas. (Lisboa, 2003; Chaves, 2007; Rodríguez y Martín, 2009).

Muchas especies producen enzimas hidrofílicas extracelulares que descomponen los polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos, permitiendo que el organismo emplee estos productos como fuentes de carbono y donadores de electrones. También producen antibióticos (bacitracina, polimixina, tirocidina, gramicidina y circulina), lipopéptidos que actúan como biosurfactantes y solubilizadores de fosfatos, son buenas secretoras de proteínas y metabolitos, fáciles de cultivar y altamente eficientes para el control de plagas y enfermedades. Los mecanismos de acción de *Bacillus* como antagonista de enfermedades fúngicas y bacterianas son: competencia por espacio y nutrientes, antibiosis, inducción de resistencia, y promotores del crecimiento de las plantas (Chaves, 2007; Rodríguez y Martín, 2009).

c) Bacterias del género *Burkholderia*

El género *Burkholderia* está compuesto por: bacilos rectos; Gram negativos; oxidasa y catalasa positivos; con una proporción de G+C que oscila entre el 59 y el 69,5 %. Son bacterias móviles con un flagelo polar único o bien con un penacho de flagelos polares según las especies. También son mesófilos y no esporulados. Su metabolismo es aerobio y muy versátil. Como sustancia de reserva utilizan el polihidroxibutirato (Stoyanova *et al*., 2007; Parra, 2009).

Burkholderia cepacia fue descubierta por Walter Burkholder en 1949 en las catáfilas de cebolla y en su epidermis radicular. La identificación y clasificación de la *B*. *cepacia* es extremadamente complicada; se conoce ahora como un "complejo *Burkholderia cepacia*" y está compuesto por al menos 9 especies distintas que constituyen los denominados "genomovars" o genotipos: *B*. *cepacia*, *B*. *multivorans*, *B*. *cenocepacia*, *B*. *vietnamienses*, *B*. *dolosa*, *B*. *ambifaria*, *B*. *anthina* y *B*. *pyrrocinia*; con la excepción de *B*. *mallei*y B. *pseudomallei*, las que son patógenas de animales y humanos. El género *Burkholderia* ecológicamente es saprófito, es decir que interviene en el reciclaje de materia orgánica, además es uno de los géneros bacterianos utilizados para biorremediación de herbicidas y plaguicidas recalcitrantes, como agentes de control biológico de hongos fitopatógenos y para promover el crecimiento de las plantas (Stoyanova *et al*., 2007; Parra, 2009).

Parra *et al*. (2009) y Trujillo *et al*., (2007) quienes exponen la actividad antifúngica de *B*. *cepacia* aislada del maíz amarillo, lograron inhibir la esporulación de los hongos como *F*. *solani*, *F*. *moniliforme*, *F*. *oxysporum*, *Aspergillus niger*, *Penicillium expansum*, *A*. *alternata* y *Curvularia* sp., además indican que esta bacteria produce sustancias químicas quinolisidínicas de naturaleza antibiótica, y antibióticos como: A. cepacidina, B. xilocandina y pirrolnitrina, capaces de inhibir el desarrollo de diversos hongos fitopatógenos.

En Venezuela se ha utilizado la bacteria *B*. *cepacia* en control de enfermedades en especies forestales como la mancha azul en *Pinus caribae* causada por *Lasiodiplodia theobromae*; también muchas especies del complejo *B*. *cepacia* se han utilizado en biorremediación ambiental por su capacidad de degradar plaguicidas recalcitrantes. (Alemán *et al*., 2003, Benítez y McSpadden, 2008). Un aspecto importante a señalar sobre esta bacteria es: la capacidad de inhibir a hongos entomopatógenos y a antagonistas como *Beauveria bassiana* y *Trichoderma harzianum*, por lo que se debe tener cuidado si se usa en combinación para un programa de Manejo Integrado de Plagas. (Santos *et al*., 2004; Parra, 2009).

2.7. Quitosana

La Quitosana es un producto obtenido de la desacetilación alcalina de la quitina, que es el principal componente del exoesqueleto de crustáceos como el camarón y el cangrejo. Las propiedades antimicrobianas de la Quitosana eran conocidas

por el hombre desde la antigüedad, por lo cual la usaban como cicatrizante de heridas. El uso en la agricultura comenzó su auge en la década de los setenta, aunque actualmente se siguen descubriendo otros usos de este compuesto (Lárez, 2008; Porras *et al*., 2009).

Son muchos los resultados exitosos de la utilización de Quitosana, así podemos mencionar los experimentos de Sánchez-Domínguez *et al*. (2007) quienes estudiaron el efecto *in vitro* de Quitosana en el desarrollo y morfología de *Alternaria alternata* en tomate, y obtuvieron reducción del grado de inhibición y crecimiento de este hongo en un 50,6%.La Quitosana en los últimos años se ha demostrado tener un efecto negativo contra diversos hongos fitopatógenos. Esto dependerá del grado de polimerización, de acetilación, naturaleza del hospedante, composición de los nutrientes, condiciones del medio ambiente y período de incubación; además, mientras menor sea el grado de polimerización de la Quitosana menor será el número de especies de hongos que controle (Porras *et al*., 2009).

Lárez (2008) y Fernández (2010) reportan que la Quitosana tiene diversas propiedades como: actividad antibacteriana (controla un gran número de bacterias Gram negativas mediante la interacción electrostática con diferente grado de acetilación), actividad antifúngica (controla las enfermedades como: *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium solani*, *Phytophthora capsici*, *Pythium debaryanum* y *Sclerotium rolfsii*) y actividad antiviral (una solución acuosa 0,1% de Quitosana controla completamente la infección en hojas de frijoles

producida por el virus del mosaico de la alfalfa (AMV), el virus de la necrosis del tabaco (TMV), virus del no crecimiento del maní, virus del mosaico del pepino y el virus X de la papa.

Asimismo se ha demostrado la inhibición del viroide que afecta a las solanáceas, denominado potato spindle tuber viroid. Además de ser antagonista de diversos microorganismo fitopatógenos en plantas, se ha señalado que Quitosana estimula el crecimiento de la planta e induce a la resistencia frente al ataque de microorganismo fitopatógenos (Lárez, 2008; Rodríguez-Pedroso *et al*., 2006).

CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Generalidades

3.1.1. Localización del Área de Estudio

El trabajo de investigación se realizó en dos fases: la fase de campo se ejecutó en el organopónico “El Minero”, ubicado en las calles Unión y Caridad en la ciudad de Santa Clara, Cuba, y la fase de laboratorio se efectuó en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas en el período comprendido de enero a abril de 2011. Se utilizaron posturas de tomate híbrido var. “Esem”-2 de crecimiento indeterminado, de procedencia canadiense y de 30 días de edad, las cuales fueron plantadas en parcelas de 2 m x1 m, en un sustrato (con una relación 1:1)compuesto por suelo agrícola (pardo medianamente lixiviado) y humus de lombriz.

Las variables climáticas fueron registradas en la Estación Meteorológica del “Yabú”, durante el período de desarrollo de la investigación (Tabla 1).

Tabla 1. Variables climáticas registradas durante el ensayo (enero-abril, 2011)

Variables Climáticas	Meses											
	Enero			Febrero			Marzo			Abril		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
T. máxima	27,2	27,3	26,4	29,9	26,3	29,5	29,2	28,2	31,9	32,2	32,7	32,5
T. mínima	14,1	18,3	18,2	18,1	16,2	18,7	17,8	14,8	17,5	19,5	19,1	20,2
Humedad Relativa	79	83	83	82	82	79	80	78	71	73	68	73
Lluvia acumulada	0	3,8	92,8	18,5	4,9	0	3,6	0	12,5	7,5	0	90,7

3.1.2. Diseño experimental empleado

El diseño experimental empleado en la investigación fue en bloques completos aleatorizados (Figura 1).

Los tratamientos empleados fueron:

- Testigo absoluto (T. a.)
- Tebuconazol más Triadimenol (T.T.) Dosis: 2 cm^3/ 2 litros.
- *Pseudomonas fluorescens* (P. f.). Procedente de la American Type Culture Collection (ATCC), de Bélgica, a una concentración entre 6,6 x 10^9 y 4,5 x 10^9ufc/mL en 2 litros de agua.
- *Pseudomonas aeruginosa* (P.a.). Procedente de ATCC (Bélgica) a una concentración entre 1,8 x 10^9 y 5,3 x 10^9ufc/mL en 2 litros de agua.

- *Bacillus subtilis* (B. s.). Procedente de ATCC (Bélgica) a una concentración entre 1,5 x 10^9 y 6,5 x 10^9ufc/mL en 2 litros de agua.
- *Burkholderia cepacia* (B. c.). Procedente de ATCC (Bélgica) a una concentración entre 4,9 x 10^9 y 7,8 x 10^9ufc/mL en 2 litros de agua.
- *Trichoderma viride* (T.v.) Procedente del Laboratorio de Microbiología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agropecuarias a una concentración entre 5,2 x 10^9 y 8 x 10^9 ufc/mL en 2 litros de agua.
- Quitosana(Q), procedente de la compañía Chitoplant (Alemania) a una concentración de 1 g / litro (0,1 %)

N

T. a.	**P. f.**	**B. s.**	**T. T.**	**Q.**	**B. c.**	**P. a.**	**T. v.**	**RÉP. I**
P. a.	**B. c.**	**Q.**	**B. s.**	**T. a.**	**P. f.**	**T. v.**	**T. T.**	**RÉP. II**
Q.	**P. a.**	**T. a.**	**P. f.**	**B. s.**	**T. v.**	**T. T.**	**B. c.**	**RÉP. III**

Figura 1. Diseño experimental en Bloques al Azar

- Número de tratamientos: 8
- Número de réplicas: 3
- Número de unidades experimentales (UE): 24

- Número de posturas por UE: 16
- Número de posturas por repetición: 128
- Número de plantas a evaluar por UE: 9
- Número total de posturas: 384
- Marco de siembra: 0,70 x0,25 m.
- Edad de la postura en el momento de la siembra: 30 días
- Fecha de siembra: 21/01/2011
- Total de plantas a evaluar: 27
- Variedad de tomate utilizada: Esem-2
- Lugar de procedencia de la variedad: Canadá

3.1.3. Metodologías de evaluación de los tratamientos

3.1.3.1. Preparación del inóculo

El inóculo para la multiplicación de las bacterias se preparó a partir de caldo nutriente. Para la activación de cada una de las cepas bacterianas se añadieron 5 mL del caldo nutriente en un tubo de ensayo y con el asa de siembra se barrió con todo el crecimiento bacteriano. Se sembró cada una de las bacterias por separado y fueron incubadas durante 48 horas a 28 ºC± 1 ºC.

