

UNIVERSIDAD PARA LA COOPERACIÓN INTERNACIONAL



AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *Trichoderma koningiopsis*, PARA EL CONTROL DE *Fusarium oxysporum* EN TOMATE CHERRY (*Solanum lycopersicum*)

LINA MARÍA ARRIETA MERCADO

PROYECTO FINAL DE GRADUACION PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR POR EL TITULO DE MASTER EN GERENCIA DE PROGRAMAS SANITARIOS EN INOCUIDAD DE ALIMENTOS

San José, Costa Rica

Marzo, 2023

UNIVERSIDAD PARA LA COOPERACIÓN INTERNACIONAL

Este proyecto final de graduación fue aprobado por la Universidad como requisito parcial para optar por el título de Magister en Gerencia de programas sanitarios en inocuidad de alimentos

PhD. Félix Cañet Prades
PROFESOR TUTOR

Ing. Luis Matarrita Diaz. MSc
LECTOR

Lina María Arrieta Mercado
SUSTENTANTE

DEDICATORIA

A Dios, a mi familia, a mi hijo José Eduardo y a mi compañero de vida José Félix por ser mis mayores motivadores, la fuerza que me hiciera continuar en los momentos más difíciles de este recorrido académico, sin su apoyo incondicional nada de esto hubiese sido posible.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a Dios Todopoderoso por ser mi guía y por enseñarme el camino a seguir, por todas sus bendiciones, infinitas gracias.

Expreso mis más sentidos agradecimientos a mis directores de tesis, Dr. José Félix Ortiz Lemus y Dr. Félix M Cañet Prades, por su constante apoyo y acompañamiento en el desarrollo del proyecto. Gracias por sus aportes, sugerencias y dedicación.

A la Universidad de Pamplona, por la financiación del proyecto y por permitirme desarrollar todas las fases de mi trabajo en sus instalaciones.

Al grupo de Investigación en microbiología y biotecnología SIMBIO de la Universidad de Pamplona, a los integrantes del mismo especialmente a la estudiante María Gabriela Castillo por todo su apoyo.

A mi hijo José Eduardo Ortiz y mi esposo José Félix Ortiz por ser mi motivación cada día para seguir adelante, quienes con su compañía, apoyo y amor fueron luz en todo momento.

A mi abuela Zobeida, a mi madre Kelly, a mi hermana Andrea y mi sobrino Jerónimo por ser mi refugio sagrado en todo momento.

A la profesora Ángela Cajiao, por brindarme sus enseñanzas y la oportunidad de crecer como investigadora, por ser una mano amiga y un ángel en mi camino.

A la Universidad para la cooperación internacional y a cada uno de mis docentes que fueron mentores en esta etapa de mi vida y con sus conocimientos.

A todas las personas que de una u otra manera me apoyaron en este proceso.

A todos mis más profundos agradecimiento.

TABLA DE CONTENIDO

1	INTRODUCCION.....	12
1.1	ANTECEDENTES.....	12
1.2	JUSTIFICACIÓN.....	16
1.3	OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	19
1.3.1	Objetivo general.....	19
1.3.2	Objetivos específicos.....	19
2	MARCO TEÓRICO.....	20
2.1	Tomate cherry.....	20
2.1.1	Cultivo del tomate.....	20
2.1.2	Marchitamiento vascular del tomate.....	21
2.2	Estrategias de manejo de <i>Fusarium oxysporum</i>	22
2.2.1	Bioplaguicidas como estrategia de mitigación.....	23
2.3	Marco legal.....	24
3	METODOLOGÍA.....	28
3.1	Área de estudio.....	28
3.2	Aislamiento del fitopatógeno.....	29
3.3	Identificación fenotípica y genotípica del fitopatógeno aislado.....	30
3.3.1	Identificación fenotípica presuntiva.....	30
3.3.2	Identificación genotípica.....	31
3.4	Aislamiento e identificación del microorganismo biocontrolador. ...	34
3.4.1	Aislamiento y purificación de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp... 34	
3.4.2	Identificación fenotípica y genotípica de los aislados.....	35

3.5	Confrontación <i>in vitro</i> de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp. vs cepa fitopatógena.....	35
3.6	Masificación del microorganismo biocontrolador y determinación de la concentración conidial.	37
3.7	Evaluación de la efectividad del biocontrolador	37
4	RESULTADOS Y DISCUSION	40
4.1	Aislamiento del fitopatógeno	40
4.2	Identificación fenotípica presuntiva del aislado	41
4.2.1	Descripción macroscópica	41
4.2.2	Descripción microscópica	42
4.3	Identificación genotípica del aislado.....	42
4.4	Aislamiento del microorganismo biocontrolador.....	44
4.5	Confrontación <i>in vitro</i> de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp. vs cepa fitopatógena.....	46
4.6	Evaluación de la efectividad de <i>Trichoderma koningiopsis</i> frente a <i>Fusarium oxysporum</i> en plantas de tomate cherry.....	51
5	CONCLUSIONES	56
6	RECOMENDACIONES.....	57
7	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
8	ANEXO 1	67

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Finca las Plazuelas: extensión y delimitación por actividades	28
Figura 2: Esquema de enfrentamiento dual	36
Figura 3: Aislamiento del fitopatógeno de una planta enferma de tomate cherry.	40
Figura 4: Vista macroscópica del fitopatógeno aislado a los 3 días (A) y a los 7 días de incubación 25°C en PDA (B) respectivamente.	41
Figura 5: Vista microscópica de las diferentes estructuras microscópicas de <i>Fusarium</i> sp 40 x (A – B) y 100 x (C)	42
Figura 6: Actividad antagónica de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp sobre <i>Fusarium oxysporum</i>	47
Figura 7: Características morfológicas del aislado “C1”. A crecimiento en medio OGY, B crecimiento en medio OGY enriquecido con arroz, C crecimiento en medio OGY enriquecido con avena, D crecimiento en medio YGC, E reverso del crecimiento fúngico en medio MEA (evaluado en tasa de crecimiento). F Conidióforo- microscopía (100x) obtenida del crecimiento de la cepa en el medio A, G Conidióforo- microscopía (100x) obtenida del crecimiento de la cepa en el medio B, H- I Conidióforos, conidios- microscopía (100x) obtenida del crecimiento de la cepa en el medio.	50
Figura 8: Efectividad de <i>Trichoderma koningiopsis</i> frente a <i>Fusarium oxysporum</i> en plantas de tomate cherry	53

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Programación PCR. _____	32
Tabla 2: Escala para evaluación de la capacidad antagónica _____	37
Tabla 3: Tratamientos de inoculación. _____	38
Tabla 4: Identificación molecular _____	43
Tabla 5: Características generales de las cepas nativas de <i>Trichoderma</i> spp. Aisladas de suelos destinados para actividades agrícolas _____	44
Tabla 6: Porcentaje de Inhibición del crecimiento radial (PICR) de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp _____	46
Tabla 7: Micoparasitismo de <i>Trichoderma koningiopsis</i> sobre <i>Fusarium oxysporum</i> _____	48
Tabla 8: Identificación molecular de la cepa _____	51

ABREVIACIONES

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ASD: Agar Sabouraud dextrosa

ASPAGRO: Asociación de productores agropecuarios de Pamplona

CYA: Agar Czapek con extracto de levadura

DNTP: Desoxirribonucleótidos

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

ICA: Instituto Colombiano Agropecuario

IDM: Índice de marchitamiento

ITS: Espaciador transcrito interno

MEA: Agar extracto de malta

MAVDT: Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial

MV: Marchitamiento vascular

NCBI: Centro nacional de información biotecnología

OGY: Agar oxitetraciclina, glucosa, extracto de levadura

PCR: Reacción en cadena de polimerasa

PDA: Agar papa dextrosa

PICR: Porcentaje de Inhibición del crecimiento radial

SIMBIO: Semillero de investigación en microbiología y biotecnología

YGC: Agar extracto de levadura, glucosa y cloranfenicol

RESUMEN

Actualmente el uso excesivo de agroquímicos (fertilizantes, plaguicidas y otros) en la agricultura, constituye una gran amenaza para la salud humana y de los ecosistemas. Los sistemas de producción agrícola convencionales, centrados en incrementar los rendimientos, han producido trastornos y problemas como la pérdida de la fertilidad natural de los suelos y su erosión, así como graves situaciones de emergencia de plagas.

Por lo tanto, se requiere de un cambio en el manejo tradicional de la sanidad vegetal, que permita disminuir el alto impacto negativo generado por el uso excesivo de plaguicidas con alternativas de manejo integrado y la inclusión de microorganismos con el fin de regular biológicamente las poblaciones de plagas agrícolas, mejorar la calidad e inocuidad de los alimentos y restablecer el equilibrio ambiental.

Dentro de las estrategias viables de la agricultura orgánica, para combatir enfermedades causadas por fitopatógenos, se encuentra el control biológico, el cual se basa en la utilización de microorganismos antagonistas que ejercen su acción de biocontrol por diferentes mecanismos. Por tal razón este trabajo tiene como objetivo elaborar un biocontrolador a partir del microbiota presente de forma autóctona en el cultivo de tomate cherry, para la sustitución del uso de plaguicidas. Todo esto, mediante ensayos de tamizaje (screening) de microorganismos con potencial biocontrolador frente a microorganismos fitopatógenos, a través de herramientas microbiológicas y moleculares.

Los resultados obtenidos establecen a *Trichoderma koningiopsis* con porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) del 95,33% frente a *Fusarium oxysporum*, con lo cual fue posible concluir que *Trichoderma koningiopsis* demostró la capacidad biocontroladora sobre este hongo, reduciendo la incidencia de la enfermedad de marchitez del tomate cherry en un 94%.

Palabras claves: Biocontrol, fitopatógeno, *Trichoderma*, *Fusarium*.

