

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE CUENCA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA
DE LOS RECURSOS NATURALES

*Trabajo de titulación previo a la
obtención del título de Ingeniera en
Biotecnología de los Recursos Naturales*

TRABAJO EXPERIMENTAL:

**“BIOCONTROL DEL MARCHITAMIENTO VASCULAR CAUSADO POR
Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici MEDIANTE EL USO DE LA BACTERIA
ENDÓFITA *Azospirillum sp.* EN TOMATE (*Solanum lycopersicum L.*)”**

AUTORA:

MIRIAM SUSANA VIRI AVILA

TUTORA:

DRA. INÉS PATRICIA MALO CEVALLOS, Ph.D.

CUENCA - ECUADOR

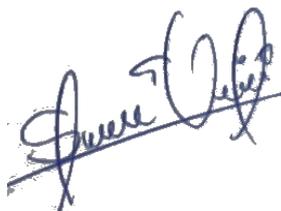
2022

CESIÓN DERECHOS DE AUTOR

Yo, Miriam Susana Viri Ávila con documento de identificación N° 0106149313, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autora del trabajo de titulación: **“BIOCONTROL DEL MARCHITAMIENTO VASCULAR CAUSADO POR *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* MEDIANTE EL USO DE LA BACTERIA ENDÓFITA *Azospirillum sp.* EN TOMATE (*Solanum lycopersicum L.*)”**, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de *Ingeniera en Biotecnología de los Recursos Naturales*, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autora me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo en formato digital a la biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, enero del 2022.



Miriam Susana Viri Ávila

C.I. 0106149313

CERTIFICACIÓN

Yo, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **“BIOCONTROL DEL MARCHITAMIENTO VASCULAR CAUSADO POR *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* MEDIANTE EL USO DE LA BACTERIA ENDÓFITA *Azospirillum sp.* EN TOMATE (*Solanum lycopersicum L.*)”**, realizado por Miriam Susana Viri Ávila, obteniendo el *Trabajo Experimental* que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, enero del 2022.



Dra. Inés Patricia Malo Cevallos, Ph.D

C.I. 0102291044

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD

Yo, Miriam Susana Viri con el documento de identificación N° 0106149313, autora del trabajo de titulación: **“BIOCONTROL DEL MARCHITAMIENTO VASCULAR CAUSADO POR *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* MEDIANTE EL USO DE LA BACTERIA ENDÓFITA *Azospirillum sp.* EN TOMATE (*Solanum lycopersicum L.*)”**, certifico que el total del contenido del *Trabajo Experimental*, es de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Cuenca, enero del 2022.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Miriam Susana Viri Avila', written over a horizontal line.

Miriam Susana Viri Avila

C.I. 0106149313

DEDICATORIA

Con todo el amor y cariño quiero dedicar el presente trabajo a las tres personas más importantes de mi vida

A mis padres: Beatriz Ávila y Luis Viri, por ser mi gran ejemplo e inspiración, por brindarme todo el apoyo, la paciencia y amor a lo largo de esta etapa, por ser los pilares para no darme por vencida nunca, por su gran corazón, por ser mis maestros de vida enseñándome grandes valores lo que me hace admirarlos cada día más.

A mi hermano: Pablo Viri, por ser mi ejemplo, mi compañero en las buenas y malas, por todas sus enseñanzas, por la gran paciencia y por todas las risas.

A mi sobrina Milena Micaela: por llegar a alegrarnos la vida y hacer que esta sea mucho más hermosa.

Miriam Susana Viri Ávila

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a Dios por darme a la mejor familia del mundo, por brindarme toda la fortaleza y paz a lo largo de mi carrera y mi vida.

A mis Padres y hermano, por ser la fuente de inspiración para culminar mi carrera, gracias a ellos por creer en mí, darme su apoyo y amor incondicional, gracias por todo el sacrificio que han hecho para que pueda llegar a cumplir uno de mis sueños, gracias por la compañía, por ese plato de comida y ese jugo que nunca faltaron en mi mesa y sobre todo gracias por todos esos consejos que nunca me han faltado.

A la Dra. Inés Malo, tutora de la investigación, por ser mi guía en todo este trayecto, por su paciencia y sobre todo por su confianza puesta en mí.

A Erika y Gabriela, mis grandes amigas, gracias por las muestras colaboradas para el desarrollo de esta investigación.

A Evelyn por ser una gran amiga, por las palabras de aliento, por todas las risas y apoyo para la culminación del proyecto haciendo que el trabajo fuera más relajado y llevadero.

A Luis Z por ser mi incondicional, gracias por el gran apoyo brindado, por todas las palabras de aliento y ser contribuyente de la perfecta realización de esta investigación.

A la Dra. Mónica Espadero y la Ing. Sandra Gavilanes por todas las enseñanzas y ayuda que me han brindado dentro del laboratorio.

A todos ellos ¡Muchas gracias!

INDICE GENERAL

DEDICATORIA	V
AGRADECIMIENTOS	VI
RESUMEN	XVII
ABSTRACT	XVIII
CAPÍTULO 1	1
1.1 INTRODUCCIÓN	1
1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	3
1.3 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	4
1.4 JUSTIFICACIÓN	4
1.5 LIMITACIONES	5
1.6 OBJETIVOS	5
1.6.1 Objetivo general	5
1.6.2 Objetivos específicos	5
1.7 HIPÓTESIS	6
CAPÍTULO 2	7
2.1 ESTADO DEL ARTE	7
2.2 BASES TEÓRICA	9
2.2.1 EL TOMATE (<i>Solanum lycopersicum L.</i>)	9
2.2.2 <i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i> (Sacc.) Snyder y Hansen. (FOL) 14	
2.2.3 CONTROL BIOLÓGICO	16
2.2.4 MICROORGANISMOS ANTAGONISTAS	19
2.2.5 MICROORGANISMO ENDÓFITOS	20
2.2.6 BACTERIAS ENDOFITAS	21
2.2.7 GÉNERO <i>Azospirillum sp.</i>	21
2.3 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS	27
CAPÍTULO 3	29
3.1 NIVEL DE INVESTIGACIÓN	29
3.2 DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	29
3.3 POBLACIÓN Y MUESTRA	29
3.4 VARIABLES	30
3.5 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS .	30
3.6 TÉCNICAS DE PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS	30

3.7 PROCEDIMIENTO	31
3.7.1 FASE 1: Recolección de las muestras.	31
3.7.2 FASE 2: AISLAMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS	
<i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i> y <i>Azospirillum sp.</i>	33
3.7.3 FASE 3: Identificación de bacterias del género <i>Azospirillum sp.</i> y	
<i>Fusarium Oxysporum f. sp. lycopersici</i> (FOL)	35
3.7.4 FASE 4: Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i>	38
3.7.5 Fase 5: inoculación de bacterias en semillas de tomate	42
3.7.6 Fase 6: Siembra de semillas de tomate	43
3.7.7 FASE 7: Inoculación de <i>Fusarium Oxysporum f. sp. lycopersici</i> (FOL)	
en las plantas de tomate inoculadas y no inoculadas con la bacteria	44
3.7.8 Efecto de la inoculación de <i>Azospirillum sp.</i>	45
3.7.9 Establecer el grado de infección de las plantas de tomate riñón con	
<i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i> con y sin la bacteria <i>Azospirillum sp.</i> ...	45
CAPÍTULO 4	48
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
4.1 MUESTREO	48
4.1.1 <i>Azospirillum sp.</i>	48
4.2 AISLAMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS <i>Fusarium</i>	
<i>oxysporum f. sp. lycopersici</i> y <i>Azospirillum sp.</i>	48
4.2.1 <i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i>	48
4.2.2 <i>Azospirillum sp.</i>	50
4.3 Identificación de bacterias del género <i>Azospirillum sp.</i> y <i>Fusarium</i>	
<i>Oxysporum f. sp. lycopersici</i> (FOL)	51
4.3.1 <i>Azospirillum sp.</i>	51
4.3.2 <i>Fusarium Oxysporum f. sp. lycopersici</i> (FOL).	55
4.4 Evaluación <i>in vitro</i> del efecto antagónico de <i>Azospirillum sp.</i> frente a	
<i>Fusarium Oxysporum f. sp. lycopersici</i> (FOL) a 30 °C	60
4.5 Efecto de la inoculación en la longitud de las plantas y en el desarrollo	
de las raíces	66
4.5.1 Efecto de la inoculación en germinación de las semillas	66
4.5.2 Efecto de la inoculación en la longitud se plantas de tomate al	
momento del trasplante	69
4.5.3 Efecto de la inoculación en la longitud de plantas de tomate al	
término de la investigación	72
4.5.4 Efecto de la inoculación en el peso fresco del sistema radicular al	
término de la investigación.	76
4.6 Grado de infección de las plantas de tomate riñón con <i>Fusarium</i>	
<i>oxysporum f. sp. lycopersici</i> con y sin la bacteria <i>Azospirillum sp.</i> (T2 y T3).....	81

4.6.1 Grado de infección de la marchitez vascular del tomate mediante la incidencia en el tratamiento T2 (FOL) y T3 (Azospirillum +FOL).....	82
4.6.2 Grado de infección de la marchitez vascular del tomate mediante la severidad en el tratamiento T2 (FOL) y T3 (Azospirillum +FOL).....	88
4.7 Re aislamiento de <i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i> (FOL) y <i>Azospirillum sp.</i>	98
4.7.1 Prueba de Patogenicidad de <i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i> mediante los postulados de Koch	98
4.7.2 Prueba de presencia de <i>Azospirillum sp.</i>	99
CAPÍTULO 5	101
5.1 CONCLUSIONES	101
5.2 RECOMENDACIONES	102
REFERENCIAS	104
ANEXOS	119

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación taxonómica del tomate (<i>Solanum Lycopersicum L.</i>) -----	10
Tabla 2: Información de FOL-----	14
Tabla 3: Posición Taxonómica de FOL -----	15
Tabla 4: Taxonomía de <i>Azospirillum sp.</i> -----	22
Tabla 5: Materiales para el lavado de esporas -----	38
Tabla 6: Materiales para el conteo de esporas. -----	39
Tabla 7: Materiales para pruebas de antagonismo in vitro -----	41
Tabla 8: Tratamientos de la investigación -----	44
Tabla 9: Escala de severidad de <i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i> -----	47
Tabla 10: Muestras de <i>L. perenne</i> recolectadas por Susana Viri-----	48
Tabla 11: características macroscópicas y microscópicas de la cepa de <i>Azospirillum</i> (C7Az)-----	52
Tabla 12: Resultados de pruebas bioquímicas-----	54
Tabla 13: Crecimiento de Fol durante 7 días a 25°C -----	56
Tabla 14: Resultados del crecimiento en cm de FOL en confrontación con <i>Azospirillum sp.</i> -----	61
Tabla 15: Porcentaje de inhibición de FOL con la bacteria <i>Azospirillum sp.</i> -----	62
Tabla 16: Longitud de plantas inoculadas y no inoculadas en el trasplante-----	70
Tabla 17: Longitud en cm de plantas de tomate a los 28 días-----	73
Tabla 18: Peso del sistema radicular de los cuatro tratamientos a los 28 días -----	77
Tabla 19: Incidencia del marchitamiento vascular en el T2(FOL) -----	82
Tabla 20: Incidencia en el tratamiento T3 a los 15 y 28 días-----	85
Tabla 21: Comparación de la incidencia T2 y T3 a los 15 y 28 días-----	88

Tabla 22: Datos de la severidad en el tratamiento T2 (FOL)-----	89
Tabla 23: Datos de la severidad en el tratamiento T3 (Azospirillum+FOL)-----	92
Tabla 24: Comparación de la severidad en T2 y T3 -----	95
Tabla 25: Porcentajes de reducción de marchitez vascular del tomate con la aplicación de Azospirillum sp. -----	95

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1: Prueba de normalidad del porcentaje de inhibición a los 8 y 11 días	62
Ilustración 2: Transformación de Johnson para la inhibición in vitro	63
Ilustración 3: ANOVA de los porcentajes de inhibición a los 8 y 11 días	63
Ilustración 4: Diagrama de cajas de la inhibición a los 8 y 11 días.	64
Ilustración 5: Prueba de Tukey de los porcentajes de inhibición a los 8 y 11 días...	64
Ilustración 6: Prueba de normalidad de la longitud del sistema radicular	67
Ilustración 7: ANOVA del crecimiento radicular en semillas germinadas inoculadas y no inoculadas	67
Ilustración 8: Tukey del crecimiento radicular en semillas germinadas inoculadas y no inoculadas	68
Ilustración 9: Diagrama de Boxplot del crecimiento radicular en semillas germinadas inoculadas y no inoculadas	68
Ilustración 10: Prueba de normalidad de datos de plántulas inoculadas y no inoculadas.	70
Ilustración 11: ANOVA de plántulas inoculadas y no inoculadas en el trasplante .	71
Ilustración 12: Prueba de Tukey de plántulas inoculadas y no inoculadas en el trasplante.....	71
Ilustración 13: Boxplot de plántulas inoculadas y no inoculadas en el trasplante ...	72
Ilustración 14: Prueba de normalidad en longitudes al término de la investigación.	74
Ilustración 15: Transformación de Johnson en la longitud al término de la investigación.....	74
Ilustración 16: Prueba de ANOVA para los cuatro tratamientos al final del experimento	75

Ilustración 17: Prueba de Tukey para los datos de longitud de los cuatro tratamientos al final de la investigación Fuente: Autora	75
Ilustración 18: Diagrama de cajas para los datos de longitud de los cuatro tratamientos al final de la investigación	76
Ilustración 19: Prueba de normalidad del peso del sistema radicular	77
Ilustración 20: ANOVA del peso radicular al final de la investigación	78
Ilustración 21: Prueba de Tukey en el peso radicular al final de la investigación ...	78
Ilustración 22: Boxplot del peso radicular al final de la investigación	79
Ilustración 23: Prueba de normalidad de la incidencia en T2 (FOL)	83
Ilustración 24: ANOVA de la Incidencia T2	83
Ilustración 25: Prueba de Tukey de la Incidencia T2.....	84
Ilustración 26: Boxplot de la Incidencia T2 a los 15 y 28 días	84
Ilustración 27: Prueba de normalidad para Incidencia en el tratamiento T3	86
Ilustración 28: ANOVA de Incidencia en el tratamiento T3	86
Ilustración 29: Prueba de Tukey de la Incidencia del tratamiento T3	87
Ilustración 30: Boxplot de la incidencia en el tratamiento T3	87
Ilustración 31: Prueba de normalidad de la severidad en el tratamiento T2	90
Ilustración 32: ANOVA de severidad en el tratamiento T2.....	90
Ilustración 33: Prueba de Tukey para la severidad en el tratamiento T2.....	91
Ilustración 34: Gráfico de intervalos de la severidad en el tratamiento T2	91
Ilustración 35: Prueba de normalidad en la severidad del tratamiento T3.....	93
Ilustración 36: Prueba de Wilcoxon para la severidad en tratamiento T3	94

ÍNDICE DE IMAGENES

Imagen 1: Muestra de tomate infectados	31
Imagen 2: Muestras de raíz de <i>L. perenne</i>	32
Imagen 3: A. Siembra de fragmentos en medio PDA. B. Incubación de medios de cultivo.	33
Imagen 4: Cortado de raíces de <i>L. perenne</i>	34
Imagen 5: Siembra de <i>L. perenne</i> en medio NFB semisólido	35
Imagen 6: Materiales para prueba de poli- β hidroxibutirato	37
Imagen 7: Lavado de esporas	39
Imagen 8: esporas en cámara de Neubauer con el lente 40X	40
Imagen 9: A. Agitador orbital. B. Escala 0.5 de McFarland	41
Imagen 10: Sustrato estéril	43
Imagen 11: Cubetas en invernadero	44
Imagen 12: Diferentes tipos de hongos de tomate.....	49
Imagen 13: cepa Folle de FOL aislada.....	49
Imagen 14: Cepa de <i>Azospirillum C7Az</i>	50
Imagen 15: Crecimiento de <i>Azospirillum</i> en medio semisólido	51
Imagen 16: Bacterias del género <i>Azospirillum</i> sp. vistas con el lente de 100x.....	53
Imagen 17: A. Hongo FOL visto de frente. B. Hongo FOL visto de reverso.....	55
Imagen 18: A. Hongo FOL a las 24 horas de crecimiento. B. Hongo FOL a las 48 horas de crecimiento. C. Hongo FOL a las 72 horas de crecimiento	56
Imagen 19: A. Microconidios de FOL (100x). B. Macroconidios de FOL (100X). C. Clamidosporas de FOL (40x)	58
Imagen 20: A. Macroconidio 20.85 μ m de largo y 2.77 μ m de ancho. B. Microconidio 5.17 de largo y 2.80 de ancho. C. Clamidospora 15.06 μ m de diámetro.	58

Imagen 21: Cepa de FOL en confrontación con <i>Azospirillum</i> sp a los ocho días de incubación.....	60
Imagen 22: Semillas germinadas inoculadas y no inoculadas.....	66
Imagen 23: Plántulas de tomate, izquierda (no inoculadas), derecha (inoculadas) .	69
Imagen 24: Prueba de patogenicidad	99
Imagen 25: A. Positivos para <i>Azospirillum</i> sp. B. Negativos para <i>Azospirillum</i> sp	100

INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: MEDIOS DE CULTIVO	119
ANEXO 2: Longitud de sistema radicular	121
ANEXO 3: Toma de muestras	124
ANEXO 4: Preparación de medios de cultivo para aislamiento	126
ANEXO 5: Preparación de medio agar urea Christensen.	128
ANEXO 6: Aislamiento de Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici	129
ANEXO 7: Aislamiento de Azospirillum sp	131
ANEXO 8: Pruebas bioquímicas de identificación de Azospirillum sp.	132
ANEXO 9: Pruebas de antagonismo in vitro de Azospirillum sp. frente a FOL	134
ANEXO 10: Inoculación de Azospirillum en semillas de tomate	137
ANEXO 11: Germinación se semillas inoculadas y no inoculadas.....	138
ANEXO 12: Siembra de semillas inoculadas y no inoculadas	139
ANEXO 13: Trasplante e inoculación con el patógeno (FOL)	141
ANEXO 14: Plantas de los cuatro tratamientos al final de la investigación (28 días después del trasplante)	143
ANEXO 15: Síntomas de la enfermedad marchitamiento vascular del tomate	144
ANEXO 16: Toma de datos para determinar el porcentaje de efectividad de inoculación de Azospirillum sp.....	146

RESUMEN

La marchitez vascular del tomate es provocada por el fitopatógeno *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* (FOL), causante de grandes pérdidas de producción a nivel mundial. Tradicionalmente el manejo para el control de esta enfermedad se basa en la aplicación de fungicidas de origen químico, que perjudican severamente los suelos, el ambiente y la salud de las personas; por lo que control biológico con bacterias del género *Azospirillum sp.*, es una alternativa con altas expectativas en la agricultura moderna ya que estas actúan directamente sobre las raíces, evitando el paso del patógeno e induciendo las defensas en las plantas. El objetivo de esta investigación fue evaluar la capacidad biocontroladora de *Azospirillum sp.* sobre *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* a través de pruebas de antagonismo *in vitro* e *in vivo* para la reducción del marchitamiento en tomate (*Solanum lycopersicum L.*). Se caracterizó tanto el antagonista (C7Az) como el patógeno (Fol1e), obteniendo una cepa de cada una. Mediante las pruebas de antagonismo *in vitro*, se determinó altos porcentajes mayores al 70% de inhibición del patógeno durante 8 días de crecimiento. Así mismo se encontró altos porcentajes en el índice de efectividad de la inoculación de *Azospirillum*, mediante su longitud del sistema radical, peso fresco radicular y la altura de la planta en el trasplante, longitud de la planta al término de la investigación y el peso del sistema radical al término de la investigación en 39.75%, 27.55%, 29.06% y 34.43% respectivamente y el grado de marchitez vascular se redujo en un 27,5% en cuanto a la incidencia y en un 19% en la severidad. La utilización de bacterias promotoras de crecimiento como *Azospirillum sp.* es altamente confiable para el control biológico de esta enfermedad mitigando el daño en las plantas.

Palabras clave: *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*, *Azospirillum sp.*, control biológico, incidencia, severidad.

ABSTRACT

Tomato wilt disease is caused by the phytopathogen *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* (FOL), which causes great production losses worldwide. Traditionally, the management for the control of this disease is based on the application of chemical fungicides, which severely damage the soil, the environment and human health; therefore, biological control with bacteria of the genus *Azospirillum sp.* is an alternative with high expectations in modern agriculture, since they act directly on the roots, preventing the passage of the pathogen and inducing plant defenses. The objective of this research was to evaluate the biocontrol capacity of *Azospirillum sp.* on *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* through *in vitro* and *in vivo* antagonism tests for the reduction of wilt in tomato (*Solanum lycopersicum L.*). Both the antagonist (C7Az) and the pathogen (Fol1e) were characterized, obtaining one strain of each. *In vitro* antagonism tests determined high percentages of more than 70% inhibition of the pathogen during 8 days of growth. Likewise, high percentages were found in the effectiveness index of the *Azospirillum* inoculation, through the length of the root system, fresh root weight and plant height at transplant, plant length at the end of the research and the weight of the root system at the end of the research in 39.75%, 27.55%, 29.06% and 34.43% respectively, and the degree of vascular wilt was reduced by 27.5% in terms of incidence and 19% in severity. The use of growth-promoting bacteria such as *Azospirillum sp.* is highly reliable for the biological control of this disease, mitigating plant damage.

Keywords: *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*, *Azospirillum sp.*, biological control, incidence, severity.

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUCCIÓN

El marchitamiento vascular es causado por el hongo *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* conocido comúnmente como FOL, ataca principalmente a plantas de tomate de edad adulta, sin embargo, también puede infectar a plantas mucho más jóvenes siempre y cuando estas estén en contacto con el inóculo. Esta enfermedad es altamente destructiva comienza a nivel de la raíz avanzando hacia la parte superior de la planta, una vez haya invadido completamente la planta, llega a su etapa final y muere (Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria [CNRF], 2019). A pesar de que los cultivos de tomate son controlados desde su siembra, el contagio puede darse por la contaminación del suelo, ya que FOL mediante la producción de clamidosporas se mantiene en el suelo por largos periodos de tiempo, donde cultivos sanos llegan a contaminarse por la rápida diseminación del patógeno mediante el viento o el agua (Vásquez & Castaño 2017).

Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici (FOL) es considerado como uno de los principales patógenos que afecta gravemente a las plantas de tomate a nivel mundial, disminuyendo en un 60% el rendimiento total, afectando significativamente la calidad del producto, por esta causa se incrementa la preocupación entre los productores debido a que para la mayoría es su fuente principal de ingresos (Ascencio-Álvarez et al., 2008). El tomate (*Solanum lycopersicum L.*), es uno de los principales cultivos sembrados y consumidos, ocupando un lugar importante en la explotación hortícola, aproximadamente el 75% de la producción mundial de tomate se destina al consumo fresco, mientras que el 25% restante, a la industria para la elaboración de pastas, salsas, etc. Tan solo en el año 2017 su producción fue de 241641489 t (Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria, 2017).

Comúnmente el manejo de la marchitez vascular es tratado en su mayoría con productos químicos que afectan no solo a producción y a sus trabajadores, sino también al medio ambiente y al suelo para futuros cultivos. El control biológico es tomado como una opción para muchos productores, el cual consiste en la utilización de organismos vivos, que beneficien a cultivos y controlen patógenos de forma segura y eficaz (Pullupaxi, 2016) .

Actualmente existen muchos hongos y bacterias endófitas que son utilizados como antagonistas de enfermedades fitopatógenas de cultivos de tomate, entre los más conocidos están *Trichoderma*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Azotobacter* (Quiroqa-Rojas et al., 2012), no obstante, en estudios recientes se ha podido apreciar que la inoculación de bacterias del género *Azospirillum sp.* resultan beneficiosas para el crecimiento y producción del cultivo de tomate, además su aplicación resultaría eficiente para que la contaminación del suelo se reduzca (Esquivel-Cote, 2017). Las bacterias *Azospirillum sp.* al ser muy versátiles tienen la capacidad de adaptarse con mucha rapidez y facilidad lo cual resulta importante para un cultivo, de la misma manera su incidencia influye para que el volumen de sus raíces se incremente y ayuda a la resistencia de fitopatógenos (Hernández et al., 2015).

El objetivo de esta investigación fue evaluar la capacidad biocontroladora de *Azospirillum sp.* sobre *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* a través de pruebas de antagonismo *in vitro* e *in vivo* para reducir el marchitamiento en tomate (*Solanum lycopersicum L.*).

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

El tomate es uno de los cultivos más importantes a nivel nacional ya que es de gran valor para la agricultura e industria, además de ser uno de los principales productos dentro de la canasta familiar. Su consumo se extiende cada vez más y la producción se ve aumentada para satisfacer a las necesidades de la población, lo que ha conllevado que se generen diversas formas de control intensivas que aumentan el uso de agroquímicos causando incluso el surgimiento de patógenos más agresivos. Ya que este cultivo es principalmente amenazado por bacterias, nematodos, virus y hongos que reducen la calidad y productividad del cultivo y de su fruto dejando pérdidas económicas fatales (Jaramillo, 2015). En un estudio realizado por la INEC (2013, como se citó en Jaramillo, 2015) se encontró que en el año 2013 se perdieron 27 hectáreas de 1353ha a causa de plagas y enfermedades.

El hongo *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici* (FOL) causante de la marchitez vascular del tomate, es responsable de bajos rendimientos en la producción y calidad de tomate de mesa, según (Martínez-Ruiz et al., 2016) indica en su investigación que *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici* (FOL) afectó al 60% de la producción en los últimos tiempos.

Se debe agregar que actualmente uno de los principales problemas en la agricultura es el uso y manejo descontrolado de fungicidas químicos, que en su mayoría resultan costosos e ineficaces para el control de la enfermedad, debido a que en los últimos años han aumentado su resistencia y se han esparcido de manera inescrupulosa. El uso indiscriminado de estos productos genera daños casi irreversibles al ambiente y a sus recursos naturales, sin contar que ponen en peligro la salud de sus productores y consumidores e incrementan costos de producción (RECHARTE, 2015).

1.3 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el grado de reducción de la marchitez vascular provocada por el hongo *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* con el uso de la bacteria *Azospirillum sp.*?

1.4 JUSTIFICACIÓN

Uno de los principales objetivos en la actualidad es la búsqueda por mantener un equilibrio y desarrollo sustentable con la naturaleza, surge la necesidad de la aplicación de nuevas estrategias ecológicas como alternativas que conlleven a la creación de nuevas tecnologías eficientes, utilizando material biológico y especies vegetales de corto plazo. El uso de agroquímicos no siempre es la mejor opción para satisfacer las demandas de los productores y consumidores, que en muchas ocasiones resultan inútiles, teniendo como resultado pérdidas significativas, no solo económicas si no también ambientales (RECHARTE, 2015).

Es por ello que, para reducir el efecto negativo al ambiente por el uso de estos químicos, se ha optado por la utilización de nuevos métodos de control mediante antagonistas. Tomado como opción a las bacterias del género *Azospirillum sp.* ya que es capaz de asociarse directamente con la raíz produciendo de esta manera diversos beneficios a la planta (Rangel-Lucio et al., 2011), lo que permite su utilización para el control de enfermedades producidas por hongos fitopatógenos como es *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* (FOL). El control biológico es una estrategia efectiva a largo plazo, siendo un mecanismo muy diferente al de los productos desarrollados químicamente (Ibarra et al., 2006).

1.5 LIMITACIONES

Las limitaciones de la presente investigación fueron el tiempo de trabajo en las instalaciones de los laboratorios de la universidad y el tiempo de contaminación de las plantas con el hongo.

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 Objetivo general

Evaluar la capacidad biocontroladora de *Azospirillum sp.* sobre *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* a través de pruebas de antagonismo *in vitro* e *in vivo* para la reducción del marchitamiento en tomate (*Solanum lycopersicum L.*).

1.6.2 Objetivos específicos

- Caracterizar los microorganismos *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* y *Azospirillum sp.* mediante técnicas microbiológicas y bioquímicas para su posterior uso en pruebas *in vitro* e *in vivo*.
- Determinar el efecto antagonista de *Azospirillum sp.* sobre *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* mediante ensayos *in vitro* para el estudio de su factibilidad de uso.
- Establecer el grado de infección de las plantas de tomate riñón con *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* mediante pruebas microbiológicas determinando la eficacia antagónica de los inoculados de *Azospirillum sp.*
- Elaborar una propuesta de artículo científico respetando los formatos internacionales para la posible divulgación de los resultados obtenidos.

1.7 HIPÓTESIS

La bacteria *Azospirillum sp.* es capaz de reducir el grado de marchitez provocado por el hongo *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* en condiciones *in vitro* e *in vivo*, pudiendo ser utilizada para control biológico de tomate.

CAPÍTULO 2

2.1 ESTADO DEL ARTE

En la investigación de (Russo et al., 2008) concluyó que las plantas de *Prunus cerasifera* L. clon Mr. S 2/5 inoculadas con *Azospirillum brasilense* Sp245 tuvieron efectos favorables ya que el sistema radicular, la producción de biomasa de pelos radiculares y la actividad apical aumentaron. Así mismo *A. brasilense* Sp245 protege a las plantas contra *Rhizoctonia spp.*, en casi un 100% frente al 0% con respecto al control negativo.

En la investigación de (Parmasi et al., 2019) se dio a conocer que *A. brasilense* disminuyó la gravedad de la enfermedad de *A. rabiei* conocida como el tizón de *Ascochyta* en cultivos de garbanzo. *A. brasilense* mejoro la expresión del gen Snakin2 que está relacionado con la defensa. En el experimento que se realizó en cultivos de garbanzo resistentes (ICC 12004) y susceptibles (Bivanij), resulta que la inoculación de esta bacteria si tendría significancia en los cultivos ya sea en el alza de la expresión del gen en plantas resistentes, así también en la regulación de la expresión del mismo en plantas susceptibles.

De acuerdo con (Hernández et al., 2015) indican que *Azospirillum* posee potencialidades para ser utilizada en la agricultura, ya que según información recopilada por estos autores estas bacterias son aptas para entrar en simbiosis y mutualismo con las plantas y con otros microorganismo relacionadas a estas. Las bacterias además fijan nitrógeno atmosférico, producen fitohormonas que ayudan al crecimiento y aumento de raíces, solubilizan nutrientes y minerales a las plantas y además de puede ser utilizada como control biológico induciendo la resistencia a patógenos.

Citando a Alfonso y colaboradores (2005), considera que *Azospirillum* es el género que domina en la rizófora del cultivo de tomate en contraste con *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Bacillus* y *Streptomyces* en las condiciones adecuadas. Las bacterias *Azospirillum* provocaron que las plantas obtuvieran un rendimiento agrícola que supera el 11% con respecto a los testigos y que las plantas tuvieron efectos positivos en el crecimiento y estado nutricional de las plantas, además de que la rizósfera de las plantas inoculadas hayan aumentado positivamente.

En la investigación de (Carmona, 2019) titulada “Identificación de un aislamiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y respuesta fisiológica en tomate durante la infección frente a dos elicitores fúngicos” se dio a conocer que la marchitez vascular del tomate se redujo en un 70% con la aplicación en conjunto del quitosán de un bajo peso molecular (2.5 mg.mL^{-1}) y *Trichoderma* spp.

Con base en Esquivel-Cote (2017), plantea que con *Azospirillum* sp., y la fertilización química nitrogenada -FQN- beneficiaron el crecimiento y fisiología de plántulas aumentando de esta forma el crecimiento y la tasa de asignación, además de ello favorecieron positivamente la producción de frutos. Los frutos cosechados de plantas inoculadas con la cepa AZm5 fertilizadas con $255 \text{ kg de Nha}^{-1}$, registraron contenidos altos en potasio, sugiriendo que la inoculación con *Azospirillum* contribuye al crecimiento y producción del cultivo bajo condiciones agotadoras, reduciendo la contaminación del suelo con fertilizantes químicos.

En la investigación de Cuevas (2000), señala que *A. brasilense* en combinación con NK tuvieron un mejor comportamiento en semillero mientras que en el trasplante hubo una mejor relación nutricional NPK esta investigación fue realizada en tomate y se tomaron diferentes parámetros para su estudio como es: diferentes relaciones nutricionales en fase de trasplante, sobre la altura y masa fresca de las plántulas al

trasplante, el número de frutos y rendimiento agrícola en el cultivo del tomate Var. Campbell-28, comparado con un testigo de producción y un control sin fertilizar.

2.2 BASES TEÓRICAS

2.2.1 EL TOMATE (*Solanum lycopersicum L.*)

Solanum lycopersicum L. es conocido comúnmente como tomate, tomatara o jitomate (Molina et al., 2018). Es uno de los cultivos más populares en el ámbito industrial y gastronómico por su valor nutricional y gran demanda a los consumidores. Es una planta perenne que usualmente es cultivada en invernaderos o al aire libre. Dentro de los 10 países que más producen el fruto de tomate son: China, Estados Unidos, India, Egipto, Turquía, Italia, Irán, España, Brasil y México (Hernández-Leal et al., 2013).

2.2.1.1 Origen

El tomate (*Solanum lycopersicum L.*) es una especie originaria de la Región Andina de Sudamérica, pero su domesticación fue en México (SILVA, 2015). El ancestro silvestres según muchos autores procedía de Perú y Ecuador el cuál en aquella época se dispersó como maleza, aquella variedad era llamada *Solanum lycopersicum var.cerasiforme* (Dunal) (Molina et al., 2018).

2.2.1.2 Importancia

El tomate (*Solanum lycopersicum L.*) es de gran importancia por sus altos niveles nutricionales, económicos e industriales (SILVA, 2015) el tomate es de gran importancia económica ya que muchos países destinan grandes superficies de tierras para el cultivo de esta especie, así mismo es de gran importancia industrial ya que gran parte del producto es destinado a la fabricación de diferentes productos comerciales comestibles como salsas, jugos, sopas, entre otros (Sánchez López, 2017).

2.2.1.3 Clasificación Taxonómica

Según el Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA, 2017) el tomate presenta la siguiente clasificación taxonómica:

Tabla 1: Clasificación taxonómica del tomate (Solanum Lycopersicum L.)

Reino:	<i>Plantae</i>
División:	<i>Magnoliophyta</i>
Clase:	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase:	<i>Asteridae</i>
Orden:	<i>Solanales</i>
Familia:	<i>Solanaceae</i>
Género:	<i>Solanum</i>
Especie:	<i>Solanum Lycopersicum L.</i>

Fuente: INTA (2017)

2.2.1.4 Descripción Botánica

Son plantas herbáceas, con una altura de más de 1.5 cm que comúnmente son vellosas. Sus hojas son compuestas con borde dentado y miden aproximadamente entre 5 y 7 cm de longitud. Su fruto es de color rojo, aunque puede tornarse de color amarillento o rosado en sus primeras etapas, y su diámetro es de más de 2 cm, este fruto puede contener grandes cantidades de semillas que comúnmente son amarillentas y aplanadas (ÁLVAREZ, 2018).

2.2.1.5 Requerimientos térmicos del cultivo

Según Aguilar-Rodríguez y colaboradores (2020), la temperatura para que el cultivo se desarrolle favorablemente bajo invernadero oscila entre los 22 y 26 °C durante el día y 13 a 16 °C por la noche. Hay que tener en cuenta que durante todo el ciclo de desarrollo

la temperatura tendrá un papel importante, ya que para en temporada de maduración del fruto es esencial que la temperatura este entre 18 y 24 °C (MERINO, 2017).