El inóculo para *Trichoderma viride*, se preparó a partir del medio de cultivo (miel final de caña 30 g, levadura de torula 3 g y agar al 2%), seguidamente se añadió un litro de agua destilada estéril y se realizaron los mismos pasos que los empleados en las bacterias.

3.1.3.2. Aplicación de los tratamientos

A los 27 días después de la plantación de las posturas de tomate (57 días de edad de la planta), se inició la aplicación de los microorganismos mediante el empleo de un atomizador hasta los 93 días de edad de la planta. Se realizaron cuatro aplicaciones cada 10 días. Todas las aplicaciones se realizaron en horas de la tarde. Cabe destacar que para todas las aplicaciones se utilizó una solución de 200 mL del inoculo fúngico o bacteriano más 1 800 mL de agua, con un volumen de la solución final de 2 litros por cada tratamiento hasta el goteo.

3.1.4. Procesamiento estadístico

El procesamiento estadístico de los datos consistió en el análisis de la varianza en correspondencia con un Diseño de Bloques al Azar, complementándose con una comparación de medias mediante la prueba de Duncan. Se empleó el paquete estadístico STATGRAPHICS Centurión ver. XV- II de 2006.

3.2. Identificación de los principales agentes fitopatógenos

Para el aislamiento y la identificación de los principales agentes fitopatógenos se aplicaron las técnicas conocidas. El 15 de febrero de 2011, se realizó un muestreo visual de las plantas de tomate en todos los tratamientos y se observaron los primeros síntomas de las enfermedades. Se tomaron las muestras de hojas y se

trasladaron al Laboratorio de Fitopatología de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, donde se lavaron con abundante agua corriente y luego se cortaron en pequeños fragmentos de aproximadamente 1 cm^2, a continuación se colocaron sobre un papel de filtro dentro de una placa de Petri y se las incubaron a una temperatura de 28 ºC ± 1 ºC por 48 horas.

Para la identificación de los hongos se realizó primero una observación directa al microscopio estereoscopio, y se seleccionó la muestra más representativa. Posteriormente se efectuó un montaje de dicha muestra en un portaobjetos, añadiéndose gotas de lactofenol blanco cuando las estructuras del hongo son hialinas y cuando no lo son se le coloca lactofenol azul. Seguidamente se observó al microscopio óptico la presencia de las estructuras fúngicas y se comparó con la clave ilustrada de hongos imperfectos de Barnett y Hunter (1987).

En cuanto a la identificación y caracterización de las enfermedades bacterianas, se procedió a identificar las plantas que tenían síntomas de bacteriosis, para lo cual se recolectaron muestras de hojas enfermas y se trasladaron al Laboratorio de Fitopatología.

Se realizaron en total 5 evaluaciones durante el ensayo para evidenciar la presencia de enfermedades fúngicas o bacterianas.

3.3. Evaluación del efecto antagonista de las bacterias y sustancias naturales sobre los principales agentes fitopatógenos foliares del tomate

Para la evaluación de la intensidad de ataque de las enfermedades foliares se tomaron 9 plantas para cada tratamiento. Se empleó una escala de seis grados según Rivas (1981) y Bernal (2006). Se calculó el grado de ataque de la enfermedad según la fórmula descrita por Vázquez (2008). Las evaluaciones se efectuaron 5 días después de cada aplicación.

$$GA = \left(\frac{\sum(a \times b)}{(n \times k)}\right) x\ 100$$

Fuente: Vázquez (2008)

Donde:

GA = Grado de Ataque de la enfermedad

∑ (a x b) = Sumatoria del número de plantas u órganos enfermos o infectados según el grado de afectación (0, 1, 2, 3, 4, 5)

n = Número de plantas evaluadas

k = Valor o grado mayor de la escala (en este caso 5)

3.3.1. *Alternaria solani* Sorauer

Tabla 2. Escala para evaluar *Alternaria solani*

Grado	Categoría de ataque
0	Sin síntomas
1	Aparición de las primeras manchas
2	Hasta un 10 % AFA*
3	Desde 11 - 25 % AFA
4	Desde 26 -50 % AFA
5	Más 50 % AFA

* AFA = Área Foliar Afectada

Fuente: Bernal (2006)

3.3.2. *Stemphylium solani* Webber

Tabla 3. Escala para evaluar *Stemphylium solani*

Grado	Categoría de ataque
0	hojas sanas
1	1-5 manchas / hoja
2	6 -10 manchas / hoja
3	11-15 manchas / hoja
4	16-20 manchas / hoja
5	> 20 manchas / hoja

Fuente: Bernal (2006)

3.3.3. *Passalora fulva* (Cooke) U. Braun y Crous

Tabla 4. Escala para evaluar *Passalora fulva*

Grado	Categoría de ataque
0	hojas sanas
1	1-20 %
2	21-40 %
3	41-60 %
4	60-80 %
5	> 81 %

Fuente: Rivas (1981)

3.3.4. *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dowson

Tabla 5. Escala para evaluar *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*

Grado	Categoría de ataque
0	hojas sanas
1	1-15 %
2	16-30 %
3	31-45 %
4	46-60 %
5	> 61 %

Fuente: Robles (2011)

3.4. Otros agentes fitopatológicos

Se recolectaron muestras de órganos vegetativos que presentaban síntomas de ataque de enfermedades, las cuales fueron trasladadas al Laboratorio de Fitopatología, donde se lavaron con abundante agua corriente y luego se cortaron en pequeños pedazos de aproximadamente 1 cm^2, después se colocaron sobre un papel de filtro dentro de una placa de Petri, se les añadieron agua destilada estéril y se incubaron a una temperatura de 28 ºC ± 1 ºC durante 48 horas.

Se hicieron montajes de las muestras en portaobjetos y se observaron al microscopio óptico para identificar los agentes causales mediante la ayuda de literatura especializada.

3.5. Determinación del efecto de los tratamientos sobre el rendimiento en tomate

Se realizó la evaluación del rendimiento del tomate el día 31 de marzo, para lo cual se procedió a cosechar y a pesar cada uno de los tratamientos y repeticiones. Seguidamente se realizaron los cálculos en kg por parcela.

3.6. Efecto bioinsecticida de las especies bacterianas estudiadas sobre *Myzus persicae* (Sulzer)

Se utilizó a la aralia (*Polyscis guilfoylei* Bailey) como planta hospedante de *M*. *persicae*. Se realizaron aplicaciones de las bacterias antagonistas: *P*. *fluorescens*: concentración 5 x 10^9, *P*. *aeruginosa*: concentración 5,8 x 10^9, *B*. *subtilis*: concentración 6,9 x 10^9 y *B*. *cepacia*: concentración 7,1 x 10^9 ufc/mL. Por cada bacteria se utilizó una solución final de 50 cm^3 compuesta por 40 cm^3 de agua destilada estéril más 10 cm^3 del inóculo bacteriano. El experimento consistió en utilizar cinco potes que contenían un sustrato (con una relación 1:1) compuesto por suelo agrícola (pardo con carbonato) y zeolita previamente humedecido.

En cada uno de los potes se colocó una estaca de aralia infestada con poblaciones de *M*. *persicae*. Se contó el número de insectos vivos antes de la aplicación, y los muertos posterior a esta, además se les colocó papel de filtro para recoger los insectos muertos y al testigo se le aplicó agua destilada estéril con atomizadores manuales. Para mantener la humedad y la circulación del aire se utilizaron bolsas de nylon perforadas.

Se realizó una repetición del experimento con la bacteria que mostró alta mortalidad de áfidos por lo que se realizó un nuevo ensayo utilizando tres diluciones: 1/10, 1/20 y 1/40. Se colectaron 5 insectos muertos por cada una de las diluciones y se sembraron en placas de Petri con medio agar nutriente, se

incubaron por 24 horas y se realizaron observaciones microscópicas y tinciones diferenciales para determinar la identidad de la bacteria. Los datos se procesaron mediante la prueba de Chi-cuadrado en tablas de contingencia y se utilizó el paquete estadístico STATGRAPHICS Centurión ver. XV- II de 2006.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Generalidades

4.2. Identificación de los principales agentes fitopatógenos

Durante el ensayo se identificaron mediante estudios de laboratorio las enfermedades fúngicas causadas por: *Alternaria solani*, *Stemphylium solani*, *Passalora fulva*, *Phytophthora* infestans, *Corynespora cassiicola*, *Cercospora* sp., y las bacterianas causadas por: *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Estos resultados coinciden con los encontrados por Mayea *et al.,* 1983 quienes realizaron estudios sobre enfermedades del tomate en Cuba.

4.3. Evaluación del efecto antagonista de las bacterias y sustancias naturales sobre los principales agentes fitopatógenos foliares del tomate

4.3.1. *Alternaria solani* Sorauer

Los períodos de evaluación fueron de 87 y 99 días. Se observan las mayores afectaciones, ya que en los meses en que se llevó a cabo la investigación se presentó un rango de temperatura entre 27 a 32,5 ºC, una humedad relativa entre 79 % a 83 % y una pluviosidad de 0 a 92,6 mm/mes. Estas son las condiciones

óptimas para que *A*. *solani* tenga una incidencia mayor con respecto al primer período de evaluación.