ABSTRAC

Currently, the excessive use of agrochemicals (fertilizers, pesticides and others) in agriculture constitutes a major threat to human and ecosystem health. Conventional agricultural production systems, focused on increasing yields, have produced disorders and problems such as the loss of natural soil fertility and soil erosion, as well as serious pest emergencies.

Therefore, a change in traditional plant health management is required to reduce the high negative impact generated by the excessive use of pesticides with integrated management alternatives and the inclusion of microorganisms in order to biologically regulate agricultural pest populations, improve food quality and safety, and restore environmental balance.

Among the viable strategies of organic agriculture to combat diseases caused by phytopathogens is biological control, which is based on the use of antagonistic microorganisms that exert their biocontrol action by different mechanisms. For this reason, the objective of this work is to elaborate a biocontroller based on the microbiota present in cherry tomato crops, to substitute the use of pesticides. All this, by means of screening tests of microorganisms with biocontrol potential against phytopathogenic microorganisms, through microbiological and molecular tools.

The results obtained establish *Trichoderma koningiopsis* with a percentage of inhibition of radial growth (PICR) of 95.33% against *Fusarium oxysporum*, with which it was possible to conclude that *Trichoderma koningiopsis* demonstrated the biocontrol capacity on this fungus, reducing the incidence of the cherry tomato wilt disease in 94%

Keywords: Biocontrol, phytopathogen, *Trichoderma*, *Fusarium*

1 INTRODUCCION

1.1 ANTECEDENTES

Actualmente el uso excesivo de agroquímicos (fertilizantes, plaguicidas y otros) en la agricultura, constituye una gran amenaza para la salud humana y de los ecosistemas. Los sistemas de producción agrícola convencionales, que buscan un incremento en los rendimientos, han producido trastornos y problemas como la pérdida de la fertilidad natural de los suelos y su erosión, así como graves problemas de plagas (FAO, s.f)

Estos problemas se han enfrentado como fenómenos aislados del sistema agroecológico, mediante el uso intensivo de productos químicos sintéticos, que si bien son simples de usar y efectivos, presentan un número importante de debilidades como son la destrucción de los controladores naturales, con pérdidas de la capacidad de regulación natural; la generación de resistencia en algunas plagas y la resurgencia de otras potenciales; costos crecientes debido a la mayor incidencia y a la resistencia de las plagas; y, lo que no es menos grave, problemas crecientes de contaminación del medio ambiente, de los trabajadores y habitantes del medio rural y de los productos destinados al consumo (Torrado, 2011).

A raíz de esta situación se buscan opciones tomando en cuenta un sistema de producción agrícola de menor impacto ambiental o no contaminante, entre las que está el aumentar la eficiencia en el uso de fertilizantes bajo sistemas de riego tecnificado, la plasticultura, y la agricultura orgánica o ecológica. En la actualidad la agricultura orgánica es el sector productivo de más rápido crecimiento (Willer y Yussefi, 2001) a nivel mundial para sustituir la agricultura convencional o moderna, ya que exige optar por otro sistema de producción desde el punto de vista del productor y por un producto diferente a nivel del consumidor.

El *Codex Alimentarius* (FAO, 2013) define agricultura orgánica como un sistema holístico de producción que promueve y mejora la salud del agroecosistema, incluyendo la biodiversidad, los ciclos biológicos y la actividad biológica del suelo, prefiriendo el uso de prácticas de manejo dentro de la finca al uso de insumos externos a la finca. Los sistemas de agricultura orgánica se basan en la rotación de cultivos, utilización de estiércol, incorporación de leguminosas fijadoras de nitrógeno (N), abonos verdes, residuos orgánicos originados fuera del predio, mínima o cero labranza, minerales naturales y aspectos de control biológico de plagas para mantener la estructura y productividad del suelo (Gómez, 2000); todo lo anterior con la finalidad de aportar nutrientes para las plantas y prevenir o controlar la incidencia de insectos, malezas y otras plagas, para de esta forma proteger el medio ambiente y la salud humana.

Dentro de las estrategias viables de la agricultura orgánica, para combatir enfermedades causadas por fitopatógenos, se encuentra el control biológico, el cual se basa en la utilización de microorganismos antagonistas que ejercen su acción de biocontrol por diferentes mecanismos (Cotes, 2019)

El tomate cherry (*Solanum lycopersicum var. cerasiforme*) es originario de América del Sur, se sabe que esta variedad se cultiva desde comienzos del 1800 en lugares como Ecuador, Perú y el Norte de Chile. A Europa llegó desde México, aunque recién en el siglo XX su cultivo se extendió por todo el mundo. Su nombre científico es *Lycopersicum* y pertenecen a la familia Solanáceas. Según se sabe, es la variedad más ancestral pues la planta crece de forma espontánea en regiones tropicales o subtropicales. (González Gordillo, 2007)

El tomate cherry (*Solanum lycopersicum var. Cerasiforme* como alimento, que cuenta con propiedades benéficas para la salud del ser humano, como ser un poderoso antioxidante, alto contenido de vitaminas, portar minerales de gran importancia para la visión, piel, el envejecimiento, control de la diabetes y otras cualidades de esa naturaleza. (González Gordillo, 2007).

Para el año 2013 en Colombia se produjeron de 412.351,2 t, siendo Norte de Santander el principal departamento productor con 119.787 t, seguido por Antioquia con 47.110 t, Boyacá con 46.638 t, Santander con 42.924 t y Cundinamarca con 26.851 t.

El carácter cosmopolita de la planta de tomate hace que se encuentre expuesta a una alta diversidad de agentes patógenos, muchos de los cuales se hospedan en el suelo y causan importantes limitaciones en la producción del cultivo. Entre los patógenos del suelo más importantes que afectan el cultivo de tomate son *Verticillium dahliae* (Liu et al., 2013; Klosterman et al., 2011a), *Rhizoctonia solani* (Małolepsza et al., 2017; Goudjal et al., 2014; Misawa y Kuninaga, 2010; Kuramae et al., 2003), *Ralstonia solanacearum* (Tans-Kersten et al., 2004), los nemátodos: *Meloidogyne* spp. (Desaeger et al., 2017), además de *Fusarium oxysporum* que se considera uno de los diez patógenos fúngicos más importantes en la agricultura a nivel mundial (Dean et al., 2012).

Estos agentes originan pérdidas económicas para los agricultores y los llevan al uso indiscriminado de plaguicidas para proteger las plantaciones y ofrecer un producto aceptable en el mercado, sin embargo, el problema sigue existiendo y muchas veces se vuelve de carácter incontrolable (Bickel, 2018).

Por otra parte, con base en investigaciones realizadas por diferentes autores; Cubillos et al., (2009) afirman que: el género *Trichoderma* está compuesto por un grupo de especies de hongos saprofitos del suelo y de la madera (Jensen & Wolffhechel, 1995) y es ampliamente conocido por el efecto antagónico contra un amplio rango de hongos. Debido a su ubicuidad, facilidad de aislamiento y cultivo, crecimiento rápido en un gran número de sustratos, y al hecho de no atacar a las plantas superiores, diferentes especies del género *Trichoderma* se han utilizado para el control de hongos patógenos del suelo, principalmente de los géneros *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Colletotrichum*, *Pythium* y *Fusarium*, entre otros (González et al., 2002).

Trichoderma está entre los agentes más promisorios de biocontrol por sus propiedades antagónicas frente a los hongos patógenos de plantas, sobre todo porque ellos pueden estar en la rizósfera y colonizar y proteger las raíces, así como también colonizar flores, semillas y/o hojas reduciendo daños de enfermedades en un amplio rango de cultivos.

Los hongos del género *Trichoderma* puede afectar distintas estructuras de los hongos patógenos: conidios, esclerocios e, hifas. Con la ventaja de que pueden controlar, hongos de suelo que causan enfermedades radiculares y/o vasculares, y hongos que producen manchas foliares, mildius o tizones (Sivila & Álvarez, 2013).

1.2 JUSTIFICACIÓN

El uso de biocontroladores y bioinsumos contribuye tanto a favorecer la sanidad, el rendimiento y la inocuidad de los productos agrícolas, como a disminuir el impacto ambiental causado por el uso de fungicidas sintéticos para el control de enfermedades en las plantas (Serrano Carreón y Galindo Fentanes, 2007).

Por lo tanto, se requiere de un cambio en el manejo tradicional de la sanidad vegetal, que permita disminuir el alto impacto negativo generado por el uso de plaguicidas químicos sintéticos por alternativas de manejo integrado y la inclusión de microorganismos con el fin de regular biológicamente las poblaciones de plagas agrícolas, mejorar la calidad e inocuidad de los alimentos y restablecer el equilibrio ambiental (Tangarife, 2021).

La producción agrícola mundial, ha presentado avances técnicos y tecnológicos importantes en el control de plagas agrícolas (insectos, hongos y otros) ligados principalmente al uso de productos de síntesis química para la protección de cultivos, para lograr mayores volúmenes de producción, con el fin de cubrir la demanda de alimentos y materias primas. (Tangarife, 2021).

Sin embargo, aunque se ha logrado incrementar la producción agrícola, esto ha generado un alto impacto negativo sobre la inocuidad y calidad de los alimentos, la salud humana y, el medio ambiente, repercutiendo directamente en el cambio global. El desconocimiento y uso indiscriminado de plaguicidas sintéticos afectan todo el entorno, específicamente a especies silvestres, provocando un desequilibrio en el ecosistema; esto, sumado al desconocimiento técnico de las aplicaciones de plaguicidas como: dosis, frecuencias de aplicación, manejo y rotación de grupos químicos, sitio, mecanismo y modo de acción, calidad de la aspersión o aplicación (falta de calibración de equipos)), condiciones que favorecen que esto se haya convertido en un problema complejo a nivel social, económico y ambiental (Gutiérrez, Robles, Santillán, Ortiz, & Cambero, 2013).