2.2.1.6 Fenología del cultivo

Hay tres fases para el desarrollo de un cultivo de tomate según Álvarez (2018), siendo las siguientes:

- **Fase inicial:** esta fase inicia desde el primer día de germinación hasta los 21 días, aumentando rápidamente la materia seca, característica propia de esta fase.
- **Fase vegetativa:** esta fase es la continuación de la fase inicial a partir de los 30 a 45 días, con una duración de 25 a 40 días y termina antes de la floración, en esta etapa las plantas necesitan más nutrientes para su correcto desarrollo de ramas y hojas.
- **Fase reproductiva:** en esta etapa envuelve la floración y la fructificación, con una duración entre 40 y 60 días, utilizando los nutrientes para su crecimiento y maduración.

2.2.1.7 Enfermedades Causadas por hongos.

Hay muchas enfermedades causadas por hongos que causan pérdidas grandes para los productores, estas enfermedades se dan desde la primera etapa del cultivo, a continuación, se da a conocer las principales según Martínez-Ruiz y colaboradores (2016).

2.2.1.7.1 Ahogamiento de plántulas y necrosis radicular (*Pythium aphanidermatum*)

El hongo *Pythium aphanidermatum* es capaz de atacar a plantas en sus primeras etapas de crecimiento, que puede causar podredumbre del tallo e incluso la muerte, además de ellos este hongo puede causar que las plántulas de tomate crezcan de forma desigual. Los síntomas característicos de la enfermedad son las lesiones de color castaño oscuro o negras alrededor del tallo que es conocida como ahogamiento, la planta es capaz de

doblarse, seguido por un marchitamiento severo y por ende se produce la muerte (Martínez-Ruiz et al., 2016)

2.2.1.7.2 Tizón temprano (*Alternaria solani*)

Es una de las principales enfermedades que afecta al tomate, bajando su rendimiento entre el 20-30%. Esta enfermedad se desarrolla rápido con una humedad relativa del 70% durante la noche. Los principales síntomas que se pueden observar son la aparición de manchas circulares en las hojas de color café y negro que al final se secan rápidamente, mientras avanza la enfermedad se puede apreciar el desarrollo de anillos negros y concéntricos. La aparición de lesiones oscuras, correosas y hundidas en la punta del cáliz son síntomas de los frutos de platas con dicha enfermedad (Martínez-Ruiz et al., 2016).

2.2.1.7.3 Podredumbre gris (*Botrytis cinérea*)

Esta enfermedad provocada por el hongo *Botrytis cinérea* es considerada como la segunda más importante causada por hongos. Es una enfermedad muy severa que afecta a flores, frutos y tallos, provocando pérdidas grandes en cuanto a poscosecha ya que este patógeno suele infectar en esta etapa encontrándose incluso en lugares de almacenamiento. Los principales síntomas son cancro en tallos, flores y frutos (Martínez-Ruiz et al., 2016).

2.2.1.7.4 Oidio, Cenicilla u Oidiopsis (*Leveillula taurica*)

El hongo *Leveillula taurica* que provoca la enfermedad conocida como Oídio, es una enfermedad fácil de reconocer ya que tienen características similares a un polvo blanco en las hojas. Los síntomas principales son lesiones o manchas blanquecinas que aparecen en el haz y el envés de las hojas, esta enfermedad se puede desarrollar con mayor facilidad gracias a las condiciones de invernadero (Martínez-Ruiz et al., 2016).

2.2.1.7.5 Marchitez vascular (*Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici* (Sacc.)

Snyder y Hansen.

La marchitez vascular del tomate es causada por el hongo *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen, es una de las principales enfermedades ya que puede producir severas pérdidas hasta un 60% del rendimiento total (Martínez-Ruiz et al., 2016).

2.2.1.7.5.1 Síntomas

Las plantas infectadas con marchitez vascular inicialmente muestran amarillamiento en sus hojas más viejas, que mientras la enfermedad avanza, este puede darse en toda la planta, en ciertas ocasiones en plantas adultas en etapa de producción o al término, suelen presentar estos síntomas a un solo lado o solo en la mitad de la planta. Las hojas amarillas infectadas se marchitan, se secan y llegan a su etapa final. Una de las características principales de la enfermedad es la necrosis marrón que se produce en el interior del tallo, esta suele ser más extensa conforme la enfermedad es más severa. Las plantas jóvenes con la enfermedad además muestran necrosis y pudrición de las raíces conllevando a haya un crecimiento mucho más lento, epinastía, amarillamiento de las hojas inferiores, marchitez de hojas y tallos y como etapa final la muerte de la planta (Carrillo-Fasio et al., 2003).

2.2.1.7.5.2 Ciclo de vida

El hongo *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici* puede infestar a plantas mediante heridas en las raíces o tallos, además de ello pueden acoplarse a climas cálidos mayores de 28°C, unas de las ventajas para el desarrollo de la enfermedad es la humedad óptima y niveles bajos de N y P. La enfermedad puede mantenerse en los suelos por mucho tiempo y puede infectar a futuros cultivos, así mismo la enfermedad puede transmitirse por el agua, el viento y por herramientas contaminadas (Carrillo-Fasio et al., 2003).

2.2.2 *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen. (FOL)

La marchitez vascular del tomate causado por el hongo *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen. (FOL). Actualmente se han reportado 3 razas del hongo FOL, la raza 1 la cual fue descubierta en 1886 y su resistencia está presente en el locus 1 de *Solanum pimpinellifolium* PI-79532, la raza 2 que fue reportada en Ohio en 1945 y su resistencia está presente en el nuevo locus (1-2) del híbrido natural *S. esculentum x S. pimpinellifolium* PI-126915 y la raza 3 se reportó por primera vez en 1978 en Australia (Hernández et al., 2014).

2.2.2.1 Información taxonómica de FOL

A continuación se da a conocer la información taxonómica de *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici* según (CNRF, 2019):

Tabla 2: Información de FOL

Nombre científico:	<i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i> W. C. Snyder & H.N. Hansen, 1940
Sinonimias:	<i>Fusarium oxysporum subsp. lycopersici</i> Sacc., 1886 <i>Fusarium lycopersici</i> (Sacc.) Wollenw, 1913
Nombres comunes:	Marchitez del tomate Marchitez vascular del tomate <i>Fusarium wilt on tomato</i> (inglés)

Fuente: (CNRF, 2019)

Posición Taxonómica

Tabla 3: Posición Taxonómica de FOL

Reino:	Fungi
Dominio:	Eukaryota
Phylum:	Ascomycota
Subphylum:	Pezizomycotina
Clase:	Sordariomycetes
Subclase:	Hypocreomycetidae
Orden:	Hypocreales
Familia:	Nectriaceae
Género:	Fusarium
Especie:	<i>Fusarium oxysporum</i>

Fuente: (CNRF, 2019)

2.2.2.2 Caracterización Morfológica de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*

Las colonias de *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici* poseen micelio aéreo algodonoso de color blanquecino, con pigmentación que varía entre rosa claro y violeta oscuro, que es observado de mejor manera al reverso de la caja Petri. Su colonia es de crecimiento rápido y es densa dispersa de micelio (Carmona, 2019). Las colonias son hialinas al inicio de su crecimiento. El diámetro de la colonia es alrededor de 2cm pasadas las 72 horas de crecimiento (Páez & Albarracín, 2007).

Al microscopio las hifas de los hongos son hialinas y septadas, además se observa tres clases de esporas que produce este hongo que son: microconidios los cuales están agrupadas en falsas cabezas, son abundantes y en su mayoría unicelulares. Las medidas de los microconidios oscilan entre entre 5 y 12 μm de largo por 2.5 a 3.5 μm de ancho; macroconidios son abundantes en medio CLA, se forman sobre esporodoquios con conidióforos simples y cortos, presentan medidas entre 20.3 y 27 μm de la largo y 6.7 μm de ancho aproximadamente, aunque puede variar; y clamidosporas que se forman simples

o en pares en hifas de forma intercalar o terminal, su medida oscila entre 5 a 15 μm de diámetro (Cardona-Piedrahita & Castaño-Zapata, 2019).

2.2.2.3 Aislamiento de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*

Para el aislamiento de *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici* (FOL), se obtiene material vegetal con signos característicos de la enfermedad, puede ser tallos, hojas o raíces y para la siembra comúnmente se utiliza el medio de cultivo PDA (Papa Dextrosa Agar), y es óptimo para el crecimiento de microconidios, así también de macroconidios y clamidosporas, pero en bajas cantidades. El medio de cultivo CLA (Carnation Leafpiece Agar) es utilizado para el óptimo y abundante crecimiento de macroconidios, también es utilizado el medio de cultivo SNA (Spezieller Nährstoffarmer Agar) para el crecimiento óptimo de las clamidosporas. La temperatura óptima de incubación para el crecimiento de *Fusarium* oscila entre los 25 a 30 °C (Duarte et al., 2016).

2.2.3 CONTROL BIOLÓGICO

El control biológico se trata de la utilización de organismos vivos o compuestos de ellos para la disminución o el control total de las enfermedades en las plantas y suelos que resulta beneficiosa para evitar el uso de agroquímicos (Vinchira-Villarraga & Moreno-Sarmiento, 2019). Este se clasifica según su mecanismo de acción en microorganismos antagonistas, precursores de la actividad antagónica u organismos benéficos e inductores de mecanismos de defensa vegetal (A. García, 2014).

2.2.3.1 Ventajas y desventajas

Dentro de las ventajas y desventajas del control biológico Según Jiménez (2009) son las siguientes:

Ventajas

- No provoca ningún efecto negativo para otros organismos incluido el hombre.
- Evita plagas introducidas
- La relación costo / beneficio es muy favorable.
- El control es a largo plazo o permanente.
- Se reemplazan a los productos químicos.

Desventajas

- Falta de conocimiento sobre el control biológico.
- Falta de personal con conocimientos en el tema.
- Falta de ingresos.
- Poca disponibilidad
- Los enemigos naturales no siempre atacan a todas las plagas de un cultivo.
- Los enemigos naturales son más susceptibles a los Plaguicidas.

2.2.3.2 Atributos ecológicos de enemigos naturales

Para que un enemigo natural sea efectivo es necesario que sea adaptable a los cambios del medio ambiente, capaz de mostrar densidad-dependencia con su huésped y que sea capaz de crecer más rápido que su enemigo (A. García, 2014).

2.2.3.3 Tipos de control biológico

- **Control biológico natural:** es aquel donde los factores abióticos (elementos climáticos como la temperatura, viento o lluvia) y factores bióticos (enemigos naturales como bacterias, virus, hongos, nematodos, etc.) ejercen un papel importante sobre una plaga atacándola o manteniéndola inactiva para el buen crecimiento de un cultivo, este control es la clave para que plagas importantes no se desarrollen (Jiménez, 2009).

- **Control biológico clásico:** consiste en la introducción de determinados enemigos naturales, para el control de patógenos, insectos plaga, malezas, etc. (Boldini et al., 2019).
- **Control biológico aplicado (CBA):** se trata de la inoculación de diferentes organismos en masa, obtenidos en laboratorio, este control busca un equilibrio con la reducción del nivel de daño que ocasiona los patógenos. Es un método bastante similar a los convencionales que usan insecticidas y son a largo plazo (Boldini et al., 2019).

2.2.3.4 Mecanismos de control microbiológico

2.2.3.4.1 Competencia

La competencia trata del requerimiento de dos o más microorganismos por un mismo elemento ya sea por nutrientes, oxígeno o espacio, donde solo un microorganismo logre beneficiarse de dicho elemento dejando a los otros organismos con menos opciones de supervivencia (Fernández-Larrea, 2001).

2.2.3.4.2 Fungistasis

Es una técnica en donde se trata de inactivar las condiciones propias para el desarrollo de las esporas de los hongos, que generalmente se limita las fuentes de carbono (Lockwood, 1986).

2.2.3.4.3 Antibiosis

La antibiosis trata de la interacción de dos organismos en la cual uno de ellos no puede sobrevivir debido a producción de sustancias llamados antibióticos que produce. El estudio de los antibióticos aislados de microorganismos es muy importante en medicina (Cubilla-Ríos et al., 2019).

2.2.3.4.4 Micoparasitismo

Es una simbiosis antagónica que es dada entre organismos, en esta acción están implicadas el uso de enzimas como la quitinasa, glucanasa o celulasa, en donde el patógeno es usado como fuente de alimento y el organismo antagonista micoparásito es capaz de romper su pared celular con dichas enzimas. (Infante et al., 2009).

2.2.3.4.5 Mecanismos combinados

Este efecto se da cuando un microorganismo es capaz de utilizar varios mecanismos de acción simultáneamente para combatir un patógeno, reduciendo de esta manera el daño que provoca o eliminándolo en su totalidad (Infante et al., 2009).

2.2.4 MICROORGANISMOS ANTAGONISTAS

Los microorganismos antagonistas son aquellos capaces de interferir en el desarrollo o supervivencia de los patógenos presentes en las plantas o en el suelo. Es importante que para el buen desarrollo de estos antagonistas haya una introducción masiva de estos microorganismos, así también que la temperatura sea óptima para su buena aceptación al huésped. Un microorganismo antagónico entra en competencia contra el patógeno por el espacio, nutrientes, sitios de colonización, producción de enzimas, etc. (Ezziyyani et al., 2006).

2.2.4.1 Bacterias antagonistas

Son aquellas bacterias benéficas que ejercen un control biológico sobre patógenos como hongos, bacterias, nematodos u otros. Actualmente hay muchas bacterias para el control biológico de patógenos como bacterias del género *Pseudomonas fluorescens* y del género *Bacillus*, estas bacterias son consideradas es diferentes estudios como unas de las más eficaces (Fernández-Larrea, 2001).

2.2.5 MICROORGANISMO ENDÓFITOS

Los microorganismos endófitos son aquellos que colonizan los tejidos internos de las plantas sin causar daños, entrando en equilibrio y asociación con la planta, en donde las plantas y los microorganismos endófitos se benefician uno del otro (Gonzalez et al., 2019).

2.2.5.1 Origen

Según estudios realizados las primeras asociaciones de endófitos con plantas fueron evidenciadas en tejidos y hojas fosilizadas, planteando la posibilidad de que estas asociaciones hayan ocurrido desde el nacimiento de la primera planta. Debido a una larga asociación, es posible que genéticamente las plantas y los endófitos se comuniquen entre sí para adaptarse de forma segura, rápida y eficaz (Cordero et al., 2009).

2.2.5.2 Ecología de endófitas

Para la buena colonización de las bacterias en las plantas influyen las variaciones estacionales, tipo de tejido de la planta, densidad poblacional, entre otros. Así mismo los factores bióticos y abióticos que interfieren en los suelos juegan un papel importante en la colonización de los microorganismos endófitos (Cordero et al., 2009).

2.2.5.3 Aislamiento e identificación de endófitas

Existen diferentes métodos para el aislamiento e identificación de microorganismos endófitos como es crecimiento en medios de cultivos, utilizando microplacas BiologTM es otro método dependiente del cultivo que tiene 95 fuentes diferentes de carbono, sal de tetrazolio y un control negativo, así también Ecoplate BiologTM conteniendo 31 fuentes de carbono diferentes que comúnmente son encontradas en el ambiente, tres repeticiones y un control negativo. Otros métodos son el análisis de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) y la caracterización molecular junto con la bioinformática (Cordero et al., 2009).

2.2.6 BACTERIAS ENDOFITAS

Las bacterias endófitas son microorganismos que al colonizar la planta no produce efectos negativos en ella, por lo contrario, se produce un mutualismo entre la planta y los endófitos bacterianos que resultan beneficiosas para la planta. Muchas de las bacterias endófitas colonizadas en las raíces son duraderas y producen compuestos para las plantas ayudando a su resistencia, es por esta razón que las bacterias endófitas son de gran importancia en la agricultura (González et al., 2019).

2.2.7 GÉNERO *Azospirillum sp.*

Azospirillum sp. son conocidas como bacterias promotoras de crecimiento en las plantas, ya que producen auxinas como el ácido indol acético (AIA) y el ácido indol butírico (AIB), que ayudan a que la raíz de las plantas inoculadas con esta bacteria aumente y sea capaz de absorber mayor cantidad de nutrientes del suelo. Pueden utilizar fuentes de carbono para su crecimiento como alcoholes, azúcares y ácidos orgánicos (Velasteguí & Pallo, 2011).

Las bacterias del género *Azospirillum sp.* son conocidas como diazótrofos, ya que son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico, que crecen en ambientes microaerófilos. Además, son endófitos, penetrando en las raíces de las plantas, las bacterias son captadas por las raíces por una reacción denominada quimiotaxis por la presencia de sustancias presentes en su ambiente lo que hace que estas bacterias sean capaces de colonizar espacios intra e intercelulares de las raíces (Aguilar, 2020).

2.2.7.1 Taxonomía de *Azospirillum sp.*

A continuación se presenta la clasificación taxonómica de las bacterias del género *Azospirillum sp.* según Aguilar y colaboradores (2016).

Tabla 4: Taxonomía de *Azospirillum sp.*

Dominio:	Bacteria
División:	Proteobacteria
Clase:	Alphaproteobacterias
Orden:	Rhodospirillales
Familia:	Rhodospirillaceae
Género:	<i>Azospirillum</i>
Especie:	<i>A. lipoferum</i> , <i>A. brasilense</i> , <i>A. amazonense</i> , <i>A. halopraeferans</i> , <i>A. irakense</i> , <i>A. largimobile</i>

Fuente: (Aguilar et al., 2016)

2.2.7.2 Historia

Las bacterias del género *Azospirillum sp.* originalmente eran llamadas *Spirillum lipoferum* y su primera especie fue aislada por Beijerinck en Holanda en el año de 1925 de suelos arenosos que contenían poco nitrógeno. En 1973 fue redescubierta gracias a las observaciones de Peña-Cabriales y Döbereiner quienes reportaron su gran distribución en la rizófora de pastos tropicales, debido a ello empezaría la época moderna de la bacteria, que fue reclasificada a partir de la clasificación taxonómica de *S. lipoferum* tomando un nuevo género con el cuál es reconocida hasta la actualidad como *Azospirillum sp.* (De-Bashan et al., 2007).

Actualmente se conocen seis especies del género *Azospirillum sp.*, las cuales son: *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*, *A. halopraeferans*, *A. irakense*, *A. largimobile*. Las primeras especies en ser descritas y las más estudiadas fueron *A. lipoferum* y *A. brasilense*. Después de que este género fue redescubierto hacia el año 1993, fue muy estudiada por su gran capacidad de aumento en el crecimiento y rendimiento de las plantas (Leyva et al., 2006).

2.2.7.3 Aislamiento

El aislamiento de bacterias de *Azospirillum sp.* se lo realiza comúnmente de la superficie de la raíz y del suelo de las plantas, aunque según Caballero-Mellado (1998), indica que también pueden ser aisladas del interior de las raíces o tallos de las plantas.

En la investigación de Mendoza y colaboradores (2004), se asegura que para la toma de muestras para el aislamiento de bacterias es idóneo realizarlas en etapa de floración ya que es donde hay más concentración de bacterias.

Tradicionalmente el medio de cultivo utilizado para el aislamiento de las bacterias del género *Azospirillum sp.*, es Nitrogen Fixation Biological (NFB, por sus siglas en inglés). La consistencia del medio tiene que ser semisólida ya que la bacteria es móvil y tiene que ser libre de nitrógeno, utilizando al malato como su fuente de carbono (Velasteguí & Pallo, 2011). *Azospirillum sp.*, es capaz de crecer en diferentes temperaturas pero la idónea para el aislamiento y crecimiento según Bergey (2011, como se citó en Reyes, 2016) oscila entre 32-35 °C con un pH de 6.5-7.

2.2.7.4 Identificación

Se pueden encontrar diversas pruebas para la identificación de las especies de *Azospirillum* como las bioquímicas y las inmunológicas. Las bacterias del género *Azospirillum* son bacterias Gram negativas, poseen pleomorfismo, forma vibroide y movilidad en espiral. Contiene gran cantidad, hasta un 50% del peso seco celular de poli-β-hidroxibutirato (PHB), que se observa en el microscopio como abundantes gránulos refringentes en medios sólidos o semisólidos de 24 a 48 horas de crecimiento (Caballero-Mellado, 1998).

En la investigación realizada por Tarrand y colaboradores (1978), indica que las bacterias *Azospirillum* son ligeramente curvas, de forma bacilar similar a un quiste, su tamaño varía entre con 08 a 1 μm de diámetro y 2.1 a 5 μm de longitud.

Cuando el crecimiento bacteriano en medios de cultivo NFB semisólidos forman una película blanca y densa de tamaño de 2-3 mm por debajo de la superficie en forma de sombrilla, y, además el medio cambia de color de verde a azul por el indicador azul de bromotimol, señalando como positivo para el aislamiento de bacterias del género *Azospirillum sp.* (Velasquí & Pallo, 2011).

2.2.7.5 Distribución

Las bacterias de *Azospirillum sp.*, están distribuidas alrededor de todo el mundo, siendo abundantes en las regiones tropicales. En zonas templadas, frías y desérticas la presencia de *Azospirillum* es supremamente baja. El pH del suelo tiene mucho que ver en la presencia de *Azospirillum* en las plantas ya que en suelos con pH cercanos a la neutralidad se han encontrado grandes cantidades de las especies de *A. brasilense* y *A. lipoferum* (Caballero-Mellado, 1998).

2.2.7.6 Bioquímica

La morfología de las células de *Azospirillum* en forma de quistes que son conocidos como formas C, se debe a la presencia de metales pesados y el envejecimiento de la célula. El mejoramiento de la sobrevivencia de *Azospirillum* es debido a la formación y agregación de quistes cuando los nutrientes indispensables para las bacterias están limitados. La acumulación de poli- β -hidroxibutirato (PHB) es importante debido a que sirve como almacén de energía, carbono y nitrógeno, así también son resistentes a la desecación, al choque osmótico y a la luz ultravioleta. Se han encontrado otros compuestos en cultivos de *Azospirillum* como ácido indol pirúvico, indol etanol, indol acetaldehído, triptamina entre otros (Velasquí & Pallo, 2011).

2.2.7.6.1 Ventajas del uso de *Azospirillum*

El uso de las bacterias del género *Azospirillum* tiene diferentes ventajas como:

- Ayuda a la reducción del uso de productos químicos como fertilizantes nitrogenados, además ayudan en el incremento en el rendimiento de cultivos (Fischer et al., 2007).
- Aumenta el volumen del sistema radicular, acelerando el crecimiento de las plantas. Fijan nitrógeno y producen auxinas (Villegas-Espinoza et al., 2010).
- Son parte del proceso de degradación de moléculas orgánicas de origen vegetal y animal ya que son fuentes de energía y carbono beneficiosas (Rivera-Cruz et al., 2010).
- Forman alginitos en las raíces de las plantas hospedadoras, los cuales contribuyen a las bacterias a resistir mejor en temporadas de sequía (Bashan et al., 2005).

2.2.7.7 Control biológico con cepas de *Azospirillum sp.*

Hay diversas investigaciones que demuestran el uso de bacterias del género *Azospirillum* como control biológico por ejemplo el uso de *Azospirillum brasilense* como biocontroladora de la antracnosis en cultivos de fresas, así también en combinación con *Pseudomonas fluorescens* sirve como biocontrol frente a frente a *Pyricularia oryzae*, *Azospirillum* induce la resistencia al ataque de *Diabrotica* en cultivos de maíz entre otros (Fendrihan et al., 2017).

2.2.7.8 Asociación bacteria-planta

Las bacterias del género *Azospirillum sp.*, invaden o colonizan principalmente la superficie de las raíces y los pelos radicales. Las proteínas y polisacáridos de la membrana externa del *Azospirillum* son los que participan en la asociación eficaz entre

las bacterias y las plantas. Estas sustancias permiten una fuerte adherencia a las raíces de la planta a las que se inocularon las bacterias (Schoebitz, 2006).

2.2.7.9 Mecanismo de acción

Mediante la fijación de nitrógeno de la atmosfera, siguiendo un proceso enzimático denominado nitrogenasa, las bacterias aumentan la biodisponibilidad de minerales necesarios para su sobrevivencia, de esta forma aporta nitrógeno naturalmente a la planta, siendo este el principal mecanismo para el incremento del crecimiento de las plantas inoculadas con *Azospirillum sp.* (Aguilar, 2020).

2.2.7.10 Fijación de nitrógeno

La fijación de nitrógeno es uno de los principales beneficios que ofrece las bacterias del género *Azospirillum* a las plantas (Fendrihan et al., 2017).

Según un estudio la fijación de nitrógeno de la atmósfera se lleva a cabo mediante:

El complejo enzimático llamado nitrogenasa, que está constituido por dos hierros proteínas: la proteína (I), llamada hierro-molibdeno-proteína, y la proteína (II), llamada hierro-proteína. La enzima requiere de la colaboración de otras dos proteínas: ferredoxina y flavodoxina, que actúan como donadores de electrones y reductores naturales de la nitrogenasa. Los electrones son transportados a la nitrogenasa por la ferredoxina y llegan a la hierroproteína, ésta activa a la Mo-Fe-proteína y se produce la reducción de nitrógeno, siendo luego fijado como compuesto aminado (L. Aguilar, 2020).

2.2.7.11 Efecto de *Azospirillum* sobre las plantas

Según estudios la inoculación de bacterias del género *Azospirillum* puede tener muchos efectos en su crecimiento y producción, pero las más significativas son: el

aumento en peso seco total, altas concentraciones de nitrógeno, tasas de germinación elevadas e incremento en las raíces de las plantas (de-Bashan et al., 2010).

2.3 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS

Mutualismo: el mutualismo es la interacción o relación entre dos especies diferentes como bacterias plantas, donde se benefician mutuamente manteniendo un equilibrio (González et al., 2019).

Pleomorfismo: aquellos microorganismos que tiene la capacidad de cambiar su morfología, es decir su morfología es variable (Musto et al., 2013).

Escala de Mc FARLAND: consiste en una escala de diez tubos estandarizados con la mezcla de diferentes cantidades de Cloruro de Bario y Ácido Sulfúrico, en donde se asemeja a la turbidez de una determinada suspensión microbiana, que se compara visualmente hasta la obtención de la concentración requerida y lo relaciona con el número de células de acuerdo a cada patrón. Para que no haya ningún margen de error es conveniente realizar la comparación con tubos que sea de igual diámetro o volumen (McFARLAND, 1907).

Inoculantes microbianos: son microorganismos con una concentración determinada que es introducida en las semillas, suelo o en las plantas, de esta manera aumenta su población para almacenar más nutrientes disponibles y aumentar los beneficios para la planta (Pedraza et al., 2010).

Medios de cultivo: es un conjunto de nutrientes que puede estar en forma sólida, semisólida o líquida, que es usado para el crecimiento e identificación de microorganismos. Este medio asegura la disponibilidad de nutrientes necesarios para que los microorganismos puedan sobrevivir periodos de tiempos necesarios hasta su utilización (Nápoles et al., 2006).

Diazótrofos: Son organismos capaces de crecer en ambiente sin fuentes de nitrógeno, es por ello que tiene la habilidad de fijar nitrógeno de la atmosfera, sintetizando la enzima nitrogenasa (Bello et al., 2015).

Microaerófilas: Son los microorganismos que requieren de condiciones bajas de oxígeno para sobrevivir, relativamente bajas a lo se puede encontrar en la atmosfera, ya que un microorganismo microaerófilo puede sobrevivir a un 5% de oxígeno en comparación a la atmosfera que su nivel de oxígeno es aproximadamente de un 21% (Macías et al., 2019).

Quimiotaxis: fenómeno que se da cuando microorganismos uni y pluricelulares como las bacterias destinan sus movimientos por la presencia de ciertas sustancias químicas que pueden estar presentes en su alrededor o en su ambiente (Fernández, 1997).

■ CAPÍTULO 3

3.1 NIVEL DE INVESTIGACIÓN

El presente trabajo tiene un nivel de investigación de tipo experimental cuantitativo, ya que de los datos numéricos adquiridos durante el trabajo experimental se realizó una interpretación para dar a conocer el efecto beneficioso de la aplicación de inoculantes bacteriológicos del género *Azospirillum* en las plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) para la reducción del marchitamiento vascular producido por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Así mismo la investigación tiene un nivel exploratorio y explicativo debido a que se da a conocer porque de los hechos generando una reacción de causa y efecto.

3.2 DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

El trabajo tiene un diseño de investigación de tipo experimental puesto que las variables dependientes cambian debido a la manipulación de las variables independientes, en este caso se presencia la reducción de la incidencia de la marchitez vascular en plantas de tomate con la inoculación de bacterias del género *Azospirillum* sp.

3.3 POBLACIÓN Y MUESTRA

Para el aislamiento de las bacterias del género *Azospirillum* sp., se tomó raíces de plantas de *L. perenne* de un área destinada como forrajes de alimentación animal de 200 m² en el cantón Paute, de donde se obtiene una muestra de ocho raíces. Para el aislamiento de hongos *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* se tomaron muestras representativas de un área ubicada en la parroquia Bulán, cantón Paute en la provincia del Azuay. El total de muestras es de 56 tallos de 15 a 17 cm de longitud con síntomas de marchitez vascular transportadas al laboratorio en siete fundas autosellantes. Para la siembra de las plantas de tomate se obtienen como muestra representativa 200 semillas certificadas de la

variedad “Sheila Victory” de un paquete de 900 semillas, obtenidas del centro agropecuario “Semilleros el Huerto”.

3.4 VARIABLES

Dependiente: Plantas de tomate con marchitez vascular.

Independiente: Inoculación de bacterias de género *Azospirillum sp.*

Interviniente: colonización de las bacterias en las raíces de las plantas.

3.5 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Las técnicas e instrumentos de recolección de datos fueron la observación documental con la ayuda de cuadros, tablas estadísticas y revisión bibliográfica de documentos, tesis, manuales, artículos científicos, libros con la ayuda de base de datos como: Google Escolar, Scielo, Dialnet, Springer, Scopus y programas de referencia como Zotero. Adicionalmente para la técnica de observación no estructurada se realizó mediante instrumentos como diario de campo, cámara fotográfica y de video.

3.6 TÉCNICAS DE PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS

Para el análisis estadístico del experimento se utilizó el programa estadístico Minitab 17 con las funciones de prueba de normalidad, para normalizar los datos se utilizó COX-BOX y transformación de Johnson, así mismo se utilizó la prueba no paramétrica de signos Wilcoxon para aquellos datos que no seguían una distribución normal. Con los valores obtenidos durante el estudio para las variables medibles se llevó a cabo un análisis de varianza ANOVA y la comparación entre los tratamientos mediante la prueba de Tukey.

3.7 PROCEDIMIENTO

3.7.1 FASE 1: Recolección de las muestras.

3.7.1.1 *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*

Las muestras se tomaron de cultivos de tomate con evidentes síntomas de marchitamiento vascular ubicados en la comunidad de Bulán, cantón Paute, Provincia del Azuay.

Materiales: tijeras de podar, fundas autosellantes, rotulador

El tipo de muestreo utilizado es muestreo por cuotas, la misma que según Hernández y Carpio (2019) consiste en la formación de grupos o estratos con determinadas cualidades o rasgos representativos de la muestra requerida.

Con una tijera de podar se cortaron 70 fragmentos de entre 15 y 17 cm de la base del tallo de plantas con características de *Fusarium oxysporum* y se las coloca en fundas autosellantes (Imagen 1), con su debida rotulación para ser trasladadas a los Laboratorios de Ciencias de la vida de la Universidad Politécnica Salesiana.



Imagen 1: Muestra de tomate infectados

Fuente: Autora

3.7.1.2 *Azospirillum sp.*

Se toman muestras de raíces de la especie *L. perenne* conocida comúnmente como raigrás, las cuáles presentaron las mejores cualidades en cuanto a su altura y vigorosidad. Ubicadas en el barrio “La Playa”, Cantón Paute, provincia del Azuay.

Materiales: pala, fundas autosellantes, rotulador.

La técnica utilizada es la de muestreo aleatorio simple, la cual consiste en que los sujetos de la población muestra tienen la misma probabilidad de ser seleccionados, son elegidos aleatoriamente mediante números que se les ha asignado al principio, con la utilización de tablas (Hernández & Carpio, 2019).

Con la ayuda de una pala se excava alrededor de la planta para obtener raíces con tierra impregnada, una vez obtenidas se elimina la mayor cantidad de tierra y se tomó la longitud de la parte aérea de cada muestra. Cada raíz se introduce en fundas de de papel rotuladas y se adjuntan todas en una funda autosellante como se observa en la Imagen 2 para su traslado a los laboratorios de CCVV.

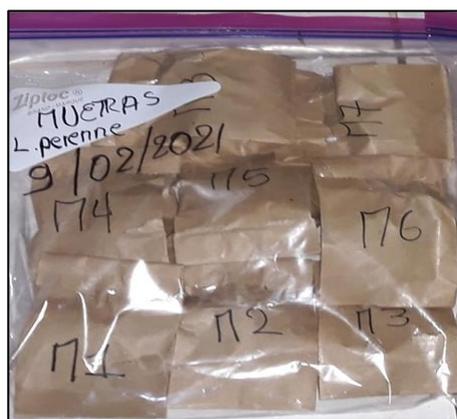


Imagen 2: Muestras de raíz de L. perenne.

Fuente: Autora

3.7.2 FASE 2: AISLAMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* y *Azospirillum sp.*

3.7.2.1 *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* (FOL)

Una vez obtenidas las muestras (tallos infectados), se procede a lavarlos cuidadosamente con agua corriente y se colocan en papel secante, a continuación, los tallos infectados se cortaron en pequeños fragmentos de un centímetro aproximadamente, se sumergieron en hipoclorito de sodio al 2% por 3 minutos, posteriormente se desinfectaron con etanol al 70% por 1 minuto y se enjuagaron tres veces en agua destilada estéril, a continuación se dejó en papel secante y por último se realizó la siembra de los tallos en medio PDA como es descrito en Páez y Albarracín (2007), se puede observar en la Imagen 3 y 4. Este proceso fue realizado en completa esterilidad en la cámara de flujo laminar para evitar la contaminación ya sea de bacterias u hongos.

Se sembraron 10 fragmentos de tallos en 7 cajas Petri con medio PDA, fueron selladas con Parafilm e incubadas a 25 °C por 7 días (Páez & Albarracín, 2007).

Una vez obtenidos los diferentes hongos se procedió a purificarlos en nuevos medios hasta la obtención de la cepa axénica.

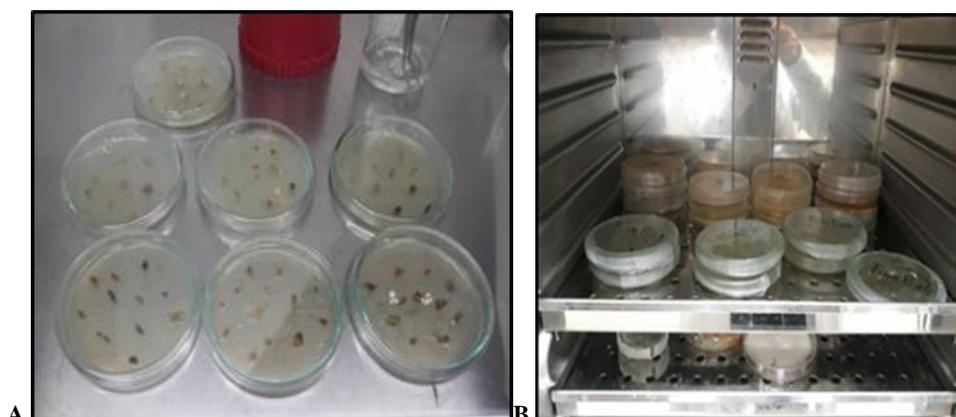


Imagen 3: A. Siembra de fragmentos en medio PDA. B. Incubación de medios de cultivo.