En la tabla 6 se presentan los resultados de la aplicación de los diversos medios de control sobre la incidencia de *A. solani*. Todos los tratamientos mostraron mayor efectividad que el testigo absoluto (T. a.). El análisis de la varianza a los 64 días mostró que los tratamientos presentaron diferencias estadísticas entre sí. Al realizar la prueba de Duncan ($p<0,05$) se observó que *Trichoderma viride* presentó diferencias significativas respecto a los demás con un error estándar de la media $[\mathrm{EE}(\overline{\mathrm{X}})]$ de ± 2,37, es decir tuvo mayor eficacia en la reducción del grado de afectación de la enfermedad.

Asimismo a los 75 días se observó que los tratamientos presentaron diferencias estadísticas. Al realizar la prueba de Duncan, ($p< 0,05$) los tratamientos no difieren estadísticamente entre sí con un $\mathrm{EE}(\overline{\mathrm{X}})$de ± 3,33. Estos resultados nos indican que todos los tratamientos mostraron igual efectividad en el control de *A*. *solani*.

A los 87 días de evaluación, el análisis de la varianza mostró diferencias estadísticas entre los tratamientos. Al realizar la prueba de Duncan ($p< 0,05$), nos expresó que el tratamiento con Tebuconazol más Triadimenol (testigo químico) superó significativamente a los tratamientos *P*. *fluorescens*, *P*. *aeruginosa*, *B*. *cepacia* y *T*. *viride*, pero no presentó diferencias estadísticas con *B*. *subtilis* con un $\mathrm{EE}(\overline{\mathrm{X}})$de ± 3,42, es decir que este tratamiento puede ser utilizado como complemento del producto químico.

Por último a los 99 días el análisis de la varianza reveló diferencias significativas entre los tratamientos. Los tratamientos, Tebuconazol más Triadimenol (testigo químico), *P*. *fluorescens* y *B*. *cepacia*, no mostraron diferencias estadísticas entre sí y con un $\mathrm{EE}(\overline{\mathrm{X}})$de ± 3,48. Sin embargo, superaron significativamente a los demás tratamientos.

Tabla 6. Efecto de los tratamientos evaluados sobre *Alternaria solani* Sorauer

Tratamientos	Tiempo de Evaluación			
	64 días	**75 días**	**87 días**	**99 días**
T. a.	34,07c	37,04a	54,07c	50,37c
T. T.	23,70b	34,07a	23,70a	37,78ab
P. f.	34,07c	37,78a	34,81b	42,96ab
P. a.	31,11bc	40,00a	37,04b	48,89b
B. s.	28,15b	36,30a	33,33ab	49,63c
B. c.	25,19b	34,81a	41,48b	35,56a
T. v.	11,85a	34,07a	45,93cd	48,15b
Q.	34,81c	38,52a	40,74b	48,15b

Medias con letras no comunes en una misma columna difieren por la prueba de Duncan a (p< 0,05)

En la figura 2 se muestra el efecto de los tratamientos en el comportamiento de *A*. *solani* a través del tiempo en los cuatro momentos de aplicación, donde se puede observar una distribución discontinua en la reducción del patógeno.

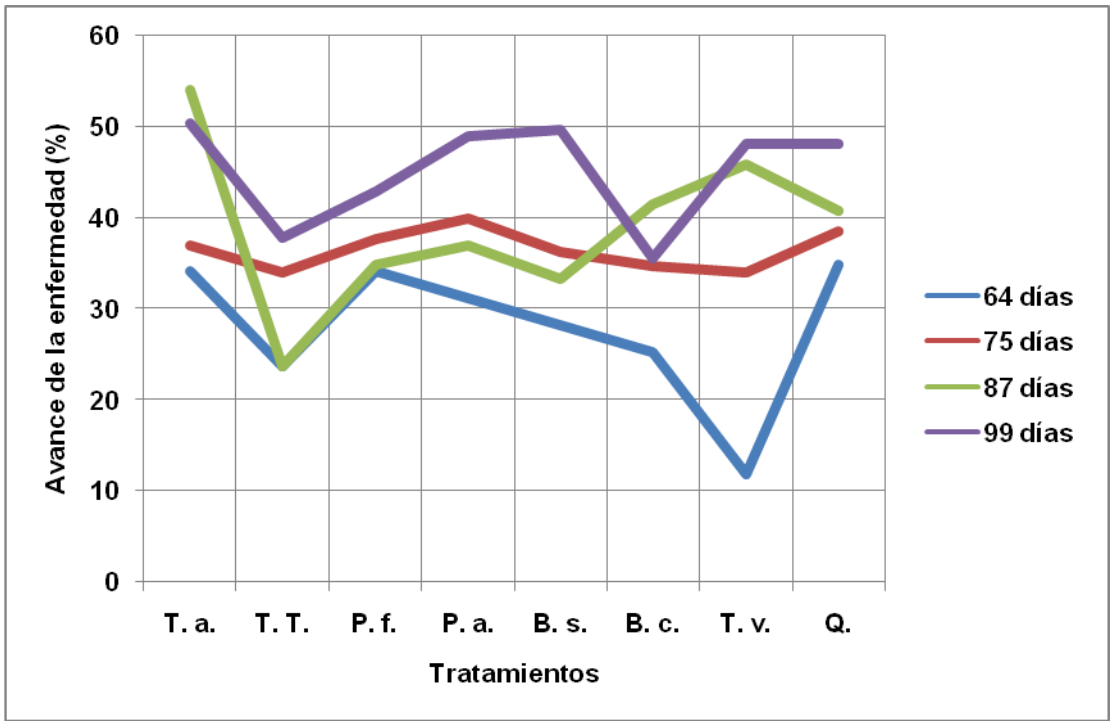


Figura 2. Comportamiento de *A. solani* en los cuatro momentos de aplicación

LEYENDA			
T. a	Testigo absoluto	**B. s**	*Bacillus subtilis*
T. T.	Tebuconazol más Triadimenol	**B. c**	*Burkholderia cepacia*
P. f	*Pseudomonas fluorescens*	**T. v.**	*Trichoderma viride*
P. a.	*Pseudomonas aeruginosa*	**Q.**	Quitosana

Los resultados obtenidos ratifican lo realizado por Michel-Aceves *et al*. (2008), quienes evaluaron el control biológico *in vitro* con *Trichoderma* sp., para el control de enfermedades fungosas del tomate, reduciendo el grado de afectación de *A. solani* y *P. infestans*. Este producto constituye una alternativa de control preventivo

de estas enfermedades en la agricultura urbana. Además, estos resultados reafirman que *T*. *viride* es un hongo antagonista de gran importancia en el control de enfermedades en cultivos, ya que controla una gran variedad de hongos fitopatógenos.

Además, se han realizado numerosos estudios sobre la utilización de bacterias antagonistas en el control de *A*. *solani*, como los realizados por Okumoto *et al*. (2001), quienes evaluaron la actividad quinolítica *in vitro* de dos cepas de *P*. *fluorescens* y 14 cepas de *Bacillus* sp., como antagonistas de *A*. *solani*, y concluyen que las cepas de *Bacillus sp*., son las que producen mayor capacidad quinolítica frente a la reducción de esta enfermedad.

En la cuarta evaluación se observa un porcentaje de avance del patógeno del 18% con respecto a la primera, pero este no sobrepasa el 52% de afectación. También se puede observar la eficacia de los medios de control biológico, como la aplicación de *B*. *cepacia*. Asimismo los resultados obtenidos en el presente estudio señalan la tendencia progresiva de esta bacteria en la disminución del grado de afectación de *A*. *solani*.

No hay estudios sobre la utilización de *B*. *cepacia* en el control de *A*. *solani*, pero podemos señalar las investigaciones realizadas por Parra *et*. *al*., (2009), quienes estudiaron la actividad antifúngica de *B*. *cepacia* aislada de maíz amarillo bajo diferentes condiciones de cultivo, redujeron el grado de afectación de *Fusarium solani y F. moniliforme*. Diversos estudios demuestran la capacidad de esta

bacteria de producir sustancias químicas quinolisidínicas de naturaleza antibiótica, además produce antibióticos como: A. cepacidina, B. xilocandina y pirrolnitrina; capaces de inhibir el desarrollo de diversos hongos fitopatógenos. (Trujillo *et al*., 2007; Parra *et al*., 2009)

4.3.2. *Stemphylium solani* Webber

Agrios (2005) y Martínez *et al*. (2006) afirman que *S*. *solani* se desarrolla muy bien a 25 ºC y una alta humedad relativa. Además, las condiciones ambientales de los meses donde se llevó a cabo la investigación favorecieron una mayor intensidad en las últimas dos evaluaciones.

En la tabla 7 se presentan los resultados de las aplicaciones de los diversos medios de control sobre la incidencia de *S*. *solani*. Todos los tratamientos mostraron mayor efectividad que el testigo absoluto (T. a.). El análisis de la varianza a los 64 días indica que los tratamientos presentaron diferencias estadísticas entre sí. Al realizar la prueba de Duncan ($p<0,05$) se observó que Quitosana presentó diferencias significativas respecto a los demás tratamientos, excepto con los tratamientos Tebuconazol más Triadimenol (testigo químico) y *B*. *subtilis* con $\mathrm{EE}(\overline{X})$de ± 2,54, es decir que el producto químico es sustituible, debido a la residualidad de sus componentes y la resistencia que genera por parte de los microorganismos fitopatógenos; además este resultado nos indica que estos dos tratamientos tuvieron una mayor eficacia en la reducción del grado de afectación de *S*. *solani*.