Por lo anterior, la evolución natural de los sistemas de producción agrícola ha tenido que direccionarse de acuerdo a los gustos y preferencias de los consumidores y a la vertiginosa demanda de productos naturales de alta inocuidad y calidad, provenientes de sistemas productivos que implementan métodos de control de plagas agrícolas con visión más respetuoso con el ambiente y amigable con el pensamiento de desarrollo sustentable (Badii & Abreu, 2006), teniendo como alternativa el conocimiento y uso de un gran grupo importante y creciente de arvenses, insectos, hongos, bacterias, virus, nematodos y otros patógenos que presentan efectos antagónicos con otros microorganismos o insectos, y esta acción puede reducir el uso de plaguicidas en pro de una agricultura sostenible.

Como ejemplo de esta situación se menciona la finca “Las Plazuelas”, la cual está ubicada en el departamento de Norte de Santander- Colombia, en el municipio de Pamplona en la vereda Chichira, esta cuenta con 60 ha, las cuales están dispuestas para la actividad agrícola, piscícola y ganadera. Actualmente, esta cuenta con cultivos de tomate Cherry, fresa, cebolla y papa.

Los proyectos agrícolas son realizados en asociación comunitaria con la Asociación de Productores Agropecuarios de Pamplona (ASPAGRO) y estos están destinados al consumo de familias y de la sociedad Pamplonesa en general. La producción de tomate Cherry se realiza bajo invernaderos, se producen anualmente tres toneladas de éste.

Los productores de ASPAGRO, especialmente el dueño de la finca Plazuelas a partir de la experiencia obtenida en el cultivo del tomate Cherry a lo largo de los últimos años, ha observado que la producción ha disminuido y que la causa se debe posiblemente a la presencia de fitopatógenos que afectan la planta, induciendo el marchitamiento de la misma; por tal razón, han pensado en la necesidad de realizar prácticas que permitan dar manejo sostenible a la presencia de plagas y enfermedades que anualmente acarrear grandes pérdidas en las producciones, por lo tanto, se hace indispensable disponer de recursos

biológicos autóctonos que mitiguen el impacto económico, social y de salud pública generado por las enfermedades y plagas de los cultivos, así como el impacto ambiental generado por el uso de plaguicidas.

De esta forma el presente proyecto pretende caracterizar el agente causante del marchitamiento vascular en las plantas de tomate Cherry y establecer la eficacia de un posible biocontrolador para eliminar el uso de plaguicidas y así disminuir el impacto ambiental y los riesgos relacionados con la calidad e inocuidad de los alimentos.

1.3 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.3.1 Objetivo general

Elaborar un biocontrolador a partir del microbiota presente de forma autóctona en el cultivo de tomate cherry, para la sustitución del uso de plaguicidas químicos sintéticos.

1.3.2 Objetivos específicos

- Realizar el screening del microorganismo patógeno y el microorganismo biocontrolador, presentes en el cultivo del tomate cherry, mediante análisis microbiológicos para la identificación del agente causal y el agente controlador.
- Analizar la actividad antagónica de los microorganismos identificados, mediante bioensayos *in vitro*, para el sondeo de su posible uso como bioinsumo.
- Evaluar el comportamiento del biopreparado sobre el cultivo del tomate cherry.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Tomate cherry

El tomate cherry también conocido como cereza, es originario de la costa oeste de Sudamérica, propio de climas tropicales y subtropicales. Con la llegada de los españoles a América, fue introducido en Europa como planta ornamental, hasta que descubrieron sus cualidades culinarias y comenzó a cultivarse como alimento.

En su lugar de origen es una planta perenne y en las zonas no tan cálidas es cultivada como planta anual. La planta es de tipo crecimiento indeterminado, con tallo erguido y ramificado, recubierto en su totalidad por vellosidades, alguna de las cuales son glandulares con sustancias de olor muy característico. Las hojas son alternas y compuestas, con margen dentado, y están recubiertas de las mismas vellosidades que el tallo. Posee una raíz pivotante de una estructura muy ramificada. Las flores producen unas bayas globosas y carnosas de color rojo y forma variada, cuando los frutos se agrandan llegan a quebrar la planta. Las semillas están inmersas en una pulpa bastante líquida de agradable sabor. En todas las especies salvajes los frutos son muy pequeños (Warnock, 1988).

2.1.1 Cultivo del tomate

En la actualidad, el tomate es una de las hortalizas de mayor producción a nivel mundial, que año tras año ha incrementado su producción siendo la mayor en el año 2017, con 182 millones de t en un área de 4.782,753 ha alrededor del mundo (FAO, 2019). Para el año 2017, en Colombia se produjeron 347.000 t, de las cuales 244 mil provinieron de invernadero, alcanzando rendimientos promedio de 78 t. ha⁻¹ posicionando al tomate como el primer producto hortícola nacional (AGRONET, 2018); siendo Norte de Santander el principal departamento productor con 119.787 t, seguido por Antioquia con 47.110 t, Boyacá con 46.638 t, Santander con 42.924 t y Cundinamarca con 26.851 t.

Adicionalmente, el cultivo de tomate es altamente intensivo en el uso de mano de obra, por lo que representa una importante fuente de empleo en el país. El sector hortofrutícola es uno de los mayores aportantes, generando 527 mil empleos directos (21% del empleo en sector agrícola) para el año 2016 (MinAgricultura, 2017).

2.1.2 Marchitamiento vascular del tomate

El carácter cosmopolita de la planta de tomate hace que se encuentre expuesta a una gran diversidad de agentes patógenos, muchos de los cuales se hospedan en el suelo y causan importantes limitaciones en la producción del cultivo. Algunos de los patógenos del suelo más importantes que afectan el cultivo de tomate son *Verticillium dahliae* (Liu *et al.*, 2013; Klosterman *et al.*, 2011a), *Rhizoctonia solani* (Misawa y Kuninaga, 2010), *Ralstonia solanacearum* (Tans-Kersten *et al.*, 2004), además de, los nemátodos: *Meloidogyne* spp. (Desaeger *et al.*, 2017) y *Fusarium oxysporum* que se considera uno de los diez patógenos fúngicos más importantes en la agricultura a nivel mundial (Dean *et al.*, 2012).

Fusarium oxysporum es un hongo ampliamente distribuido en el mundo, formando un complejo de variantes (*formae speciales*) de acuerdo con su capacidad de infectar determinados hospederos. En plantas, más de 120 especies (ff. spp.) han sido descritas ocasionando marchitez vascular y pudriciones en las raíces (Dean *et al.*, 2012).

En tomate, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Forl) y *F. oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* (Forl), causan marchitez vascular y pudrición de la corona respectivamente, ocasionando importantes pérdidas económicas en los cultivos (Solanki *et al.*, 2015). El patógeno permanece en el suelo de forma latente mediante sus estructuras de supervivencia (clamidosporas) que pueden sobrevivir hasta por 20 años, y germinan en cercanía de la raíz del hospedero (Dean *et al.*, 2012; Michielse y Rep, 2009; Di Pietro *et al.*, 2003)

2.2 Estrategias de manejo de *Fusarium oxysporum*

El control de los patógenos del suelo tiene implicaciones complejas, por lo cual, el uso de fumigantes y fungicidas de síntesis química es la principal estrategia utilizada por los productores en Colombia; con un promedio de uso de plaguicidas químicos para el año 2015 fue de 14.7 kg. ha⁻¹. Esta cifra posiciona a Colombia como el tercer país del mundo en consumo de plaguicidas, con un uso varias veces mayor al del promedio mundial para la producción agrícola, que se encuentra en 3.9 kg. ha⁻¹ (MinAgricultura, 2017).

La falta de implementación de prácticas integradas de manejo de plagas del cultivo, hace que el uso de los plaguicidas de síntesis química como único recurso, desencadene la presencia de residuos de sustancias nocivas para la salud de los consumidores en el fruto de tomate (USDA, 2014) y favorezca la aparición de microorganismos resistentes por el uso continuo de las mismas moléculas activas, haciendo más difícil su manejo (Rubio-Reque et al., 2008; Gisi y Cohen, 1996). En Colombia se ha reportado la presencia de residuos de 30 sustancias activas de plaguicidas (organoclorados y organofosforados) que sobrepasan los límites permitidos en tomates frescos, colectados en mercados para consumo, de las cuales tres están prohibidas por las autoridades reguladoras como el heptacloro, aldrin y clordano (Gutiérrez y Londoño, 2009; Castro et al., 2004). Así mismo, Arias et al., (2014) encontraron trazas de 15 plaguicidas en suelos de cultivos de tomate en invernadero y a campo abierto.

En este contexto, los riesgos asociados a la salud, contaminación ambiental y costos en aplicaciones, disminuyen la viabilidad de los métodos químicos de control (USDA, 2014; Mandal et al., 2009).

2.2.1 Bioplaguicidas como estrategia de mitigación

Los bioplaguicidas se definen como productos naturales (sustancias derivadas de microorganismos, de plantas superiores y de animales), microorganismos (bacterias, hongos, nemátodos y protozoos) y virus, que podrían ayudar a reducir el impacto negativo de los agentes sintéticos utilizados para el manejo de las plagas que atacan un cultivo. Estos bioplaguicidas no generan residuos tóxicos, tampoco favorecen el desarrollo de resistencia por parte de los fitófagos y fitopatógenos y no producen contaminación ambiental por ser biodegradables y menos tóxicos para el ambiente (Yoon *et al.*, 2013; Copping y Menn, 2000).

En este contexto otros autores usan la palabra elicitor, para referirse a componentes de origen biológico, derivados de plantas o microorganismos e incluyen también algunas sustancias que pueden ser generadas sintéticamente y que inducen un tipo de respuesta principalmente de resistencia (Walters *et al.*, 2013).