Fuente: Autora

3.7.2.2 *Azospirillum sp.*

Las muestras de *L. perenne* (raíces) se lavaron cuidadosamente con agua destilada para que el suelo adherido a las raíces no se pierda en su totalidad, de las ocho muestras tomadas se cortaron dos fragmentos de cada una de un centímetro aproximadamente (Imagen 5). La siembra de fragmentos de *L. perenne* para el aislamiento de *Azospirillum sp.* se realizó en la cámara de flujo laminar para mantener la esterilidad.



Imagen 4: Cortado de raíces de L. perenne

Fuente: Autora

Se sembró fragmentos de *L. perenne* de aproximadamente 1 cm esterilizadas con hipoclorito de sodio al 2% durante 5 minutos, enjuagadas dos veces con agua destilada estéril y secadas en papel secante siguiendo el método descrita por García y colaboradores (2010). Estas fueron sembradas en siete matraces de vidrio de 100 mL y uno de 200 mL con medio NFB semisólido que se preparó previamente para facilitar la movilidad de la bacteria, se sembró dos fragmentos por matraz. Estos fueron incubados a 33 °C durante ocho días como se observa en la Imagen 6, hasta el desarrollo de una película blanca, densa y ondulada por debajo de la superficie (Schoebitz, 2006).



Imagen 5: Siembra de L. perenne en medio NFB semisólido

Fuente: Autora

3.7.3 FASE 3: Identificación de bacterias del género *Azospirillum sp.* y *Fusarium Oxysporum f. sp. lycopersici* (FOL)

3.7.3.1 *Azospirillum sp.*

Para la identificación de las bacterias del género *Azospirillum sp.* se implementa la caracterización macroscópica, microscópica y bioquímica.

3.7.3.1.1 Caracterización macroscópica y microscópica de *Azospirillum sp.*

Para la caracterización macroscópica se evalúa el crecimiento, cambio de color del medio de cultivo utilizado de verde a azul, morfología de la colonia observada en el medio NFB sólido, descrito por Carrera y colaboradores (2010), como es el tamaño, forma, superficie, elevación, borde, consistencia, color. En esta caracterización se utiliza cepas de cajas Petri con medio sólido de 48 horas de crecimiento. Además de ello la presencia de una película blanca, densa y ondulada por debajo de la superficie en medio semisólido de 8 días de crecimiento.

Para la caracterización microscópica se evalúa la forma, presencia de gránulos intracelulares de poli- β -hidroxibutirato y movimiento en espiral, utilizando medios de cultivo de 48 horas de crecimiento (Caballero-Mellado, 1998).

3.7.3.1.2 Pruebas bioquímicas

Para confirmar que la cepa corresponde a *Azospirillum sp.* se realizaron las siguientes pruebas Bioquímicas, realizando cada prueba por triplicado (ANEXO 8):

Tinción de Gram: En un cubreobjetos se añade una asada de las cepas fijándolas con la ayuda del mechero, se tiñe con cristal violeta durante 1 minuto y se retira el exceso de colorante con agua destilada, a continuación, se aplica lugol por un minuto y se retira el exceso con agua destilada. Para decolorar se utiliza alcohol acetona y por último se tiñe con la solución de safranina por 30 segundos, se deja secar, se añade el cubreobjetos y se observa al microscopio. Encontrando a las bacterias Gram negativas teñidas de color rosado y las bacterias Gram positivas teñidas de color morado (Carrera et al., 2010).

Reactivos: cristal violeta, solución de lugol y safranina.

Prueba de la catalasa: se añade una colonia de bacterias en un portaobjetos limpio, a continuación, se añade una gota de H₂O₂ al 30% sobre la colonia y observar la presencia inmediata de burbujas (Carrera et al., 2010).

Reactivos: H₂O₂ al 30%

Prueba de la ureasa: se prepara medio de cultivo Christensen (Anexo 1-E) y después del autoclavado se añade urea. Una vez preparado el medio se cultiva *Azospirillum* en medio inclinado y se incuba a 37 °C por 24 a 48 horas, resulta como positivo el cambio de color de amarillo a rosa (Carrera et al., 2010).

Reactivos: Medio de cultivo Christensen

Prueba de motilidad: para esta prueba se siembra por punción a las baterías en medio de cultivo NFB semisólido (Anexo 1-A), en tubos de ensayo por un lapso de 48 horas (Velasteguí & Pallo, 2011).

Prueba de la oxidasa: en un portaobjetos limpio colocar un fragmento de papel filtro y seguidamente agregar de 2-3 gotas del reactivo de Kovacs. Con un asa tomar una colonia y difuminarla en el papel con el reactivo y esperar de 5 a 10 segundos para su reacción. Resultando como positivo el cambio de color a un tono púrpura (Universidad de Las Palmas de Gran Canaria [ULPGC], 1989).

Fijación de nitrógeno: preparar el medio de cultivo NFB sólido ajustando el pH a 6.8 (Anexo 1-B), sembrar las bacterias en estriado e incubar por 8 días a 32 °C, el viraje a color azul indica fijación de nitrógeno resultando una prueba positiva (Velasteguí & Pallo, 2011).

Prueba de poli- β hidroxibutirato (PHB): este procedimiento fue propuesto por Bradshaw (1976, como se citó en Reyes, 2011), la cual consiste en realizar un frotis de colonia bacteriana y fijar a la llama con la ayuda del mechero, seguidamente se añade al frotis Negro Sudan B durante 10 minutos. Retirar el colorante con agua destilada y secar con papel el exceso del colorante, a continuación, añadir de 2 a 3 gotas de xilol para eliminar el colorante en exceso y secar nuevamente con papel secante. Teñir con safranina durante 10 a 15 segundos, lavar con agua destilada, secar al aire y observar en microscopio. Esta prueba se realiza en cultivos de 24 y 48 horas.

Reactivos: Negro Sudan B, Xilol, Safranina (Imagen 7).



Imagen 6: Materiales para prueba de poli- β hidroxibutirato

Fuente: Autor

3.7.3.2 *Fusarium Oxysporum f. sp. lycopersici* (FOL)

3.7.3.2.1 Caracterización macroscópica y microscópica de *Fusarium Oxysporum f. sp. lycopersici*

Para la caracterización macroscópica la cepa aislada se sembró en medio de cultivo PDA y fueron incubados a 25 °C por diez días, donde se evalúa el color, aspecto y diámetro de crecimiento de la colonia (Páez & Albarracín, 2007).

Para la caracterización microscópica los aislados fúngicos se sembraron de igual manera en medio PDA e incubados a 25 °C por un periodo de siete días, se realiza observaciones (Páez & Albarracín, 2007) y mediciones de microconidios, macroconidios y clamidosporas (Cardona-Piedrahita & Castaño-Zapata, 2019), con la ayuda de un microscopio con cámara acoplada.

3.7.4 FASE 4: Pruebas de antagonismo *in vitro*

3.7.4.1 Lavado de esporas

Materiales

Tabla 5: Materiales para el lavado de esporas

Materiales	Equipos	Reactivos
2 matraces de 250 mL	Cámara de flujo laminar	Azul de Lactofenol
Agua destilada estéril	Micropipeta de 1000 µL	Cepa de FOL
1 embudo		
1 pipeta de 10 mL		
2 gasas estériles		
Puntas para micropipetas		
Pera de succión		
Mechero		

Fuente: Autora

El lavado se realizó de cepas purificadas de *Fusarium Oxysporum f. sp. lycopersici* las cuales fueron purificadas en cuatro matraces de 250 mL durante 14 días a 25 °C. Este proceso se realizó en la cámara de flujo laminar para evitar contaminaciones, como se observa en la Imagen 8.

Se realizó seis lavados de cada matraz con 10 mL de agua destilada estéril, agitándola suavemente por un aproximado de 20 segundos y depositando en un matraz, para posteriormente filtrar en otro matraz de 250 mL con la ayuda de gasas estériles para evitar de esta forma el paso de micelio o de medio de cultivo que se desprende por los lavados realizados (Llivicura, 2018).

Con la micropipeta de 1000 μ l se tomó una muestra y se la depositó en un tubo cónico de 1.5 mL con una gota de azul de lactofenol.



Imagen 7: Lavado de esporas

Fuente: Autora

3.7.4.2 Conteo de esporas en la cámara de Neubauer

Materiales

Tabla 6: Materiales para el conteo de esporas.

Materiales	Equipos
Cámara de flujo laminar	Tubo cónico con la suspensión de esporas.
Microscopio con cámara	
Cámara de Neubauer	
Micropipeta de 10 μ L	

Fuente: Autora

Con la micropipeta de 10 μ L se tomó una muestra de la suspensión de esporas preparada previamente con azul de lactofenol y se depositó en la cámara de Neubauer (Imagen 9), una vez cargada la muestra, se procedió a realizar el conteo en el microscopio

con cámara, se enfocó con el lente de 40X en las cuadrículas correspondientes (Llivicura, 2018), obteniendo una concentración de 1×10^6 esporas/mL, mediante la fórmula:

$$\text{Concentración de esporas/mL} = \frac{n^\circ \text{ de células}}{n^\circ \text{ de cuadrantes contados}} * 10000$$

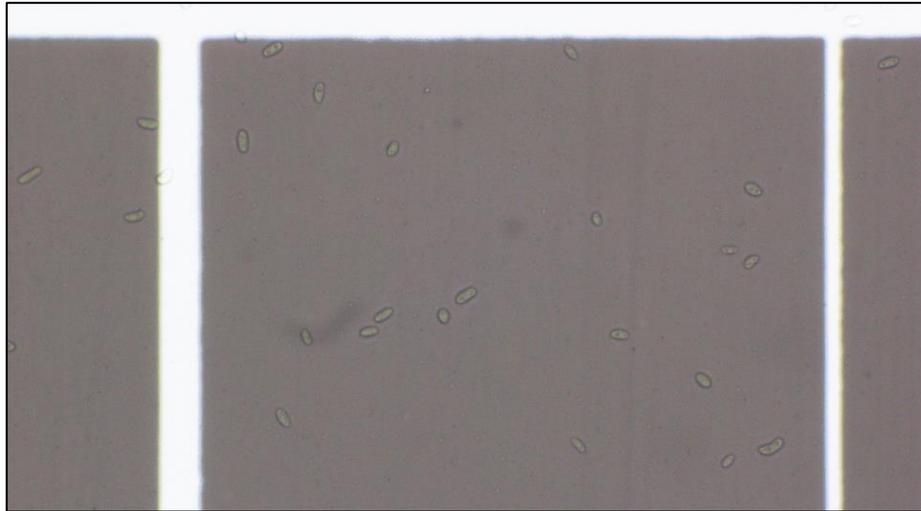


Imagen 8: esporas en cámara de Neubauer con el lente 40X

Fuente: Autora

3.7.4.3 Concentración de bacterias

Los aislados bacterianos de *Azospirillum sp.* en medio de cultivo NFB sólido, fueron cultivados en caldo nutritivo y se incubó durante 24 horas (Tejera et al., 2012), en agitación orbital a 180 rpm y a una temperatura de 35 °C (Canto et al., 2004), como se observa en la Imagen 10. La concentración se ajustó a 1.5×10^8 cel.mL⁻¹ (Imagen 11), tomando como referencia el estándar 0.5 de la escala de McFarland.

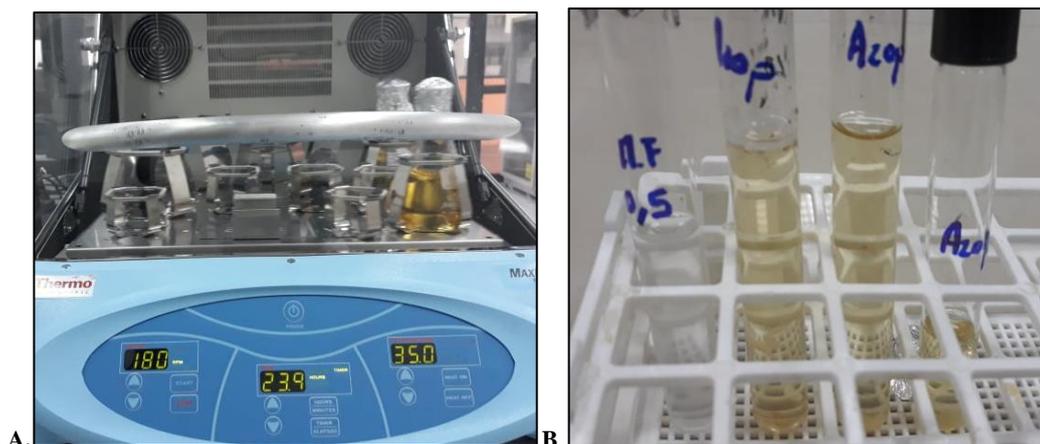


Imagen 9: A. Agitador orbital. B. Escala 0.5 de McFarland

Fuente: Autora

3.7.4.4 Determinación del efecto antagonístico *in vitro*

Materiales

Tabla 7: Materiales para pruebas de antagonismo *in vitro*

Materiales	Reactivos	Equipos
14 cajas Petri con medio PDA	Cepa de FOL en caja Petri a una concentración de 1×10^6 esporas/mL	Cámara de flujo laminar
Mechero Bunsen	Solución bacteriana en caldo nutritivo	Estufa de cultivo
Hisopos largos		
Parafilm		
Pinzas		

Fuente: Autora

Para determinar el efecto antagonístico *in vitro* se siguió la metodología de cultivo dual descrita por Bashan y colaboradores (1996, como se citó en Tejera et al., 2012). Se tomó la solución bacteriana con una micropipeta de 100 μ L y se la depositó en cada caja Petri con medio PDA, a continuación, con la ayuda de un hisopo se extendió por toda la caja. Con un sacabocados se extrajo un fragmento del hongo crecido previamente a la concentración requerida y se colocó en el centro de cada una de las cajas Petri. Como

control negativo se utilizaron cuatro cajas Petri donde solo se colocó fragmentos del hongo. Estas cajas fueron incubadas a 30 °C.

Para determinar el efecto antagónico a los 8 y 11 días se utilizó la siguiente fórmula descrita por (Chaiharn et al., 2009):

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

Donde:

D.C.C= diámetro de la colonia de control

D.C. P= diámetro de la colonia del hongo en interacción con las bacterias.

3.7.5 Fase 5: inoculación de bacterias en semillas de tomate

3.7.5.1 Preparación de las semillas

Se utilizaron 200 semillas de tomate Sheila Victory, las cuáles se esterilizaron con una solución de hipoclorito de sodio al 3% en agitación constante durante 3 minutos, posteriormente se le añadió a una solución de alcohol al 70% durante 3 minutos y por último se realizó tres lavados con agua destilada estéril, realizado este proceso se dejó secar en papel secante, siguiendo el proceso descrito por (Vergani-Boza & Zúñiga-Dávila, 2018), el cual fue realizado en la cámara de flujo laminar en condiciones estériles.

3.7.5.1 Preparación del inóculo

Teniendo los tubos con la concentración de 1.5×10^8 cel.mL⁻¹, se añadió 50 mL de inóculo en dos cajas Petri para añadir las semillas.

3.7.5.2 Inoculación

En las cajas Petri con 50 mL del cultivo bacteriano de 24 horas de crecimiento, con una concentración de 1.5×10^8 cel.mL⁻¹, se colocaron 50 semillas por caja previamente

esterilizada, agitando levemente para permitir que se produzca la imbibición de la semilla y el establecimiento de la bacteria, por treinta minutos (Canto et al., 2004).

De la misma manera se realizó la inoculación a los 5 y 10 días después de la siembra con 10 mL por planta.

3.7.5.3 Germinación de las semillas

Se colocaron grupos de 20 a 30 semillas de tomate en cada caja Petri sobre dos capas de papel filtro húmedo y cubiertos con papel secante húmedo. Estos se conservaron a 25°C en una estufa de cultivo por tres días (Canto et al., 2004).

3.7.6 Fase 6: Siembra de semillas de tomate

Para la siembra de semillas germinadas, se utilizó turba como sustrato en un total de tres libras, la cual se procedió a esterilizar dos veces en cinco vasos de precipitación a 120 °C por 15 minutos cada una (Imagen 12).



Imagen 10: Sustrato estéril

Fuente: Autora

Una vez estéril el sustrato, se desinfectó dos cubetas plásticas de 200 cavidades cada una, seguidamente se rellenaron con turba estéril y se sembraron las semillas ya germinadas y por último se regaron con 10 mL de agua destilada estéril en cada cavidad.

Las cubetas se mantuvieron en un invernadero improvisado totalmente desinfectado hasta el trasplante, como se observa en la Imagen 13.



Imagen 11: Cubetas en invernadero

Fuente: Autora

3.7.7 FASE 7: Inoculación de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* (FOL) en las plantas de tomate inoculadas y no inoculadas con la bacteria

Para el experimento se tomó cuatro grupos de veinte plantas cada uno como tratamientos de investigación, los cuales son presentados en la Tabla 8:

Tabla 8: Tratamientos de la investigación

N° de tratamiento	Tratamiento	Concentración
T0	Testigo absoluto	
T1	Testigo relativo (<i>Azospirillum sp.</i>)	1.5×10^8 cel.mL ⁻¹
T2	FOL (<i>Fusarium Oxysporum f. sp. lycopersici</i>)	1×10^6 esporas/mL,
T3	Azospirillum + FOL	1.5×10^8 cel.mL ⁻¹ 1×10^6 esporas/mL

Fuente: Autora

3.7.7.1 Inoculación

La inoculación se realizó a los 28 días después de la siembra en 20 plantas inoculadas con bacterias *Azospirillum sp* denominando a este tratamiento como T3 y 20 plantas sin la bacteria (T2), utilizando dos métodos de inoculación: inyección en la corona de la raíz e inmersión de las raíces, descritos por Cardona-Piedrahita y Castaño-Zapata (2019). La inoculación por inyección en la corona de la raíz se realizó en plantas con tres hojas verdaderas, inyectando 1 mL de suspensión de esporas con una concentración de 1×10^6

esporas/mL, con la ayuda de jeringas para insulina de 1 mL. Para la inoculación por inmersión de las raíces, se lavaron cuidadosamente las raíces con agua destilada estéril y con un bisturí estéril se cortan los ápices de la raíz principal, a continuación, se sumergieron las plántulas hasta el cuello de las raíces en un vaso de precipitación de 100 mL que contenía la suspensión de esporas a una concentración de 1×10^6 esporas/mL, por un periodo de 30 minutos como lo plantea Carmona (2019).

3.7.7.2 Trasplante

Después de la inoculación las plantas -T2 Y T3- y los testigos -T0 Y T1- fueron trasplantadas en vasos plásticos transparentes reciclados de 10 oz. Se utilizó 5 kg de turba esterilizada en autoclave a una temperatura de 121°C y 15 atm durante 15 minutos dos veces para eliminar cualquier rastro de organismos vivos. Una vez trasplantadas se trasladaron a condiciones de invernadero manteniendo una humedad constante en los maceteros para facilitar la colonización del patógeno.

3.7.8 Efecto de la inoculación de *Azospirillum sp.*

Transcurridos 15 y 28 días después de la siembra, se midieron las plantas de los diferentes tratamientos, así también el peso del sistema radicular al término del experimento, es decir a los 28 días, calculándose el índice de efectividad de la inoculación (IEI), mediante la siguiente fórmula descrita por García y colaboradores (2010):

$$IEI(\%) = \frac{\text{Tratamiento con inoculación} - \text{Control sin inoculación}}{\text{Control sin inoculación}} \times 100$$

3.7.9 Establecer el grado de infección de las plantas de tomate riñón con *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* con y sin la bacteria *Azospirillum sp.*

Para establecer el grado de infección se determinó el porcentaje de incidencia de la enfermedad en 20 plántulas de dos tratamientos -*Azospirillum* +FOL y FOL- de 15 y 28 días después del trasplante tomando como muestra 6 y 8 hojas verdaderas

respectivamente, utilizando la siguiente fórmula según Castillo-Arévalo y Jiménez-Martínez (2020):

$$\text{Incidencia (\%)} = \frac{\text{Número de hojas muestreadas con síntomas}}{\text{Total de hojas muestreadas}} \times 100$$

Así mismo se calculó el grado porcentual de severidad utilizando una escala citada por Carmona (2019) para medir el daño foliar del tomate utilizando la siguiente fórmula descrita por Castillo-Arévalo y Jiménez-Martínez (2020):

$$s(\%) = \frac{\sum i}{N(V_{max})} \times 100$$

Donde:

S= Porcentaje de severidad

$\sum i$ = Sumatoria de valores observados

N= Número de plantas muestreadas

V_{max}= Valor máximo de la escala

Tabla 9: Escala de severidad de Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici

Nivel	Síntomas en la parte aérea
<p data-bbox="518 309 544 338">0</p> 	<p data-bbox="901 309 1050 338">Planta sana</p>
<p data-bbox="518 575 544 604">1</p> 	<p data-bbox="724 575 1189 604">Amarillamiento en las hojas basales</p>
<p data-bbox="518 833 544 862">2</p> 	<p data-bbox="687 833 1225 969">Amarillamiento de las hojas basales y tercio medio y marchitez en una o dos hojas.</p>
<p data-bbox="518 1090 544 1120">3</p> 	<p data-bbox="687 1090 1225 1227">Amarillamiento severo en las hojas. 50% de las hojas marchitas y crecimiento inhibido.</p>
<p data-bbox="518 1348 544 1377">4</p> 	<p data-bbox="687 1348 1225 1552">Síntomas generalizados, amarillamiento en toda la planta, raíz principal necrosada, necrosis vascular.</p>
<p data-bbox="518 1628 544 1657">5</p> 	<p data-bbox="724 1628 906 1657">Planta muerta</p>

Fuente: (Carmona, 2019)

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 MUESTREO

4.1.1 *Azospirillum sp.*

Se obtuvieron ocho muestras de *L. perenne* conocida como raigrás, las cuales tenían alturas aéreas muy significativas, la información de las muestras se presenta en la Tabla 10:

Tabla 10: Muestras de L. perenne recolectadas por Susana Viri

MUESTRA	ALTURA	LUGAR
M1	84 cm	Paute
M2	58 cm	Paute
M3	81 cm	Paute
M4	59 cm	Paute
M5	71 cm	Paute
M6	76 cm	Paute
M7	84 cm	Paute
M8	69 cm	Paute

Fuente: Autora

4.2 AISLAMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* y *Azospirillum sp.*

4.2.1 *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*

Hubo la presencia de diferentes hongos en cuatro cajas Petri en las que fueron sembradas los fragmentos de tomate contaminado, se aisló el hongo que presentaba las características de FOL (color rojo-violeta), el cual fue nuevamente sembrado e incubado a una temperatura de 25 °C por siete días para la obtención de la cepa axénica.



Imagen 12: Diferentes tipos de hongos de tomate

Fuente: Autora

En la Imagen 14, se muestra la presencia de crecimiento de diferentes tipos de hongos que afectan a las plantas de tomate, en el que sobresale el hongo de coloración roja, con aspecto algodonoso característico de *Fusarium oxysporum*.

En total se obtuvo una cepa de FOL denominada Folle, la cual presentó las características de este microorganismo, siendo el crecimiento con aspecto algodonoso blanquecino y de pigmentación difusible violeta que son característicos del género *Fusarium oxysporum*, como se presenta en la Imagen 15, del cual se purificó nuevamente para obtener cultivos completamente puros.



Imagen 13: cepa Folle de FOL aislada

Fuente: Autora

4.2.2 *Azospirillum sp.*

Transcurridos ocho días desde la siembra, se obtuvo en total una cepa de *Azospirillum sp.*, que creció abundantemente en el matraz de 200 mL (muestra 7), denominándolo como matraz positivo.

Del matraz positivo se sembró en cajas Petri con medio NFB sólido de color verde, se incubó a 33 °C por 48 horas y hubo bastante crecimiento, además de que el medio cambió a un tono azul. Se sembró nuevamente para obtener la cepa pura denominada C7Az, observada en la Imagen 16.

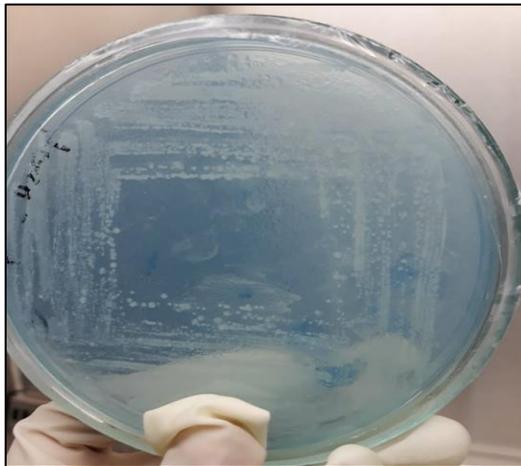


Imagen 14: Cepa de Azospirillum C7Az.

Fuente: Autora

4.3 Identificación de bacterias del género *Azospirillum sp.* y *Fusarium Oxysporum f. sp. lycopersici* (FOL)

4.3.1 *Azospirillum sp.*



Imagen 15: Crecimiento de Azospirillum en medio semisólido

Fuente: Autora

Los aislados en medio NFB semisólido presentaron el crecimiento característico de bacterias del género *Azospirillum* como son la presencia de movilidad y de la película densa, ondulada y blanca en forma de sombrilla de 0.8 mm de longitud bajo la superficie y el cambio de color del medio de verde a azul, como se observa en la Imagen 17. Estas características concuerdan con las reportadas por Hernández (2003) en su trabajo “AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CEPAS DE *AZOSPIRILLUM*, Y EVALUACIÓN DE SU CAPACIDAD PARA SUPLIR LAS NECESIDADES DE NITRÓGENO EN PLANTAS DE *ORYZA SATIVA* (ARROZ)” en donde indica que los 10 tubos denominados positivos para crecimiento de las bacterias *Azospirillum sp.*, presentaron la película blanca y espesa por debajo de la superficie de una longitud de entre 0.5-1 mm aproximadamente. En el estudio “EFECTO DE LA INOCULACIÓN CON *Azospirillum sp.* EN PLANTAS DE CHILE HABANERO (*Capsicum chinense Jacquin*), así mismo menciona la aparición de esta película blanca en los tubos positivos denotando que esta condición se debe a que las bacterias de este género tienen la

necesidad de migrar hacia la zona donde el flujo de oxígeno se encuentre en mejores proporciones para la supervivencia de los microorganismos, haciendo que no se inhiba la fijación de nitrógeno. De la misma manera autores como Velasteguí & Pallo (2011) en su investigación titulada EVALUACIÓN DE SOPORTES SÓLIDOS Y LÍQUIDOS, PARA LA PRODUCCIÓN DE UN BIOFERTILIZANTE A BASE DE *Azospirillum spp.* APLICABLE AL CULTIVO DE MAÍZ (*Zea mays L.*) utilizaron medios de cultivo NFB para el aislamiento de las bacterias del género *Azospirillum sp.*, en donde tomaron como positivos aquellos que cambiaron el color de verde a azul gracias al cambio de pH del medio que son utilizados para determinar y evaluar la actividad reductora del acetileno, que indica evidentemente la fijación del nitrógeno (Caballero-Mellado, 1998).

En la Tabla 11 se puede apreciar las características macroscópicas y microscópicas de la cepa de *Azospirillum sp.*, identificadas en medio NFB sólido a las 48 horas de crecimiento a 33 °C.

Tabla 11: características macroscópicas y microscópicas de la cepa de Azospirillum (C7Az)

Identificación macroscópica	Identificación microscópica
Tamaño: entre 1 y 2mm	Pleomorfismo
Forma: circular	Forma: vibroide
Borde: entero	Rectas o levemente curvadas
Elevación: convexa	Movilidad: espiral
Superficie: lisa	Medidas promedio: de 0.98 µm de diámetro y 3.5 de longitud
Consistencia: cremosa	
Color: blanco	

Fuente: Autora

Estas características concuerdan con los reportados por Cortez (2012), en su investigación titulada “EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO VEGETAL DE *Azospirillum sp.* EN PLANTAS DE MAÍZ (*Zea mays*

L.)”, que nos indica que la cepa identificada como *Azospirillum sp* presentaba características referenciales en donde las colonias que crecieron en medios de Agar Libre Nitrógeno (NFB) presentaron colonias mucosas de 2 mm de ancho y largo, de forma redonda, convexa y además el medio tuvo un viraje de color de verde a Azul, así mismo dentro de la morfología microscópica presento bacilos gruesos, Gram negativos ligeramente curvos o rectos. En el estudio “A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov” Tarrand y colaboradores (1978), señala que *Azospirillum* al microscopio presentan formas bacilares y ligeramente curvas, que tienen de diámetro de 1 μ y 2.1 a 3.8 μ de longitud, que presentan movilidad en medios líquidos a una temperatura de 30 °C; resultados similares son presentados por Caballero-Mellado (1998) en su investigación sobre el género *Azospirillum* donde indica que para la identificación rutinaria de este género es la forma vibroide, su movilidad en espiral y el pleomorfismo, estas características se observan en la Imagen 19.

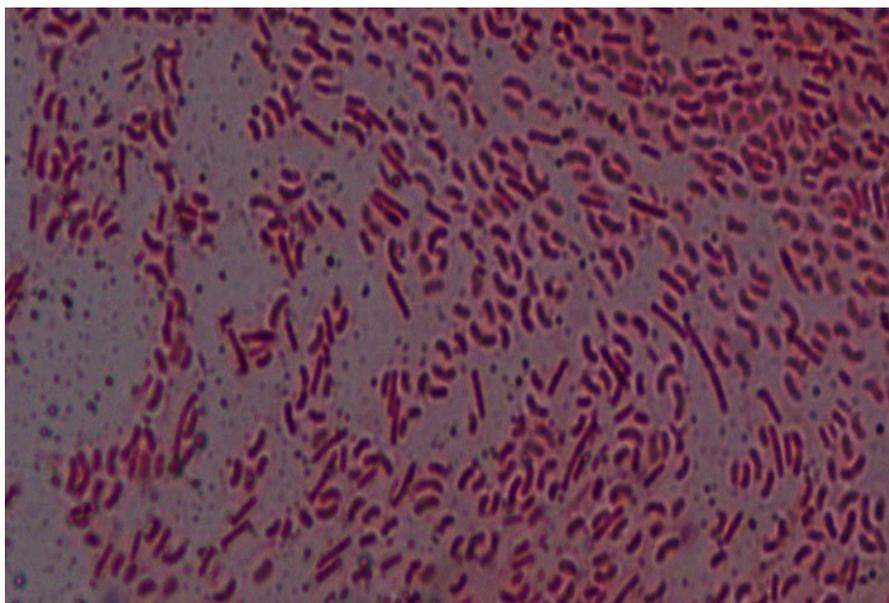


Imagen 16: Bacterias del género Azospirillum sp. vistas con el lente de 100x

Fuente: Autora

4.3.1.1 Pruebas bioquímicas

En la tabla 12 se aprecian los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas para la identificación de la cepa aislada denominada C7Az, confirmando que pertenece al género *Azospirillum sp.* estas pruebas se realizaron por triplicado (ANEXO 8).

Tabla 12: Resultados de pruebas bioquímicas

Cepa	Pruebas						
	Tinción de Gram	Catalasa	Ureasa	Motilidad	Oxidasa	Fijación de nitrógeno	poli- β hidroxibutirato
C7Az							
I	-	+	+	+(espiral)	+	+	+
II	-	+	+	+	+	+	+
III	-	+	+	+	+	+	+

Fuente: Autora

De acuerdo con lo descrito por Okon y colaboradores (1976) y Sangoquiza y colaboradores (2018), las cepas identificadas como *Azospirillum*, son bacterias Gram negativas, llegando a esta conclusión por el procedimiento realizado por la Tinción de Gram donde las cepas se tiñen de un tono rosado característico de este grupo, así mismo concluyen que la cepas poseen cantidades superiores de poli- β -hidroxibutirato (PHB), llegando a contener hasta el 50 % del peso seco celular y tiene movilidad en espiral esto debido a que las bacterias del género *Azospirillum* poseen flagelos uno polar y varios laterales permitiéndoles desplazarse tal y como lo confirma Caballero-Mellado (1998), estas evidencias concuerdan con los resultados obtenidos de la cepa C7Az obtenida de las raíces de *L. perenne*.

Así mismo se realizó una prueba de la catalasa resultando positiva, añadiendo peróxido de hidrógeno a la cepa C7Az de *Azospirillum sp* (Anexo 8-B) donde se determinó la presencia de la enzima catalasa por la presencia de burbujas esto debido al

desprendimiento de oxígeno dando paso a la siguiente reacción:



La fórmula indica que la catalasa descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, donde la catalasa destruye tóxicos del oxígeno (Velasquí & Pallo, 2011), este resultado concuerda con los publicados por Cortez (2012).

La prueba de la oxidasa resultó positiva indicando la presencia de enzimas oxidasas por la reacción de un sistema citocromo oxidasa, y la prueba ureasa también positiva, concordando con Cortez (2012), y, W. I. Hernández (2003).

Para la prueba de fijación de nitrógeno de la cepa C7Az aislada, se realizó en el medio NFB sólido, el cual cambio de tono de un verde a azul debido a la presencia de bacterias fijadoras de nitrógeno haciendo referencia al cambio del pH.

4.3.2 *Fusarium Oxysporum f. sp. lycopersici (FOL)*.

4.3.2.1 Identificación macroscópica

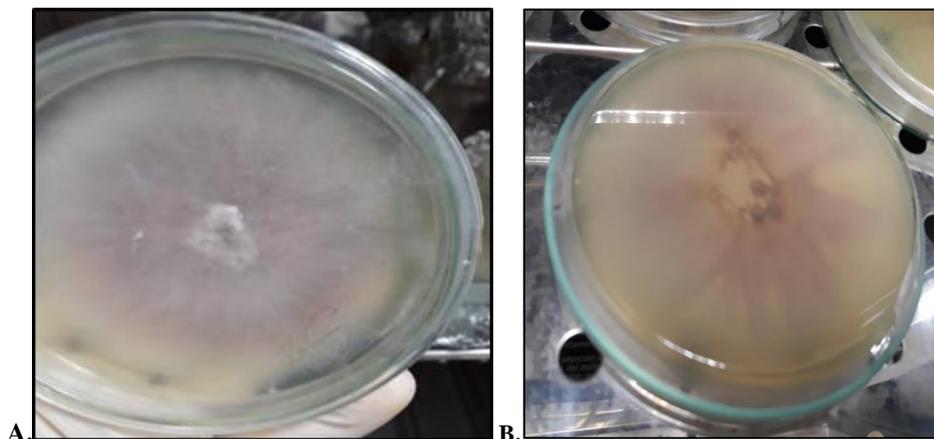


Imagen 17: A. Hongo FOL visto de frente. B. Hongo FOL visto de reverso

Fuente: Autora

En la Imagen 20 se observa las características macroscópicas de la cepa Fol1e de FOL, la cual presenta un aspecto algodonoso blanquecino y pigmentación violeta a los diez días

de crecimiento, igual que al reverso de la colonia. En los primeros días de crecimiento se observó que las colonias son hialinas adquiriendo a las 48 horas una leve coloración roja, como se observa en la Imagen 21.



Imagen 18: A. Hongo FOL a las 24 horas de crecimiento. B. Hongo FOL a las 48 horas de crecimiento. C. Hongo FOL a las 72 horas de crecimiento

Fuente: Autora

En la Tabla 13 se detalla el crecimiento de la cepa de Fol1e de FOL, a una temperatura de 25°C por 7 días.