Asimismo a los 75 días se observó que los tratamientos presentaron diferencias estadísticas entre sí. Al realizar la prueba de Duncan se evidencia que los tratamientos *T*. *viride*, *B*. *cepacia*, *P*. *aeruginosa*, *P*. *fluorescens* y el testigo químico no presentaron diferencias significativas entre ellos. De esto se puede interpretar que la aplicación del producto químico produce el mismo efecto que la aplicación de los microorganismos biológicos; es decir, sobre la base de estos resultados se puede recomendar el uso de estas bacterias con los mismos resultados. Sin embargo, estos tratamientos superaron significativamente a *B*. *subtilis* y al testigo absoluto, con un $\mathrm{EE}(\overline{\mathrm{X}})$de ± 1,92.

Asimismo, en la evaluación realizada a los 87 días, el análisis de la varianza mostró diferencias estadísticas entre los tratamientos. Al realizar la prueba de Duncan ($p< 0,05$) esta nos reveló la separación de las medias en dos grupos, las cuales se puede afirmar que son estadísticamente iguales y con un $\mathrm{EE}(\overline{\mathrm{X}})$de ± 4,42, excepto con el tratamiento de *T*. *viride*; es decir que la aplicación de los tratamientos resulta eficaz en la reducción de *S*. *solani*.

Finalmente a los 99 días el análisis de la varianza reveló diferencias significativas entre los tratamientos. La prueba de Duncan ($p< 0,05$), nos separa a las medias en 2 grupos, todos los tratamientos no difieren estadísticamente entre sí, excepto con la aplicación de *P*. *aeruginosa*, con un $\mathrm{EE}(\overline{\mathrm{X}})$de ± 3,29. Estos resultados nos indican que cualquier aplicación de los tratamientos puede servir de complemento a otro.

Tabla 7. Efecto de los tratamientos evaluados sobre *Stemphylium solani* Webber

Tratamientos	Tiempo de Evaluación			
	64 días	**75 días**	**87 días**	**99 días**
T. a.	32,59d	20,00b	37,04ab	45,93ab
T. T.	16,30abc	13,33a	22,22a	35,56a
P. f.	22,22c	17,04ab	36,30ab	45,19ab
P. a.	22,96c	15,56ab	28,15ab	54,07b
B. s.	10,37ab	20,00b	29,63ab	40,74a
B. c.	17,78c	12,59a	36,30ab	37,04a
T. v.	20,74c	11,85a	40,00b	40,00a
Q.	8,89a	17,04ab	37,04ab	40,74a

Medias con letras no comunes en una misma columna difieren por la prueba de Duncan a ($p < 0,05$)

En la figura 3 se muestran los efectos de los tratamientos en el comportamiento de *S*. *solani* a través del tiempo en los cuatro momentos de aplicación, donde se puede observar una distribución más discontinua en la reducción del patógeno.

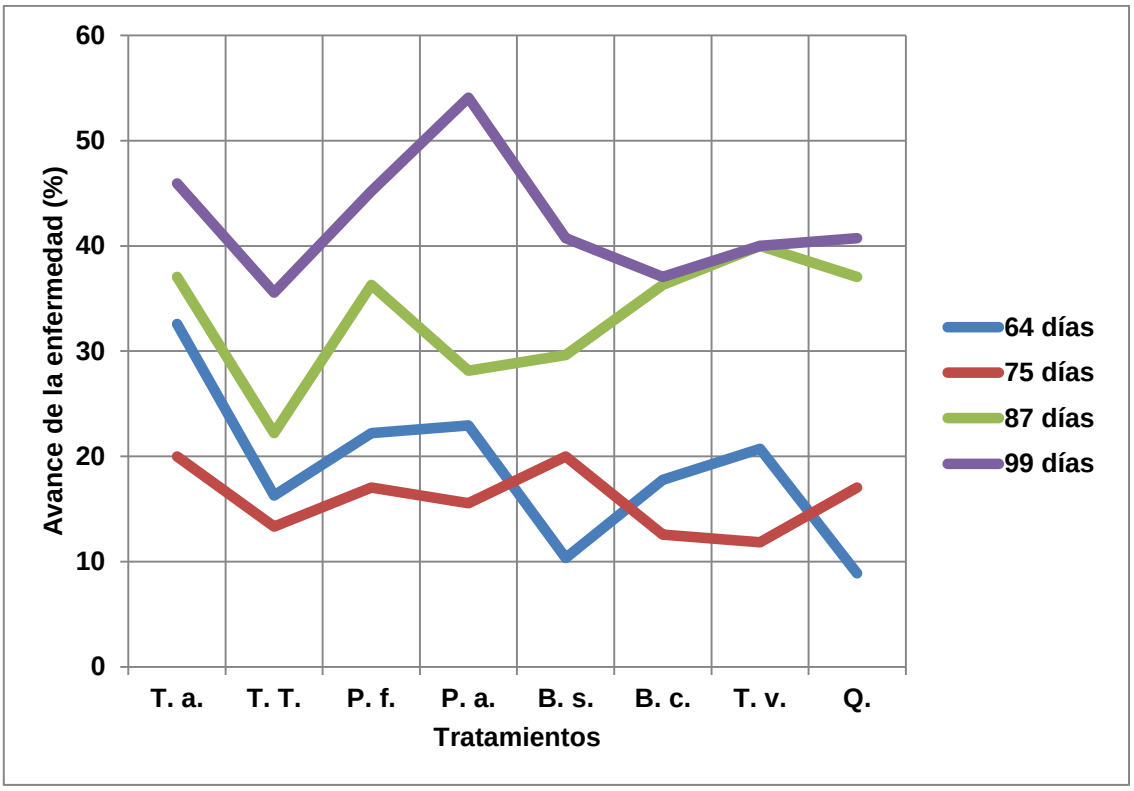


Figura 3. Comportamiento de *S. solani* en los cuatro momentos de aplicación

LEYENDA			
T. a	Testigo absoluto	**B. s**	*Bacillus subtilis*
T. T.	Tebuconazol más Triadimenol	**B. c**	*Burkholderia cepacia*
P. f	*Pseudomonas fluorescens*	**T. v.**	*Trichoderma viride*
P. a.	*Pseudomonas aeruginosa*	**Q.**	Quitosana

Los resultados obtenidos con *B. subtilis* como biocontrolador de enfermedades foliares en tomate coinciden con los alcanzados por Bernal *et al*. (2006) quienes lograron reducir la incidencia de *S. solani* a menos de 25 % en tomate. Asimismo concluyen que el modo de acción de esta bacteria es la producción de sideróforos,

la competencia por el sustrato en la rizosfera y filosfera de los patógenos de las plantas, también produce antibióticos que son altamente fungo-tóxicos para los hongos fitopatógenos (Lisboa, 2003). Además el género *Bacillus* es antagonista de muchos hongos fitopatógenos y es bacteria promotora del crecimiento vegetal e inducen a la planta a producir fitoalexinas que le proveen de resistencia contra los hongos patógenos (Sosa-López *et al*., 2011).

Los resultados obtenidos con la aplicación de la Quitosana concuerdan con los alcanzados por Sánchez-Domínguez *et tal*., (2007) quienes estudiaron el efecto *in vitro* de Quitosana en el desarrollo y morfología de *Alternaria alternata* en tomate, reduciendo el grado de inhibición y crecimiento de este hongo en un 50,6%. En los últimos años se ha demostrado el efecto antagonista de la Quitosana contra diversos hongos fitopatógenos.

4.2.3. *Passalora fulva (*Cooke) U. Braun y Crous

Se ha demostrado que *P*. *fulva* se desarrolla a una temperatura de 20 a 25 ºC y una humedad relativa del 90 %. Es por ello que en el gráfico del comportamiento de la enfermedad se observa un decrecimiento del grado de afectación a los 75 días, incluso en este período hay una mejor eficacia de los tratamientos comparados con el primero, tercero y cuarto períodos de evaluación; seguidamente se ve un aumento del progreso de la enfermedad.

En la tabla 8 se presentan los resultados de la aplicación de los diversos medios de control sobre la incidencia de *P*. *fulva*. Todos los tratamientos mostraron mayor efectividad que el testigo absoluto (T. a.). El análisis de la varianza a los 64 días reveló que los tratamientos presentaron diferencias estadísticas entre sí. Al realizar la prueba de Duncan ($p<0,05$) se observó que la Quitosana, *P*. *aeruginosa*, *P*. *fluorescens* y *B*. *cepacia* no presentaron diferencias significativas entre sí y con un $\mathrm{EE}(\overline{\mathrm{X}})$de ± 3,83; lo cual indica que con la aplicación de este grupo de microorganismos uno puede servir de complemento del otro; no obstante tuvieron significación con los tratamientos de *T*. *viride* y Tebuconazol más Triadimenol. Cabe resaltar que la aplicación del producto químico no resultó efectivo en el control de *P*. *fulva*.

Asimismo a los 75 días el análisis de varianza entre los tratamientos muestra diferencias significativas entre sí. Al realizar la prueba de Duncan ($p< 0,05$), el análisis separa a las medias en dos grupos, es decir que todos los tratamientos no presentaron significación entre sí, excepto con el testigo con $\mathrm{EE}(\overline{\mathrm{X}})$de ± 1,87. Estos resultados reafirman que los agentes biológicos producen el mismo efecto que el producto químico en la reducción del grado de *P*. *fulva*.

En la evaluación realizada a los 87 días, el análisis de la varianza mostró que los tratamientos presentaron diferencias estadísticas entre sí. Al realizar la prueba de Duncan ($p< 0,05$) reveló diferencias estadísticas entre los tratamientos, es decir

todos los tratamientos tuvieron la misma eficacia en el control de la enfermedad y con un $\mathrm{EE}(\overline{\mathrm{X}})$de ± 5,30.

Por último, en la evaluación a los 99 días el análisis de la varianza nos revela pocas diferencias significativas entre los tratamientos; la prueba de Duncan (p< 0,05) separa a las medias en dos grupos, es decir difieren estadísticamente entre sí, excepto la aplicación de *T*. *viride* y el testigo absoluto y con un $\mathrm{EE}(\overline{\mathrm{X}})$de ± 4,91.