Entre los bioplaguicidas más ampliamente usados se encuentran especies del género *Trichoderma*, los cuales son habitantes del suelo. El uso frecuente de este hongo se relaciona con su capacidad antagónica que implica mecanismos como micoparasitismo, competición, antibiosis, producción de metabolitos inhibidores de crecimiento de patógenos y promoción de crecimiento de la planta. Sin embargo, en los últimos años se ha incrementado su uso al demostrarse la capacidad de inducción de resistencia sobre diversas especies de plantas cultivadas (Howell, 2003; Van Wees *et al.*, 2008; Walters *et al.*, 2013; Sánchez *et al.*, 2015).

Se considera que *Trichoderma* spp., liberan al menos tres tipos de elicitores que interactúan con las plantas en el proceso de colonización: enzimas o péptidos, proteínas Avr y oligosacáridos de bajo peso molecular que son secretados por

acción enzimática sobre las paredes celulares del hongo o de las plantas (Woo *et al.*, 2006).

2.3 Marco legal

Con la constitución política colombiana de 1991, se constituye la legislación ambiental aplicable al subsector hortofrutícola con el fin de establecer las directrices y acciones de seguimiento y control ambiental por parte de los productores, la comunidad y las autoridades ambientales. A partir de esto, y con base en la Guía Ambiental Hortofrutícola de Colombia creada por el Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial (MAVDT, 2009), a continuación, se expondrán las principales normas y leyes que deben ser tenidas en cuenta para la presente investigación.

De esta forma, el decreto 1449 de 1977 - Artículo 2, exige que se deben implementar las normas que establece el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) para proteger la calidad de los recursos, en materia de aplicación de productos agroquímicos y su manipulación (MinAmbiente, 2022).

A su vez, la resolución 693 de 2007 - Artículo 7, invita a seguir las instrucciones de manejo seguro de los plaguicidas y residuos peligrosos suministradas por el fabricante o importador, en las etiquetas de los productos. **Al mismo tiempo, ratifica la necesidad de realizar la práctica de triple lavado a los envases que hayan estado en contacto con plaguicidas y entregar los residuos, al mecanismo de devolución que el fabricante o importador haya establecido** (MAVDT, 2007).

Finalmente, mediante el decreto 1843 de 1991 – Artículo 63, se establece que la distribución y expendio de productos clasificados dentro de las categorías I y II “extremadamente y altamente tóxicos”, excepto rodenticidas para uso casero, tienen prescripción de ingeniero agrónomo, médico veterinario u otro

profesional capacitado en las áreas agropecuarias o de salud. Igualmente, el decreto recalca la utilización de técnicas que prevengan los riesgos ambientales de la aplicación de plaguicidas, así como pide respetar las franjas de seguridad para la aplicación de estos. Las cuales exigen no menos de 10 metros en aplicación terrestre y 100 metros en aplicación aérea en relación a cuerpos o cursos de agua, población humana y animal, carreteras troncales o cualquier otra área que requiera protección especial (ICA, 2015).

Por otra parte, sobre la base de las facultades legales que conserva el ICA, en virtud de la Resolución 68370 de 2020 “se establecen los requisitos para el registro de productor, productor por contrato, envasador, importador y departamentos técnicos de ensayos de eficacia agronómica de bioinsumos para uso agrícola; así como los requisitos para el registro de Bioinsumos para uso agrícola” (ICA, 2020). Es decir, se indican los términos de la solicitud de registro y los documentos que deben ser presentados por las personas naturales o jurídicas que deseen registrar productos clasificados como bioinsumos o produzcan, envasen, importen y/o ejecuten ensayos de eficacia agronómica de bioinsumos para uso agrícola dentro del territorio nacional, garantizando así el control efectivo del sector de bioinsumos para uso agrícola en el país.

Resoluciones del Instituto Colombiano Agropecuario

Ley 9 de 1979: de las sustancias peligrosas -plaguicidas- artículos pirotécnicos (ICA, 1979).

Artículo 130º.- En la importación, fabricación, almacenamiento, transporte, comercio, manejo o disposición de sustancias peligrosas deberán tomarse todas las medidas y precauciones necesarias para prevenir daños a la salud humana, animal o al ambiente, de acuerdo con la reglamentación del Ministerio de Salud.

Artículo 136º.- El Ministerio de Salud establecerá las normas para la protección de la salud y la seguridad de las personas contra los riesgos que se deriven de la fabricación, almacenamiento, transporte, comercio, uso o disposición de plaguicidas.

Artículo 138º.- El registro que aprobare el Ministerio de Salud para plaguicidas destinados a uso agropecuario no exime a los interesados del cumplimiento de las disposiciones que para tales productos tengan establecidas las autoridades de agricultura.

Artículo 139º.- El Ministerio de Salud podrá realizar la importación o fabricación de muestras de plaguicidas para fines de investigación, experimentación o registro. Cuando la experimentación con estos productos pueda causar daño a la salud de los trabajadores, de la población o del ambiente tal actividad debe someterse a la vigilancia de las autoridades de salud, las cuales exigirán la adopción de las medidas necesarias para prevenir o remediar tales daños.

Artículo 144º.- Los residuos procedentes de establecimientos donde se fabriquen, formulen, envasen o manipulen plaguicidas, así como los procedentes de operaciones de aplicación no deberán ser vertidos directamente a cursos o reservorios de agua, al suelo o al aire.

Ministerio de salud decreto 775 del 16 de abril de 1990: Por el cual se reglamentan parcialmente los Títulos III, V, VI, VII y XI de la Ley 09 de 1979, sobre uso y manejo de plaguicidas (MinSalud, sf).

Artículo 1º Del objeto del control y vigilancia epidemiológica. El control y la vigilancia epidemiológica en el uso y manejo de plaguicidas, deberá efectuarse con el objeto de evitar que afecten la salud de la comunidad, la sanidad animal y vegetal o causen deterioro del ambiente.

Artículo 2° Régimen aplicable al uso y manejo de plaguicidas. El uso y manejo de plaguicidas estarán sujetos a las disposiciones contenidas en la Ley 09 de 1979, el Decreto 2811 de 1974, Reglamento Sanitario Internacional, las demás normas complementarias previstas en el presente Decreto y las que dicten los Ministerios de Salud y de Agricultura o sus institutos adscritos (MinSalud, sf).

Decreto 1376 de 2013: El cual reglamenta el permiso de recolección de especímenes de especies silvestres de la diversidad biológica con fines de investigación científica no comercial. En este decreto se toma espécimen de especie silvestre como: organismo silvestre de la diversidad biológica vivo o muerto o sus productos, partes, en adelante. Para su recolección es importante la referencia de información básica inherente a los especímenes como la taxonomía, localidad de colecta, fecha de colecta y colector, entre otras. También se dictan disposiciones acerca de las Instituciones Nacionales de Investigación entre las cuales están las Instituciones de educación superior (MinAmbiente, 2013).

3 METODOLOGÍA

3.1 Área de estudio

El presente proyecto de investigación se lleva a cabo en el municipio de Pamplona, ubicado en el departamento de Norte de Santander Colombia. Municipio cuya actividad económica se sustenta en su mayoría en actividades agrícolas.

La finca “Las Plazuelas” (Figura 1) está ubicada en la vereda Chichira en el municipio de Pamplona, esta cuenta con 60 ha, las cuales están dispuestas para la actividad agrícola, piscícola y ganadera. Actualmente, cuenta con cultivos de tomate cherry, fresa, cebolla y papa.

Los proyectos agrícolas son realizados en asociación comunitaria con la Asociación de productores agropecuarios de Pamplona (ASPAGRO) y estos están destinados al consumo de familias y de la sociedad Pamplonesa en general. La producción de tomate cherry se realiza bajo invernaderos y se producen anualmente un promedio de tres toneladas.

Fuente: miParamo

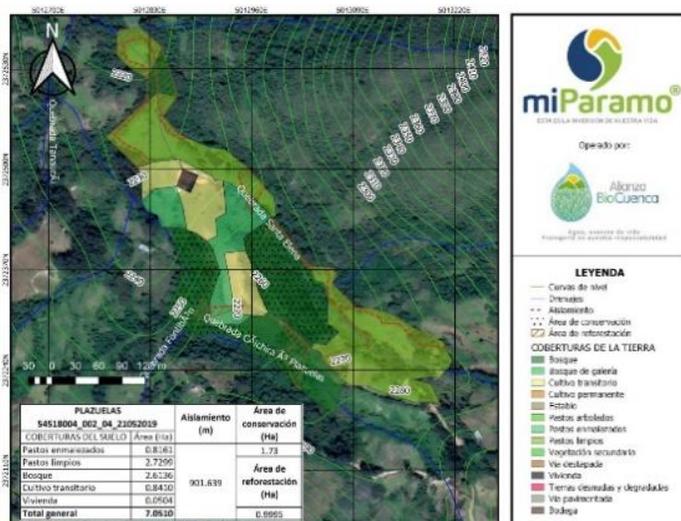


Figura 1: Finca las Plazuelas: extensión y delimitación por actividades

3.2 Aislamiento del fitopatógeno

Se realizó el muestreo en los cultivos de tomate cherry emplazados en la finca las Plazuelas, teniendo en cuenta los indicios de sintomatología en las plantas proporcionado por los cultivadores. Cada uno de los cultivos se recorrió en su totalidad, en busca de plantas expresando síntomas de marchitez general, amarillamiento y necrosis vascular.

Se realizó una inspección visual total del cultivo recorriéndolo e identificando las plantas sintomáticas con amarillamiento y marchitez. Las plantas identificadas, fueron cortadas transversalmente en el tallo, a 30 cm de la corona y se verificó la coloración marrón característica de la marchitez vascular. Las herramientas usadas fueron desinfectadas luego de cada muestreo, usando etanol al 70%. Cada planta fue extraída cuidadosamente con tallo y raíz; y depositada en bolsas de papel, previamente esterilizadas y luego en bolsas plásticas debidamente rotuladas.

Las muestras se almacenaron y trasladaron en refrigeración, hasta el laboratorio de investigación del grupo SIMBIO (Semillero de Investigación en Microbiología y Biotecnología) de la Universidad de Pamplona; para su procesamiento.