Tabla 13: Crecimiento de Fol durante 7 días a 25°C

Día	Diámetro del crecimiento (cm)	Coloración	Aspecto
1	1.5 cm	Blanquecino	Cremoso
2	2.5 cm	Rosado	Cremoso
3	3.5 cm	Rosado	Cremoso
4	4.5 cm	Rosado-violeta	Algodonoso
5	5.5 cm	Violeta	Algodonoso
6	6.5 cm	Violeta	Algodonoso
7	7.5 cm	Violeta	Algodonoso

Fuente: Autora

Como se observa en la Tabla 13, el crecimiento de la cepa de *Fusarium Oxysporum f. sp. lycopersici* a 25 °C es sumamente rápida ya que por cada día el rango de crecimiento es de 1 cm, adquiriendo a los 7 días un diámetro de 7.5 cm, con una coloración violeta y aspecto algodonoso, estas características concuerdan con las descritas por Páez & Albarracín (2007) en su trabajo titulado “Identificación de *Fusarium oxysporum f. sp.*

lycopersici y *Trichoderma koningii* colectados en el Estado Aragua, Venezuela”, el cual indica que las cepas aisladas de diferentes localidades productoras de tomate presentan características propias de *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici*, la coloración violeta y aspecto algodonoso de las colonias que se adquieren en un periodo de diez días, así mismo indica que el diámetro de la colonia fue alrededor de 2.0 cm al cabo de 72 horas de crecimiento y su micelio aéreo se denotaba poco floco, sin embargo hay que agregar que el diámetro de las colonias eran diferentes dependiendo de las cepas aisladas en diferentes localidades el cual se encontraban en el rango entre 7 a 8.4 cm durante un periodo de diez días, así mismo el autor recalca que el crecimiento se dio bajo condiciones alternas de luz y obscuridad cada doce horas, en donde en el periodo de obscuridad se mantenía a las colonias a una temperatura de 20 °C y durante periodos de luz se mantenían a una temperatura de 25 °C, se puede asimilar que el crecimiento puede verse afectado por el cambio alterno de temperaturas provocando estrés y por ende reducción en su crecimiento (Muñoz et al., 2014). En la investigación “Identificación de un aislamiento de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* y respuesta fisiológica en tomate durante la infección frente a dos elicitores fúngicos” Carmona (2019) señala que los 119 aislados presentan las características morfológicas de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* las cuales fueron incubadas en medio PDA y sus coloraciones fueron violeta oscuro y rosa claro, su micelio se presentaba denso y algunos crecimientos era pionotal que según el autor este se puede dar por la degeneración del cultivo.

4.3.2.2 Identificación microscópica

El hongo *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* (FOL), posee micelio hialino y septado, así mismo presenta tres clases de esporas asexuales que son:

Microconidios, los cuales son abundantes que se presentaron sobre cortas monofiálides en falsas cabezas; Macroconidios, los cuales son poco abundantes en medio

PDA, con una célula apical alargada, son septados y fusiforme; Clamidosporas se presentan globosas, como terminales y/o intercalares.

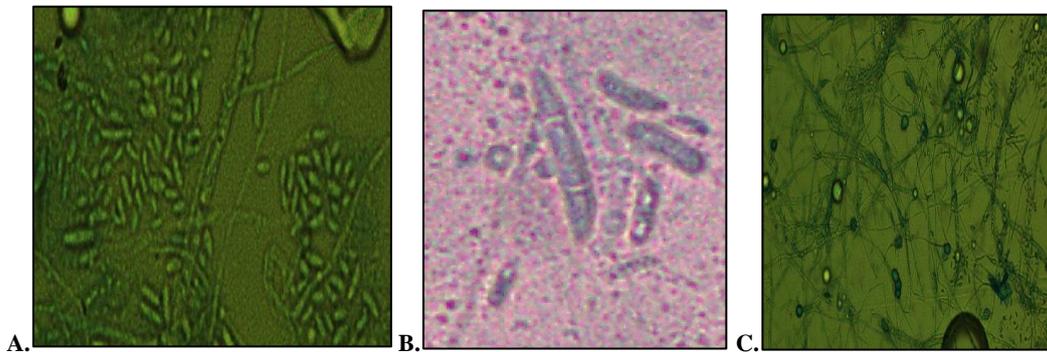


Imagen 19: A. Microconidios de FOL (100x).B. Macroconidios de FOL (100X).C. Clamidosporas de FOL (40x)

Fuente: Autora

En la Imagen 22, se puede observar la presencia de abundantes microconidios agrupados visto con el lente de 100x, la presencia de macroconidios visto con el lente de 100x y abundantes clamidosporas al igual que los microconidios vistos con el lente de 40x ya que con este se observó con mayor facilidad.

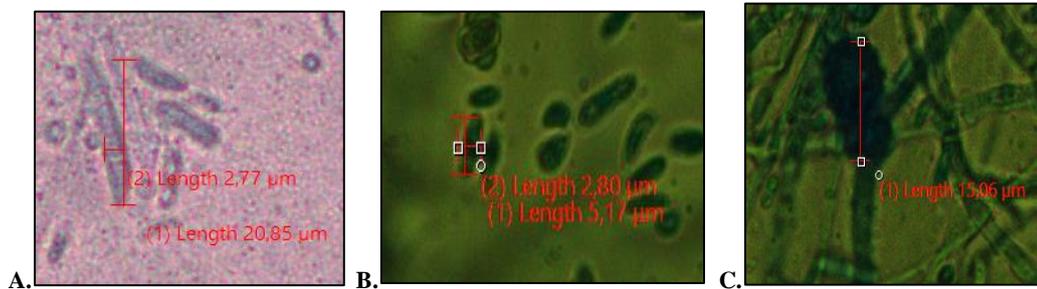


Imagen 20: A. Macroconidio 20.85 μm de largo y 2.77 μm de ancho. B. Microconidio 5.17 de largo y 2.80 de ancho. C. Clamidospora 15.06 μm de diámetro.

Fuente: Autora

Se realizaron mediciones a las estructuras microscópicas como se muestra en la Imagen 23, utilizando un microscopio con cámara acoplada. El promedio de las mediciones de microconidios fue de 5.59 μm de largo y 2.94 μm de ancho, el promedio de los macroconidios fue de 26.36 μm de largo y 6.42 μm de ancho, del mismo modo, para las clamidosporas, se obtuvo un promedio de 8.57 de diámetro.

Los resultados obtenidos de la identificación macroscópica coinciden con los presentados por Páez y Albarracín (2007), indican que los micelios de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* (Fol) son septados, producen altas cantidades de microconidios unicelulares sobre falsas cabezas midiendo 4.755-9.5 μm x 1.90-2.85 μm , observándose macroconidios con dos o tres septas de 9.5-32.5x1.9-3,8 μm y clamidosporas de 6.5-9.50 μm . Así también Carmona (2019) agrega datos similares con respecto a las características microscópicas donde especifica que en los aislados se encontró con altas cantidades de macroconidios y que estas estaban agrupadas en falsas cabezas sobre monofiálides cortas, los macroconidios eran observados sobre esporoquios cortos y simple y de igual manera las clamidosporas se observaban en pares o simples, formadas de forma terminal o intercalar. Carmona (2019) presenta medidas las cuales son las siguientes: microconidias (6.14-9.75 μm), macroconidias (18.7-48.9 μm) y clamidosporas (7.5-8.4 μm). En “Comparación de métodos de inoculación de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen, causante del marchitamiento vascular del tomate” Cardona-Piedrahita y Castaño-Zapata (2019) añaden datos similares en cuanto a las medidas de las tres esporas que el hongo FOL, produce las cuales son: microconidios, entre 5 y 12 μm de largo x 2.5 a 3.5 μm de ancho; macroconidios, entre 20.3 y 27.0 μm de largo x 6.7 μm de ancho; y, clamidosporas, 5 a 15 μm de diámetro. Con la revisión de diferentes autores se comprueba que el aislado denominado Folle corresponde a *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* (FOL), denotando que los datos obtenidos en las diferentes investigaciones tienen mucha similitud en cuanto a sus resultados.

4.4 Evaluación *in vitro* del efecto antagónico de *Azospirillum sp.* frente a *Fusarium Oxysporum f. sp. lycopersici* (FOL) a 30 °C

La confrontación de las cepas se dio en cajas Petri a 30 °C, donde el crecimiento de FOL se vio afectado por la presencia de la bacteria del género *Azospirillum sp.*, ya que su crecimiento fue lento en los primeros ocho días. En el día once se observó que las colonias de FOL, crecían mucho más rápido, pero aun así el enfrentamiento fue exitoso ya que se apreció que la cepa de *Azospirillum* efectivamente cumple como antagonista, ya que como se observa en la Imagen 24, en el lado anverso y reverso de la caja Petri a los ocho días la cepa de FOL, alcanza apenas la etapa inicial de su crecimiento.

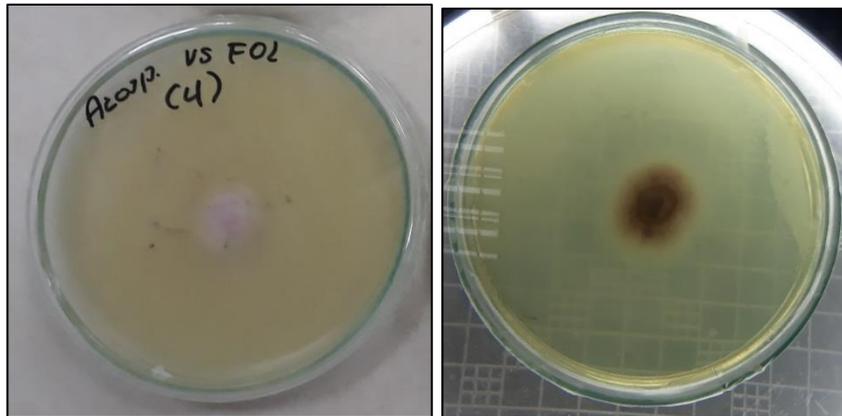


Imagen 21: Cepa de FOL en confrontación con Azospirillum sp a los ocho días de incubación.

Fuente: Autora

Los datos obtenidos de los crecimientos de FOL en confrontación con *Azospirillum sp.*, a los 8 y 11 días en las evaluaciones mediante el cultivo dual, son detallados en la Tabla 14.

Tabla 14: Resultados del crecimiento en cm de FOL en confrontación con *Azospirillum sp.*

Repeticiones	Crecimiento en cm de FOL en confrontación con <i>Azospirillum sp.</i>		Cepa testigo FOL	
	8 días	11 días	8 días	11 días
C7Az vs Fol1e (1)	2	5	8.5	9
C7Az vs Fol1e (2)	2	4.5	8.5	9
C7Az vs Fol1e (3)	1.8	4.2	8.5	9
C7Az vs Fol1e (4)	2	2.5	8.5	9
C7Az vs Fol1e (5)	2.3	4.4		
C7Az vs Fol1e (6)	1.6	1.8		
C7Az vs Fol1e (7)	2.2	2.5		
C7Az vs Fol1e (8)	2	4.6		
C7Az vs Fol1e (9)	2.1	2.4		
C7Az vs Fol1e (10)	2.5	4.7		

Fuente: Autora

En la Tabla 14, se detalla que la cepa C7Az de *Azospirillum sp.*, que es el antagonista, interviene en el crecimiento de la cepa FOL denominada Fol1e tanto a los ocho días como a los 11 días, este hecho es notorio comparando las cajas en confrontación (C7Az vs Fol1e) con los testigos (FOL). Los testigos tuvieron un mayor crecimiento aun cuando la cepa fue incubada a 30 °C, esto se debe a que los testigos no recibieron ningún mecanismo con el cual afectara su crecimiento y desarrollo. Los resultados indican que efectivamente la cepa aislada de *Azospirillum sp.*, cumple el rol como antagonista al confrontar a la cepa del patógeno (FOL). y los mejores resultados se reflejan a los ocho días en donde el patógeno creció en un diámetro de hasta los 2.5 cm en comparación de los 4.7 cm de diámetro máximo que alcanzo en los 11 días. Estos resultados se fundamentan en lo señalado por Hernández y colaboradores (2015) en su trabajo “Uso de *Azospirillum* en la agricultura” en donde señala que las bacterias *Azospirillum* posee un sin número de características que hace que sea un microorganismo antagónico como es el hecho de que estos microorganismos pueden adaptarse a los cambios nutricionales debido a que es capaz de consumir varios compuestos aromáticos, azúcares y ácidos orgánicos, es capaz de adaptar su flagelación a diferentes ambientes por lo que tendría un mayor control sobre

el hábitat en el que se maneja. Así mismo Ramírez y colaboradores (2015) señala que la actividad antagónica se da por la producción de sideróforos con actividad antimicrobiana, HCN, bacteriocinas y ácido fenilacético. Con estos resultados se puede afirmar que el crecimiento del hongo FOL es afectado por la presencia de

Tabla 15: Porcentaje de inhibición de FOL con la bacteria Azospirillum sp.

Repeticiones	Porcentaje de inhibición (I%)	
	8 días	11 días
C7Az vs Fol1e (1)	76.47%	44.4%
C7Az vs Fol1e (2)	76.47%	50%
C7Az vs Fol1e (3)	78.82%	53.3%
C7Az vs Fol1e (4)	74.12%	72.2%
C7Az vs Fol1e (5)	72.94%	51.2%
C7Az vs Fol1e (6)	81.17%	80%
C7Az vs Fol1e (7)	74.12%	72.2%
C7Az vs Fol1e (8)	76.47%	48.9%
C7Az vs Fol1e (9)	75.29%	73.39%
C7Az vs Fol1e (10)	70.59%	47.7%
Promedio	75.65%	59.33%

Fuente: Autora

Con los datos obtenidos en el porcentaje de inhibición mostrados en la Tabla 15, se aplica una prueba de normalidad por Shapiro Wilkes.

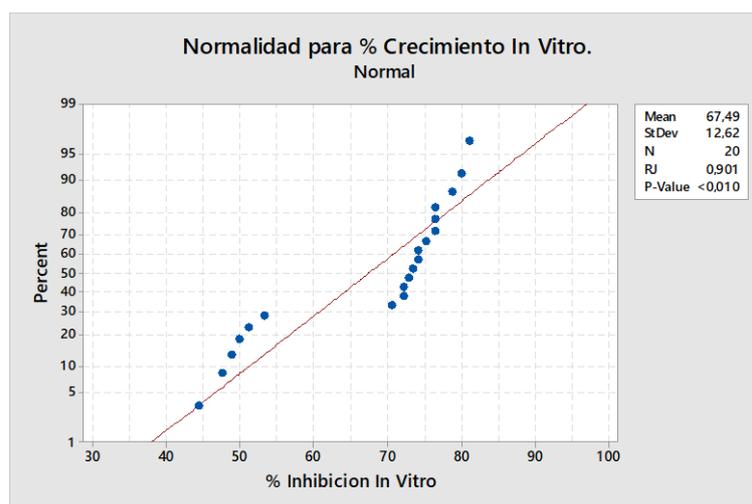


Ilustración 1: Prueba de normalidad del porcentaje de inhibición a los 8 y 11 días

Fuente: Autora

En la Ilustración 1 se observa que el valor de $P < 0,010$. No son normales los datos por lo que se rechaza la hipótesis nula H_0 de que los datos siguen una distribución normal y

se acepta la hipótesis alternativa H_i de que estos datos no son normales, por lo que se procedió a aplicar BOX- COX en donde tampoco se obtuvo la normalidad de los datos. Es por ello que se aplicó la Transformación de Johnson.

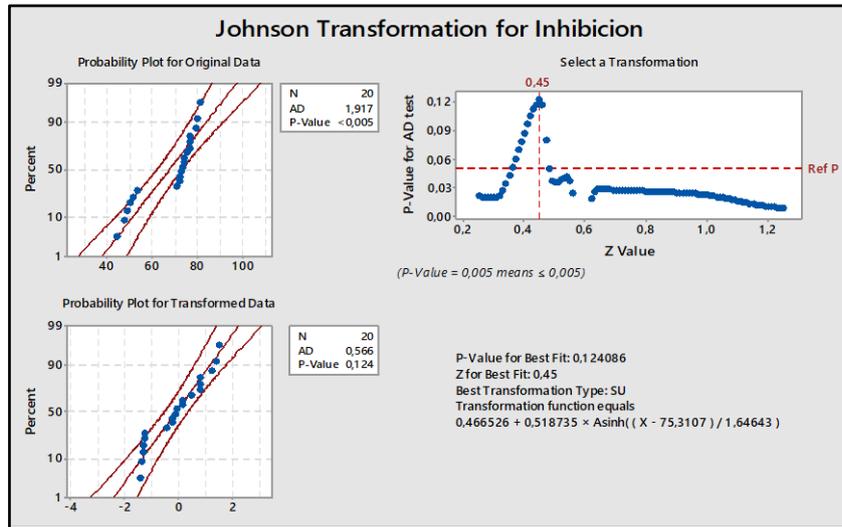


Ilustración 2: Transformación de Johnson para la inhibición in vitro

Fuente: Autora

En la Ilustración 2 se observa que se logró normalizar los datos mediante la transformación de Johnson ya que el valor de $P < 0,05$ pasó a ser $p > 0,05$ ($p = 0,124$), en donde se aplica un Diseño Completamente al Azar DCA con un arreglo de 2×10 (dos tratamientos (8 y 11 días) por 10 repeticiones y calcular el ANOVA (Análisis de Varianza de un factor) con los nuevos datos normales.

One-way ANOVA: 8 Dias. 11 Dias					
Method					
Null hypothesis	All means are equal				
Alternative hypothesis	At least one mean is different				
Significance level	$\alpha = 0,05$				
Equal variances were assumed for the analysis.					
Factor Information					
Factor	Levels	Values			
Factor	2	8 Dias. 11 Dias			
Analysis of Variance					
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	1	7,667	7,6669	12,62	0,002
Error	18	10,938	0,6076		
Total	19	18,605			

Ilustración 3: ANOVA de los porcentajes de inhibición a los 8 y 11 días

Fuente: Autora

En la Ilustración 3 se observa que $P < 0,05$ ($P = 0.02$) lo que significa que vamos a rechazar la hipótesis nula H_0 de que las medias estadísticas son iguales a los 8 y 11 días con respecto al porcentaje de de inhibición y aceptamos la H_i que estas son diferentes, es decir el porcentaje de inhibición no es igual a los 8 y 11 días.

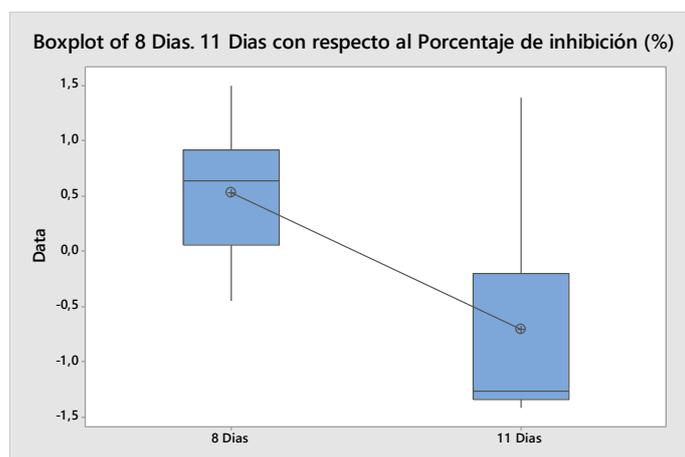


Ilustración 4: Diagrama de cajas de la inhibición a los 8 y 11 días.

Fuente: Autora

En la Ilustración 4 se observa un diagrama de cajas (Boxplot), donde se indica que si existen diferencias significativas con respecto a los días en los que se calcula el porcentaje de inhibición, se puede deducir que los mejores resultados de inhibición en la evaluación *in vitro* del efecto antagónico de *Azospirillum sp.* frente a *Fusarium Oxysporum f. sp. lycopersici* (FOL) se producen a los 8 días vs los 11 días.

Tukey Pairwise Comparisons			
Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence			
Factor	N	Mean	Grouping
8 Dias	10	0,527	A
11 Dias	10	-0,712	B
Means that do not share a letter are significantly different.			

Ilustración 5: Prueba de Tukey de los porcentajes de inhibición a los 8 y 11 días.

Fuente: Autora

En la Ilustración 5 del método de Tukey se observa que los tratamientos son significativamente diferentes en cuanto a sus medias estadísticas es decir el porcentaje de

inhibición no es igual a los 8 días (75.65%) y 11 días (59.33%) tal y como lo describe el ANOVA.

En la Tabla 15, se observa los resultados obtenidos del enfrentamiento mediante caja dual antagonista vs patógeno. Con el objetivo de evaluar la capacidad de antagonismo *in vitro* de *Azospirillum* contra FOL, los resultados reflejaron que la cepa de *Azospirillum* (C7Az), presenta antagonismo tanto a los 8 como a los 11 días, como se presenta en el ANEXO 9, sin embargo, entre estos dos tratamientos hay una diferencia significativa ($p=0.02$) evidenciando que el mejor porcentaje de inhibición se presentó a los ocho días de incubación con un porcentaje entre el 70 y 81%, al contrario de las pruebas realizadas a los 11 días donde el porcentaje fue menor entre 40 y 80%. La reducción de inhibición que se produjo a los 11 días puede estar vinculado con la baja concentración de metabolitos anti fúngicos para la inhibición del crecimiento de FOL, debido a que el proceso se realiza en condiciones controladas (Tejera et al., 2012), sin embargo el porcentaje sigue siendo alto esto debido a que estas bacterias son capaces de soportar cambios en el ambiente en el que se encuentre (Hernández et al., 2015) como lo ya mencionado anteriormente. En un estudio realizado por Ramírez y colaboradores (2015) en su trabajo titulado “Efecto de cuatro rizobacterias promotoras de crecimiento sobre la pudrición basal causada por *Phytophthora capsici* en plantas de chiledulce (*C. apsicum annuum*)”, indica que la cepa *Azospirillum lipoferum* PCJ2 logro inhibir en un 50% el crecimiento de *Phytophthora capsici* a nivel *in vitro* donde posee resultados altos al igual que los observados en esta investigación. En “RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL COMO BIOFERTILIZANTES” Pernasetti y Di Barbaro (2012) indican que *Azospirillum sp.*, ejerce antagónicamente en pruebas *in vitro* contra hongos fitopatógenos como *Fusarium moniliforme*, haciendo que este no se desarrolle en las cajas Petri y *Fusarium sp* asilado de raíces enfermas de nogal (*Juglans nigra sp*),

donde el crecimiento disminuyó significativamente con la presencia de *Azospirillum sp.* En base a estos resultados se confirma que las bacterias de género *Azospirillum sp.* sirven como antagonistas de FOL a los 8 días de incubación en condiciones controladas *in vitro*, obteniendo altos y aceptables índices de antagonismo.

4.5 Efecto de la inoculación en la longitud de las plantas y en el desarrollo de las raíces

4.5.1 Efecto de la inoculación en germinación de las semillas

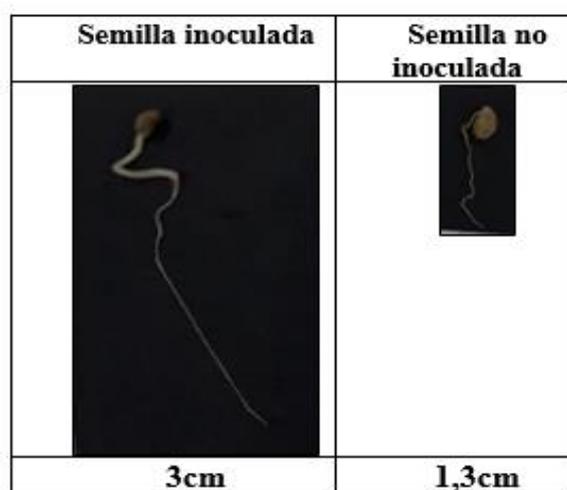


Imagen 22: Semillas germinadas inoculadas y no inoculadas

Fuente: Autora

Tres días después de la siembra de las semillas en placas estériles a una temperatura de 25 °C, se observó la germinación de las semillas inoculadas y no inoculadas, a las cuales se realizó la medición de la longitud radicular con una regla esterilizada como se observa en la Imagen 25, obteniendo datos en centímetros de 100 semillas germinadas inoculadas y 100 no inoculadas (ANEXO 2).

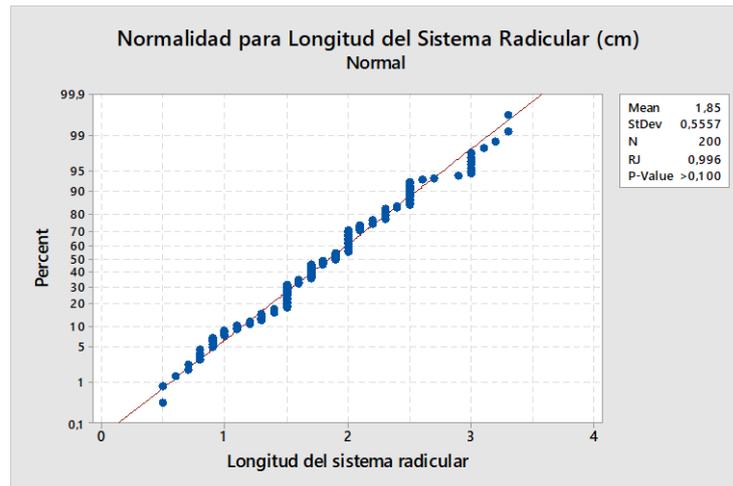


Ilustración 6: Prueba de normalidad de la longitud del sistema radicular

Fuente: Autora

En la Ilustración 6, se aprecia que al aplicar un test de Shapiro – Wilkes si existe normalidad en los datos dado que el valor de $p > 0,05$, siendo en este caso es 0,100, es por ello que se acepta la H_0 (Hipótesis Nula) que los datos siguen una distribución normal, rechazando por defecto la H_1 , todo esto con 100 repeticiones. Lo que permite realizar el ANOVA aplicando un DCA de dos tratamientos por 100 repeticiones con un arreglo factorial 2×100 , para conocer la longitud del sistema radicular en centímetros.

Factor	Levels	Values
Factor	2	Inoculadas (Azospirillum sp.). No inoculadas

Analysis of Variance					
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	1	19,97	19,9712	95,31	0,000
Error	198	41,49	0,2095		
Total	199	61,46			

Ilustración 7: ANOVA del crecimiento radicular en semillas germinadas inoculadas y no inoculadas

Fuente: Autora

En la Ilustración 7 se observa que el valor de p es igual a 0,000 es decir $p < 0,05$ por lo que se rechaza la H_0 que las medias estadísticas de la longitud radicular en centímetros de las semillas germinadas inoculadas y no inoculadas son iguales es decir aceptamos la H_1 que al menos un tratamiento o una media estadística es diferente.

Tukey Pairwise Comparisons			
Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence			
Factor	N	Mean	Grouping
Inoculadas (Azospirillum sp.)	100	2,1660	A
No inoculadas	100	1,5340	B
Means that do not share a letter are significantly different.			

Ilustración 8: Tukey del crecimiento radicular en semillas germinadas inoculadas y no inoculadas

Fuente: Autora

En la Ilustración 8, se observa la prueba de Tukey donde se confirma que efectivamente existen diferencias significativas en la longitud del sistema radicular en centímetros de las plantas inoculadas vs no inoculadas. Este proceso se realizó con un intervalo de confianza del 95 %.

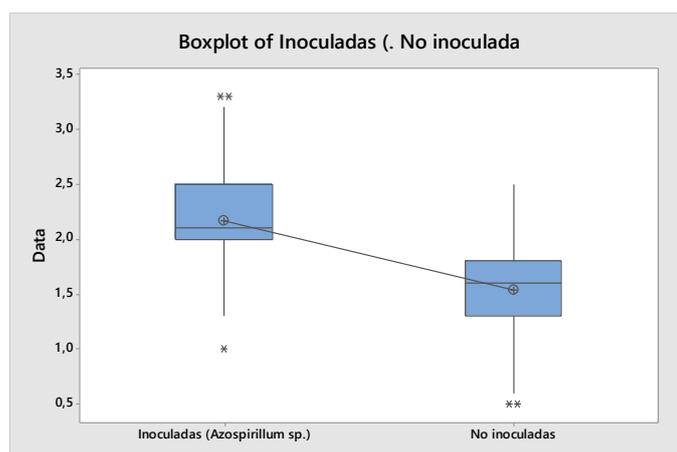


Ilustración 9: Diagrama de Boxplot del crecimiento radicular en semillas germinadas inoculadas y no inoculadas

Fuente: Autora

En la Ilustración 9 se puede apreciar el diagrama de Boxplot donde se muestra que efectivamente la longitud media del sistema radicular en centímetros de las plantas inoculadas con *Azospirillum* -media de 2.166- es diferente a las no inoculadas -media de 1.534-, se presentan mejores resultados de crecimiento radicular con la inoculación de *Azospirillum*.

Los valores de las medias de la longitud radicular de las semillas germinadas oscilan entre 2.166 y 1.534 cm para las inoculadas y no inoculadas respectivamente. Según la

prueba de Tukey (Ilustración 8) las mayores longitudes del sistema radicular a los 3 días de germinación se alcanzaron con las semillas inoculadas, alcanzando un índice de efectividad del 39.75%.

4.5.2 Efecto de la inoculación en la longitud se plantas de tomate al momento del trasplante

Después de 30 días de la siembra de las semillas germinadas se pudo apreciar una notable diferencia entre las plántulas inoculadas y no inoculadas. Las plantas no inoculadas tenían un aspecto amarilloso y eran más pequeñas, al contrario de las plántulas inoculadas que eran verdes en su totalidad (Imagen 26), además de ser más grandes en longitud. Según Hernández (2003) esto podría indicar la falta de nitrógeno en el suelo, en donde las plantas que fueron inoculadas indicaban un buen aspecto al contar como única fuente de nitrógeno la solución bacteriana *Azospirillum sp.*



Imagen 23: Plántulas de tomate, izquierda (no inoculadas), derecha (inoculadas)

Fuente: Autor

Así mismo se tomó la longitud de 20 plantas con a las que fueron inoculadas las bacterias *Azospirillum* y 20 plantas sin inocular.

Tabla 16: Longitud de plantas inoculadas y no inoculadas en el trasplante

Número de plantas	Longitud de plantas (cm)	
	Inoculadas (<i>Azospirillum sp.</i>)	No inoculadas
1	12	8.5
2	13	10
3	12.2	8.2
4	12.1	9.5
5	13	8.5
6	13	8.5
7	10.8	10.2
8	11.5	10.2
9	11.3	9.8
10	13.2	10.2
11	12.5	9.5
12	13.5	9.8
13	13	10.4
14	13.2	11.3
15	13.1	10.3
16	12.5	9.5
17	12.2	11.2
18	13.1	10
19	12	10
20	13.4	10.3
PROMEDIO	12.5	9.8

Fuente: Autora

La Tabla 16 muestra las longitudes de las plantas inoculadas y no inoculadas en el momento del trasplante, para el estudio se toman 20 plantas para cada tratamiento para la obtención de datos más acercados y reales.

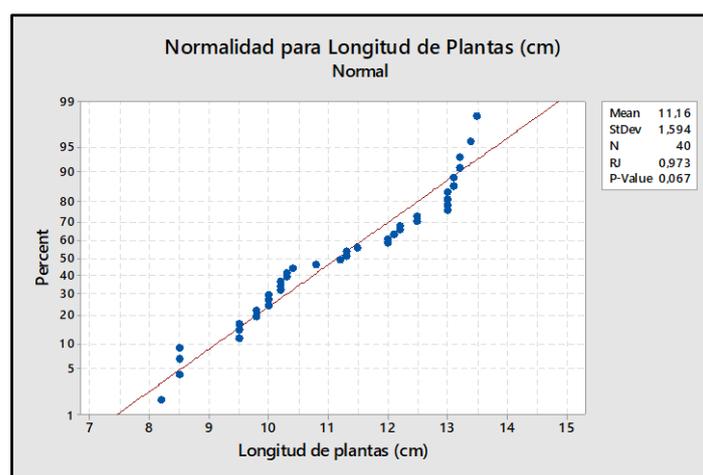


Ilustración 10: Prueba de normalidad de datos de plántulas inoculadas y no inoculadas.

Fuente: Autora

La Ilustración 10 indica que al aplicar un test de normalidad por el método de Shapiro – Wilkes, la gráfica revela al instante que los datos son normales dado que $p > 0.05$, es

decir 0,067 eso significa que se acepta la Ho (Hipótesis Nula) que los datos siguen una distribución normal (rechazando por defecto la Hi).

Se aplicó un DCA (Diseño estadístico completamente al Azar) con un arreglo factorial de 2x20 es decir dos tratamientos (inoculadas y no inoculadas) por veinte repeticiones, para comprobar la existencia de diferencias significativas con la longitud de las plantas inoculadas y no inoculadas medidas en cm, esto gracias a una prueba de ANOVA.

One-way ANOVA: Inoculadas (Azospirillum sp.). No inoculadas					
Method					
Null hypothesis		All means are equal			
Alternative hypothesis		At least one mean is different			
Significance level		$\alpha = 0,05$			
Equal variances were assumed for the analysis.					
Factor Information					
Factor	Levels	Values			
Factor	2	Inoculadas (Azospirillum sp.). No inoculadas			
Analysis of Variance					
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	1	40,61	40,6125	58,33	0,000
Error	18	12,53	0,6963		
Total	19	53,15			

Ilustración 11: ANOVA de plántulas inoculadas y no inoculadas en el trasplante

Fuente: Autora

En la Ilustración 11 se puede observar que el valor de $p < 0.05$ ($p= 0.000$) lo que se rechaza la Ho que las medias estadísticas de las plantas inoculadas y no inoculadas son iguales es decir aceptamos la Hi que al menos un tratamiento o una media estadística es diferente.

Tukey Pairwise Comparisons			
Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence			
Factor	N	Mean	Grouping
Inoculadas (Azospirillum sp.)	10	12,210	A
No inoculadas	10	9,360	B
Means that do not share a letter are significantly different.			

Ilustración 12: Prueba de Tukey de plántulas inoculadas y no inoculadas en el trasplante

Fuente: Autora

En la Ilustración 12 se observa la prueba de Tukey, confirmando que efectivamente existen diferencias significativas en la longitud en centímetros de las plantas inoculadas vs no inoculadas. Todo este proceso se realiza con un intervalo de confianza del 95 %.

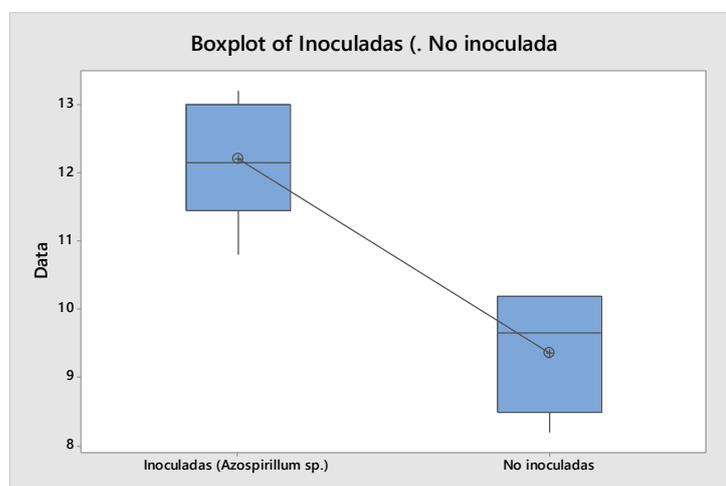


Ilustración 13: Boxplot de plántulas inoculadas y no inoculadas en el trasplante

Fuente: Autora

La Ilustración 13 indica el diagrama de Boxplot, en donde se confirma que efectivamente la longitud medida en centímetros de las plantas inoculadas con *Azospirillum* -media de 12.2- es diferente a las no inoculadas -media de 9.3-, se presentan mejores resultados de crecimiento con la inoculación. Donde el índice de efectividad de la inoculación oscilo en un 27.55%.