Tabla 8. Efecto de los diversos medios de control sobre *Passalora fulva* (Cooke) U. Braun y Crous

Tratamientos	Tiempo de Evaluación			
	64	**75**	**87**	**99**
T. a.	31,92c	20,00b	37,78a	49,03b
T. T.	21,48b	13,33a	31,11a	23,7a
P. f.	17,04ab	12,59a	37,04a	38,52ab
P. a.	14,81ab	16,30ab	26,67a	44,44b
B. s.	27,49b	12,59a	28,29a	36,3ab
B. c.	18,52ab	12,59a	38,52a	38,52ab
T. v.	26,67b	15,56ab	40,00a	42,96b
Q.	7,41a	14,07ab	36,30a	33,33ab

Medias con letras no comunes en una misma columna difieren por la prueba de Duncan a (p< 0,05)

En la figura 4 se muestra el efecto de los tratamientos en el comportamiento de *P. fulva* a través del tiempo en los cuatro momentos de aplicación, donde se puede observar una distribución discontinua en la reducción del patógeno

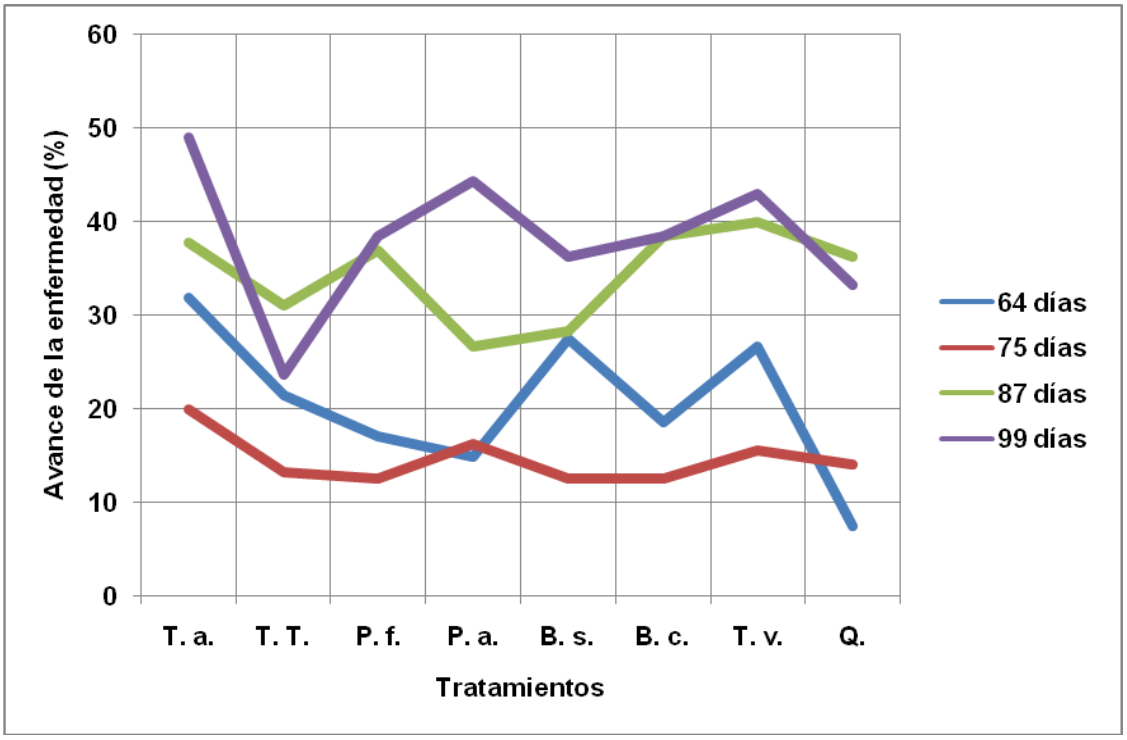


Figura 4. Comportamiento de *P. fulva* en los cuatro momentos de aplicación

LEYENDA			
T. a	Testigo absoluto	**B. s**	*Bacillus subtilis*
T. T.	Tebuconazol más Triadimenol	**B. c**	*Burkholderia cepacia*
P. f	*Pseudomonas fluorescens*	**T. v.**	*Trichoderma viride*
P. a.	*Pseudomonas aeruginosa*	**Q.**	Quitosana

Estos resultados sustentan lo indicado anteriormente, el uso de microorganismos antagonistas como *P*. *fluorescens*, *B. subtilis* y *B. cepacia*, controlan diversas enfermedades fitopatógenas; además este grupo de bacterias son las denominadas por algunos investigadores como las bacterias promotoras del crecimiento vegetal.

Torres *et al*. (2008) manifiestan que el uso de microorganismos antagonistas (*Trichoderma harzianum*, *T*. *viride*, *T*. *virens* y *Hansfordia pulvinata*) en el control del hongo *Cladosporium fulvum* (*Passalora fulva*) redujo la severidad de la enfermedad en un 19,35 %.

Asimismo se ha determinado que la Quitosana también estimula el crecimiento de la planta; es decir, además de controlar diversas enfermedades fitopatógenas, activan mecanismos de defensa, e inducen a la resistencia sistémica adquirida (Mondino y Vero, 2006). El uso exitoso de la Quitosana en el control de diversas enfermedades fitopatógenas se evidencia en los estudios realizados en Sonora, México por Quintana-Obregón *et al*., (2010) en el control *in vitro* del hongo *Cladosporium cladosporoides*, con la cual reporta una inhibición de las esporas del 70 % a las 24 horas de medición. También afirma que la Quitosana produce alteraciones morfométricas como la elongación en el tubo germinal y excesivo incremento de la espora.

4.2.4. *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dowson

En los últimos años el control de las enfermedades bacterianas se ha basado en el uso de productos a base de cobre o formulaciones de éste en combinación con Mancozeb o Estreptomicina, sin embargo, el control no ha sido del todo satisfactorio, debido al surgimiento de nuevas razas de microorganismos patógenos más resistentes a estos productos. *X*. *campestris* pv. *vesicatoria* es una de las enfermedades más importantes y destructivas de las solanáceas, ya que ataca a tomate, papa y ají (*Capsicum annuum*).

En la tabla 9 se presentan los resultados de la aplicación de los diversos medios de control sobre la incidencia de esta bacteria. Todos los tratamientos mostraron mayor efectividad que el testigo absoluto (T. a.). El análisis de la varianza a los 64 días reveló diferencias estadísticas entre sí. Al realizar la prueba de Duncan ($p< 0,05$) se observó que la aplicación de los tratamientos con Tebuconazol más Triadimenol, *P*. *fluorescens*, *P*. *aeruginosa*, *B*. *subtilis*, *B*. *cepacia* y Quitosana no presentaron diferencias significativas entre sí, es decir todos los tratamientos tuvieron una eficacia en el control de la enfermedad con un $\mathrm{EE}(\overline{\mathrm{X}})$de ± 2,99.

Del mismo modo en la evaluación efectuada a los 75 días, el análisis de varianza entre los tratamientos mostró diferencias estadísticas entre sí. Al realizar la prueba

de Duncan (p< 0,05) los tratamientos no presentaron diferencias significativas entre ellos con un $\mathrm{EE}(\overline{\mathrm{X}})$de ± 3,18.

En la evaluación realizada a los 87 días, el análisis de la varianza mostró diferencias estadísticas entre sí. Al realizar la prueba de Duncan (p<0,05) nos indica la separación de las medias en dos grupos, todos los tratamientos no presentaron diferencias significativas, no obstante, superaron significativamente a *T*. *viride* con un $\mathrm{EE}(\overline{\mathrm{X}})$de ± 3,80.

Finalmente en la evaluación a los 99 días, el análisis de la varianza reveló diferencias significativas entre los tratamientos, la prueba de Duncan (p< 0,05) señaló la separación de las medias en 3 grupos, es decir los tratamientos testigo absoluto, Tebuconazol más Triadimenol y *P*. *fluorescens* no difieren estadísticamente entre sí, a pesar de que superaron significativamente al resto de los tratamientos con un $\mathrm{EE}(\overline{\mathrm{X}})$de ± 3,03.

En la figura 5 se muestra el efecto de los tratamientos en el comportamiento de *X*. *campestris* pv. *vesicatoria* a través del tiempo en los cuatro momentos de aplicación, donde se puede observar una distribución más uniforme en la reducción del patógeno.

Tabla 9. Efecto de los diversos medios de control sobre *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*

Tratamientos	Tiempo de Evaluación			
	64	**75**	**87**	**99**
T. a.	30,37b	20,00a	35,56ab	31,11ab
T. T.	20,00a	15,56a	25,93a	22,96a
P. f.	20,00a	17,04a	37,04ab	24,44a
P. a.	20,26a	20,00a	26,67a	39,26bc
B. s.	20,00a	20,00a	28,15ab	57,04d
B. c.	20,50a	16,31a	37,78ab	39,26bc
T. v.	20,00a	14,81a	40,00b	46,67c
Q.	20,47a	14,07a	37,04ab	45,19c

Medias con letras no comunes en una misma columna difieren por la prueba de Duncan a ($p < 0,05$)