Desinfección.

El material vegetal obtenido en campo y trasladado hasta el laboratorio, fue agitado cuidadosamente para descartar la mayor cantidad posible de suelo adherido a las raíces. Posteriormente, las raíces y tallos fueron lavados superficialmente con agua potable. Usando unas tijeras podadoras limpias y desinfectadas con etanol al 70%, se recortaron y descartaron todas las raíces secundarias de la planta, dejando únicamente el tallo y la raíz principal.

Aislamiento y purificación.

Previamente, se elaboró medio de cultivo PDA (Agar papa dextrosa) adicionado con 0.01% de cloranfenicol para evitar el crecimiento de bacterias y 0.1% de tritón para restringir la velocidad de crecimiento de las colonias de hongos endófitos. Después de la desinfección de material traído de campo, se separaron a la altura de la corona de la planta, una sección de tallo y otra de raíz. Cada sección se procesó de forma independiente, ya que la abundancia fúngica presente en el suelo puede arrojar ciertas poblaciones en la raíz y otras poblaciones diferentes en lo alto del interior del tallo.

Las secciones fueron cortadas de forma transversal, en segmentos de 1 cm de longitud, con el uso de una pinza estéril, se sembraron los segmentos en agar PDA en orden ascendente en el caso del tallo y descendente en el caso de la raíz (cada sección en cajas separadas) con el fin de determinar la altura a la cual se encontraba avanzando la infección. Las cajas de Petri fueron selladas y rotuladas, y se incubaron a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ en condiciones de luz constante.

Aproximadamente tres días después del proceso de aislamiento, se tomó una muestra de micelio aéreo en crecimiento sobre el tejido y se sembró en una nueva caja de Petri conteniendo medio de cultivo PDA + cloranfenicol. Las nuevas cajas fueron incubadas en iguales condiciones a las anteriormente descritas. En caso de presencia de otros hongos contaminantes, se realizaron sucesivos pases hasta obtener cultivos axénicos. Posteriormente los aislados fueron conservados en glicerol al 20 % a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$

3.3 Identificación fenotípica y genotípica del fitopatógeno aislado.

3.3.1 Identificación fenotípica presuntiva.

A partir de los aislados obtenidos en la etapa anterior se procedió a realizar la identificación fenotípica de cada uno de los aislados fúngicos tanto microscópicamente como macroscópicamente

3.3.1.1 *Descripción macroscópica*

Se procedió a describir macroscópicamente cada una de las cepas aisladas y purificadas en cada uno de los muestreos, determinándose las características de color, textura, tamaño, borde, elevación, diámetro y luz transmitida.

3.3.1.2 *Descripción y clasificación presuntiva microscópica*

Para una presunta identificación de los aislados se utilizó el procedimiento propuesto por Watanabe (2010), en el cual, es necesario realizar un repique en agar PDA mediante punción directa sobre el medio de crecimiento, incubándose a 25°C durante 5 días, posteriormente mediante microscopia bajo el método de la impronta con cinta y azul de metileno y se hicieron las respectivas visualizaciones (40x-100x) para la determinación de estructuras fúngicas, de esta forma fue posible una previa identificación.

Los aislados fueron identificados utilizando la clave taxonómica descrita por Pitt y Hocking, la cual propone una identificación basada en aspectos microscópicos que permiten la identificación de las formas reproductivas y vegetativas. A partir de los aislados obtenidos y conservados se procedió a realizar una siembra por punción sobre agar CYA y MEA, se efectuaron tres punciones simétricas en cada caja de Petri, seguidamente se incubó bajo tres temperaturas, 5°C, 25°C y 37°C, e incubándose durante 7 días, durante el transcurso de este periodo se realizaron mediciones a los diámetros de cada aislado en los días 4° y 7°.

Finalmente, a partir de los cultivos obtenidos, se procedió a la descripción e identificación microscópica, mediante la observación de las estructuras reproductivas y vegetativas con la ayuda de un microscopio óptico.

3.3.2 *Identificación genotípica*

La caracterización genotípica se llevará a cabo mediante análisis de las secuencias de ADN correspondiente a las regiones ITS, respectivas a los géneros de los organismos aislados. Para lo anterior, las cepas serán analizadas en el

laboratorio de genética y biología molecular de la Universidad de Pamplona y procesadas según el método descrito a continuación.

3.3.2.1 Extracción y cuantificación del ADN

La extracción de ADN se realizará utilizando el kit comercial marca Zymo research® (<https://zymoresearch.eu/>), siguiendo las indicaciones del fabricante. La cuantificación del ADN se realizará utilizando el equipo Nanodrop 2000 y se determinará la concentración de ADN en ng/μL y las relaciones entre las densidades ópticas medidas a 260nm/280nm y 260nm/230nm.

3.3.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés)

La reacción de amplificación se configurará utilizando el sistema MyTaq™ Red Mix (Bioline) siguiendo las indicaciones del fabricante y usando 50 ng de ADN molde en la reacción. La mezcla será sometida a 35 ciclos según se describe en la tabla 1, usando para ello un termociclador ProFlex™ 3x32-Well (Applied Biosystems® <https://www.thermofisher.com/co/en/home/brands/applied-biosystems.html>), con los primer correspondientes a cada marcador: Como control negativo se configurará una reacción sin ADN molde. Todo este anterior proceso y los cebadores (primers) a utilizar van a depender de los organismos aislados durante el procesamiento de las muestras.

Tabla 1: Programación PCR.

Paso	Temperatura °C	Tiempo	Repeticiones
Desnaturalización inicial	94	2:00	1
Desnaturalización	94	0:30	35
Alineamiento	60	0:30	
Elongación	72	0:30	
Elongación final	72	10:00	1
Terminación	4	-	1

Fuente: Elaboración según método

3.3.2.3 Secuenciación de fragmentos mediante el método de Sanger (Sanger, 1974)

Para llevar a cabo el proceso de secuenciación de fragmentos, siguiendo la metodología de Sanger inicialmente se realizó una purificación con la enzima Exosap (Exonucleasa 1 + fosfatasa alcalina) la cual permitió eliminar grupos fosfato de DNTP y cadenas sencillas de cebadores (primers); para este proceso se seguirán las indicaciones del fabricante.

Posterior a esto, se realizó la reacción cíclica de secuencia (amplificación y marcaje con DNTP fluoromarcados) con el kit Bigdye Terminator versión 3.1. siguiendo las indicaciones del fabricante y se utilizó como molde el primer F del cebador para las regiones previamente amplificada (ITS1).

Finalmente, se realizó la purificación del producto de secuencia con el kit BigDye Xterminator (marca Applied Biosystems <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4376486>), el cual permitió eliminar iones salinos, DNTP fluoromarcados y estabilizar la reacción de secuencia. De igual forma se siguieron las recomendaciones del fabricante.

Los productos fueron corridos en el equipo Secuenciador ABI 3500, de la marca Applied Biosystems, a través del programa Data Collection software 3 y finalmente visualizados en el programa Sequencing Analysis versión 5.4, el cual permitió evaluar los datos crudos (Raw view), los valores de probabilidad de asignación de bases (Quality Value) y el electroferograma, el cual permite graficar las fluorescencias normalizadas de los datos analizados.

3.3.2.4 Análisis Bioinformático

Para el análisis orientado a conseguir la identificación a nivel de especie, cada cepa se sometió al protocolo de identificación molecular; para esto, los electroferogramas resultantes de la secuenciación fueron transcritos a secuencias FASTA empleando el programa Chromas versión 2.6.6 (<https://chromas.software.informer.com/2.6/>), posteriormente, se recortaron las

secuencias ITS, y otros, a la longitud correspondiente a cada uno de los loci del código de barras de referencia establecidos. Una vez obtenidas las secuencias recortadas se procedió a realizar un análisis de similitudes entre las cepas de consulta y las cepas de referencia disponibles en las bases de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y el MycoBank (<https://www.mycobank.org/>); para comprobar el género, la similitud máxima de ITS debe ser \geq 76% y la especie se determinó con una similitud máxima para *tef1* del 97% y para *rpb2* del 99% frente a las secuencias de referencia.

3.3.2.5 Análisis Filogenético

Se ejecutaron análisis filogenéticos por separado para las secuencias de acuerdo a los análisis realizados a cada cepa, mediante el programa MEGA X (Kumar et al., 2018) con los métodos de máxima verosimilitud, máxima parsimonia y Neighbor Joining con 5.000 réplicas de bootstrap, ubicando las secuencias de consulta y las secuencias de referencia más similares (Dou et al., 2020).

3.4 Aislamiento e identificación del microorganismo biocontrolador.

Con el objetivo de aislar cepas nativas de *Trichoderma* spp. se extrajeron muestras de suelo de la finca “Las Plazuelas”. Con la ayuda de una barra y una pala limpias, a una profundidad de 10-20 cm, se procedió a tomar submuestras de suelo, las que fueron depositadas en un recipiente plástico limpio para formar así una muestra completa. A continuación, se tomó 500 g de suelo, que fueron colocados en fundas plásticas y etiquetados debidamente para su respectivo procesamiento.

3.4.1 Aislamiento y purificación de las cepas de *Trichoderma* spp.

De cada muestra se tomaron 5 g de suelo que fueron colocados en fundas estériles con 50 ml de solución de cloruro de sodio al 1%. Se agitaron manualmente por 15 minutos. De cada muestra se procedió a tomar 100 μ l y se inocularon en

cajas Petri con medio Agar Sabouraud Dextrosa. Las cajas fueron selladas con parafilm e incubadas a 25°C durante 7 días o hasta que aparecieron las colonias de *Trichoderma*. Para la purificación las colonias identificadas como *Trichoderma* se realizó transferencia directa a cajas Petri con medio PDA.