4.5.3 Efecto de la inoculación en la longitud de plantas de tomate al término de la investigación

Para determinar que las plantas de tomate hayan sido efectivamente beneficiadas con la bacteria *Azospirillum sp.*, como lo describe donde confirma que la aplicación de *Azospirillum* hace que la longitud de las plantas sea mayor a las plantas testigo (no inoculadas), se realizó la medición de la parte aérea de las plantas de los cuatro tratamientos para determinar que el uso de la bacteria beneficio en el crecimiento de las

plantas. Los resultados de las mediciones de longitudes de los cuatro tratamientos al término de la investigación -28 días después del trasplante- se detalla en la tabla 13.

Tabla 17: Longitud en cm de plantas de tomate a los 28 días

Número de planta	Longitud de las plantas (cm)			
	T0 (testigo absoluto)	T ₁ (Testigo relativo) <i>Azospirillum sp.</i>	T ₂ (Hongo FOL)	T ₃ (<i>Azospirillum</i> +FOL)
1	23.5cm	30 cm	16 cm	25 cm
2	23 cm	29 cm	16.5 cm	24.2 cm
3	23.8 cm	29.2 cm	17 cm	26 cm
4	24.7 cm	28 cm	18.2 cm	24 cm
5	22.5 cm	29.2 cm	19 cm	23 cm
6	22.7 cm	27.4 cm	16.5 cm	24.2 cm
7	23.5 cm	28 cm	17.9 cm	25.2 cm
8	22.2 cm	34 cm	19 cm	26 cm
9	24.2 cm	27.5 cm	19.5 cm	25.5 cm
10	24 cm	27.5 cm	18.2 cm	24 cm
11	24.2 cm	27 cm	17 cm	27 cm
12	22 cm	26.8 cm	17 cm	26.8 cm
13	23 cm	28.2 cm	20.3 cm	24 cm
14	22 cm	26.5 cm	16.5 cm	26 cm
15	25 cm	26.6 cm	16.5 cm	24 cm
16	21.8 cm	27.2 cm	17.6 cm	23.8 cm
17	21.5 cm	28.5 cm	18.1 cm	23.2 cm
18	23.5 cm	29 cm	19.2 cm	22.5 cm
19	22.4 cm	26 cm	17.6 cm	23.2 cm
20	22 cm	26 cm	16.3 cm	23.5 cm
PROMEDIO	23.1cm	28.08cm	17.68cm	24.55cm

Fuente: Autora

En la Tabla 17 se indica que T1 y T3 obtuvieron mayor crecimiento ya que fueron inoculadas con la bacteria *Azospirillum* en comparación al T0 y T2, que el caso del segundo fue contaminado con el patógeno tan solo, en donde no tenía un biocontroladora como *Azospirillum* como el T3, que aun con la inoculación del patógeno las plantas alcanzaron mayores longitudes casi alcanzando al T1.

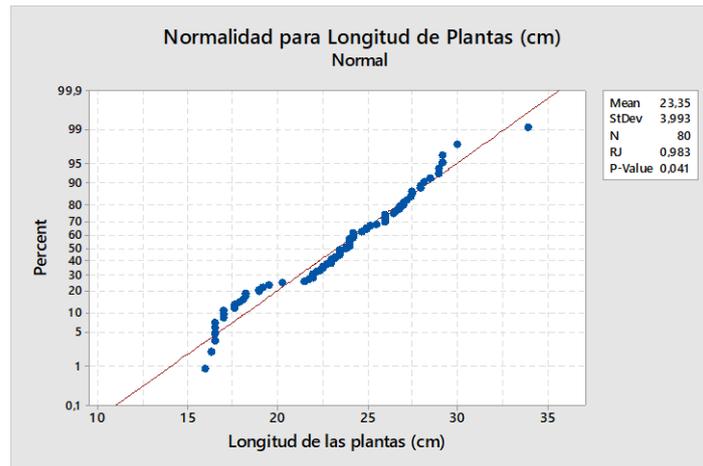


Ilustración 14: Prueba de normalidad en longitudes al término de la investigación.

Fuente: Autora

Como se observa en la Ilustración 14 el test de normalidad indica que el valor de $p < 0,05$ ($p = 0,041$), por lo que se rechaza la hipótesis nula H_0 de que los datos siguen una distribución normal y se acepta la hipótesis alternativa H_i de que estos datos no son normales. Es por ello que con la intención de normalizar los datos se intentó transformar los datos con BOX – COX, en el cual también se evidenció que los datos no siguen una distribución normal, por lo que se transformó los datos con Johnson.

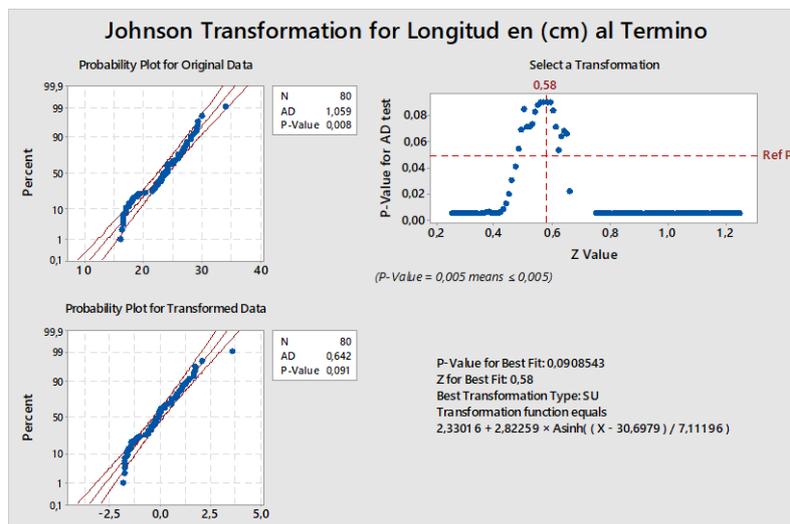


Ilustración 15: Transformación de Johnson en la longitud al término de la investigación

Fuente: Autora

En la Ilustración 15 se observa se logró normalizar los datos con Johnson, ya que $p = 0,091$ es decir $p > 0,05$ podemos aceptar la Hipótesis Nula (H_0) de que los datos siguen un comportamiento normal.

Una vez normalizado los datos se aplicó un DCA (Diseño Estadístico completamente al Azar) con arreglo factorial de 4×20 (cuatro tratamientos por 20 repeticiones), es decir que se analiza cada tratamiento con 20 repeticiones cada uno. Con los datos normalizados se procedió a ejecutar el ANOVA.

One-way ANOVA: T0 (testigo abso. T1 (Testigo rela. T2 (Hongo FOL). T3 (Azospirillum					
Method					
Null hypothesis	All means are equal				
Alternative hypothesis	At least one mean is different				
Significance level	$\alpha = 0,05$				
Rows unused	12				
Equal variances were assumed for the analysis.					
Factor Information					
Factor	Levels	Values			
Factor	4	T0 (testigo absoluto). T1 (Testigo relativo). T2 (Hongo FOL). T3 (Azospirillum+FOL)			
Analysis of Variance					
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	3	82,55	27,5152	146,21	0,000
Error	76	14,30	0,1882		
Total	79	96,85			

Ilustración 16: Prueba de ANOVA para los cuatro tratamientos al final del experimento

Fuente: Autora

La Ilustración 16 indica que, en base a los resultados del Análisis de Varianza, el valor de $p < 0,05$ ($p = 0,000$); por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula de que todos los tratamientos presentan medias estadísticas similares, al menos uno de los tratamientos es diferente (se acepta H_i alternativa).

Tukey Pairwise Comparisons				
Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence				
Factor	N	Mean	Grouping	
T1 (Testigo relativo)	20	1,329	A	
T3 (Azospirillum+FOL)	20	0,1407	B	
T0 (testigo absoluto)	20	-0,2889	C	
T2 (Hongo FOL)	20	-1,5120	D	
Means that do not share a letter are significantly different.				

Ilustración 17: Prueba de Tukey para los datos de longitud de los cuatro tratamientos al final de la investigación

Fuente: Autora

Con el Análisis de Tukey (Ilustración 17) efectivamente se puede apreciar que ninguno de los tratamientos es similar entre sí, todos presentan diferencias significativas.

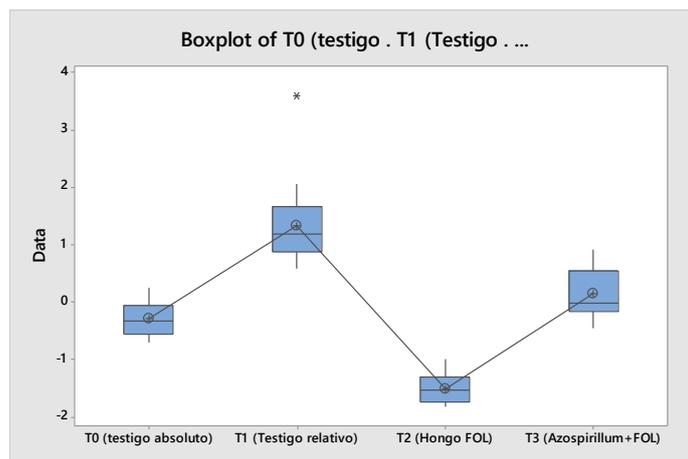


Ilustración 18: Diagrama de cajas para los datos de longitud de los cuatro tratamientos al final de la investigación

Fuente: Autora

La grafica de cajas (Ilustración 18), corrobora el Análisis de Tukey. Ningún tratamiento comparte medias similares es decir son significativamente diferentes en otras palabras el T1 (testigo relativo *Azospirillum sp.*) produjo los mejores valores de crecimiento en la planta de tomate al final del experimento seguido del T3 (*Azospirillum* + FOL). En donde se obtuvo un porcentaje de efectividad del 29.06%.

4.5.4 Efecto de la inoculación en el peso fresco del sistema radicular al término de la investigación.

El efecto de la inoculación de las bacterias en el peso de las raíces de las plantas a los 28 días después del trasplante mostrando los siguientes resultados:

Tabla 18: Peso del sistema radicular de los cuatro tratamientos a los 28 días

Número de planta	Peso de las raíces (g)			
	T0 (testigo absoluto)	T1 (Testigo relativo) Azospirillum sp.	T2 (Hongo FOL)	T3 (Azospirillum+FOL)
1	2.03	4.81	2.72	4.52
2	2.88	4.61	3.04	4.31
3	3.84	5.02	3.55	4.24
4	3.28	4.04	2.84	3.93
5	3.39	3.94	3.06	4.34
6	2.86	4.42	4.54	3.99
7	2.38	4.23	2.98	3.87
8	2.91	3.96	3.53	4.26
9	3.15	4.52	4.67	4.18
10	2.75	4.22	3.65	3.76
11	3.55	4.34	3.43	3.76
12	3.54	4.67	2.56	4.56
13	2.6	3.67	3.87	5.06
14	4	3.93	3.56	4.96
15	3.5	3.45	2.97	4.65
16	3.4	4.46	2.97	4.65
17	3.32	4.43	3.86	3.68
18	2.98	4.64	3.80	3.89
19	2.67	3.56	2.94	3.90
20	3.25	4.68	3.54	4.89
PROMEDIO	3.11	4.28	3.25	4.27

Fuente: Autora

En la Tabla 18 se observa, los diferentes datos recolectados de los pesos de las raíces en los cuatro tratamientos, donde tanto T1 como el T3 tiene mayor peso en comparación del T0 y T2. Se procede a efectuar el análisis de normalidad por Shapiro – Wilkes para comprobar los resultados.

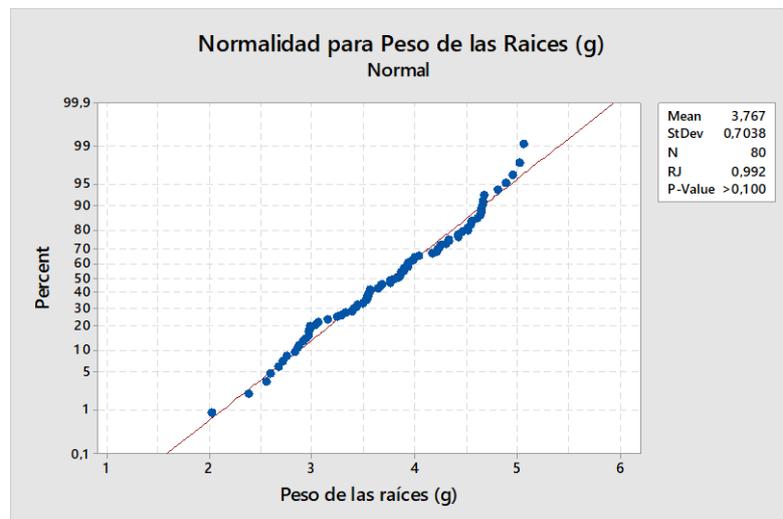


Ilustración 19: Prueba de normalidad del peso del sistema radicular

Fuente: Autora

En la Ilustración 19 se observa que el valor de $p > 0,05$ ($p = 0,237$) por lo tanto; se acepta la H_0 ; Hipótesis Nula de que los datos se comportan de forma normal (Se rechaza la hipótesis H_1). Los que permite realizar la prueba de ANOVA.

Se empleó un diseño estadístico de DCA (Diseño Completamente al Azar) de arreglo factorial 4×20 (cuatro tratamientos por veinte repeticiones), Donde cada tratamiento tiene 20 repeticiones.

Factor	Levels	Values
Factor	4	T0 (testigo absoluto). T1 (Testigo relativo). T2 (Hongo FOL). T3 (Azospirillum+FOL)

Analysis of Variance					
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	3	21,49	7,1624	30,86	0,000
Error	76	17,64	0,2321		
Total	79	39,13			

Ilustración 20: ANOVA del peso radicular al final de la investigación

Fuente: Autora

En la Ilustración 20 se puede observar los resultados del Análisis de Varianza, donde el valor de $p < 0,05$ ($p = 0,000$); por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula de que todos los tratamientos presentan medias estadísticas similares, al menos uno de los tratamientos es diferente (se acepta H_1 alternativa). Se ejecuta una comprobación mediante Tukey.

Tukey Pairwise Comparisons			
Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence			
Factor	N	Mean	Grouping
T1 (Testigo relativo)	20	4,2800	A
T3 (Azospirillum+FOL)	20	4,2700	A
T2 (Hongo FOL)	20	3,404	B
T0 (testigo absoluto)	20	3,114	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Ilustración 21: Prueba de Tukey en el peso radicular al final de la investigación

Fuente: Autora

Según la prueba de Tukey como se observa en la Ilustración 21, el tratamiento T3 es similar al T1, estos dos tratamientos no son significativamente iguales al T2 y T0 en cuanto que estos dos últimos comparten significancia.

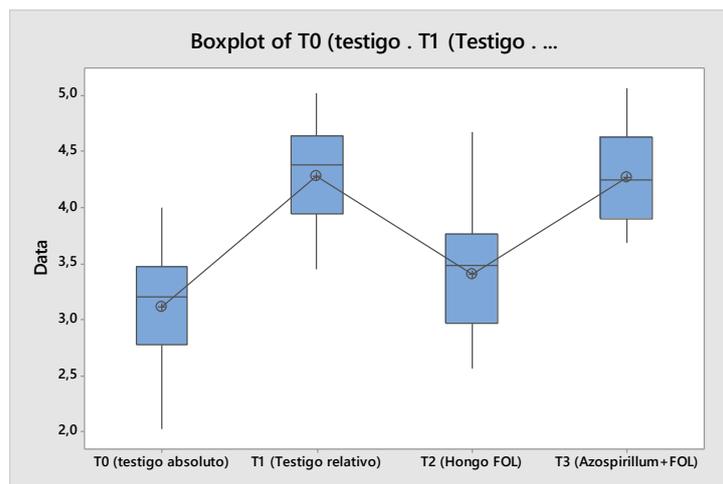


Ilustración 22: Boxplot del peso radicular al final de la investigación

Fuente: Autora

El gráfico Boxplot -Ilustración 22-, permite confirmar que el tratamiento T1 -testigo relativo con una media de 4.28-, seguido de T3 -*Azospirillum* + FOL con media de 4.27- son los mejores tratamientos aplicados ya que causan un mayor peso gramos en las raíces de las plantas a los 28 días después del trasplante, por otro lado, el T0 -testigo absoluto, media de 3.114- provocó el menor peso radicular a los 28 días del trasplante. Obteniendo un porcentaje de efectividad de 34.43%.

Los datos obtenidos en la longitud del sistema radicular, el peso fresco radicular y en la longitud de las plantas muestran resultados similares en donde indican que con la inoculación de *Azospirillum sp.*, hubo aumento de estos parámetros encontrando índices de efectividad de 39.75%, 27.55%, 29.06% y 34.43% en la longitud del sistema radical, en la longitud de la planta al momento del trasplante, en la longitud de la parte aérea al término de la investigación y peso sistema radical al término de la investigación respectivamente, asimilando que existen diferencias significativas en comparación los testigos absolutos; indicando que con la presencia de *Azospirillum* en la planta provoca cambios rápidos para su crecimiento, con la producción de hormonas, conjuntamente con la absorción de nutrientes necesarios para las plantas de suelos en los que se encuentren inmersos. Estos resultados concuerdan con lo descrito por García y colaboradores (2010)

en su investigación “Caracterización de cepas nativas de *Azospirillum spp.* y su efecto en el desarrollo de *Oryza sativa L.* “arroz” en Lambayeque” donde señala que todas las cepas aisladas e identificadas como *Azospirillum sp.*, incrementaron los resultados en la longitud y peso del sistema radical y parte aérea de las plantas de arroz, obteniendo índices de efectividad entre 21.77, 102.06 y 126.11% en relación al testigo absoluto. La cepa que mayor efectividad le dio a la planta en cuanto a la altura y biomasa seca del sistema radical fue *Azospirillum sp.* GM-86 dando a conocer que la efectividad es dada por el incremento de producción de ácido indolacético y fijación de nitrógeno producido por estas cepas. Así mismo los autores concluyen que para un mayor índice de efectividad se da con aplicación de *Azospirillum* en combinación con úrea. Autores como Villegas-Espinoza y colaboradores (2010) señala que el incremento del sistema radicular y el acelerado aumento en el crecimiento de las plantas se debe a que las bacterias del género *Azospirillum* producen reguladores de crecimiento como las citoquininas, auxinas, ácido indolacético, además de ello fijan nitrógeno, sugiriendo que estas fitohormonas podrían ser las causantes del incremento en el peso, longitud y rendimiento de los cultivos. Según Caballero-Mellado (1998), en su estudio sobre “el género *Azospirillum*” resalta que estos microorganismos tienen alta capacidad para asociarse con las plantas y fijar nitrógeno. Según el autor las inoculaciones de estas bacterias no han reportado que causen algún daño a las plantas que en este caso fueron de trigo, algodón y tomate, sino al contrario se observó que mediante la inoculación hubo un mayor desarrollo de las raíces y aumento de la parte aérea de las plantas. Los experimentos también revelaron que las plantas contenían altos índices de fósforo, potasio y nitrógeno. Okon y colaboradores (1976) indican que con la inoculación de *Azospirillum* incrementa el rendimiento de los cultivos hasta en un 30%, y que con la aplicación de fertilización que contenga nitrógeno, potasio y fósforo la efectividad aumenta hasta en un 90%. Los datos aportados por Meza (2013)

en su investigación titulada EFECTO DEL ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO PRODUCIDO POR *Azospirillum brasilense* EN LAS ENZIMAS DE ASIMILACIÓN DE AMONIO EN *Chlorella vulgaris*, BAJO CONDICIONES DE COINMOVILIZACIÓN señalan que los cambios producidos a las plantas como morfología se debe a la producción de fitohormonas que producen las bacterias de este género como son el AIA, como los ya mencionados anteriormente, sin embargo en este estudio se pudo determinar que: *A. brasilense* provocó que *Chlorella* absorba amonio, Glutamina sintetasa y Glutamato Deshidrogenasa. Por lo tanto la inoculación de *Azospirillum sp* en plantas de tomate produce aumento en las raíces y en la parte aérea de las plantas debido a que las bacterias del género *Azospirillum sp.*, son consideradas como promotoras de crecimiento por la producción de fitohormonas y fijan nitrógeno, pueden provocar que estas características conlleven a otros beneficios: que las plantas inoculadas puedan obtener mayor absorción de nutrientes, tolerancia al estrés y a la sequía, haciendo que las plantas resulten más vigorosas y productivas (Di Barbaro et al., 2014).

4.6 Grado de infección de las plantas de tomate riñón con *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* con y sin la bacteria *Azospirillum sp.* (T2 y T3)

Para la determinación del grado de infección de las plantas de tomate riñón con *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* con y sin la bacteria *Azospirillum sp.*, se realizó el cálculo de la incidencia de la enfermedad en la parte aérea de la planta a los 15 días con seis hojas muestreadas y a los 28 días con ocho hojas muestreadas en 20 plantas por tratamiento T₂-FOL- y T₃-Azospirillum +FOL-. El resultado de la incidencia se puede apreciar en las siguientes tablas:

4.6.1 Grado de infección de la marchitez vascular del tomate mediante la incidencia en el tratamiento T2 (FOL) y T3 (Azospirillum +FOL)

4.6.1.1 Incidencia en el tratamiento T2 (FOL)

Tabla 19: Incidencia del marchitamiento vascular en el T2(FOL)

Número de plantas (#)	Evaluación de Incidencia (Hojas)			
	15 días (6 hojas muestreadas)	Porcentaje (%)	28 días (8 hojas muestreadas)	Porcentaje (%)
1	2	33.3%	5	62.5%
2	1	16.6%	4	50%
3	0	0%	4	50%
4	2	33.3%	5	62.5%
5	1	16.6%	4	50%
6	2	33.3%	5	62.5%
7	1	16.6%	4	50%
8	1	16.6%	5	62.5%
9	1	16.6%	5	62.5%
10	0	0%	3	37.5%
11	2	33.3%	5	62.5%
12	1	16.6%	4	50%
13	2	33.3%	5	62.5%
14	2	33.3%	5	62.5%
15	1	16.6%	5	62.5%
16	1	16.6%	4	50%
17	0	0%	4	50%
18	1	16.6%	5	62.5%
19	2	33.3%	5	62.5%
20	0	0%	4	50%
PROMEDIO		19.13%		56.25%

Fuente: Autora

Con los datos de la Incidencia del marchitamiento vascular a los 15 y 28 días en el tratamiento T2, presentados en la Tabla 19, se aplica una prueba de Normalidad por Shapiro - Wilkes para verificar si los datos en este experimento siguen una distribución normal.

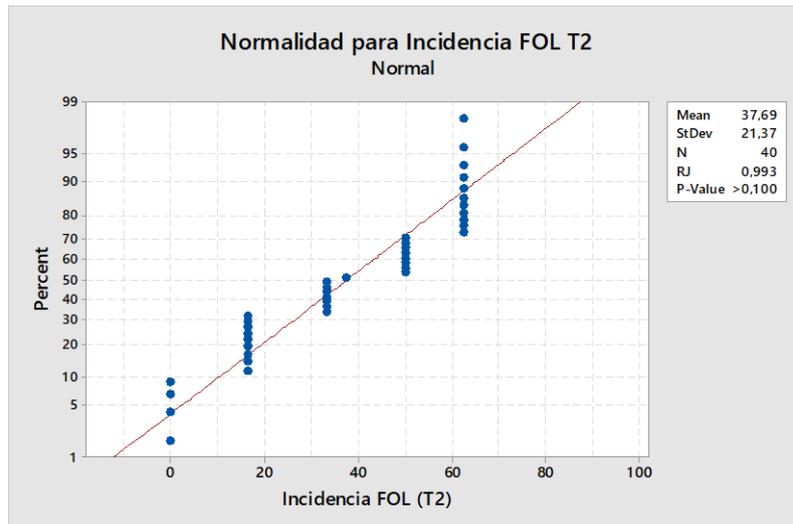


Ilustración 23: Prueba de normalidad de la incidencia en T2 (FOL)

Fuente: Autora

En la Ilustración 23 se puede observar que el valor de $p = 0.100$ según Shapiro – Wilkes; por lo tanto, $p > 0,05$, es decir los datos siguen una distribución normal según la Prueba de Shapiro – Wilkes.

Se procede a aplicar un DCA (Diseño estadístico completo al Azar) con un arreglo factorial de 2×20 , dos tratamientos, uno a los 15 días con 6 hojas muestreadas y otro a los 28 días con 8 hojas muestreadas, cada uno con 20 repeticiones -Aplicación del Análisis de Varianza ANOVA de una vía-.

Factor Information					
Factor	Levels	Values			
Factor	2	15 días (6 hojas muestreadas). 28 días (8 hojas muestreadas)			
Analysis of Variance					
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	1	13783	13782,7	130,26	0,000
Error	38	4021	105,8		
Total	39	17803			

Ilustración 24: ANOVA de la Incidencia T2

Fuente: Autora

En base a los resultados del Análisis de Varianza presentados en la Ilustración 24, se puede apreciar que el valor de $p < 0,05$ ($p = 0,000$); por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula de que todos los tratamientos presentan medias estadísticas similares, al menos uno

de los tratamientos es diferente, se acepta H_1 alternativa. A continuación, se realiza una comprobación de estos hechos mediante Tukey.

Tukey Pairwise Comparisons			
Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence			
Factor	N	Mean	Grouping
28 días (8 hojas muestreadas)	20	56,25	A
15 días (6 hojas muestreadas)	20	19,13	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Ilustración 25: Prueba de Tukey de la Incidencia T2

Fuente: Autora

Según la prueba Tukey observada en la Ilustración 25, efectivamente los dos tratamientos aplicados a los 15 y 28 días; son diferentes no presentan medias significativamente iguales.

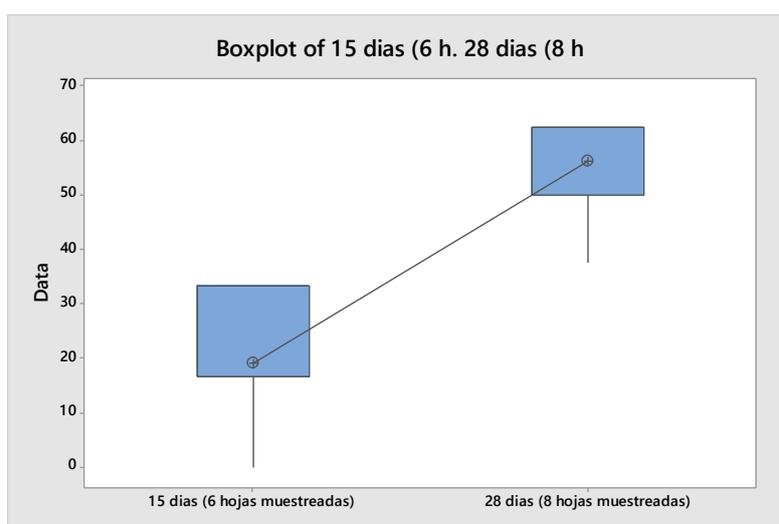


Ilustración 26: Boxplot de la Incidencia T2 a los 15 y 28 días

Fuente: Autora

La grafica de cajas –boxplot- mostrada en la Ilustración 26, permite demostrar que a los 28 días y con 8 hojas muestreadas se produjo el mayor porcentaje de incidencia en las partes aéreas del vegetal sobre los 15 días y con 6 hojas muestreadas.

4.6.1.2 Incidencia en el tratamiento T3 (Azospirillum + FOL)

Tabla 20: Incidencia en el tratamiento T3 a los 15 y 28 días

Número de plantas (#)	Evaluación de Incidencia (Hojas)			
	15 días (6 hojas muestreadas)	Porcentaje (%)	28 días (8 hojas muestreadas)	Porcentaje (%)
1	0	0%	2	25%
2	0	0%	2	25%
3	1	16.6%	3	37.5%
4	0	0%	2	25%
5	1	16.6%	3	37.5%
6	0	0%	2	25%
7	1	16.6%	2	25%
8	1	16.6%	3	37.5%
9	0	0%	2	25%
10	0	0%	3	37.5%
11	1	16.6%	2	25%
12	0	0%	2	25%
13	1	0%	3	37.5%
14	0	16.6%	2	25%
15	1	16.6%	2	25%
16	0	0%	2	25%
17	0	0%	2	25%
18	0	0%	2	25%
19	2	33.3%	3	37.5%
20	0	0%	2	25%
PROMEDIO		7.47% %		28.75%

Fuente: Autora

En la tabla 17 se aprecia los datos recogidos durante la investigación en el tratamiento T3 a los 15 y 28 días después del trasplante donde la incidencia a los 28 días fue mayor a la incidencia producida a los 15 días. Estos resultados son comprobados mediante pruebas estadísticas empezando con una prueba de normalidad para saber si los datos recogidos siguen una distribución normal.

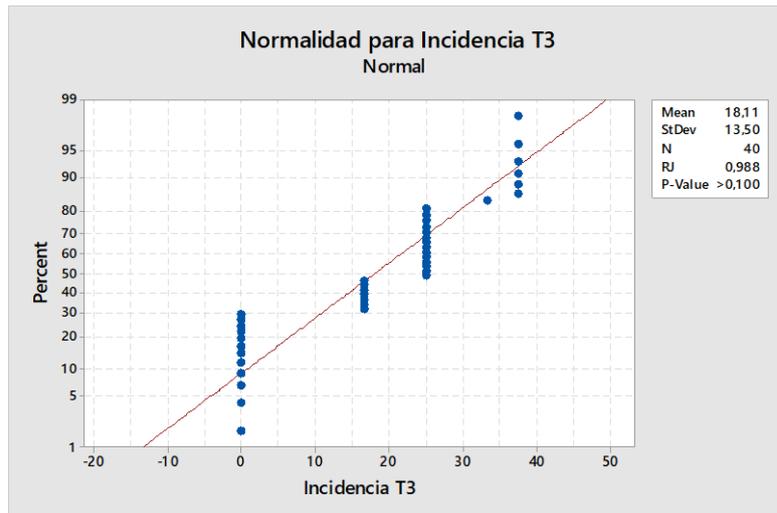


Ilustración 27: Prueba de normalidad para Incidencia en el tratamiento T3

Fuente: Autora

La Ilustración 27 demuestra que con la aplicación de Shapiro – Wilkes, el valor de $p=0.100$ por lo tanto $p > 0,050$, es decir los datos siguen una distribución normal.

Se procedió a aplicar un DCA -diseño estadístico completo al Azar; con aplicación de un ANOVA- con un arreglo factorial de 2×20 dos tratamientos uno a los 15 días con 6 hojas muestreadas y otro a los 28 días con 8 hojas muestreadas, cada uno con 20 repeticiones; de forma análoga a lo que se hizo con T2 pero esta vez con el T3 – Azospirillum vs FOL).

Factor Information					
Factor	Levels	Values			
Factor	2	15 días. 28 días			
Analysis of Variance					
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	1	4526	4526,26	66,76	0,000
Error	38	2577	67,80		
Total	39	7103			

Ilustración 28: ANOVA de Incidencia en el tratamiento T3

Fuente: Autora

En base a los resultados del Análisis de Varianza (Ilustración 28), se puede observar que el valor de $p < 0,05$ ($p = 0,000$); por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula de que todos los tratamientos presentan medias estadísticas similares, al menos uno de los tratamientos

es diferente (se acepta H_1 alternativa). Se ejecutó una comprobación mediante el análisis de Tukey.

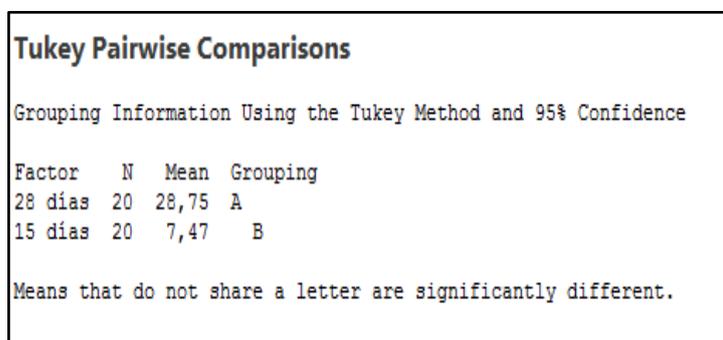


Ilustración 29: Prueba de Tukey de la Incidencia del tratamiento T3

Fuente: Autora

Al igual que en T2 usando únicamente al FOL en los dos tratamientos con 28 y 15 días, en T3 -FOL + Azospirillum- estos dos tratamientos son significativamente diferentes en relación a sus medias estadísticas.

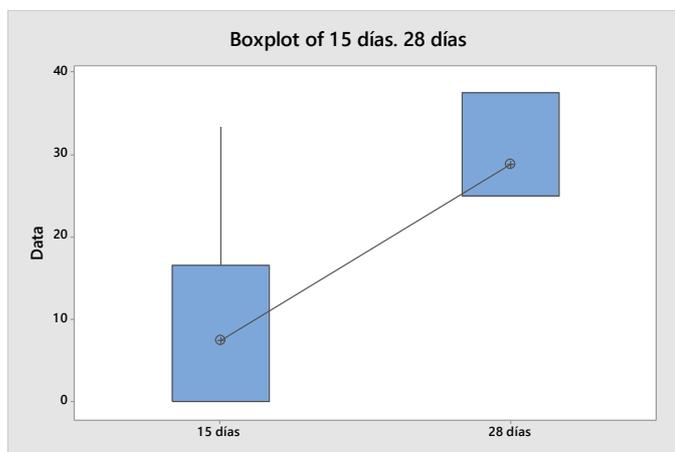


Ilustración 30: Boxplot de la incidencia en el tratamiento T3

Fuente: Autora

Con la gráfica de cajas –Boxplot- mostrada en la Ilustración 30 donde se comprueba que los resultados del porcentaje de incidencia con el tratamiento T3 -Azospirillum + FOL-, son idénticos a los resultados con T2 –FOL- ya que es a los 28 días -8 hojas muestreadas- que se obtienen mayores porcentajes de incidencia en las hojas -partes aéreas- del vegetal que con la aplicación del T3 en 15 días -6 hojas muestreadas-.

4.6.1.3 Comparación de la incidencia T2 (FOL) y T3 (Azospirillum + FOL)

Tabla 21: Comparación de la incidencia T2 y T3 a los 15 y 28 días

Tratamiento	Días	15 días	28 días
T ₂		19.15%	56.25%
T ₃		7.47%	28.75%

Fuente: Autora

La Tabla 21 indica el cálculo del promedio porcentual de cada tratamiento aplicado en 15 y 28 días, corrobora los resultados estadísticos presentados anteriormente, en donde la mayor incidencia de la marchitez vascular causada por el hongo FOL se presenta a los 28 días después del trasplante. En comparación a los dos tratamientos la incidencia en el tratamiento T3 se ve reducido en un 27.5% con la aplicación de la solución bacteriana compuesta de *Azospirillum sp.*; corroborando de esta manera que al aplicar bacterias del género *Azospirillum sp.*, reduce la incidencia de la marchitez vascular causada por FOL.

4.6.2 Grado de infección de la marchitez vascular del tomate mediante la severidad en el tratamiento T2 (FOL) y T3 (Azospirillum +FOL)

Al igual que la incidencia, la severidad se calculó de la parte aérea de la planta a los 15 días con seis hojas muestreadas y a los 28 días con ocho hojas muestreadas en 20 plantas por tratamiento T2 –FOL- y T3 -Azospirillum +FOL-. El resultado de la severidad se puede apreciar en las tablas 22 y 23.