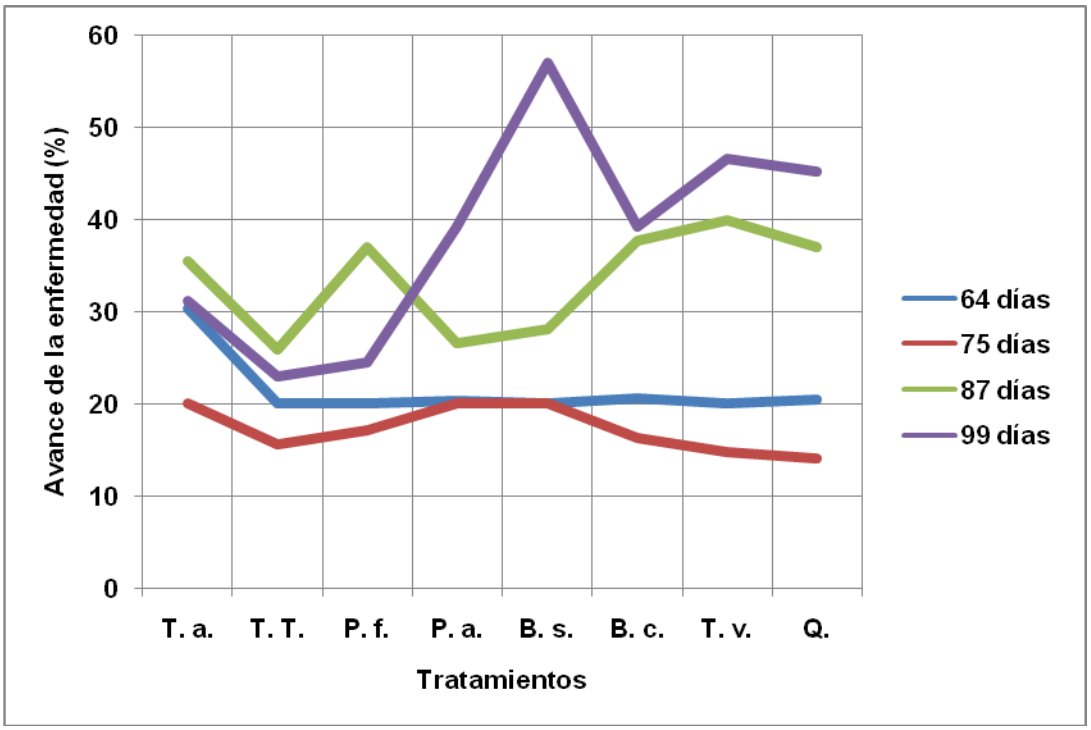


Figura 5. Comportamiento de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* en los cuatro momentos de aplicación

LEYENDA			
T. a.	Testigo absoluto	**B. s**	*Bacillus subtilis*
T. T.	Tebuconazol más Triadimenol	**B. c**	*Burkholderia cepacia*
P. f	*Pseudomonas fluorescens*	**T. v.**	*Trichoderma viride*
P. a.	*Pseudomonas aeruginosa*	**Q.**	Quitosana

Diversos estudios indican que la bacteria *P. fluorescens* pertenece al grupo llamado rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal y está presente en la rizosfera de la planta, vive comúnmente en el suelo y se encuentra interactuando

con las raíces de los cultivos, además de ser un antagonista muy eficaz contra enfermedades fúngicas y bacterianas (Pertanian, 2003).

No hay reportes sobre el uso de la bacteria *P*. *fluorescens* en el control de *X*. *campestris* pv. *vesicatoria* en tomate, pero Pertanian (2003) manifiesta el uso eficaz de esta bacteria en el control de *Erwinia carotovora* y *P*. *solanacearum* en papa, *X*. *campestris* en soya y *E*. *amylovora* en manzanas y duraznos. También se indica el uso de esta bacteria en el control de nematodos parásitos en plantas. Los resultados obtenidos en este estudio indican que la aplicación de *P*. *fluorescens* tiene un efecto sobre *X*. *campestris* pv. *vesicatoria*, lo que puede constituir un incentivo para que se realicen estudios más profundos con vistas a confirmar lo que indican los otros investigadores y descubrir otras utilidades de esta bacteria como antagonista de enfermedades, y como ayuda a la planta para activar sus mecanismos contra el ataque de patógenos vegetales (Mondino y Vero, 2006).

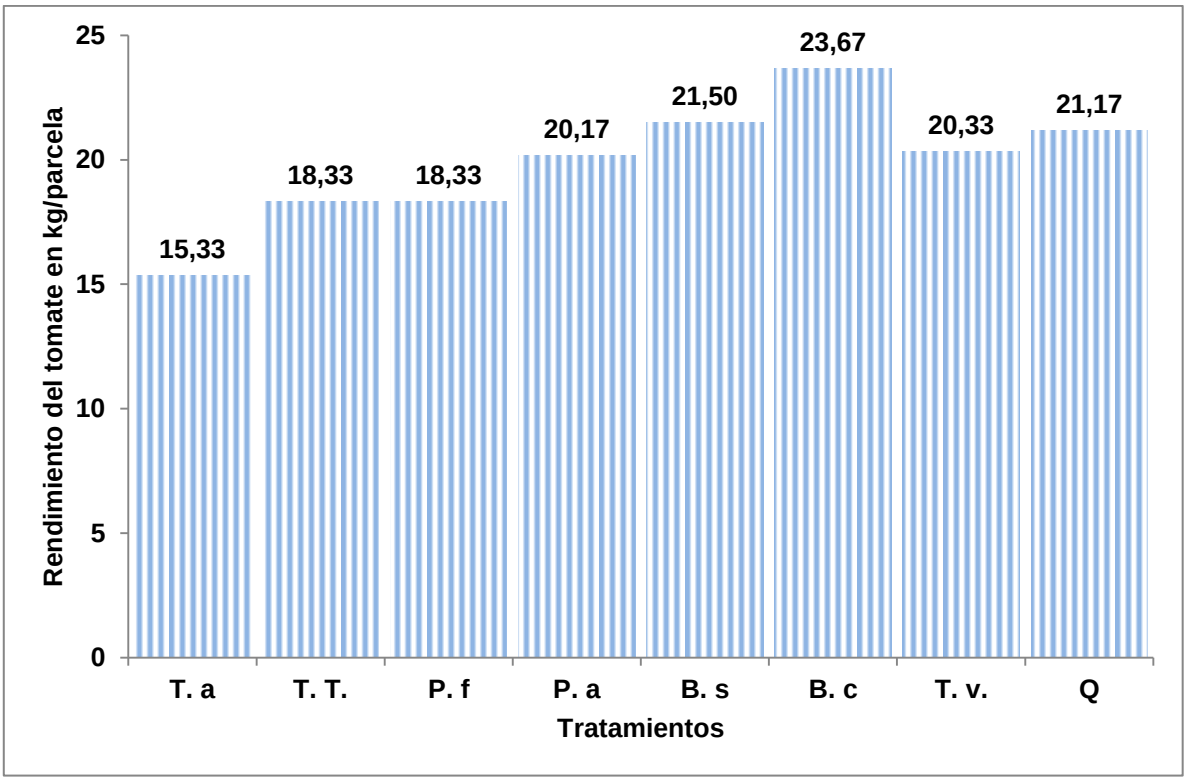
4.3. Otros Agentes Fitopatológicos

En este estudio se presentaron otras enfermedades que afectan al tomate como *Phytophthora infestans*, *Corynespora cassiicola* y *Cercospora* sp., pero su incidencia fue de menos del 10, 00 %, por lo cual pese a que son enfermedades de gran importancia por su nivel de daños, no reflejaron motivo alguno de control. Además, se ha reportado que para que los conidios de *P*. *infestans* fructifiquen es necesario que tengan condiciones de prolongada humedad y un rango de

temperatura entre 20 a 25 ºC (Agrios, 2005). Esto coincide con el período más lluvioso del mes de abril de 90, 7 mm, con una humedad relativa de 72 %.

4.4. Determinación del efecto de los tratamientos sobre el rendimiento en tomate

En la figura 6 se presentan los resultados de la aplicación de los diversos medios de control sobre el rendimiento del tomate. Todos los tratamientos mostraron mayor efectividad que el testigo absoluto (T. a.). El análisis de la varianza nos reveló que los tratamientos presentaron diferencias estadísticas entre sí. Al realizar la prueba de Duncan ($p<0,05$) se observa que los tratamientos *P*. *aeruginosa*, *B*. *subtilis*, *B*. *cepacia*, *T*. *viride* y Quitosana no presentaron diferencias significativas entre sí, es decir estos tratamientos tuvieron el mismo efecto en el rendimiento del cultivo, sin embargo, superaron significativamente a los tratamientos con *P*. *fluorescens* y al Tebuconazol más Triadimenol, con un $\mathrm{EE}(\overline{\mathrm{X}})$ de ± 3.29.



Medias con letras no comunes en una misma columna difieren por la prueba de Duncan a (p< 0,05)

Figura 6. Efecto de la utilización de los diferentes tratamientos en el rendimiento del tomate

LEYENDA			
T. a.	Testigo absoluto	**B. s**	*Bacillus subtilis*
T. T.	Tebuconazol más Triadimenol	**B. c**	*Burkholderia cepacia*
P. f	*Pseudomonas fluorescens*	**T. v.**	*Trichoderma viride*
P. a.	*Pseudomonas aeruginosa*	**Q.**	Quitosana

Los resultados obtenidos nos dicen que el uso de estas bacterias incrementa la producción del tomate en un 50 %, además de proteger al cultivo del ataque de

plagas y enfermedades. Para sustentar lo expuesto citamos el estudio realizado por Santillana (2006), quien utilizó la bacteria del género *Pseudomonas* sp., en la elaboración de biofertilizantes para la producción de frijol y maíz, demostró el incremento de la producción entre 51 a 59 % y 77 a 99 % respectivamente. Al mismo tiempo estas bacterias inducen los mecanismos de defensa y estimulan el desarrollo de la planta.

4.5. Efecto bioinsecticida de las especies bacterianas estudiadas sobre *Myzus persicae* (Sulzer)

En la tabla 10 se presentan los resultados del efecto de las bacterias antagonistas sobre la incidencia de *M*. *persicae*; como se aprecia todos los tratamientos mostraron efectividad en el control de los áfidos muertos, respecto al control. La prueba de Chi-cuadrado (X^2 =74,90 > $X^2_{0.05\ (4\ gl)}$ = 9,49) nos indicó que se acepta la hipótesis alternativa (la sobrevivencia de los áfidos está asociada con algunas de las aplicaciones de las bacterias antagonistas), es decir que la supervivencia o no de los áfidos en las poblaciones muestreadas no es la misma para cada una de las aplicaciones de las bacterias.