3.4.1.1 Mantenimiento de cepas de *Trichoderma* spp.

Para el mantenimiento de las cepas éstas fueron transferidas a tubos con medio PDA. Los tubos fueron sellados con para film e incubados a 25°C durante 2 a 3 días o hasta observar la aparición de micelio y esporas. Se añadió a los tubos de glicerol, los mismos que fueron sellados y colocados en refrigeración.

3.4.2 Identificación fenotípica y genotípica de los aislados

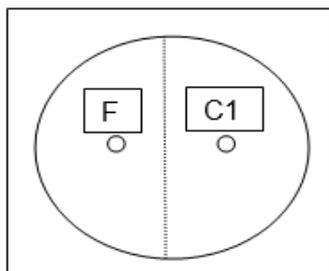
La identificación de los aislados se realizó mediante reconocimiento de crecimiento de estructuras microscópicas (hifas, esporas y clamidosporas) y macroscópicas (color de micelio, forma de micelio y crecimiento). Las características macro y microscópicas fueron cotejadas con las claves de identificación de Pitt y Hocking. Para la identificación genotípica se procedió según el protocolo antes descrito.

3.5 Confrontación *in vitro* de las cepas de *Trichoderma* spp. vs cepa fitopatógena.

Posterior a la identificación del fitopatógeno y de las cepas nativas de *Trichoderma* spp (cepas biocontroladoras), se procedió a la selección de la cepa con mayor actividad antagónica frente al fitopatógeno aislado. Para evaluar la actividad antagónica, se utilizaron las 5 cepas de *Trichoderma* spp, aisladas e identificadas anteriormente.

Para realizar el enfrentamiento de las cepas de *Trichoderma* spp frente al fitopatógeno se hizo necesario realizar el procedimiento de enfrentamiento dual. Las

pruebas de enfrentamiento se realizaron en Agar Sabouraud Dextrosa (ASD) de OXOID® pH 5,5, colocándose en un extremo de la caja de Petri un disco de Agar de 4 mm de diámetro con micelio del fitopatógeno, y en el extremo opuesto otro disco de 4 mm con micelio de cada una de las cepas de *Trichoderma* sp (nativas y comerciales utilizadas como control de referencia), a una distancia de 5 cm aproximadamente entre ellos (Howell, 2003); posteriormente se incubaron bajo las mismas condiciones del antagonista durante 10 días (Figura 2), haciéndose mediciones del crecimiento radial del micelio de la colonia de los hongos cada 24 horas con ayuda de un pie de rey.



Fuente: Elaboración propia.

Figura 2: Esquema de enfrentamiento dual

*Nota: F: Fitopatógeno, C1: Cepa 1 de *Trichoderma* sp:

Para la evaluación de la capacidad biocontroladora de los microorganismos se empleó la escala utilizada por Ezziyyani (2004), tabla 2 y el cálculo del porcentaje de Inhibición del crecimiento radial (PICR). Este se obtiene a partir del crecimiento de cada patógeno en cultivo dual, junto con sus respectivos testigos, empleando la fórmula utilizada por Suárez et al., (2008):

$$PICR = \frac{R_1 - R_2}{R_1} \times 100$$

Donde R_1 es el radio mayor (radio patógeno-testigo) y R_2 es el radio menor (radio del patógeno en cultivo dual)

Tabla 2: Escala para evaluación de la capacidad antagónica

Grado	Capacidad antagónica	Potencial biocontrolador
0	Ninguna invasión de la superficie de la colonia del hongo patógeno.	Muy malo
1	Invasión de $\frac{1}{4}$ de la superficie de la colonia del hongo patógeno	Malo
2	Invasión de $\frac{1}{2}$ de la superficie de la colonia del hongo patógeno	Deficiente
3	Invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno.	Bueno
4	Invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno esporulación sobre ella.	Muy bueno

Fuente: Ezziyani (2004).

3.6 Masificación del microorganismo biocontrolador y determinación de la concentración conidial.

A partir de la metodología plasmada por Martínez (2007), en 5 cajas de agar de PDA se realizaron repiques de la cepa axénica de *Trichoderma* sp, se llevó a incubación durante 5 días a una temperatura de 25°C. Transcurrido el período de incubación se realizaron raspados sobre el crecimiento en la caja de Petri utilizando como diluyente 2 ml de agua destilada estéril, luego con ayuda de una pipeta Pasteur se tomó una gota del diluido y se determinó la concentración mediante el recuento en cámara de Neubauer de estructuras conidiales estableciendo así la concentración por ml de estructuras reproductivas del hongo.

3.7 Evaluación de la efectividad del biocontrolador

Seleccionada la cepa *Trichoderma* sp C1 por mayor eficiencia y por mayor capacidad de inhibir el crecimiento micelial del fitopatógeno, fue empleada en el

experimento de control de la marchitez vascular (MV) en plantas de tomate cherry, dichas plantas fueron germinadas en abono orgánico previamente esterilizado, bajo condiciones controladas: a una temperatura de 16°C +- 2 °C, a 7.000 lux espectro blanco/azul y riego diario, posteriormente al observar de 3 a 4 hojas verdaderas fueron trasplantadas para la correspondiente inoculación en cada uno de los tratamientos (Tabla 3).

Tabla 3: Tratamientos de inoculación.

Tratamiento	Descripción	Número de plantas
1	Inoculación de las plantas con el fitopatógeno identificado	50 plantas
2	Inoculación de las plantas con el fitopatógeno identificado + la cepa de <i>Trichoderma</i> sp. seleccionada.	50 plantas
3	Inoculación de las plantas con el fitopatógeno + una cepa comercial de <i>Trichoderma</i> sp.	50 plantas

Fuente: Elaboración propia.

La inoculación en cada uno de los tratamientos se llevó a cabo, mediante aspersión sobre la rizósfera de las plantas. La cepa de *Trichoderma* sp comercial utilizada en el tratamiento 3 corresponde a biofungicida *Trichoderma* WP, como agente activo: *Trichoderma* spp, a una concentración de 1×10^8 esporas/g.

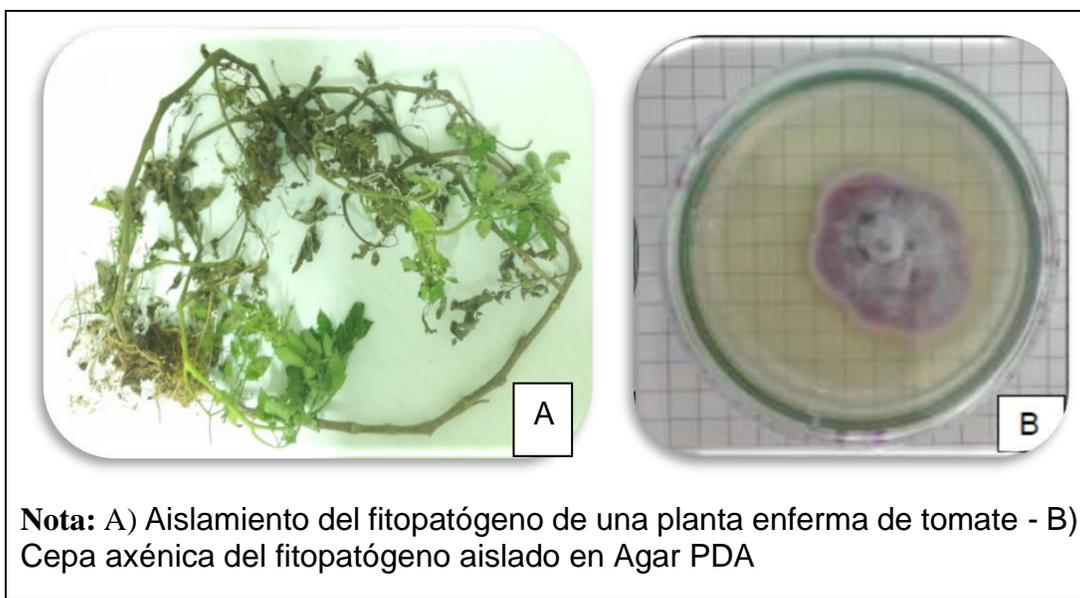
Posterior a la inoculación, cada 5 días se procedió a la evaluación visual de las características externas de cada una de las plantas, en cada tratamiento realizado. Transcurridos 45 días después de la inoculación, fue realizado un muestreo destructivo donde las plantas fueron extraídas cuidadosamente y lavadas sus raíces para retirar restos del sustrato; luego rotuladas y llevadas al laboratorio de microbiología de la Universidad de Pamplona, donde con un bisturí se hicieron cortes longitudinales de los tallos y raíces, finalmente, las plantas que presentaron síntomas de marchitamiento fueron llevadas a cámaras húmedas durante 72

horas para realizar un aislamiento del fitopatógeno y comprobar el postulado de Koch.

4 RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Aislamiento del fitopatógeno

En la Figura 3, se muestra una planta que presentó marchitamiento y podredumbre casi en su totalidad, adicionalmente se puede observar crecimiento micelial blanquecino en la raíz, lo que facilitó el aislamiento del fitopatógeno teniendo en cuenta las características propias de la enfermedad.



Fuente: elaboración propia

Figura 3: Aislamiento del fitopatógeno de una planta enferma de tomate cherry.