4.6.2.1 Severidad en el tratamiento T2 (FOL)

Tabla 22: Datos de la severidad en el tratamiento T2 (FOL)

Número de plantas (#)	Evaluación de Severidad (síntomas externos)	
	15 días	28 días
	(Nivel 0-5)	(Nivel 0-5)
1	2	3
2	2	3
3	0	3
4	2	4
5	2	3
6	2	4
7	2	3
8	2	3
9	2	4
10	0	3
11	2	3
12	2	3
13	2	3
14	2	3
15	2	4
16	2	3
17	0	3
18	2	3
19	2	4
20	0	3
PORCENTAJE (%)	32%	65%

Fuente: Autora

En la Tabla 22 se puede observar los datos recogidos de la severidad que causo el hongo FOL en el tratamiento T2 (FOL) a los 15 y 28 días, donde indica que el mayor porcentaje de severidad se produjo a los 28 días igual que la incidencia. Se aplicó el Test de Normalidad por Shapiro – Wilkes para constatar que exista una distribución normal en los datos.

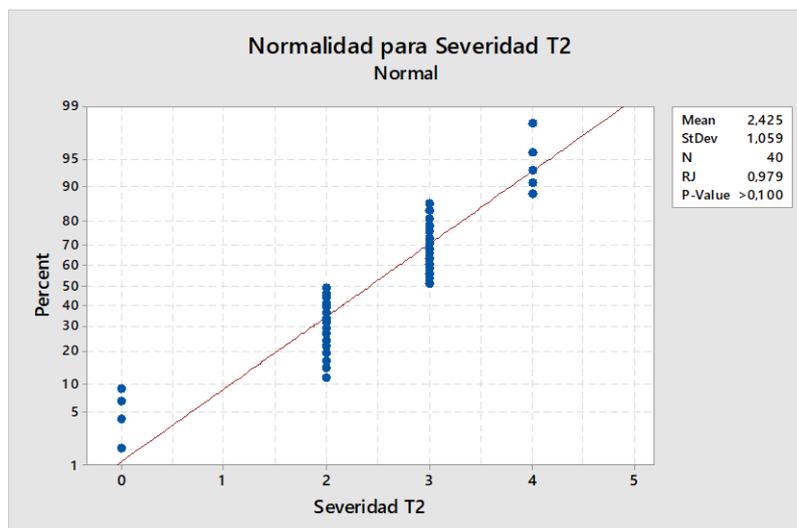


Ilustración 31: Prueba de normalidad de la severidad en el tratamiento T2

Fuente: Autora

Como puede apreciar en la Ilustración 31 la aplicación de Shapiro – Wilkes, el valor de $p = 0.100$ por lo tanto $p > 0,050$, es decir los datos siguen una distribución normal.

Se procede a aplicar un DCA -Diseño estadístico completo al Azar- con un arreglo factorial de 2×20 -dos tratamientos; el T2 aplicado a los 15 días y el T2 aplicado a los 28 días, y cada uno con 20 repeticiones-, se procede a la aplicación del Análisis de Varianza, ANOVA.

```

Factor  Levels  Values
Factor      2  15 días (Nivel 0 -5). 28 días (Nivel 0 -5)

Analysis of Variance

Source  DF  Adj SS  Adj MS  F-Value  P-Value
Factor   1  27,23  27,2250  62,51  0,000
Error   38  16,55  0,4355
Total   39  43,78

```

Ilustración 32: ANOVA de severidad en el tratamiento T2

Fuente: Autora

En base a los resultados del Análisis de Varianza, Ilustración 32, se puede apreciar que el valor de $p < 0,05$ ($p = 0,000$); por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula de que todos los tratamientos presentan medias estadísticas similares, al menos uno de los tratamientos es

diferente, se acepta H_1 alternativa. Se ejecuta una comprobación mediante el análisis de Tukey.

Tukey Pairwise Comparisons			
Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence			
Factor	N	Mean	Grouping
28 días (Nivel 0 -5)	20	3,2500	A
15 días (Nivel 0 -5)	20	1,600	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Ilustración 33: Prueba de Tukey para la severidad en el tratamiento T2

Fuente: Autora

La severidad de los síntomas en las partes aéreas del vegetal no es igual con la aplicación del T2 –FOL- a los 15 como a los 28 días, estas son diferentes, y con la prueba de Tukey queda demostrado claramente, Ilustración 33.

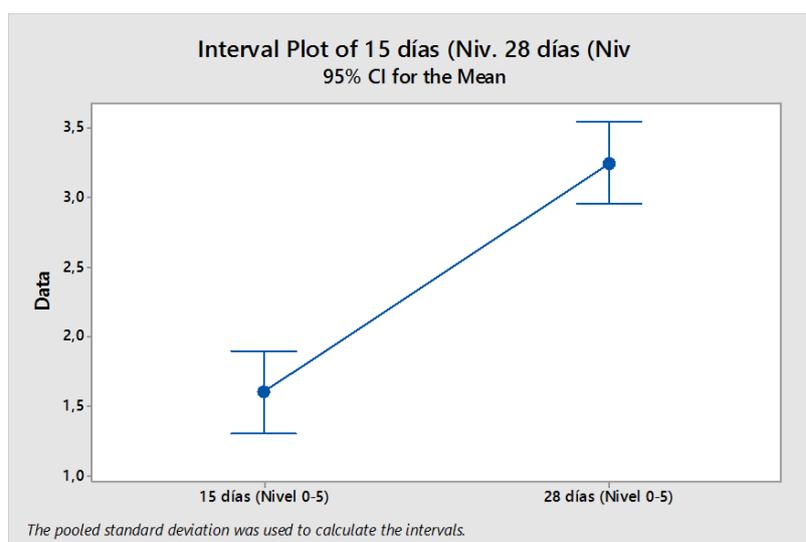


Ilustración 34: Gráfico de intervalos de la severidad en el tratamiento T2

Fuente: Autora

En la Ilustración 34 la gráfica de intervalos -*Interval Plot*- con una significancia de 95% para la media estadística -esta grafica tiene una interpretación muy similar a la gráfica de cajas- la media estadística del T2 aplicado a los 28 días es de 3.25 por sobre la media estadística de este tratamiento aplicado a los 15 días, cuya media no supera 1.6. Lo que indica que la severidad de los síntomas en las hojas del tomate es mayor en el

tratamiento T2 a los 28 días. En este número de días la severidad en las partes aéreas del vegetal alcanza valores comprendidos entre 3 y 4 de la escala de severidad que se interpreta de la siguiente forma:

3- Amarillamiento severo en las hojas. Un 50% de las hojas marchitas y crecimiento inhibido.

4- Síntomas generalizados, amarillamiento en toda la planta, raíz principal necrosada, necrosis vascular

4.6.2.2 Severidad en el tratamiento T3 (Azospirillum + FOL)

Tabla 23: Datos de la severidad en el tratamiento T3 (Azospirillum+FOL)

Número de plantas (#)	Evaluación de Severidad (síntomas externos)	
	15 días	28 días
	(Nivel 0-5)	(Nivel 0-5)
1	0	2
2	0	2
3	2	2
4	0	2
5	2	2
6	0	2
7	2	3
8	2	2
9	0	2
10	0	3
11	2	2
12	0	2
13	2	2
14	0	2
15	2	2
16	0	2
17	0	3
18	0	2
19	2	2
20	0	2
PORCENTAJE (%)	16%	46%

Fuente: Autora

En la Tabla 23 se puede observar los datos recogidos de la severidad que causo el hongo FOL en el tratamiento T3 –FOL- a los 15 y 28 días de la misma forma que el tratamiento T2, donde indica que el mayor porcentaje de severidad se produjo a los 28 días al igual que el tratamiento T2 solo que en este caso la severidad fue menor. Se aplicó

el Test de Normalidad por Shapiro – Wilkes para constatar que exista una distribución normal en los datos.

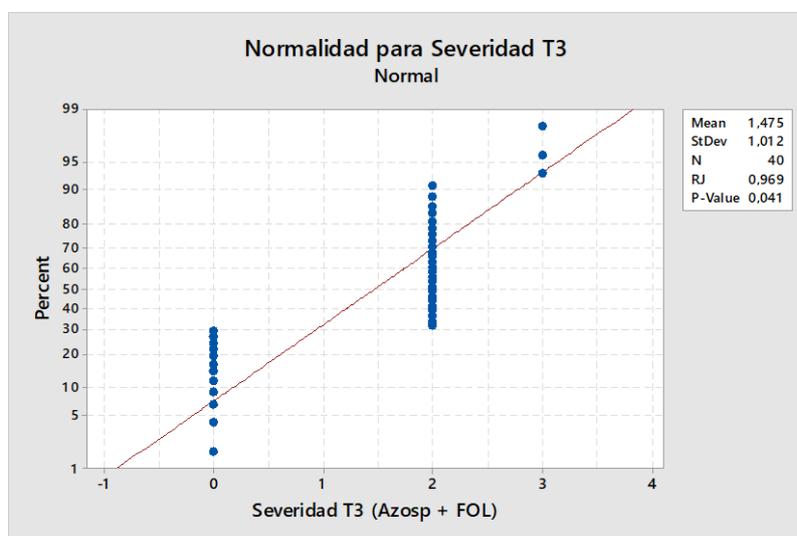


Ilustración 35: Prueba de normalidad en la severidad del tratamiento T3

Fuente: Autora

La Ilustración 35 indica que el valor de $p < 0,05$ ($p = 0,041$): por lo tanto, los datos no son normales tras la aplicación del Test de Normalidad por Shapiro Wilkes, provocando que se rechace la hipótesis nula H_0 de que los datos siguen una distribución normal y se acepta la hipótesis alternativa H_i de que estos datos no son normales.

Con la intención de normalizar los datos se aplicó una transformación de COX-BOX, en donde los datos no se normalizaron ya que dentro de los valores obtenidos había unos igual a cero y esta transformación exige siempre datos mayores a cero. Es así que se aplicó la Transformación de Johnson donde tampoco fue posible normalizar los datos ya que esta distribución posee valores menores a 4 que son incompatibles con esta transformación estadística. Es por ello que se aplicó una prueba no paramétrica de signos Wilcoxon.

Wilcoxon Signed Rank Test: Signos de Wilcoxon T3					
Test of median = 0,000000 versus median ≠ 0,000000					
	N	N for Test	Wilcoxon Statistic	P	Estimated Median
Signos de Wilcoxon T3	20	13	0,0	0,002	-1,000

Ilustración 36: Prueba de Wilcoxon para la severidad en tratamiento T3

Fuente: Autora

En la Ilustración 36 se observa el valor de p es 0,002 por lo tanto $p < 0,05$, se rechaza la Ho Hipótesis Nula de que ambos tratamientos de T3 aplicados en 15 y 28 días son significativamente iguales, y aceptamos la Hi de que estos tratamientos presentan diferencias significativas.

Con el cálculo de promedios se puede afirmar que existe una mayor severidad de síntomas en las partes aéreas del vegetal, 46%, a los 28 días de aplicado el tratamiento que frente a los 15 días con un porcentaje de severidad promedio de solo el 16 %.

A los 28 días de aplicado el tratamiento T3 se arrojan valores de severidad comprendidos entre 2 y 3 en la escala de severidad, con lo que se tiene los siguientes síntomas:

- 2. Amarillamiento de las hojas basales y tercio medio y marchitez en una o dos hojas.
- 3. Amarillamiento severo en las hojas. Un 50% de las hojas marchitas y crecimiento inhibido.

4.6.2.3 Comparación de la severidad de FOL en los tratamientos T2 (FOL) y T3 (Azospirillum+FOL).

Tabla 24: Comparación de la severidad en T2 y T3

Tratamiento	Días	
	15 días	28 días
T ₂ -FOL-	32%	65%
T ₃ -Azospirillum+FOL-	16%	46%

Fuente: Autora

La tabla 24 indica que la severidad de síntomas externos en las partes aéreas del vegetal es mayor a los 28 días para los dos tratamientos, T2 y T3, datos que han sido comprobados por métodos estadísticos, solo que la severidad se ve reducida en un 19% en el T3 - Azospirillum+FOL- ya que en este tratamiento se aplicó bacterias del género *Azospirillum sp.*, lo que comprueba que la aplicación de estas bacterias son beneficiarias. Estos promedios han sido extraídos a partir de la fórmula del porcentaje de severidad.

4.6.2.4 Reducción de la marchitez vascular con la aplicación de *Azospirillum sp.*

Tabla 25: Porcentajes de reducción de marchitez vascular del tomate con la aplicación de *Azospirillum sp.*

Tratamiento	Incidencia	Severidad
T ₃ -Azospirillum+FOL-	27.5%	19%

Fuente: Autora

En esta investigación con el objetivo de determinar el grado de reducción de la marchitez vascular provocada por el hongo *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* con la aplicación de *Azospirillum sp.*, se pudo encontrar que existen diferencias significativas en cuanto a la incidencia y severidad provocadas entre los 15 y 28 días después del trasplante, encontrando que la mayor incidencia y severidad se produjo a los 28 días obteniendo 65% de severidad en el tratamiento T2 y 46% en el T3, así mismo con 56.25%

de incidencia en el tratamiento T2 y 28.75% en el T3. Con estos datos se aprecia que existe una reducción de la severidad e incidencia del marchitamiento en un 19% y 27.5% respectivamente como se observa en la Tabla 25, en el tratamiento T3 en donde tanto el antagonista como el patógeno estuvieron presentes, en comparación con el tratamiento T2 el cual solo fue infectado con el patógeno FOL y los testigos tanto el absoluto y el relativo no sufrieron ningún daño en la investigación como se observa en el ANEXO 14. Estos resultados indican que hubo reducción de la marchitez vascular en las plantas inoculadas con *Azospirillum* y contaminadas con FOL, si bien no hubo resultados tan altos como los obtenidos *in vitro*, estos resultan significantes puesto que los bajos resultados en pruebas *in vivo* pueden estar reflejadas a interacción de muchos factores, entre los más destacables, la adaptación de la cepa al medio, para su investigación por las condiciones ambientales a las cuales las cepas están acostumbradas. Según Baro y colaboradores (2011) indican que los resultados presentados en condiciones *in vitro* no siempre son similares a los resultados observados en condiciones *in vivo* ya que dentro de este interfieren muchos más factores como es el suelo, supervivencia, competencia, capacidad de colonización, acción de otros microorganismos, etc. Es decir que en condiciones *in vivo* muchas de las veces no es posible controlar todos los factores en su totalidad, al contrario de las pruebas en condiciones *in vitro* que se puede realizar con total control del medio, temperatura, tiempo, etc. Así mismo hay que destacar el hecho de que la investigación se llevó en completa esterilidad por lo cual la única fuente de nutriente y control biológico para el correcto desarrollo de la planta fue la cepa de las bacterias *Azospirillum* sp cumpliendo un doble rol dentro de la investigación. Con estos resultados podemos asimilar que la bacteria del género *Azospirillum* sp., es eficiente para el control de fitopatógenos en este caso FOL, así como asegura Russo y colaboradores (2008) en su trabajo titulado “Respuesta de micropropagación mejorada y efecto de

biocontrol de *Azospirillum brasilense* Sp245 en plantas de *Prunus cerasifera* L. clon Mr.S 2/5, donde indica que aparte de promover el crecimiento y aumento de raíces, la inoculación ayudó al control biológico de patógenos en este caso *Rhizoctonia spp.*, que obtuvo una inhibición de casi el 100% frente al control negativo -0%-. En la investigación “Biocontrol del tizón de *Ascochyta* por *Azospirillum sp.* dependiendo del grado de resistencia de los genotipos de garbanzo” Parmasi y colaboradores (2019) indica que la inoculación *Azospirillum sp.*, disminuyó los síntomas provocados por *A. rabiei* -Bivanij e ICC 12004-. Tortora y colaboradores (2011) en su investigación “Protección de plantas de fresa (*Fragaria ananassa* Duch.) Frente a la *anthracnose disease* inducida por *Azospirillum brasilense*” también concluye en que las cepas de *A. brasilense* además de aumentar sustancialmente el crecimiento vegetal también interviene en la protección contra antracnosis causada por *C. acutatum* M11 en plantas de fresa, según los autores esto se debe a la producción de sideróforos por parte de *A. brasilense* que fueron detectados por cromatografía y espectrometría, en donde dichos sideróforos actúan en contra del patógeno. Actualmente no está claro cómo actúa específicamente *Azospirillum* para controlar e inhibir patógenos, pero Domingues y colaboradores (2020), indican que puede deberse a los mecanismos de acción de estas bacterias, como son la producción de quitinasas, sideróforos, glucanasas, antibióticos, enzimas, toxinas, mediante antibiosis y parasitismo. Así también es posible que se deba al reconocimiento planta-huésped o a la reducción de resistencia, coincidiendo con Di Barbaro y colaboradores (2014) donde propone que la tolerancia a los patógenos puede darse por el aumento de las raíces debido a las fitohormonas, dándose una mayor nutrición y resistencia. De-Bashan y colaboradores (2007) también concluyen que el control biológico por parte de las bacterias *Azospirillum* se debe a mecanismos como competencia con el patógeno en

cuestión, secreción o producción de sideróforos, antibióticos, enzimas que inhiben a los fitopatógenos y sustitución del patógeno.

4.7 Reislamiento de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* (FOL) y *Azospirillum sp.*

4.7.1 Prueba de Patogenicidad de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* mediante los postulados de Koch

- **Postulado 1**

Las muestras para el aislamiento del hongo FOL se tomaron de plantas de tomate de la variedad Fortaleza de 7 meses de edad aproximadamente con evidentes síntomas de la enfermedad, marchitez vascular, como se muestra en el ANEXO 3

- **Postulado 2**

El patógeno se aisló desde fragmentos de tallos recolectados que presentaban necrosis avanzado en el xilema y sembrados en medio de cultivo PDA, Papa Dextrosa Agar.

- **Postulado 3**

El patógeno aislado fue identificado microscópica y macroscópicamente, donde se evidencio las características propias de *Fusarium Oxysporum f. sp. lycopersici*, una vez identificado se procedió a inocular el patógeno en plantas sanas de variedad Sheila Victory con una solución de 1×10^6 esporas/mL.

- **Postulado 4**

Las plantas inoculadas presentaron los mismos síntomas que las plantas del postulado 1 es por ello que para comprobar que el hongo inoculado era el mismo que fue aislado se sembró fragmentos de tallos de plantas inoculadas en medio PDA de los 4 tratamientos. Se observó crecimiento característico de hongos *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*

en cajas Petri de los tratamientos T2 y T3, pero no en el T0 y T1, Imagen 27, es así que se identificó microscópicamente y macroscópicamente de la misma forma que el postulado 1 encontrando los mismos resultados.

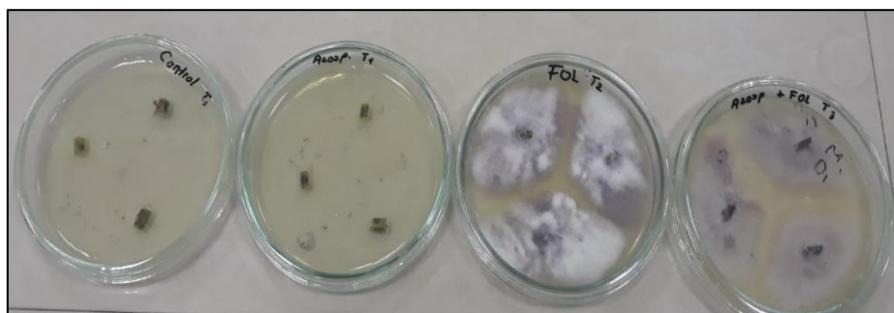


Imagen 24: Prueba de patogenicidad

Fuente: Autora

4.7.2 Prueba de presencia de *Azospirillum sp.*

Al término de la investigación se tomaron raíces de tomate de los cuatro tratamientos para comprobar que la bacteria *Azospirillum sp* interfirió en el control contra la enfermedad de marchitez vascular en donde de todas las muestras tomadas del tratamiento T1 y T3 y sembradas en medio NFB semisólido resultaron positivos ya que hubo presencia de la película blanca en forma de sombrilla por debajo de la superficie y hubo cambio de color del medio de verde a azul indicativo de la presencia de la *Azospirillum*. En cambio, las muestras tomadas del T0 y T2 no presentaron cambio alguno en el medio como se observa en la imagen 28, por lo que indicaba negativo para la presencia de *Azospirillum sp*. Se realizó continuamente las pruebas macroscópicas, microscópicas y bioquímicas de los matraces y tubos positivos para comprobar que tiene las mismas características de la cepa aislada denominada C7Az, donde se pudo apreciar que efectivamente tenía las mismas características de la cepa ya mencionada.

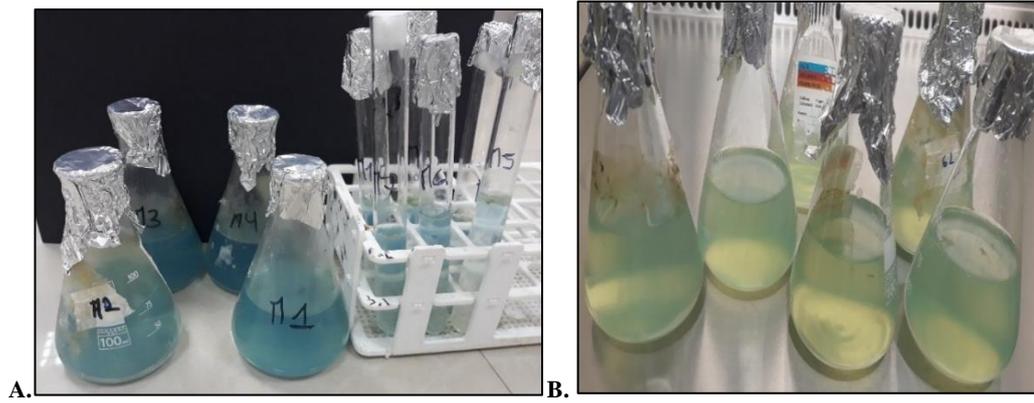


Imagen 25: A. Positivos para Azospirillum sp. B. Negativos para Azospirillum sp

Fuente: Autora

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

Con los datos obtenidos en la presente investigación se puede concluir:

- Es posible la caracterización de *Azospirillum sp* de las raíces de *L. perenne* con efectos biocontroladores contra FOL.
- Conforme a la bibliografía disponible, la cepa Fol1e pertenece a los hogos de FOL y la cepa C7Az a las bacterias del género *Azospirillum sp*, siendo comprobado en esta investigación mediante pruebas de laboratorio tanto morfológicas como bioquímicas.
- De los 10 ensayos *in vitro*, todos mostraron antagonismo con la cepa de *Azospirillum* contra FOL, destacando porcentajes mayores a 80% a los 8 días de incubación.
- Se obtuvo porcentajes de efectividad mayores a 27% por la inoculación de *Azospirillum* con respecto a la longitud radical, peso radical y altura de la planta.
- Se concluye que existe diferencias significativas en la incidencia y severidad a los 15 y 28 días de la inoculación del patógeno ya que la mayor incidencia y severidad se produce a los 28 días después del trasplante e inoculación con el patógeno, obteniendo un 56.25% de incidencia en T2 donde solo fue infectado con el patógeno y un 28.75% de incidencia en T3 donde fueron inoculados los dos microorganismos (*Azospirillum* como antagonista). En la severidad se obtuvo un 65% en el tratamiento T2 y un 46% en el tratamiento T3 a los 28 días.
- Se obtuvo una reducción en la incidencia de la enfermedad de 27.5% y reducción en la severidad de un 19%.

- Se obtuvo antagonismo tanto *in vitro* como *in vivo*, sin embargo, la mejor inhibición del patógeno se presentó en pruebas *in vitro* realizadas a los 8 días de incubación.
- La hipótesis se cumple ya que la bacteria *Azospirillum sp* si reduce el grado de marchitez provocado por el hongo *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*, por lo tanto, se puede utilizar para el control biológico en tomate.

5.2 RECOMENDACIONES

- Es recomendable al momento del muestreo para el aislamiento del patógeno, tomar muestras no solo del tallo si no de las raíces y del suelo ya que es muy probable que sea más fácil aislar de estos lugares el patógeno.
- Caracterizar las bacterias de diferentes huéspedes a parte del *L. perenne*, para determinar si las bacterias son más efectivas con respecto al huésped del que es aislado.
- Obtener más de una cepa para el estudio tanto del patógeno (*Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*) como del antagonista (*Azospirillum sp.*).
- Determinar las variedades de la bacteria y evidenciar cuál de ellas es la mejor en cuanto a la reducción del marchitamiento vascular.
- Profundizar el estudio de la respuesta de las plantas en etapas ya más avanzadas como en la producción y evidenciar los cambios que podrían darse en los frutos en cuanto a su peso, superficie, color, sabor y calidad en comparación de aquellos que no han sido inoculados con la bacteria.
- Realizar el estudio con la comparación de diferentes métodos y concentraciones de inoculación del antagonista y del patógeno.

- Profundizar el estudio con diferentes variedades de plantas de tomate, para saber si la variedad tiene algo que ver con la inoculación de las bacterias.
- Determinar el efecto de inoculación *Azospirillum* combinado con bacterias de otro género.

REFERENCIAS

- Aguilar, L. (2020). *Producción masiva de Azospirillum spp., formulación, control de calidad y su uso en la agricultura: Revisión de Literatura*. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano Honduras.
<https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/6789/1/CPA-2020-T003.pdf>
- Aguilar, M., Mendoza, R., Cabrera De La Fuente, M., & Robledo, V. (2016). REPRODUCCIÓN DE Azospirillum y Azotobacter sp EN DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EXTRACTO ACUOSO DE NOPAL. *Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro*.
<http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/handle/123456789/7998>
- Aguilar-Rodríguez, C., Flores-Velázquez, J., Rojano-Aguilar, F., Ojeda-Bustamante, W., & Iñiguez-Covarrubias, M. (2020). Estimación del ciclo de cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en invernadero, con base en grados días calor (GDC) simulados con CFD. *TECNOLOGIA Y CIENCIAS DEL AGUA* , 38-68.
<https://doi.org/10.24850/j-tyca-2020-04-02>
- Alfonso, E. T., Leyva, A., & Hernández, A. (2005). Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 7(2), 47-54.
- ÁLVAREZ, E. (2018). *CULTIVO DE TOMATE (Lycopersicon esculentum)*. CENTRO NACIONAL DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA Y FORESTAL.
http://centa.gob.sv/docs/guias/hortalizas/Guia%20Centa_Tomate%202019.pdf
- Ascencio-Álvarez, A., López-Benítez, A., Borrego-Escalante, F., Rodríguez-Herrera, S. A., Flores-Olivas, A., Jiménez-Díaz, F., & Gámez-Vázquez, A. J. (2008). Marchitez Vascular del Tomate: I. Presencia de Razas de *Fusarium oxysporum* f.

- sp. lycopersici (Sacc.) Snyder y Hansen en Culiacán, Sinaloa, México. *Revista mexicana de fitopatología*, 26(2), 114-120.
- Baro, Á., Lara, J., & Castillo, C. (2011). Evaluación in vitro de la capacidad antagonista de trichoderma lignorum FEEP TL0601 frente a fusarium oxysporum f.sp. Lycopersici. *Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal*, 225, 47-50.
- Bashan, Y., De-Bashan, L. E., & Hillel, D. (2005). Bacteria/plant growth-promotion. *Encyclopedia of Soils in the Environment*, 1, 103-115. <https://doi.org/10.1016/B0-12-348530-4/00513-0>
- Bello, O., García, J., & Cuervo, W. (2015). Cuantificación de diazótrofos en la rizósfera del olivo (*Olea europaea* L.) cultivado en Boyacá, Colombia. *Acta Agronómica*, 65(2), 109-115. <https://doi.org/10.15446/acag.v65n2.44270>
- Boldini, J., Millán, Y., Osorio, J., Montenegro, S., Fonseca, M., Mosquera, R., & Pulido, S. (2019). *Control Biológico* (pp. 201-211). <https://doi.org/10.22490/9789586516358.11>
- Caballero-Mellado, J. (1998). *El género Azospirillum*. Programa de Ecología Molecular y Microbiana, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, UNAM. <http://biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap10/>
- Canto, J., Medina, S., & Morales, D. (2004). Efecto de la inoculación con azospirillum sp. En plantas de Chile habanero (*capsicum chinense jacquin*). *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 4(1), 21-27.
- Cardona-Piedrahita, L. F., & Castaño-Zapata, J. (2019). Comparación de métodos de inoculación de Fusarium oxysporum f. Sp. Lycopersici (Sacc.) Snyder & Hansen, causante del marchitamiento vascular del tomate. *Revista de la Academia*

- Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 43(167), 227-233.
<https://doi.org/10.18257/raccefyn.854>
- Carmona, S. (2019). Identificación de un aislamiento de *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Lycopersici* y respuesta fisiológica en tomate durante la infección frente a dos elicitores fúngicos. *Universidad Nacional de Colombia*.
<https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/69660>
- Carrera, A., Yáñez, C., Morillo, E., & Miño, G. (2010). *Uso y conservación de la biodiversidad de cepas de Azospirillum spp. Para la producción y validación de un biofertilizante para el cultivo de maíz en la Sierra del Ecuador*. INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS (INIAP) Estación Experimental Santa Catalina.
<https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/874/1/iniapscP.C314i2010.pdf>
- Carrillo-Fasio, J. A., Montoya-Rodríguez, T. de J., Saúl, R., Cruz-Ortega, J. E., Márquez-Zequera, I., & Sañudo-Barajas, J. (2003). Razas de *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Lycopersici* Snyder y Hansen, en Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en el Valle de Culiacán, Sinaloa, México. *Revista Mexicana de FITOPATOLOGIA*, 21(2), 123-127.
- Castillo-Arévalo, T., & Jiménez-Martínez, E. (2020). Incidencia y severidad de enfermedades asociadas al cultivo de plátano (*Musa paradisiaca* L.) en Rivas, Nicaragua. *La Calera*, 20(35), 132-139.
<https://doi.org/10.5377/calera.v20i35.10319>
- Chaiharn, M., Chunnaleuchanon, S., & Lumyong, S. (2009). Screening siderophore producing bacteria as potential biological control agent for fungal rice pathogens in Thailand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(11), 1919-1928. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0090-7>

- Cordero, A., Sierra, J., & Vale, H. (2009). Biología y perspectiva de microorganismos endófitos asociados a plantas. *Revista Colombiana de Ciencia Animal, ISSN 2027-4297, Vol. 1, N.º. 2, 2009, pags. 286-301, 2(1), 286-301.*
- Cortez, M. (2012). Evaluación de la capacidad de promoción de crecimiento vegetal de Azospirillum SP. En plantas de maíz (*Zea Mays L.*). *PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR ESCUELA DE BIOANÁLISIS*, 104.
- Cubilla-Ríos, A. A., Ruíz-Díaz-Mendoza, D. D., & Romero-Rodríguez, M. C. (2019). Antibiosis de proteínas y metabolitos en especies de *Trichoderma* contra aislamientos paraguayos de *Macrophomina phaseolina* 1. *Agronomía Mesoamericana*, 30(1), 18. <https://doi.org/DOI:https://doi.org/10.15517/am.v30i1.34423> Redalyc: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43757673005>
- Cuevas, F. (2000). Efecto de la biofertilización con bacterias rizosféricas en el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum*). *Avances*, 2(2), 9-12.
- De-Bashan, L., Holguin, G., Glick, B., & Bashan, Y. (2007). Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. En *Microbiología Agrícola* (p. 568). Editorial Trillas Sa De Cv.
- Di Barbaro, G., González, V., & Batallán, S. (2014). *Trichoderma* sp. Y *Azospirillum* sp., POTENCIALES AGENTES DE BIOCONTROL DE FITOPATÓGENOS. ARTÍCULO DE REVISIÓN. *BIOLOGÍA EN AGRONOMÍA*, 4(1), 177-189.
- Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF). (2019). *Fusarium oxysporum f. Sp. Lycopersici razas 1, 2 y 3 y f. Sp. Radicis—Lycopersici (Marchitez del tomate y pudrición de la corona y raíz)*. <http://sinavef.senasica.gob.mx/CNRF/AreaDiagnostico/DocumentosReferencia/>

Documentos/ProtocolosFichas/Protocolos/HongosFitopatogenos/PD%20F.%20oxysporum%20Pub%20V1.pdf

- Domingues, C., Cecato, U., Trento Biserra, T., Mamédio, D., Galbeiro, S., Domingues Duarte, C. F., Cecato, U., Trento Biserra, T., Mamédio, D., & Galbeiro, S. (2020). *Azospirillum* spp. En gramíneas y forrajeras. Revisión. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, *11*(1), 223-240. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i1.4951>
- Duarte, Y., Echevarría, A., & Martínez, B. (2016). Identificación y caracterización de aislamientos de *Fusarium* spp. Presentes en garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en Cuba. *Revista de Protección Vegetal*, *31*(3), 173-183.
- Esquivel-Cote, R. (2017). EFECTO DE LA INOCULACIÓN CON *Azospirillum* sp., Y FERTILIZACIÓN NITROGENADA EN EL CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE JITOMATE (*Solanum lycopersicum* Mill.). *Agro Productividad*, *10*(7), Article 7. <https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/1064>
- Ezziyyani, M., Ahmed, A. S., Perez, C., Requena, M., & Candela, M. (2006). Control biológico por microorganismos antagonistas. *Horticultura*, 8-15.
- Fendrihan, S., Constantinescu, F., Siciua, O., & Dinu, S. (2017). AZOSPIRILLUM STRAINS AS BIOFERTILIZERS AND BIOCONTROL AGENTS -A PRACTICAL REVIEW. *JOURNAL OF ADVANCES IN AGRICULTURE*, *7*(3), 1096-1108. <https://doi.org/10.24297/jaa.v7i3.6324>
- Fernández, E. (1997). *INTERACCIONES DE CINCO ANTIFÚNGICOS CON LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES NEUTRÓFILOS Y SUERO HUMANO*. UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA III. <http://webs.ucm.es/BUCM/tesis/19972000/X/3/X3052201.pdf>

- Fernández-Larrea, O. (2001). Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*, 62, 96-100.
- Fischer, S. E., Fischer, S. I., Magris, S., & Mori, G. B. (2007). Isolation and characterization of bacteria from the rhizosphere of wheat. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(7), 895-903. <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9312-4>
- García, A. (2014). MECANISMOS DE DEFENSA INDUCIDOS POR LA COMBINACIÓN DE *Trichoderma harzianum* Y QUITOSANO EN NOCHEBUENA (*Euphorbia pulcherrima*) CONTRA *Phytophthora drechsleri*. *CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.* <https://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1023/433/1/ALMA%20GUADALUPE%20GARCIA%20VERA.pdf>
- García, F., Muñoz, H., Carreño, C., & Mendoza, G. (2010). Caracterización de cepas nativas de *Azospirillum* spp. Y su efecto en el desarrollo de *Oryza sativa* L. “arroz” en Lambayeque. *Scientia Agropecuaria*, 1(2), 107-116. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2010.02.01>
- Gonzalez, C., Cruz, M., & Choque, R. (2019). AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS ENDÓFITOS DE HOJAS DE *Physalis peruviana* L. AGUAYMANTO. Universidad Maria Auxiliadora. <http://repositorio.uma.edu.pe/bitstream/handle/UMA/338/AISLAMIENTO%20DE%20MICROORGANISMOS%20END%20FITOS%20DE%20HOJAS%20DE%20Physalis%20peruviana%20AGUAYMANTO%20123%20%281%29.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Hernández, C., & Carpio, N. (2019). Introducción a los tipos de muestreo. *ALERTA*, 2(1), 76-79. <https://doi.org/10.5377/alerta.v2i1.7535>
- Hernández, M. H., Espinosa, C. T., & Fernández, M. A. (2015). Uso de Azospirillum en la agricultura. *Revista Científica Agroecosistemas*, 3(1), Article 1. <https://aes.ucf.edu.cu/index.php/aes/article/view/26>
- Hernández, M., Terry, C., & Almogoea, M. (2015). *Revista Agroecosistemas*, Vol.3(1), 401-413.
- Hernández, R., López, A., Borrego, F., Espinoza, J., Sánchez, D., Maldonado, I. E., & López, L. A. (2014). Razas de Fusarium oxysporum f. Sp. Lycopersici en predios tomateros en San Luis Potosí. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 5(7), 1169-1178.
- Hernández, W. I. (2003). *Aislamiento e identificación de cepas de azospirillum, y evaluación de su capacidad para suplir las necesidades de nitrógeno en plantas de oryza sativa (arroz)*. <https://repositoriotec.tec.ac.cr/handle/2238/217>
- Hernández-Leal, E., Lobato-Ortiz, R., García-Zavala¹, J., Reyes-López, D., Méndez-López, A., Bonilla-Barrientos, O., & Hernández-Bautista, A. (2013). COMPORTAMIENTO AGRONÓMICO DE POBLACIONES F2 DE HÍBRIDOS DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 36(3), 209-215.
- Ibarra, J. E., Del Rincón, C., Galindo, E., Patiño, M., Serrano, L., García, R., Alcázar, A., Carrillo, J. A., Pereyra-Alfárez, B., Luna-Olvera, H., Galán-Wong, L., & Pardo, L. (2006). Los microorganismos en el control biológico de insectos y fitopatógenos. *Rev Latinoam Microbiol*, 48(2), 113-120.