Tabla 10. Efecto de las bacterias antagonistas sobre *Myzus persicae* (Sulzer)

Tratamientos	Áfidos		
	Vivos	Muertos	
	Conteo	Conteo	%
Testigo	340	0	0,00
P. fluorescens	80	20	25, 00
P. aeruginosa	150	38	25,33%
B. subtilis	100	27	27,00
B. cepacia	500	100	20,00

En la tabla 11 se presentan los resultados el efecto de *B*. *cepacia* en diferentes concentraciones sobre la incidencia de *M*. *persicae*, todos los tratamientos mostraron efectividad en el control de los áfidos muertos, respecto al control. La prueba de Chi-cuadrado (X^2 =208,98 > $X^2_{0.05\ (4\ gl)}$ = 9,49), nos indicó que se acepta la hipótesis alternativa (la sobrevivencia de los áfidos está asociada con algunas de las concentraciones de *B*. *cepacia*), es decir que supervivencia o no de los áfidos en las poblaciones muestreadas no es la misma para cada una de las diluciones de *B*. *cepacia*.

Tabla 11. Efecto de la utilización de *B*. *cepacia* en diferentes concentraciones sobre *Myzus persicae* (Sulzer)

Tratamientos	Áfidos		
	Vivos	Muertos	
	Conteo	Conteo	%
Testigo	300	4	1,33
***B*. *cepacia*: dosis 1/10**	200	78	39,00
***B*. *cepacia*: dosis 1/20**	150	13	8,67
***B*. *cepacia*: dosis 1/40**	800	24	3,00

Este resultado constituye el primer reporte de la acción de *B. cepacia* sobre *Myzus persicae*. En la actualidad se han descrito 9 grupos de bacterias o genotipos llamados "genomovars" como: *B. multivorans*, *B. cenocepacia, B. cepacia*, *B. stabilis*, *B. vietnamiensis*, *B. dolosa*, *B. ambifaria*, *B. anthina*, *B. pyrrocinia*. El género *Burkholderia* ecológicamente es saprófito, por lo cual interviene en el reciclaje de materia orgánica, además es uno de los géneros bacterianos más utilizados en biorremediación de herbicidas y plaguicidas recalcitrantes. La especie *B. mallei*, causa zoonosis y afecta a muchos animales, entre ellos los caballos, burros y mulas, que son los mamíferos más susceptibles) (Parra, 2009; Stoyanova *et al*., 2007).

Es necesario investigar los mecanismos de acción de esta bacteria sobre este grupo de insectos, para lo cual se requieren estudios de biología molecular y

biotecnológicos, y en particular el genomovars del complejo *Burkholderia* al cual pertenece la bacteria estudiada.

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

1. Se identificaron mediante estudios de laboratorio las enfermedades fúngicas causadas por: *Alternaria solani*, *Stemphylium solani*, *Passalora fulva*, *Phytophthora infestans*, *Corynespora cassicola*, *Cercospora* sp., y bacterianas causadas por: *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

2. Se determinó el desarrollo de las enfermedades en los cuatro períodos de evaluación. *A*. *solani* alcanzó el 50, 00% de afectación, *S*. *solani* el 54, 07% de afectación, *P*. *fulva* el 49,03 %, *X*. *campestris* pv. *vesicatoria* el 46,67% y *Phytophthora*. Infestans, *Corynespora cassicola*, *Cercospora* sp., menos del 10, 00 %.

3. Los tratamientos más efectivos para el control de *Alternaria solani* fueron: *Trichoderma viride*, *Burkholderia cepacia* y *Pseudomonas aeruginosa*, para *Stemphylium solani*: Quitosana, *Bacillus subtilis*, *Burkholderia cepacia* y *Trichoderma viride*, para *Passalora fulva*: *Quitosana, Bacillus subtilis* y *Burkholderia cepacia*, y para el control de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*: Quitosana y *Pseudomonas fluorescens*.

4. Para el control de las principales enfermedades foliares del tomate y en los cuatro períodos de evaluaciones los mejores tratamientos fueron: *Burkholderia cepacia*, *Trichoderma viride* y *Quitosana*.

5. El tratamiento más efectivo sobre el rendimiento del tomate se obtuvo con aplicación de la bacteria *Burkholderia cepacia*.

6. Se encontró actividad bioinsecticida de la bacteria *Burkholderia cepacia* a la dilución de 1/10 sobre *Myzus persicae*.

CAPÍTULO 6. RECOMENDACIONES

1. Continuar evaluando las bacterias más prometedoras sobre las enfermedades foliares del tomate.

2. Realizar ensayos de campo y de laboratorio con Quitosana como controladora de las enfermedades foliares del tomate.

3. Realizar estudios de biología molecular y biotecnológicos para identificar a qué genomovars pertenece la bacteria *B*. *cepacia* y realizar otros ensayos con áfidos de otros subespecies y otros órdenes de insectos para determinar su rango de efectividad.

CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA

Agrios G. (2005): Plant Pathology. (5th ed.). Publishing, Elsevier Academic Press Publications. United States of America.453 - 635 pp.

Alemán Ingrist; Sánchez J.; Sealey M.; Otoniel J. y López G. (2003): Empleo de una cepa de *Burkholderia cepacia* en el control de la mancha azul en la madera de pino caribe (*Pinus caribaea*). Maracaibo, Venezuela. Revista, *Ciencia*. 11(1). 39 – 46 pp.

Barnett H. and Hunter B. (1987) Illustrated Genera of Imperfect Fungi. (4th ed.). Publishing, MacMillan Publishing Company. United States of America. 218 p.

Benítez María y McSpadden B. (2008): Aplicación de perfiles moleculares de la comunidad microbiana para la identificación de microorganismos asociados a la supresión de enfermedades del suelo. Quito, Ecuador. Trabajo presentado para XI Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del Suelo. 1-10 pp.

Bernal A. (2007): Caracterización aislamientos de *Cladosporium fulvum* (*Passalora fulva*) (Cooke) provenientes de cultivo protegidos Tesis presentada en opción al Título Académico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Santa Clara, Cuba. 76 pp.

Bernal A.; Gato I.; Díaz M.; Herrera L. y Martínez B. (2006): Empleo de cepas de bacterias antagonistas en el control de *Stemphylium solani* Webber en tomate bajo cultivo protegido. Revista, *Centro Agrícola*. 33(3). 37-40 pp.

Bravo Alejandra; Ibarra J.; María Cristina del Rincón Castro; Galindo E.; Patiño M.; Serrano L.; García R.; Pereyra Alférez B.; Andrea Alcázar Pizaña; Luna Olvera H.; Galán Wong L.; Liliana Pardo; Muñoz Garay C.; Isabel Gómez y Soberón M. (2006): Los microorganismos en el control de insectos y patógenos. Cuernavaca, México. Revista, *Latinoamericana de Microbiología*. 48(2). 113 -120 pp.

Chaves Méndez Nancy Patricia (2007): Utilización de bacterias y hongos endofíticos para el control biológico del nematodo barrenador *Radopholus similis* (Cobb) Thorn. Tesis presentada en opción al Título Académico de *Magister Scientiae* en Agricultura Ecológica. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Turrialba, Costa Rica. 85 pp.

Cholango Martínez Luisa Paulina (2009): Selección de cepas de *Trichoderma* sp., “in vitro”, para el control de problemas radiculares en flores de verano. Checa -Ecuador. Tesis presentada en opción al Título Académico de Ingeniero Agropecuario. Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí, Ecuador. 130 pp.

Cobos Cando Grace Margot (2010): Evaluación de cepas nativas de *Trichoderma* spp., para el control de Sigatoka negra (*Paracercospora fijiensis* M.) en el cultivo de banano (*Musa paradisiaca*) en fase de laboratorio. Tesis

presentada en opción al Título Académico de Ingeniera Agropecuaria. Escuela Politécnica del Ejército, Santo Domingo, Ecuador. 99 pp.

Corpeño B. (2004): Manual del cultivo de tomate. Editorial Centro de inversión, desarrollo y exportación de agronegocios (CIDEA). El Salvador. 34 pp.

Cruz Martínez Lina Carolina (2007): Estandarización del proceso de producción masiva del hongo *Trichoderma koningii* th003 mediante fermentación bifásica a escala piloto. Tesis presentada en opción al Título Académico de Microbióloga Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. 91 pp.

Cueva Rosillo Diana María (2007): Producción de inoculantes a base de *Trichoderma* spp., para el control de *Fusarium oxysporum* f. sp., *caricae* en injertos de babaco (*Vasconcellea heilbornii* cv. babaco). Tesis presentada en opción al Título Académico de Ingeniera Agropecuaria. Escuela Politécnica del Ejército. Sangolquí, Ecuador. 114 pp.

Escalona V.; Alvarado P.; Monardes H.; Urbina C. y Alejandra Martin (2009): Manual de cultivo de tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill.). Editorial Nodo Hortícola. Chile. 60 pp.

Ezziyyani M.; Consuelo Pérez Sánchez; Ahmed S.; María Emilia Requena y María Emilia Candela (2004): *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el control de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). Murcia, España. Revista, *Anales de Biología*. 26. 35 – 45 pp.

Ezziyyani M.; Consuelo Pérez Sánchez; Ahmed S.; María Emilia Requena y María Emilia Candela (2006): Control biológico por microorganismos antagonistas. Murcia, España. Revista, *Horticultura*. 19. 18 - 15 pp.

Fernández Cancio Y. (2010): Empleo de organismos antagonistas y sustancias naturales en el tratamiento de las semillas de *Phaseolus vulgaris* L. contra hongos fitopatógenos del suelo. Tesis presentada en opción al Título Académico de Ingeniero Agrónomo, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Santa Clara, Cuba. 46 pp.