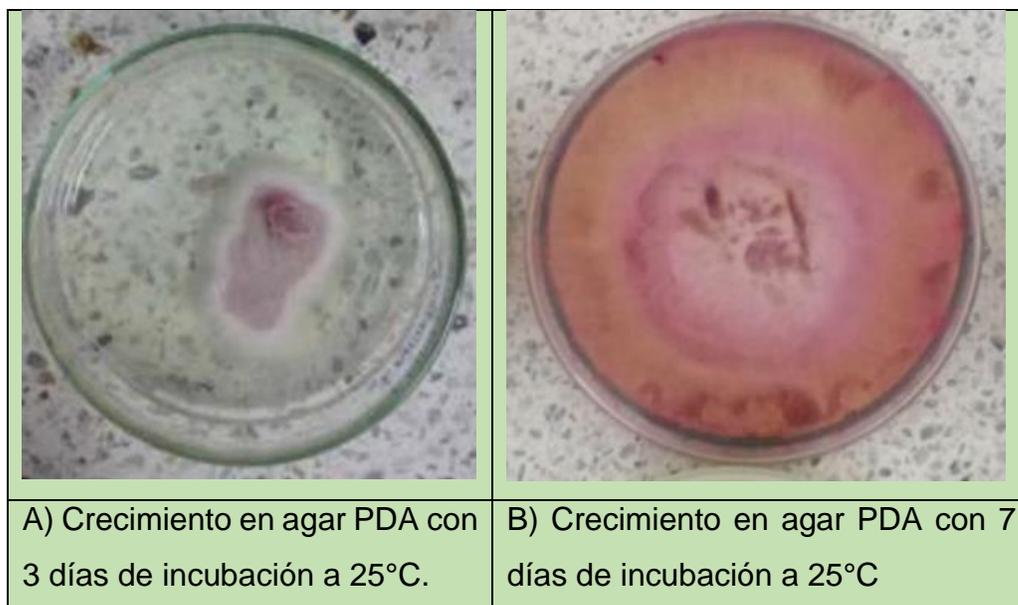
En la Figura 3B se puede observar el crecimiento axénico de la cepa aislada en agar PDA, transcurridos 3 días de incubación a 25°C, la cual presentó pigmentación morada, con bordes irregulares blancos y centro protuberante.

4.2 Identificación fenotípica presuntiva del aislado

4.2.1 Descripción macroscópica

En la Figura 4, se pueden apreciar colonias axénicas cultivadas en PDA del hongo aislado a partir de las plantas de tomate cherry. Se destaca que a los 3 días de incubación a 25°C las colonias adquirieron un color morado con bordes externos blancos, centros protuberantes, textura dura aterciopelada y crecimiento lento.

Sin embargo, transcurridos siete días de incubación bajo las mismas condiciones (Figura 4) el crecimiento fue acelerado, cubriendo en su totalidad de manera micelial el diámetro de la caja de Petri.

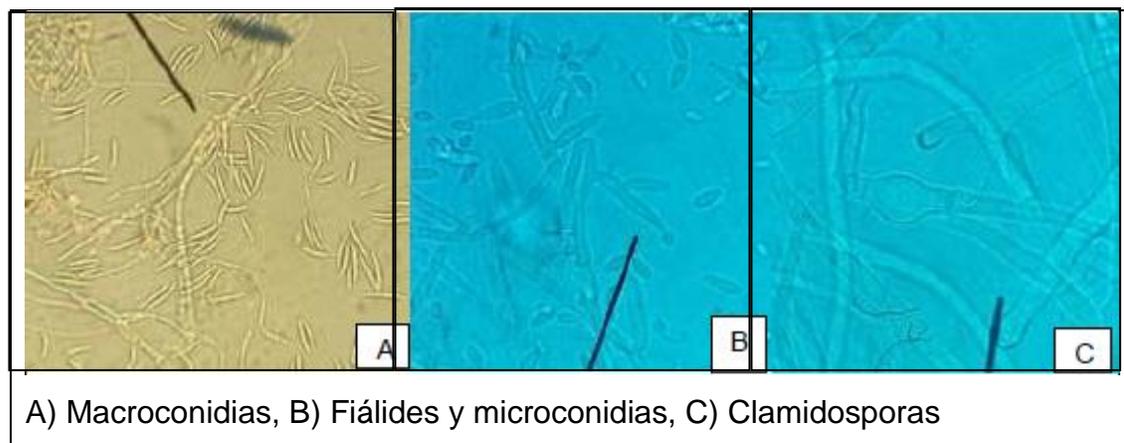


Fuente: Elaboración propia

Figura 4: Vista macroscópica del fitopatógeno aislado a los 3 días (A) y a los 7 días de incubación 25°C en PDA (B) respectivamente.

4.2.2 Descripción microscópica

En la Figura 5, se pueden apreciar estructuras reproductivas obtenidas bajo microscopia a 40 x y 100 x como: La fiálide generalmente fina, en forma de botella; simple y ramificada; en su mayoría cortas y pocas largas; monofialídica (que emergen esporas de un poro de la fiálide). Las macroconidias presentan forma de medialuna, hialinas y septadas. Las microconidias son ovoides. De igual forma, pueden observarse las clamidosporas características con pared gruesa y lisa; de manera aislada, teniendo en cuenta las claves taxonómicas descritas por Pitt y Hocking; coinciden y son propias del género *Fusarium* spp.



Fuente; Elaboración propia

Figura 5: Vista microscópica de las diferentes estructuras microscópicas de *Fusarium* sp 40 x (A – B) y 100 x (C)

4.3 Identificación genotípica del aislado.

De las muestras de tejido vegetal provenientes del cultivo del tomate cherry de la Finca las Plazuelas, se obtuvieron cuatro aislamientos del género *Fusarium*. La caracterización molecular de los cuatro aislamientos, permitió identificar a *Fusarium oxysporum* (Tabla 4) como el causante de la marchitez en las plantas de tomate cherry con un porcentaje de similitud (según NCBI) del 99,32%; incluyendo:

código de los aislados, longitud de las secuencias de los marcadores moleculares (ITS y EF1) y resultados de las búsquedas en la base de datos NCBI.

Los ensayos de PCR con los marcadores ITS y EF1, asociados a la marchitez del tomate cherry, confirmaron la presencia de *Fusarium* en los aislamientos patogénicos. La amplificación de la banda para cada primer utilizado fue la esperada. Para el primer par de primers ITS1-ITS4 amplificó a 514 pb y para los primers EF 1 se produjo un fragmento esperado de 798 pb; y la comparación entre las secuencias obtenidas para el aislamiento con las secuencias almacenadas en la base de datos GenBank, procesados con la herramienta informática BLAST permitió determinar la presencia de *Fusarium* en el cultivo de tomate cherry; ahora bien, teniendo en cuenta la base de datos de la NCBI se obtuvo como resultado un porcentaje de identidad del 99,32 para *Fusarium oxysporum*.

Tabla 4: Identificación molecular

AISLAMIENTO		Fr
ITS- Longitud de la secuencia		514 pb
Resultados ITS hongos y material de referencia NCBI	Microorganismo.	<i>Fusarium oxysporum</i>
	% Identidad	100- 100
	% Cobertura	100- 91
EF1- Longitud de la secuencia		798 pb
Resultados nr/nt NCBI	Microorganismo	<i>Fusarium oxysporum</i>
	% Identidad	99, 32
	% Cobertura	100
CONCLUSIÓN	Género	<i>Fusarium</i>
	Especie	<i>oxysporum</i>

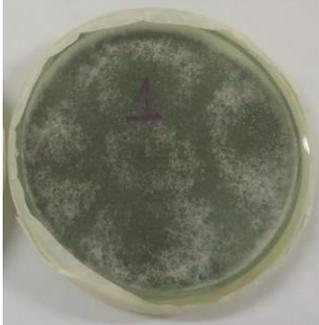
Fuente: Elaboración propia

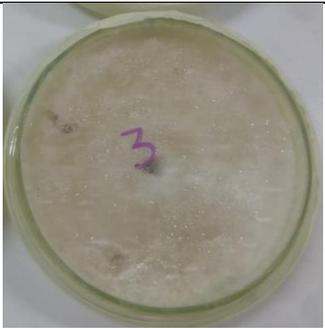
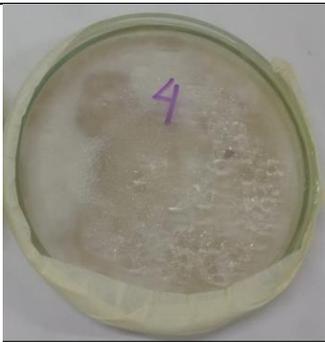
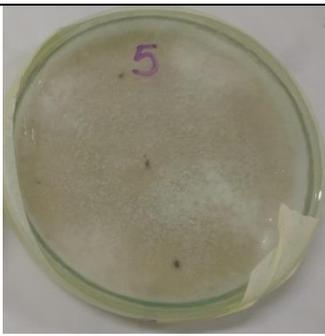
En el muestreo realizado a las plantas tomate cherry con síntomas de enfermedad que incluían marchitamiento, podredumbre y decoloración, fue posible obtener como resultado el aislamiento de un fitopatógeno, el cual, según la identificación fenotípica y genotípica corresponde a *Fusarium oxysporum*, como ha sido también reportado por Srinivas et al. (2019). *Fusarium oxysporum* es el patógeno contribuyente significativo de la marchitez vascular del tomate, causando síntomas en raíces, tallos y hojas, tales como pudriciones radicales, pudriciones secas, necrosis del tallo y de las hojas, marchitez y defoliaciones.

4.4 Aislamiento del microorganismo biocontrolador.

Teniendo en cuenta, la clave taxonómica, se identificaron 5 aislados con características macroscópicas y microscópicas específicas de especies pertenecientes al género *Trichoderma*, las cuales se observan en la Tabla 5, se evidencia diferencia en sus características macroscópicas en cada uno de los aislados.

Tabla 5: Características generales de las cepas nativas de *Trichoderma* spp. Aisladas de suelos destinados para actividades agrícolas

Cepas Código	Crecimiento en agar PDA/ 25°C- 7 Días.	Descripción
C1		La coloración del micelio es verde, presentando un rápido crecimiento y abundantes esporas transcurridos 5 días de incubación a 25°C.

C2		Presentó una coloración verde con micelio esporulado blanquecino, tornándose a color naranja transcurridos siete días de incubación a 25°C.
C3		El color del micelio es blanco transcurridos 5 días de incubación, presentado crecimiento acelerado y un leve viraje en su coloración a amarillo en la parte central.
C4		El color del micelio es blanco, sin cambio en la coloración durante la esporulación.
C5		El color del micelio es blanco transcurridos 5 días de incubación en agar PDA a 25°C, presentando un crecimiento rápido, posterior a este periodo se pudo apreciar un ligero color verde oscuro después de la esporulación.