- Infante, D., Martínez, B., González, N., & Reyes, Y. (2009). MECANISMOS DE ACCIÓN DE *Trichoderma* FRENTE A HONGOS FITOPATÓGENOS. *Revista de Protección Vegetal*, 24(1), 14-21.
- Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en & Tecnología Agropecuaria. (2017). *Manual técnico del cultivo de tomate (Solanum Lycopersicum)*. <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F01-10921.pdf>
- Jaramillo, J. (2015). *Evaluación agronómica del cultivo de tomate (Solanum lycopersicum) bajo tres diferentes coberturas plásticas*. UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ. <https://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/5339/1/122917.pdf>
- Jiménez, E. (2009). *Métodos de Control de Plagas*. UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA FACULTAD DE AGRONOMÍA. <https://cenida.una.edu.ni/relectronicos/RENH10J61me.pdf>
- Leyva, L., Bashan, Y., Garcia, F., & Suzan, H. (2006). Efecto del ácido glucónico sobre la actividad de las enzimas encargadas de su metabolismo, en la bacteria promotora de crecimiento en plantas *Azospirillum brasilense* Cd asociada a plantas de mezquite (*Prosopis articulata* S. Watson). *CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL NOROESTE, S. C.*, 79.
- Llivicura, M. (2018). Comparación in vitro de la actividad antifúngica de extractos etanólicos de romero (*Rosmarinus officinalis*) y cola de caballo (*Equisetum arvense*); frente al hongo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. *Universidad Politécnica Salesiana*, 127.
- Lockwood, J. (1986). Soilborne plant pathogens: Concepts and connections. *Phytopathology*, 76(1), 20-27.

- Macías, A., Mera, L., Espinoza, M., Vite, F., Vallejo, P., Mendoza, L., Cedeño, D., Casanova, M., Medina, F., Pigüave, J., Vélez, M., Cevallos, B., Ubillús, S., Ipiates, J., Arteaga, S., Vivas, C., Escobar, C., Vera, M., & Terán, M. J. (2019). *Microbiología y salud* (1.^a ed.). Editorial Científica 3Ciencias. <https://doi.org/10.17993/Med.2019.62>
- Martínez-Ruiz, F. E., Cervantes-Díaz, L., Aíl-Catzím, C. E., Hernández-Montiel, L. G., Sánchez, C. L. D. T., & Rueda-Puente, E. O. (2016). Hongos Fitopatógenos Asociados Al Tomate (*Solanum Lycopersicum L.*) En La Zona Árida Del Noroeste De México: La Importancia De Su Diagnóstico. *European Scientific Journal, ESJ*, 12(18), 232-232. <https://doi.org/10.19044/esj.2016.v12n18p232>
- McFARLAND, J. (1907). THE NEPHELOMETER:AN INSTRUMENT FOR ESTIMATING THE NUMBER OF BACTERIA IN SUSPENSIONS USED FOR CALCULATING THE OPSONIC INDEX AND FOR VACCINES. *Journal of the American Medical Association*, XLIX(14), 1176-1178. <https://doi.org/10.1001/jama.1907.25320140022001f>
- Mendoza, A., Cruz, M., & Jacques-Hernandez, C. (2004, noviembre 25). *Aislamiento, selección, producción y evaluación de un inoculante basado en cepas nativas de Azospirillum en el Norte de Tamaulipas*. <https://doi.org/10.13140/2.1.5090.4324>
- MERINO, G. (2017). *Producción de Semillas Híbridas de Tomates (Solanum lycopersicum L.) Determinados e Indeterminados en el valle de Cañete*. UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA FACULTAD DE AGRONOMÍA EXAMEN PROFESIONAL. <https://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/2957/F03-M47-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Meza, B. (2013). *EFFECTO DEL ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO PRODUCIDO POR Azospirillum brasilense EN LAS ENZIMAS DE ASIMILACIÓN DE AMONIO EN Chlorella vulgaris, BAJO CONDICIONES DE COINMOVILIZACIÓN*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/140/1/meza_b.pdf
- Molina, M., Pardo de Santayana, M., Tardío, J., Aceituno-Mata, L., & Morales, R. (2018). *Tomate (Solanum lycopersicum L.)* (pp. 264-280).
- Muñoz, C., María, A., & Maite, O. (2014). *Efecto de la temperatura en el subproteoma de membrana externa de Escherichia coli*. Universidad del País Vasco. <https://addi.ehu.es/bitstream/handle/10810/14880/TFG%20Christian%20MM.pdf?sequence=2&isAllowed=y>
- Musto, A., Bosisio, N., Iserte, J., Nascimento, M., Orellana, M., Rota, R., Ramirez, E., & Stephan, B. (2013). *Manual de microbiología y parasitología*. Univ. Nacional Arturo Jauretche. <https://www.unaj.edu.ar/wp-content/uploads/2018/06/Manual-de-Microbiologia-y-Parasitologia-2013.pdf>
- Nápoles, M., Martínez, J., Costales, D., Gómez, G., & Somers, E. (2006). EFECTO DE DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO EN LA MULTIPLICACIÓN CELULAR DE Bradyrhizobium elkanii. *Cultivos Tropicales*, 27(1), 35-38.
- Okon, Y., Albrecht, S., & Burris, R. (1976). Factors affecting growth and nitrogen fixation of Spirillum lipoferum. *Journal of Bacteriology*, 127(3), 1248-1254. <https://doi.org/10.1128/jb.127.3.1248-1254.1976>
- Páez, M. E., & Albarracín, N. S. de. (2007). Identificación de Fusarium oxysporum f. Sp. Lycopersici y Trichoderma koningii colectados en el estado Aragua, Venezuela. *Revista de la Facultad de Agronomía de La Universidad del Zulia*, 24(Extra 1), 51-56.

- Parmasi, Z., Tahmasebi, Z., Zare, M. J., Nourollahi, K., & Kanouni, H. (2019). Biocontrol of Ascochyta blight by Azospirillum sp. Depending on the degree of resistance of chickpea genotypes. *Journal of Phytopathology*, 167(10), 601-607. <https://doi.org/10.1111/jph.12850>
- Pedraza, R., Teixeira, K.-R., Scavino, A., García, I., Baca, B., Azcón, R., Baldani, V., & Bonilla, R. (2010). Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. Revisión. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria*, 11(2), 155-164. https://doi.org/10.21930/rcta.vol11_num2_art:206
- Pernasetti, S., & Di Barbaro, G. (2012). RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL COMO BIOFERTILIZANTES. *BIOLOGÍA EN AGRONOMÍA*, 2,(2,), 119-128.
- Pullupaxi, M. (2016). *Evaluación de trichoderma para el control de fusarium oxysporum en el cultivo de tomate riñón (Lycopersicum esculentum)*. <https://repositorio.uta.edu.ec:8443/jspui/handle/123456789/24361>
- Quiroqa-Rojas, L. F., Ruiz-Ouiñones', N., & Muñoz-Motta', G. (2012). Microorganismos rizosféricos, potenciales antagonistas de Fusarium sp. Causante de la pudrición radicular de maracuyá (Passiflora edulis Sims). *Acta agronomica*, 61(3), 265-272.
- Ramírez, C., Soto, Z., Castro, L., Arauz, L. F., Uribe-Lorío, L., Uribe, L., Ramírez, C., Soto, Z., Castro, L., Arauz, L. F., Uribe-Lorío, L., & Uribe, L. (2015). Efecto de cuatro rizobacterias promotoras de crecimiento sobre la pudrición basal causada por Phytophthora capsici en plantas de chiledulce (Capsicum annum). *Agronomía Costarricense*, 39, 87-100.
- Rangel-Lucio, J. A., Rodríguez-Mendoza, M. de las N., Ferrera-Cerrato, R., Castellanos-Ramos, J. Z., Ramírez-Gama, R. M., & Alvarado-Bárcenas, E. (2011). Afinidad

y efecto de Azospirillum sp. En maíz. *Agronomía Mesoamericana*, 22(2), 269-279.

RECHARTE, D. (2015). *EVALUACIÓN DE MICROORGANISMOS EFICIENTES AUTÓCTONOS EN EL RENDIMIENTO DEL CULTIVO DE TOMATE (Lycopersicum esculentum, Mill) EN SAN GABRIEL – ABANCAY. UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE LOS ANDES.*
<http://repositorio.utea.edu.pe/bitstream/handle/utea/30/Tesis%20-%20Evaluaci%C3%B3n%20de%20microorganismos%20en%20el%20cultivo%20de%20tomate.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Reyes, A. (2011). *Aislamiento e identificación de cepas de Azospirillum sp., y evaluación de su capacidad para suplir las necesidades de nitrógeno en el cultivo de Maíz (Zea mays) L. Semihidropónico con dos sustratos diferentes bajo invernadero. Quito-Cayambe-Ecuador-2011.* Universidad Plitécnica Salesiana Sede Quito. Carrera de Ingeniería agropecuaria.
<https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/1813/12/UPS-YT00073.pdf>

Reyes, M. (2016). *Producción, Evaluación y caracterización de un biofertilizante artesanal para la fijación de nitrógeno en especies vegetales forrajeras.* Universidad Plitécnica Salesiana Sede Quito.
<https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/12559/1/UPS-QT10043.pdf>

Rivera-Cruz, M., Trujillo-Narcía, A., & Alejo, D. (2010). Los biofertilizantes integrados con bacterias fijadoras de nitrógeno, solubilizadoras de P y sustratos orgánicos en el crecimiento del naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.). *Interciencia*, 35(2), 113-119.

Russo, A., Vettori, L., Felici, C., Fiaschi, G., Morini, S., & Toffanin, A. (2008). Enhanced micropropagation response and biocontrol effect of *Azospirillum brasilense*

- Sp245 on *Prunus cerasifera* L. clone Mr.S 2/5 plants. *Journal of Biotechnology*, 134(3), 312-319. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.01.020>
- Sánchez López, J. (2017). *Generación de líneas T-DNA de tomate (Solanum lycopersicum) para la identificación de mutantes de inserción alterados en la morfogénesis y el desarrollo vegetal* [Universitat Politècnica de València]. <https://doi.org/10.4995/Thesis/10251/78617>
- Sangoquiza, C. A., Viera, Y., & Yáñez, C. (2018). Respuesta biológica de aislados de *Azospirillum* spp. Frente a diferentes tipos de estrés. *Centro Agrícola*, 45(1), 40-46.
- Schoebitz, M. (2006). *Aislamiento y caracterización de bacterias promotoras de crecimiento vegetal de la rizósfera de Lolium perenne L. de suelo volcánico (modelo género Azospirillum spp.)*. UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS ESCUELA DE AGRONOMIA. <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2006/fas364a/doc/fas364a.pdf>
- SILVA, J. (2015). *EVALUACIÓN DE CUATRO PROGRAMAS DE FERTILIZACIÓN FOLIAR COMPLEMENTARIA EN LA PRODUCCIÓN DE TOMATE RIÑÓN (Solanum lycopersicum) L. var. Sheila BAJO INVERNADERO, 2015*. UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS ESCUELA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA. <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/7781/1/T-UCE-0004-57.pdf>
- Tarrand, J., Krieg, N., & Döbereiner, J. (1978). A taxonomic study of the *Spirillum* lipoferum group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. Nov. And two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. Nov. And *Azospirillum brasilense* sp. Nov. *Canadian journal of microbiology*, 24, 967-980. <https://doi.org/10.1139/m78-160>

- Tejera, B., Heydrich, M., & Rojas, M. M. (2012). Antagonismo de *Bacillus* spp. Frente a hongos fitopatógenos del cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Revista de Protección Vegetal*, 27(2), 117-122.
- Tortora, M., Díaz-Ricci, J., & Pedraza, R. (2011). Protection of strawberry plants (*Fragaria ananassa* Duch.) against anthracnose disease induced by *Azospirillum brasilense*. *Plant and Soil*. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-0916-6>
- Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. (1989). *Pruebas bioquímicas de identificación de bacterias*. UPLGC - Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.
https://www2.ulpgc.es/hege/almacen/download/35/35729/pruebas_bioquimicas_de_identificacion_de_bacterias.pdf
- Vásquez-Ramírez, L. M., & Castaño-Zapata, J. (2017). MANEJO INTEGRADO DE LA MARCHITEZ VASCULAR DEL TOMATE [*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (SACC.) W.C. SNYDER & H.N. HANSEN]: UNA REVISIÓN. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 20(2), 363-374.
- Velasteguí, J., & Pallo, Y. (2011). Evaluación de soportes sólidos y líquidos, para la producción de un biofertilizante a base de *Azospirillum* Spp. Aplicable al cultivo de maíz (*Zea mays* L.). *Universidad Técnica de Ambato*.
<https://repositorio.uta.edu.ec:8443/jspui/handle/123456789/1866>
- Vergani-Boza, I., & Zúñiga-Dávila, D. (2018). Efecto de la inoculación y peletización en la germinación y crecimiento de plantas de maca (*Lepidium meyenii* W.) a nivel in vitro e invernadero. *Revista Peruana de Biología*, 25(3), 329-334.
<https://doi.org/10.15381/rpb.v25i3.14035>
- Villegas-Espinoza, J., Rueda-Puente, E., Murillo-Amador, B., Puente, M., Grimaldo-Juárez, O., Avilés-Marín, S., & Ponce, J. (2010). EFECTO DE LA

INOCULACIÓN DE *Azospirillum halopraeferens* Y *Bacillus amyloliquefaciens*
EN LA GERMINACIÓN DE *Prosopis chilensis*. *Tropical and Subtropical
Agroecosystems*, 12, 19-32.

Vinchira-Villarraga, D. M., & Moreno-Sarmiento, N. (2019). Control biológico: Camino
a la agricultura moderna. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 21(1), 2-5.
<https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v21n1.80860>

ANEXOS

ANEXO 1: MEDIOS DE CULTIVO

Anexo 1-A: Medio semisólido de aislamiento NFB (Nitrogen Free Biological) para *Azospirillum sp.*

Fuente: (Schoebitz, 2006), (Velasteguí & Pallo, 2011) y (W. I. Hernández, 2003)

Reactivo	Cantidad
Ácido málico	5g
KOH	4g
KH ₂ PO ₄	0,5g
FeSO ₄	0,01g
MnSO ₄ .H ₂ O	0,01g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,01g
NaCl	0,02g
CaCl ₂	0,01g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,002g
Azul de bromotimol (5%)	2ml
Biotina	0,001g
Agar Agar	3g
Agua destilada	1000mL

Ajustar el pH de 6.8-7 (medio color verde) con el reactivo NaOH

Anexo 1-B: Medio sólido de aislamiento NFB para *Azospirillum sp.*

Fuente: (Schoebitz, 2006), (Velasteguí & Pallo, 2011) y (W. I. Hernández, 2003)

Reactivo	Cantidad
Ácido málico	5g
KOH	4g
KH ₂ PO ₄	0,5g
FeSO ₄	0,01g
MnSO ₄ .H ₂ O	0,01g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,01g
NaCl	0,02g
CaCl ₂	0,01g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,002g
Azul de bromotimol (5%)	2ml
Biotina	0,001g
Agar Agar	15g
Extracto de levadura	0,5g
Agua destilada	1000mL

Ajustar el pH de 6.8-7 (medio color verde) con el reactivo NaOH

Anexo 1-C: Caldo nutritivo

Reactivo	Cantidad
Nutrient Broth	13g
Agua destilada	1000mL

Anexo 1-D: Medio de cultivo PDA (Agar Papa Dextrosa)

Fuente: (Schoebitz, 2006)

Reactivo	Cantidad
APD Merck	39g
Agua destilada	1000mL

Anexo 1-E: Medio agar urea Christensen.

Fuente: (Schoebitz, 2006)

Reactivo	Cantidad
Peptona	1g
Glucosa	1g
KH ₂ PO ₄	5g
NaCl	2g
Rojo Fenol	0,012g
Agar	20g
Extracto de levadura	0,1g
Urea	20g
Agua destilada	1000mL

ANEXO 2: Longitud de sistema radicular

Fuente: Autora

Longitud del sistema radicular (cm)		
Número de plantas	Inoculadas (<i>Azospirillum sp.</i>)	No inoculadas
1	1.3	1.9
2	1.3	0.9
3	1.5	1.7
4	1.6	2
5	1.5	1.5
6	1	1.7
7	2.1	1.9
8	2.2	1.7
9	2.1	2.2
10	2	0.7
11	2	1.9
12	1.9	1.7
13	1.7	1.2
14	2	1.8
15	1.6	1.5
16	1.5	1.7
17	1.5	0.7
18	3.3	2.3
19	2	1.8
20	2.5	2
21	2.1	1.7
22	3	1.9
23	2.1	1.5
24	3	0.9
25	2	1.7
26	2.1	1.5
27	2	0.5
28	2.3	1.7
29	3.2	1.5
30	2.5	1.7
31	2	0.9
32	2.3	1.4
33	2.2	1.5
34	2	0.5
35	2.3	1.4
36	1.7	1.4

37	1.3	1.7
38	2	1.5
39	2	1.1
40	1.5	0.9
41	3	1.7
42	2.9	1.5
43	1.5	1.3
44	3.1	1
45	2.5	1.8
46	2	2
47	2.4	1.9
48	2.5	2
49	2.5	1.5
50	3.3	1.3
51	2.5	1.9
52	2	1.1
53	2.5	1.6
54	2.6	1.5
55	2	1.6
56	2.2	1.8
57	2.1	0.8
58	1.5	1.8
59	2	1.5
60	2	1.7
61	1.8	1.7
62	2.3	0.6
63	2.5	1.2
64	2.5	1.5
65	2	1.1
66	2	1.9
67	1.5	1.4
68	2.3	1.7
69	2.5	1.9
70	2.5	1.4
71	2	0.8
72	2.4	1
73	2	1.5
74	1.5	1.7
75	1.6	1.5
76	1.6	1.7
77	1.5	1.5
78	2.5	2
79	2.3	2

80	2.7	1.6
81	3	0.8
82	2.3	1.7
83	2.4	1.9
84	2	1.5
85	2.5	2
86	2	1.2
87	2.2	2.5
88	3	0.8
89	2.5	1.8
90	2.3	1.9
91	2.5	0.9
92	2.1	1.3
93	2	1.5
94	2	1.9
95	2.3	2.3
96	2.5	1.7
97	1.5	2.3
98	2.2	2
99	3	1.7
100	3	1
TOTAL	214.1	153.2
PROMEDIO	2.141	1.532

ANEXO 3: Toma de muestras

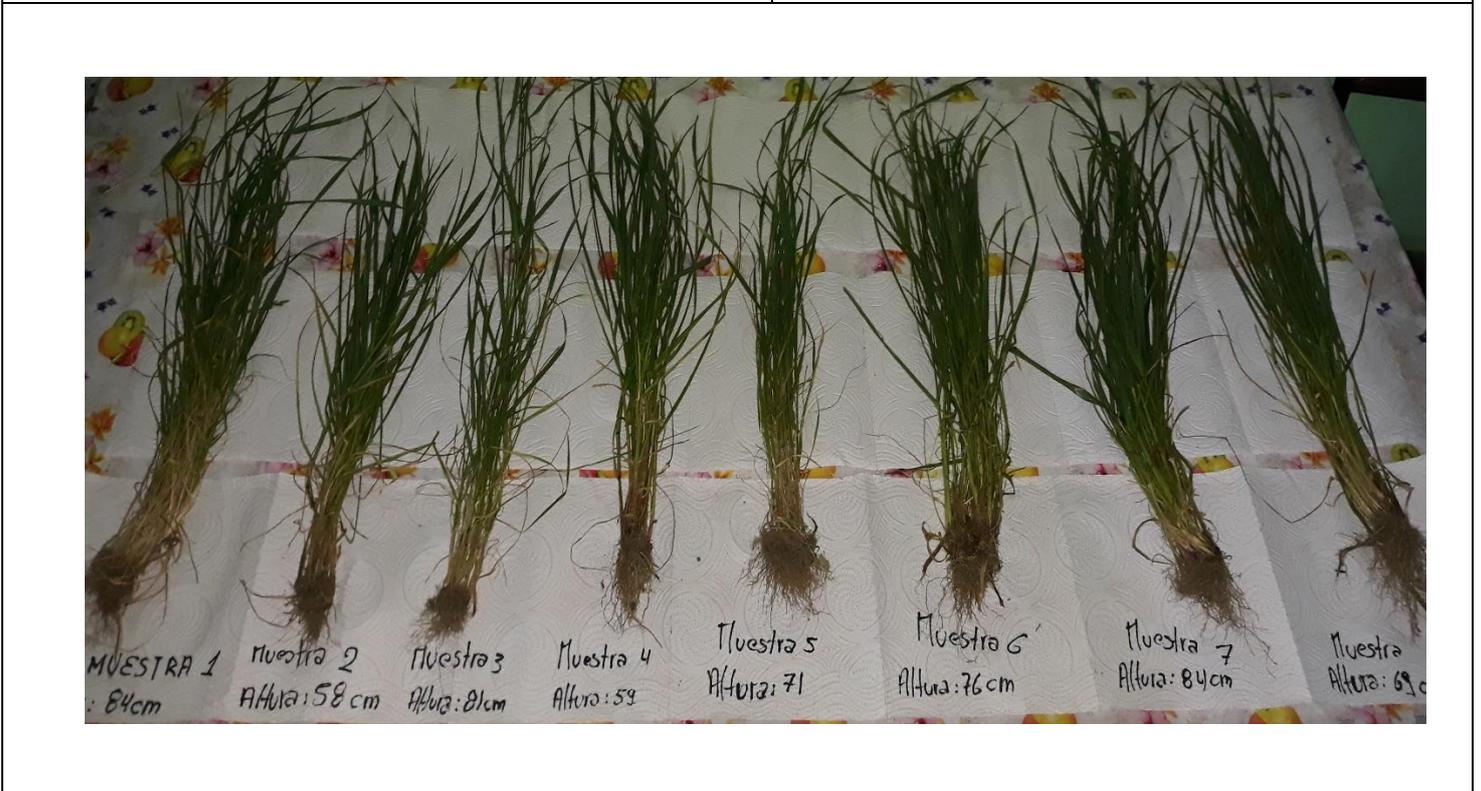
Anexo 3-A: Toma de muestras de tallos de tomate enfermo

Fuente: Autora



Anexo 3-B: Toma de muestras de raíces de *L. perenne*

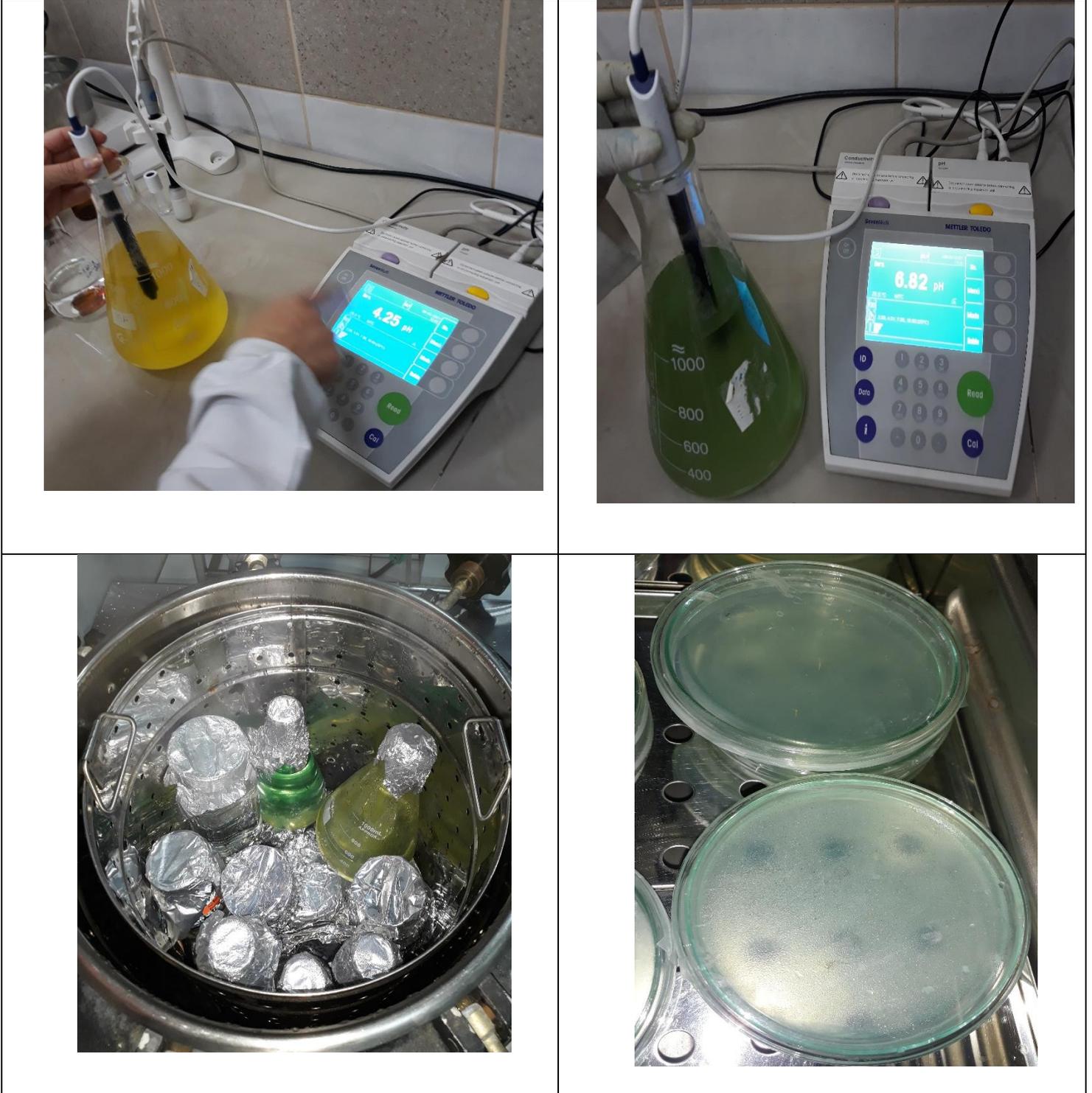
Fuente: Autora



ANEXO 4: Preparación de medios de cultivo para aislamiento

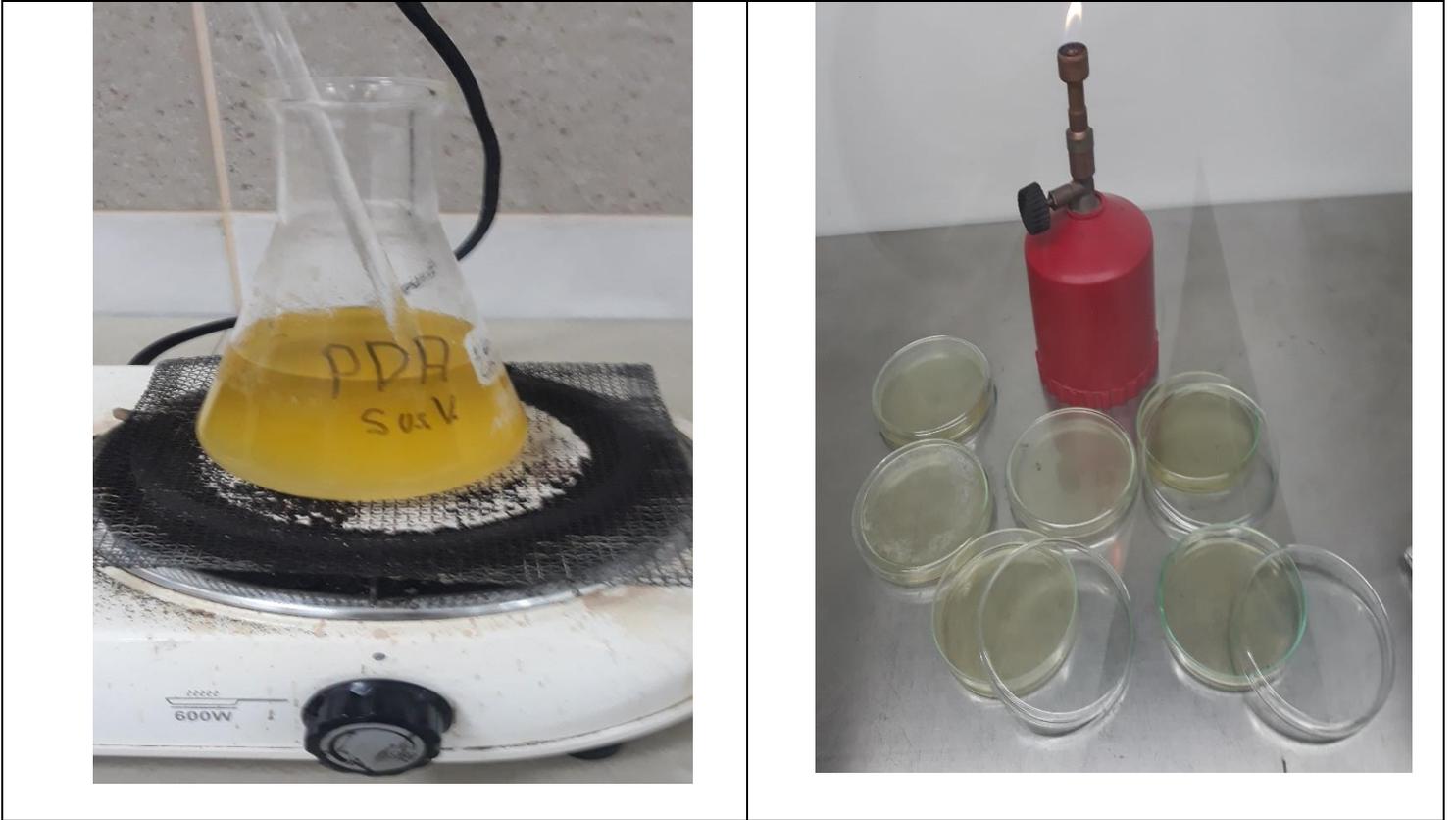
Anexo 4-A: Medio de Cultivo NFB

Fuente: Autora



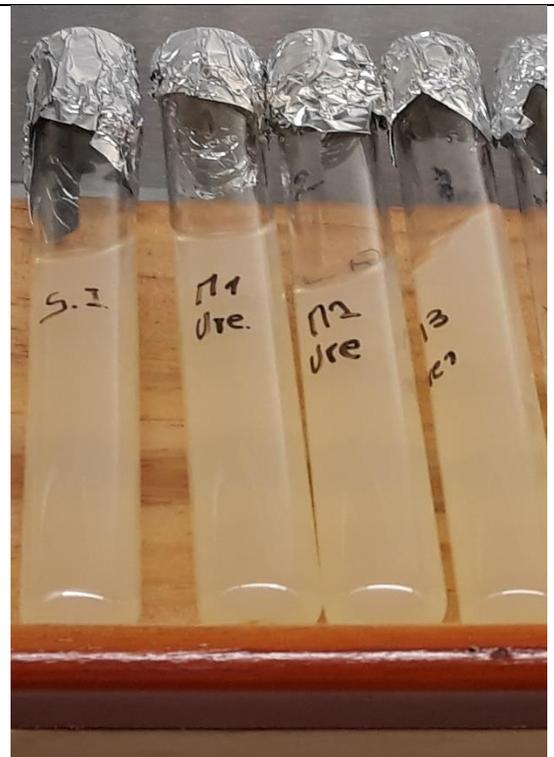
Anexo 4-B: Preparación de medio de Cultivo PDA

Fuente: Autora



ANEXO 5: Preparación de medio agar urea Christensen.