Gato I. (2006): Evaluación de bacterias antagonistas en el control de enfermedades fúngicas foliares del tomate en condiciones de cultivo protegido. Tesis presentada en opción al Título Académico de Ingeniero Agrónomo. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Santa Clara, Cuba. 64 pp.

Guédez C.; Cañizález L.; Castillo C. y Olivar R. (2009): Efecto antagónico de *Trichoderma harzianum* sobre algunos hongos patógenos postcosecha de la fresa (*Fragaria* spp). Estado de Trujillo, Venezuela. Revista, *Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29. 34-38 pp.

Guilcapi Pacheco E. D. (2009): Efecto de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride*, en la producción de plantas de café (*Coffea arabica*) variedad caturra a nivel de vivero. Tesis presentada en opción al Título Académico de

Ingeniero Agrónomo, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador. 73 pp.

Guillén Cruz Raquel; Hernández Castillo F.; Gallegos Morales G.; Rodríguez Herrera R.; Aguilar González C.; Padrón Corral E. y Reyes Valdés M. (2006): *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 annuum* L.). Revista, *Mexicana de Fitopatología*. 24(2). 105-114 pp.

Hernández Rodríguez Annia; Ana Niurka Hernández Lauzardo; Velázquez del Valle M.; Bigiramana Y.; Kris Audenaert y Mónica Hofte. (2004): Aplicación de Rizobacterias para Inducir Resistencia en los Sistemas Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) – *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. y Magnus) Lams.-Scrib., y Tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill.) –*Botrytis cinerea* Pers.: Fr. La Habana, Cuba. Revista, *Mexicana de Fitopatología*. 22(1). 100-106 pp.

Hernández Rodríguez Annia; Mayra Heydrich Pérez, Velázquez del Valle M. y Ana Niurka Hernández Lauzardo (2006): Perspectivas del Empleo de Rizobacterias Como Agentes de Control Biológico en Cultivos de Importancia Económica. Revista, *Mexicana de Fitopatología*. 24(1). 42-49 pp.

Infante Danay; Martínez B.; Noyma González y Yusimy Reyes (2009): mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. La Habana, Cuba. Revista, *Protección Vegetal*. 24(1). 14 - 21 pp.

Lárez C. (2008): Algunas potencialidades de la quitina y el Quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica. Mérida, Venezuela. Revista, *UDO Agrícola*. 8(1). 1-22 pp.

Lisboa Minguzzi M. A. (2003): Efectividad de *Bacillus subtilis* y de una cepa nativa de *Trichoderma harzianum* sobre la incidencia y severidad de pudrición gris (*Botrytis cinerea*) en Vid (*Vitis vinífera*). Tesis presentada en opción al Título Académico de Ingeniero Agrónomo. Universidad de Talca, Talca, Chile. 38 pp.

Martínez E.; Barrios G.; Rovesti L. y Santos R. (2007): Manejo Integrado de Plagas. Editorial Grup Bou. Tarragona, España. 330-357 pp.

Mayea S.; Herrera L.; Andreu C. (1983): Enfermedades de las plantas cultivadas en Cuba. Editorial Pueblo y Educación. La Habana. 420 pp.

Michel Aceves A. C. (2001): Cepas nativas de *Trichoderma* spp *Euascomycetes*: *Hypocreales*), su antibiosis y micoparasitismo sobre *Fusarium subglutinans* y *F*. *oxysporum* (*Hyphomycetes*: *Hyphales*). Tesis presentada en opción al Título Académico de Doctor en Ciencias: Área Biotecnología. Universidad de Colima, México. 152 pp.

Michel Aceves A.; Otero Sánchez M.; Martínez Rojero R.; Ariza Flores R.; Barrios Ayala A. y Rebolledo Martínez A. (2008): Control biológico *in vitro* de enfermedades fungosas en tomate *Lycopersicum esculentum* Mill. Guerrero, México. Revista, *Avances en Investigación Agropecuaria*, 12(3). 55-68 pp.

Mondino, P., Silvana Vero (2006): Control biológico de patógenos en plantas. Editorial. Facultad de Agronomía Universidad de la República. Montevideo, Uruguay. 158 pp.

Okumoto S.; Bustamante E. y Gamboa A. (2001): Actividad de cepas de bacterias quitinolíticas antagonistas a *Alternaria solani* “in vitro”. Costa Rica Revista, *Manejo Integrado de Plagas*. 59. 58-62 pp.

Paredes Escalante J.; Carrillo Fasio J.; García Estrada R.; Allende Molar R.; Josefa Adriana Sañudo Barajas y Valdez Torres J. (2009): Microorganismos Antagonistas para el Control del Complejo de Hongos Causantes de la Rabia del Garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en el Estado de Sinaloa, México. Revista, *Mexicana de Fitopatología*, 27(1). 27-35 pp.

Parra González E. (2009): Actividad antifúngica de *Burkholderia cepacia* aislada de maíz amarillo (*Zea mays* L.) bajo diferentes condiciones de cultivo. Tesis presentada en opción al Título Académico de *Magister Scientiarum* en Biología Aplicada mención: Microbiología Aplicada. Universidad de Oriente. Cumaná, Venezuela. 74 pp.

Pérez Consuegra Nilda (2004): Manejo Ecológico de Plagas. La Habana, Cuba. Editorial Centro de Estudios de Desarrollo Agrario y Rural. 127 – 284pp.

Pertanian F. (2003): The application of antagonistic bacteria *Pseudomonas fluorescens* to control soft rot disease (*Erwinia carotovora*) on potato crops. Universitas Sumatera Utara Digital Library. 1-7 pp.

Porras Gina; Calvo M.; Marianelly Esquivel; María Sibaja y Madrigal Carballo S. (2009): *Quitosano* n-acilado con cinamaldehído: un potencial bioplaguicida contra agentes patógenos en el campo agrícola. Heredia, Costa Rica. Revista, *Iberoamericana de Polímeros*. 10(3) 197 – 206 pp.

Quintana Obregón E.; Plascencia Jatomea M.; López Cervantes J.; Cira Chávez L.; Sánchez Machado D. y Cortez Rocha M. (2010): Actividad Antifúngica de Quitosano sobre *Cladosporium cladosporoides*. Memorias del VII Congreso del Noroeste y III Nacional de Ciencias Alimentarias y Biotecnología Microbiología y Toxicología. Sonora, México. 1119 -1129 pp.

Rivas Figueredo E. M. (1981): Biología, epifitiología y lucha contra *Stemphylium solani* Webber en tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill). Tesis para optar por el grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas, ISCAH, 87 pp.

Rodríguez C. V.; María José Martín Hernández. (2009): Aislamiento y selección de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal en cultivos de uchuva (*Physalis peruviana* L.) con capacidad antagónica frente a *Fusarium* sp. Tesis presentada en opción a los Títulos Académicos de Microbiólogo Agrícola-Veterinario y Microbiólogo Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. 61 pp.

Rodríguez Pedroso Aida Tania; Ramírez Arrebato M.; Regla María Cárdenas Travieso; Falcón Rodríguez A. y Silvia Bautista Baños (2006): Efecto de la Quitosana en la Inducción de la Actividad de Enzimas Relacionadas con la

Defensa y Protección de Plántulas de Arroz (*Oryza sativa* L.) contra *Pyricularia grises* Sacc. México. Revista, *Mexicana de Fitopatología*. 24(1). 1-7 pp.

Ruiz Martínez Lidia (2007): *Pseudomonas aeruginosa*: Aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos. Tesis presentada en opción al Título Académico de Doctora en Medicina y Cirugía. Universidad de Barcelona. Barcelona, España. 7-12 pp.

Sánchez Domínguez D.; Bautista Baños S. y Castillo Ocampo P. (2007): Efecto del Quitosano en el desarrollo y morfología de *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. Revista, *Anales de Biología*. (29). 23-32 pp.

Santillana N. (2006): Producción de biofertilizantes utilizando *Pseudomonas* sp. Revista, *Ecología Aplicada*. 5(1,2). 87-91 pp.

Santos A.; Dillon R; Viv Dillon; Reynolds S. y Samuels R. (2004): Ocurrence of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia* sp. in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. Fluminense, Brazil. Journals Microbiology Letters. 239. 319-323 pp.

Sosa LópezArcenet; Victoria Pazos Álvarez Rivera; Borges G.; Marleny González García y Ponce E. (2011): Evaluación del método de conservación en papel de filtro en dos cepas de *Bacillus subtilis* Cohn, mediante la actividad

antagónica frente a *Rhizoctonia solana* Kühn. Revista, *Fitosanidad*. 15(1).39-43 pp.

Stoyanova M.; Pavlina I.; Moncheva P.; Bogatzevska N. (2007): Biodiversity and incidence of *Burkholderia* species. Review Plant Protection Institute. Kostinbrod, Bulgaria. 306-310 pp.

Terry E.; Leyva A. y Hernández A. (2005): Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para el cultivo del tomate (*Lycopersicum esculentum*, Mill). La Habana, Cuba. Revista, *Colombiana de Biotecnología*. 2(2). 47- 54 pp.

Torres E.; Iannacone J. y Hilda Gómez, (2008): Biocontrol del moho foliar del tomate *Cladosporium fulvum* empleando cuatro hongos antagonistas. Campinas, Brasil. Revista, *Bragantia*. 67(1). 169-178 pp.

Trujillo I.; Acela Díaz; Annia Hernández y Mayra Heydrich, (2007): Antagonismo de cepas de *Pseudomonas fluorescens* y *Burkholderia cepacia* contra hongos fitopatógenos del arroz y el maíz. Revista, *Protección Vegetal*. 22(1). 41-46 pp.

Van Haeff J.; Mondoñedo J.; Parsons D. y Medina J. (1990): Tomates. Editorial Trillas. México, D. F. 5-6 pp.

Vázquez L. (2008): Manejo Integrado de Plagas. Editorial Científico-Técnica, La Habana, Cuba, 208-225 pp.