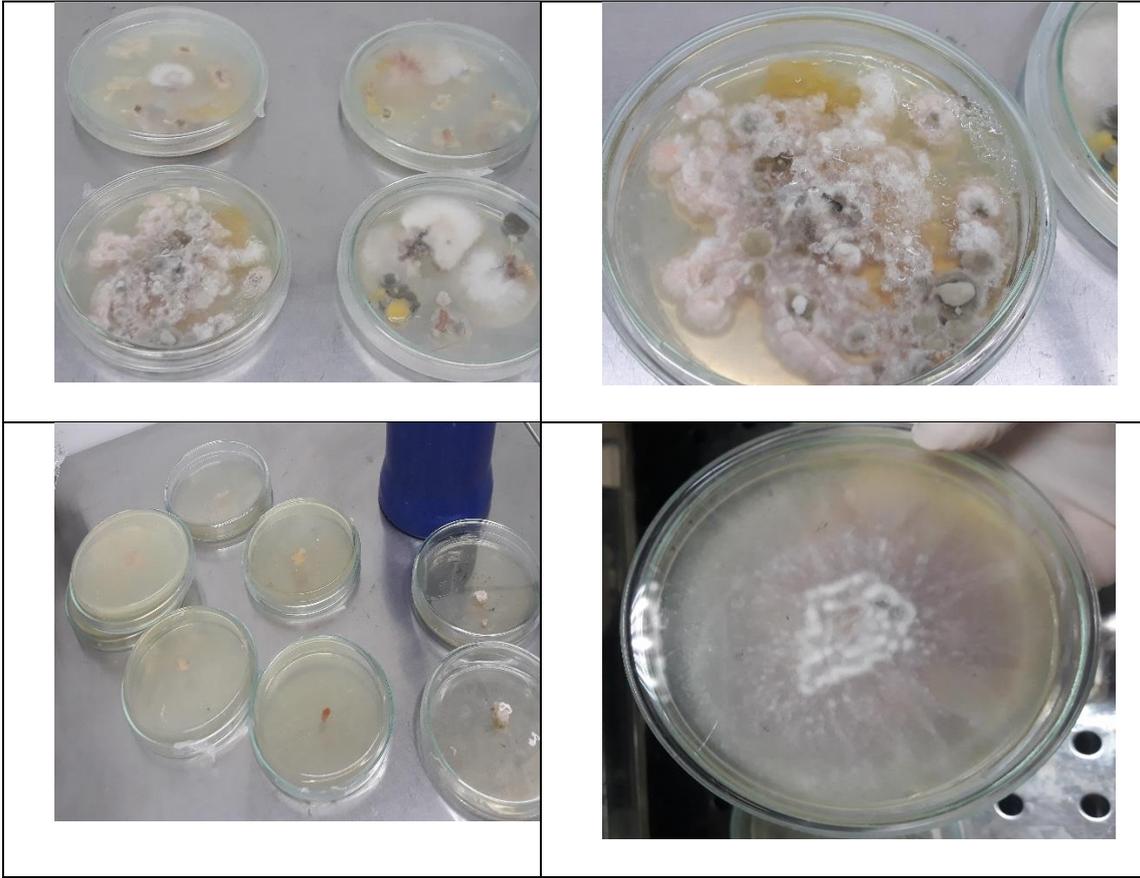
Fuente: Autora



ANEXO 6: Aislamiento de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*

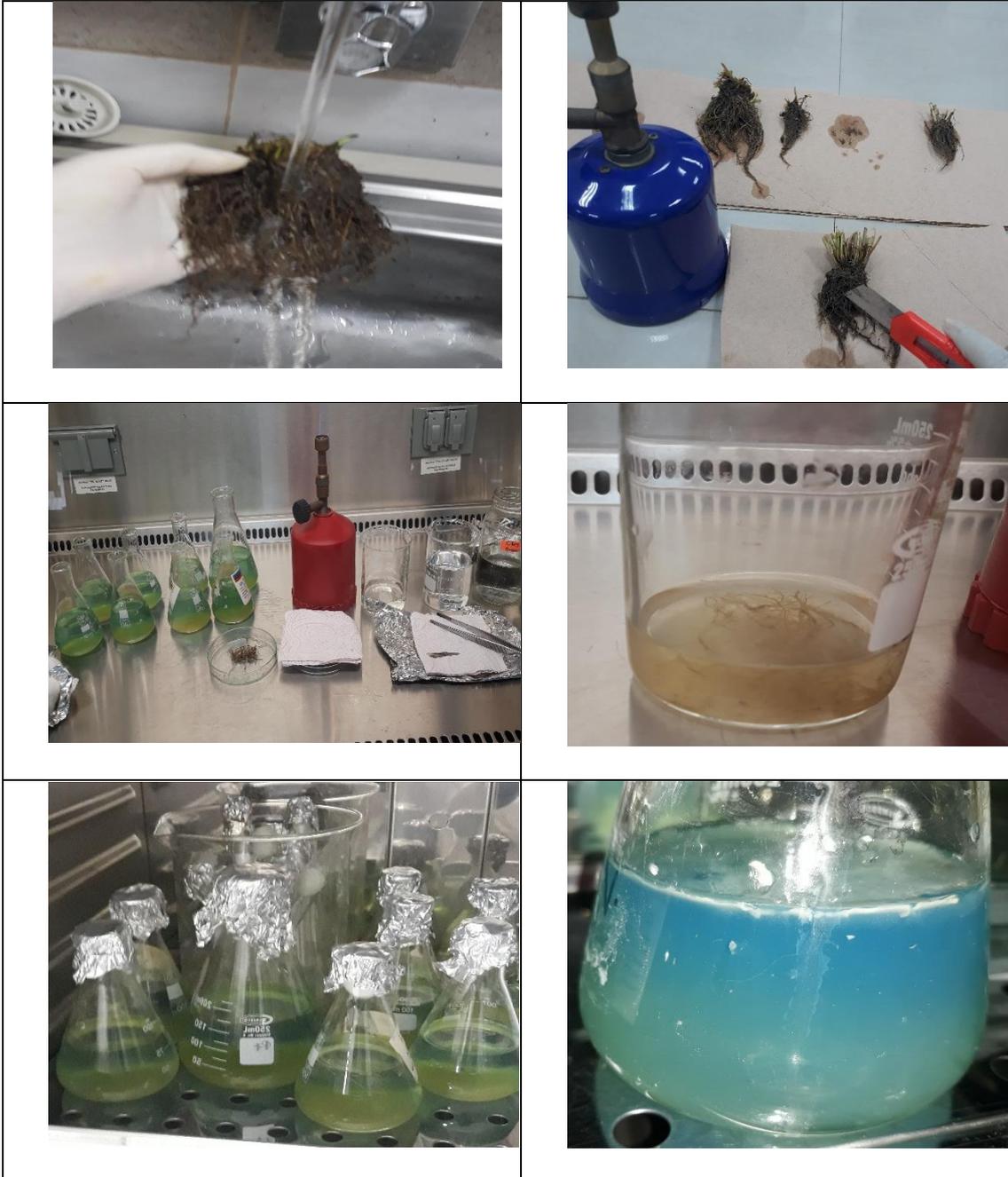
Fuente: Autora





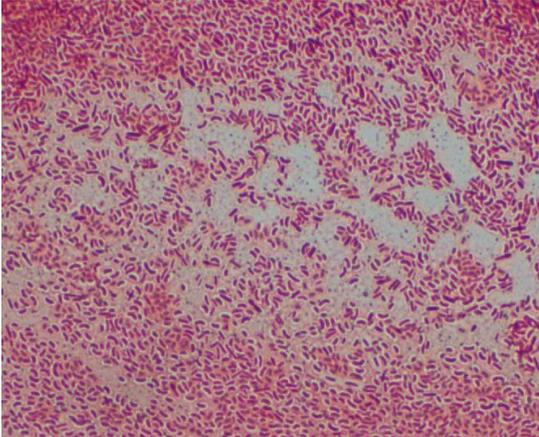
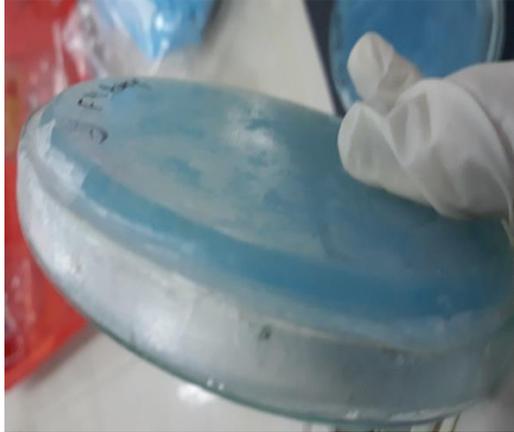
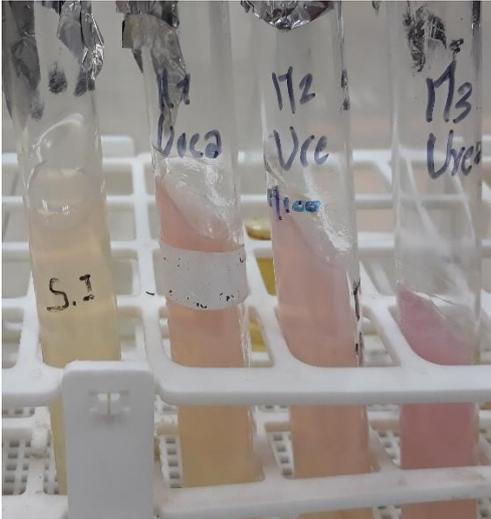
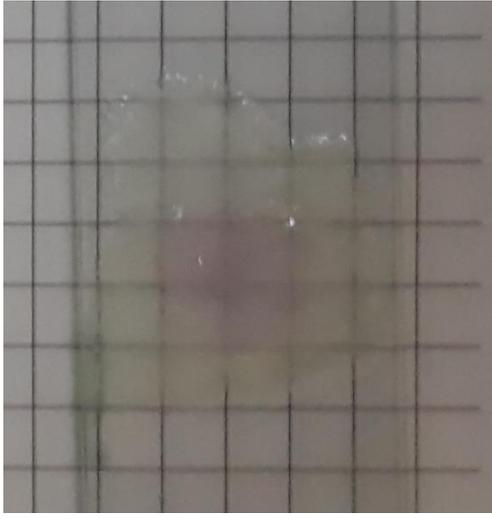
ANEXO 7: Aislamiento de *Azospirillum* sp

Fuente: Autora

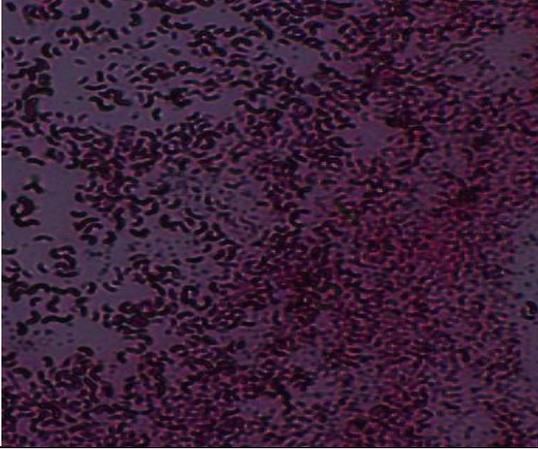


ANEXO 8: Pruebas bioquímicas de identificación de *Azospirillum sp.*

Fuente: Autora

<p>A. Tinción de Gram</p> 	<p>A. Prueba de la catalasa</p> 
<p>B. Fijación del Nitrógeno</p> 	<p>C. Motilidad</p> 
<p>D. Ureasa</p> 	<p>E. Oxidasa</p> 

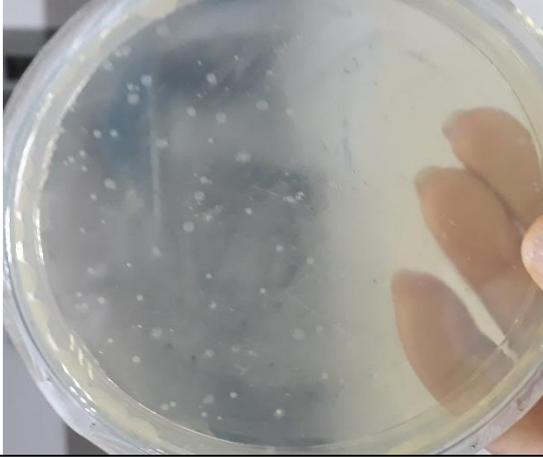
F. Poli β Hidroxibutirato



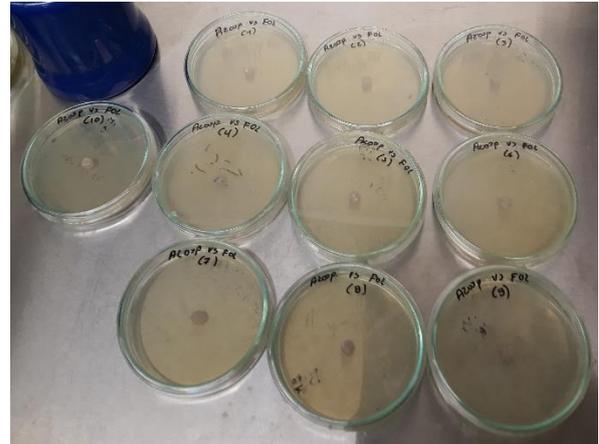
ANEXO 9: Pruebas de antagonismo *in vitro* de *Azospirillum sp.* frente a FOL

Fuente: Autora

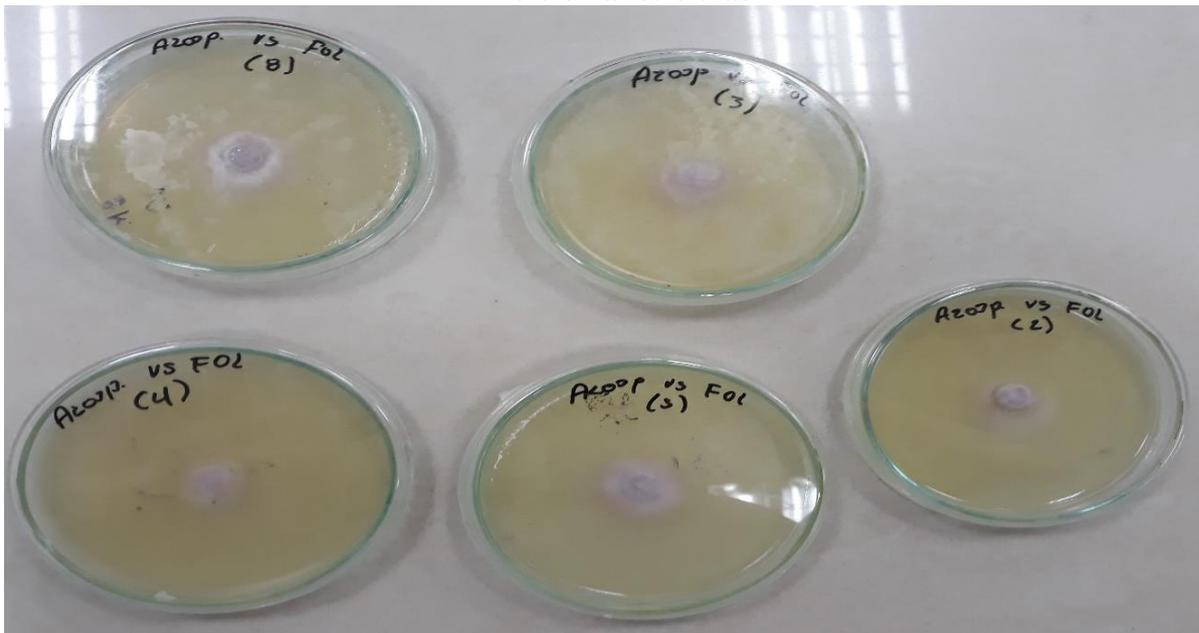
Crecimiento de *Azospirillum sp.* en medio PDA



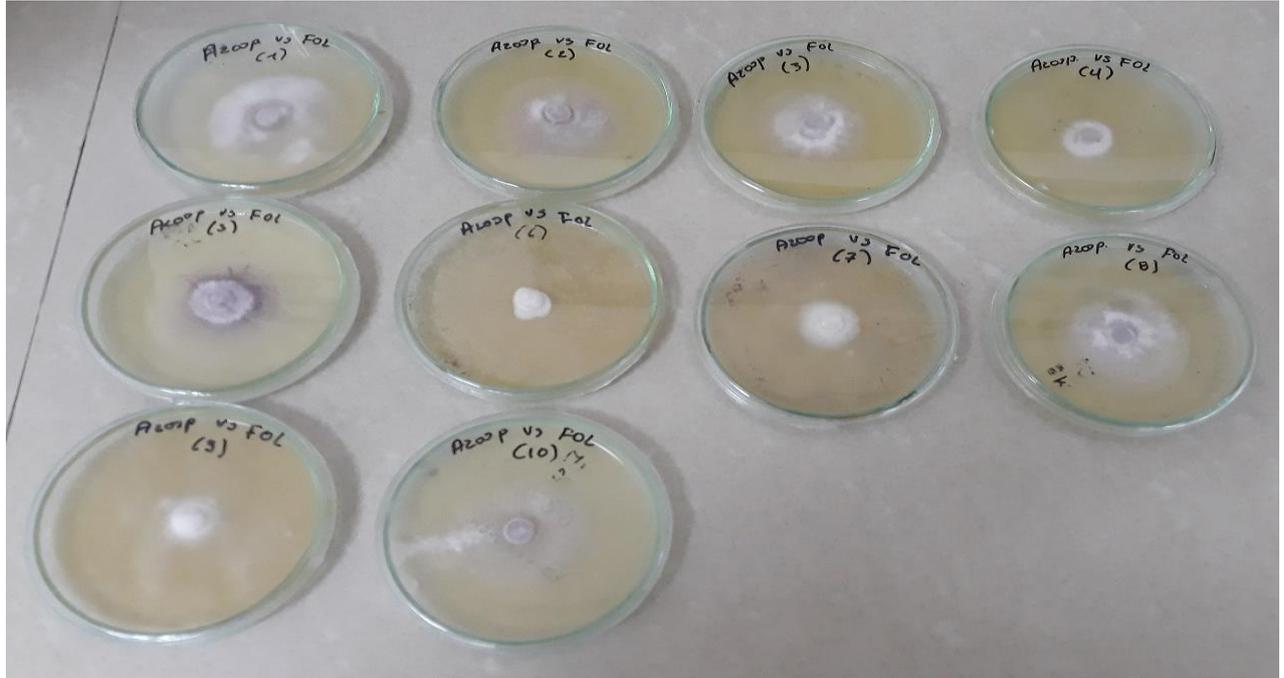
Crecimiento de FOL a la concentración requerida



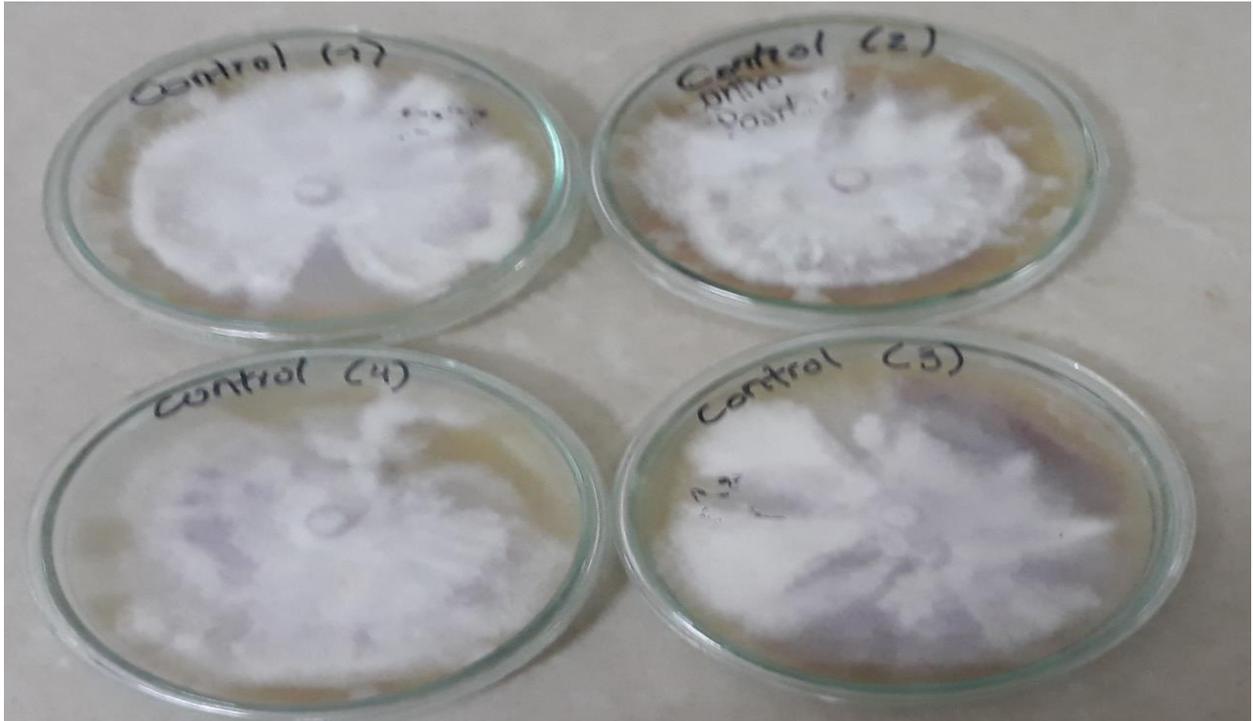
Inhibición a los 8 días



Inhibición a los 11 días



Control

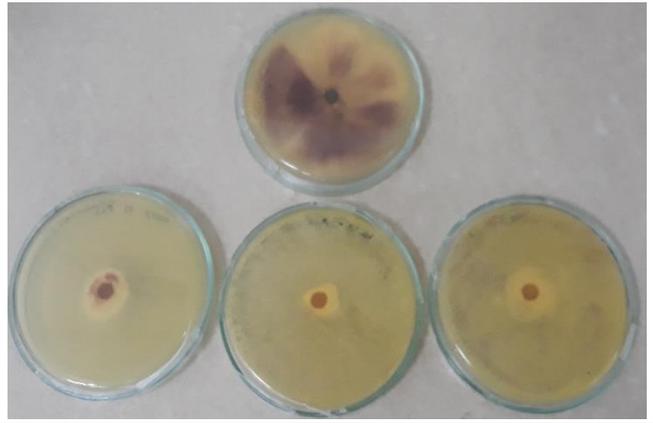


Inhibición a los 8 días en comparación con el control

Anverso

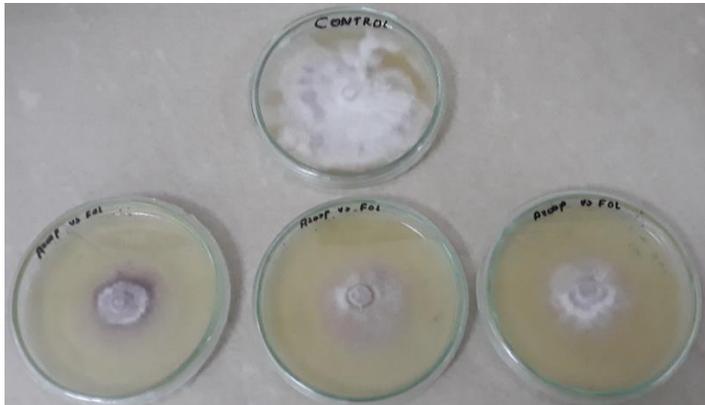


Reverso

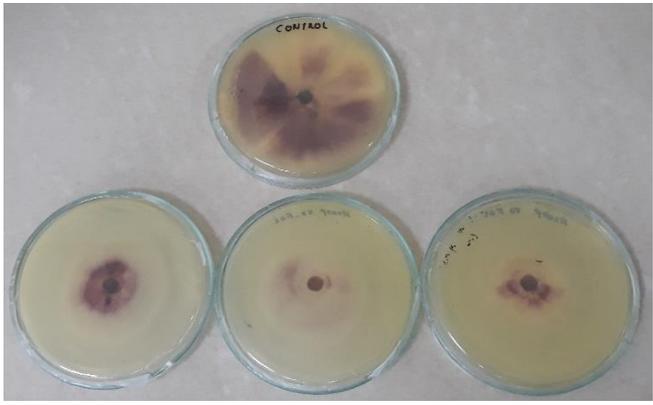


Inhibición a los 11 días en comparación con el control

Anverso

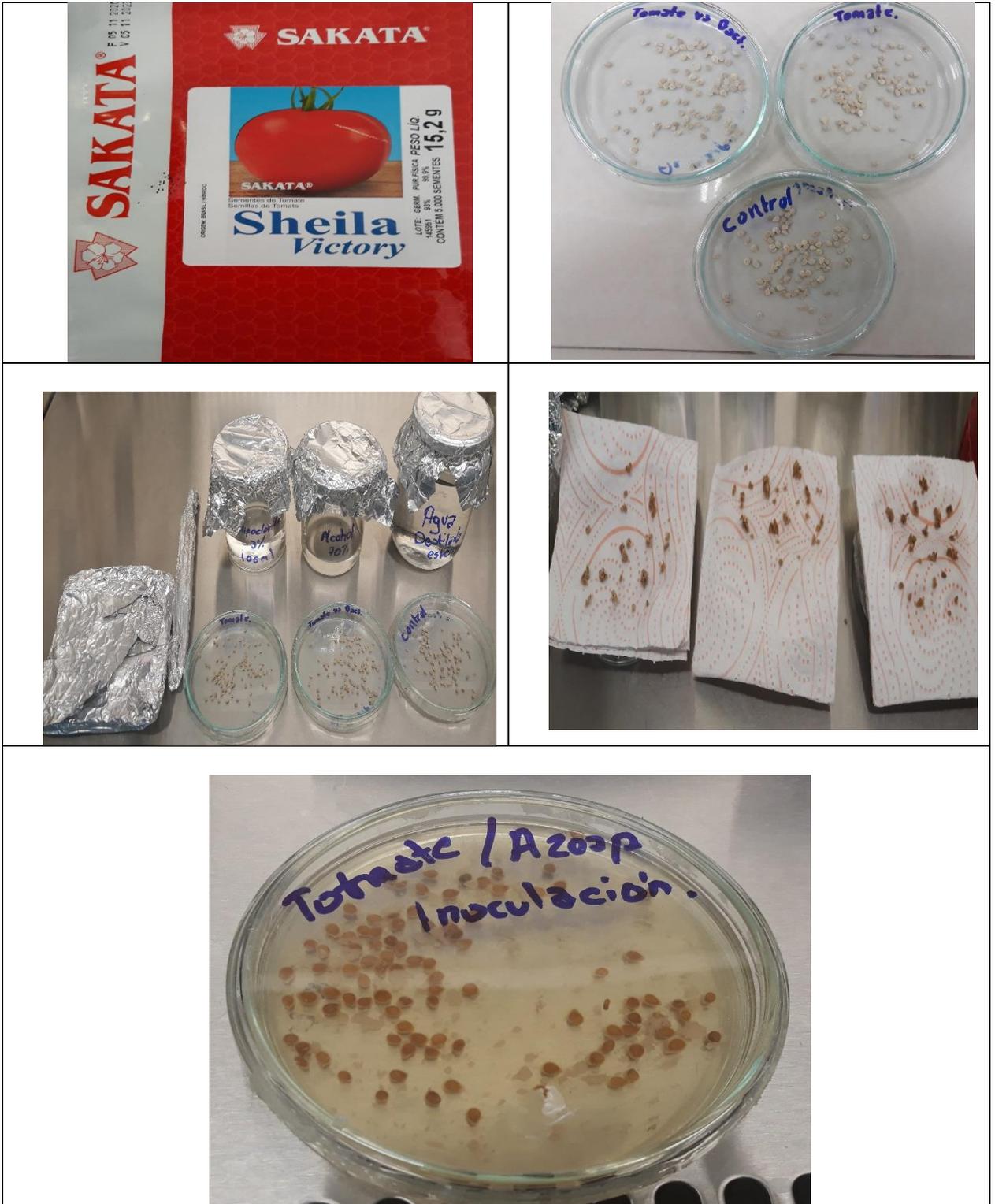


Reverso



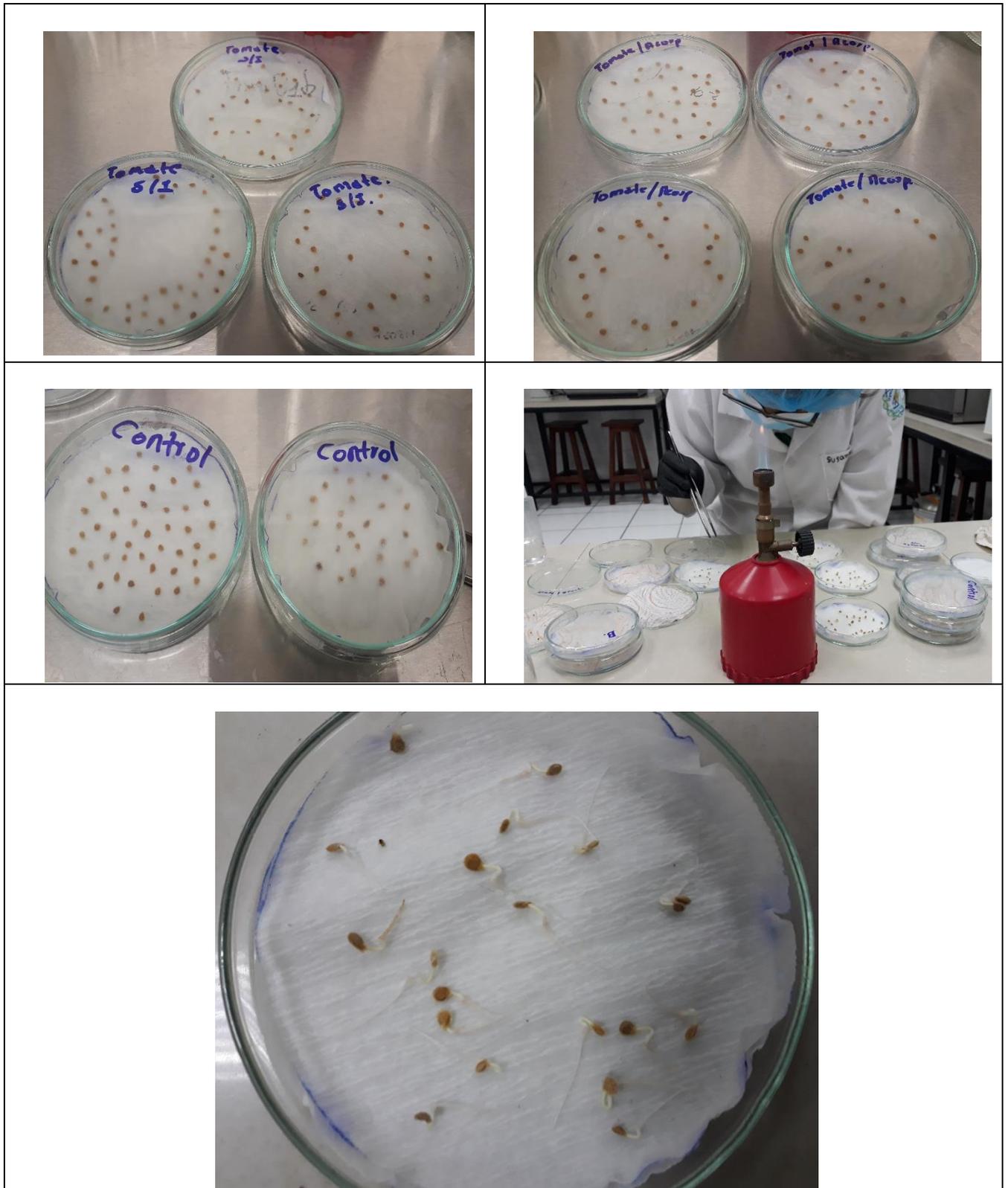
ANEXO 10: Inoculación de *Azospirillum* en semillas de tomate

Fuente: Autora



ANEXO 11: Germinación de semillas inoculadas y no inoculadas

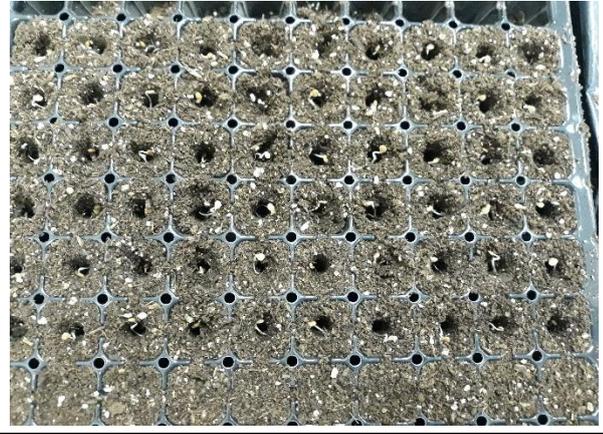
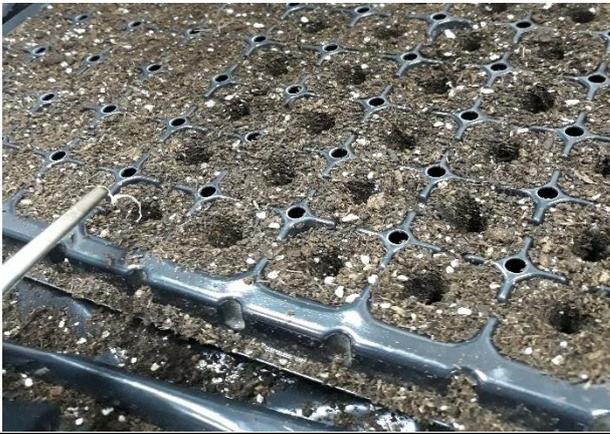
Fuente: Autora



ANEXO 12: Siembra de semillas inoculadas y no inoculadas

Fuente: Autora

Esterilización de Agua y turba





ANEXO 13: Trasplante e inoculación con el patógeno (FOL)

Fuente: Autora

	<p>Plantas sin inocular</p> 
<p>Inoculadas (<i>Azospirillum</i>)</p> 	<p>Plantas inoculadas vs no inoculadas (<i>Azospirillum</i>)</p> 
<p>Inoculación del patógeno (Inyección en la corona de raíz)</p> 	<p>Inoculación del patógeno (Inmersión de la raíz)</p> 

Trasplante



No inoculadas vs inoculadas (*Azospirillum*)



Plantas en invernadero



ANEXO 14: Plantas de los cuatro tratamientos al final de la investigación (28 días después del trasplante)

Fuente: Autora

T0 (Testigo absoluto)



T1 (testigo relativo Azospirillum)



T2 (FOL)

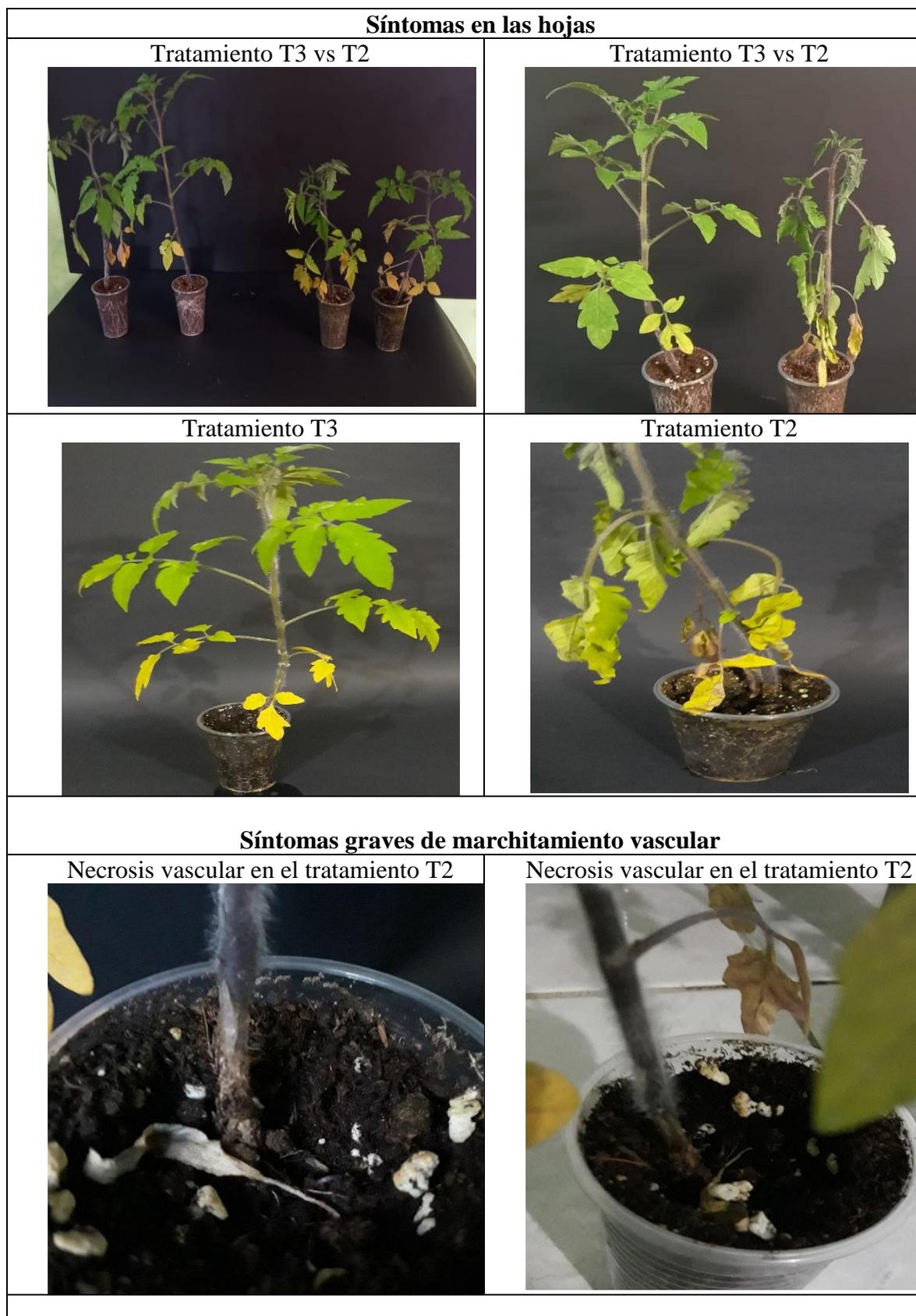


T3 (Azospirillum+FOL)



ANEXO 15: Síntomas de la enfermedad marchitamiento vascular del tomate

Fuente: Autora



Necrosis Radicular en tratamiento T2



**ANEXO 16: Toma de datos para determinar el porcentaje de efectividad de
inoculación de *Azospirillum sp.***

Fuente: Autora