Fuente: Elaboración propia

Las especies del género *Trichoderma* se caracterizan por ser una microbiota fúngica de amplia distribución en los suelos, en especial en los suelos con fines

agrícolas, por ello el aislamiento de este tipo de hongo es relativamente fácil y de gran aplicación por su capacidad biocontroladora sobre diversos fitopatógenos como ha sido reportado por Samaniego F Luz, en el 2018.

Ahora bien, según lo establecido por Kredics et al. 2014, estos hongos, con uso potencial para la agricultura, se pueden encontrar en el suelo, madera en descomposición y material vegetal y existe amplia diversidad dentro y entre especies.

4.5 Confrontación *in vitro* de las cepas de *Trichoderma* spp. vs cepa fitopatógena.

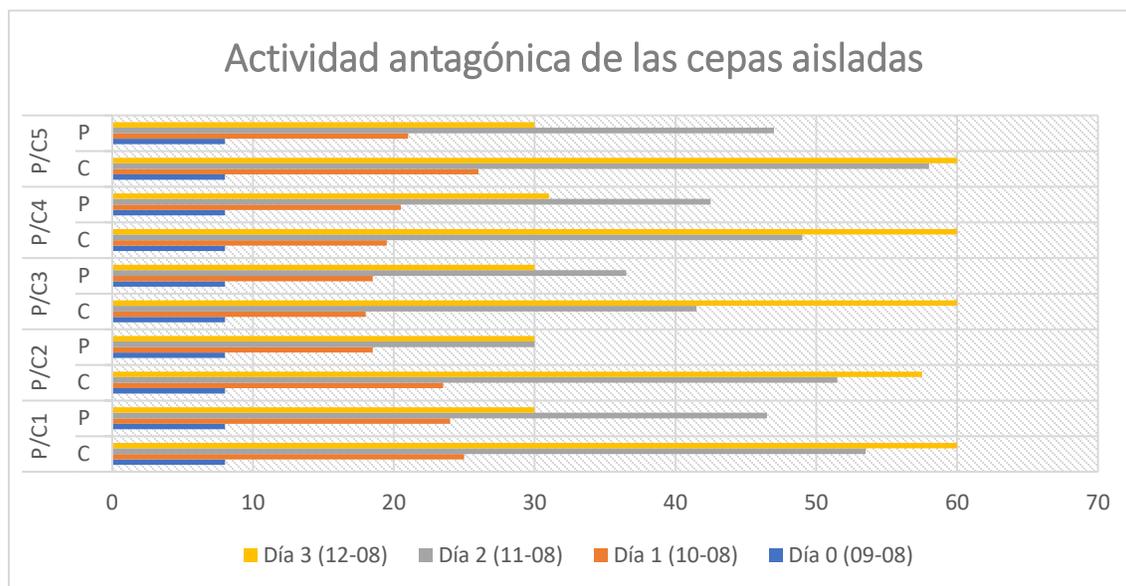
Se obtuvieron los porcentajes de inhibición de crecimiento radial (PICR) de las colonias de *Fusarium* spp frente a los aislados de *Trichoderma* spp, (Tabla 6). Los resultados indicaron que todos los aislados redujeron significativamente el tamaño de las colonias del agente fitopatógeno, e invadiendo su área de crecimiento y desarrollo; de manera consistente el aislamiento C1 presentó el PICR más alto (95,33%).

Tabla 6: Porcentaje de Inhibición del crecimiento radial (PICR) de las cepas de *Trichoderma* spp

Cepa	PICR (%)	Grado. Capacidad antagónica según Ezziyyani (2004).	Potencial biocontrolador
C1	95,33	4	Muy bueno
C2	86,66	3	Bueno
C3	50,00	2	Deficiente
C4	58,33	2	Deficiente
C5	93,50	4	Muy bueno

Fuente: Elaboración propia

Adicionalmente, teniendo en cuenta, la medición de los diámetros (Figura 6) se pudo determinar la cepa C1 de *Trichoderma* sp como un biocontrolador con alta capacidad antagónica.



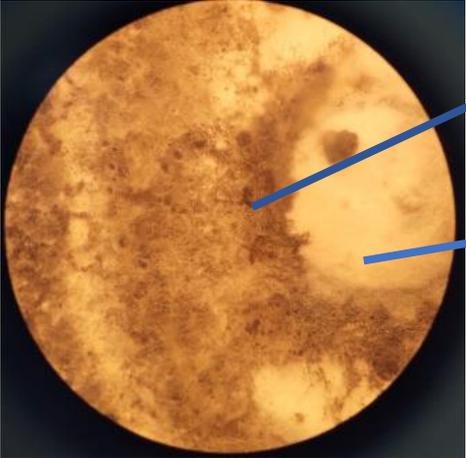
Fuente: Elaboración propia

Figura 6: Actividad antagónica de las cepas de *Trichoderma* spp sobre *Fusarium oxysporum*

El género *Trichoderma* comprende varias especies de hongos filamentosos que han sido usados como agentes de biocontrol en enfermedades de importancia para la agricultura y constituyen una alternativa al control químico (Bhale *et al.*, 2013; Ghazanfar *et al.*, 2018);

La actividad antagónica de las especies de *Trichoderma* involucran mecanismos de acción como micoparasitismo (Tabla 7), antibiosis, competencia por nutrientes, entre otros (Ghazanfar *et al.*, 2018; Mungole y Chaturvedi, 2011). Pudiendo confirmar lo anterior con el estudio realizado por Alfonso Luna, et al. 2019.

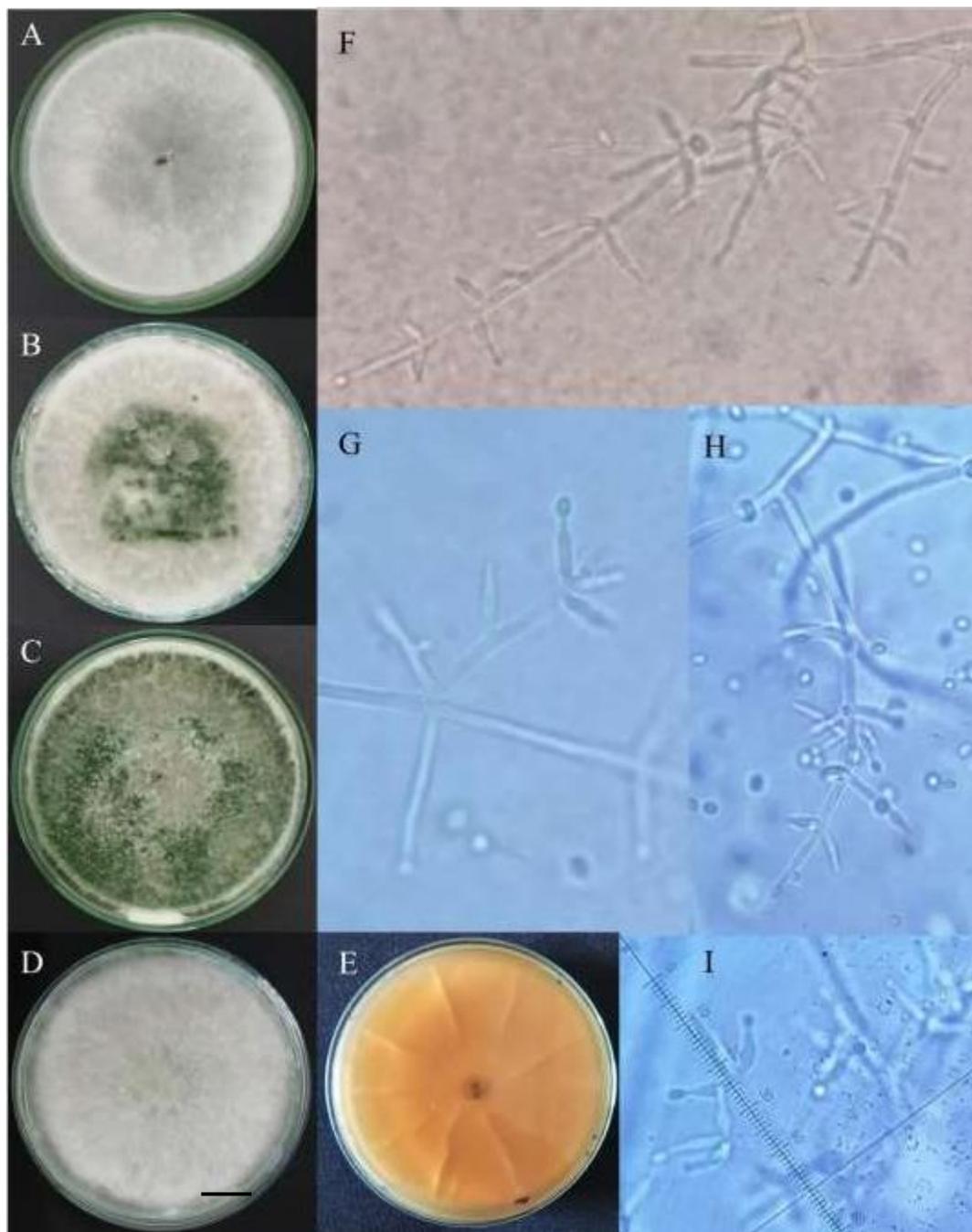
Tabla 7: Micoparasitismo de *Trichoderma koningiopsis* sobre *Fusarium oxysporum*

Fotografía. Observación al Estereoscopio	Descripción
	<p data-bbox="976 384 1422 506">Ensayo de enfrentamiento dual entre <i>Trichoderma</i> sp y <i>Fusarium oxysporum</i></p> <p data-bbox="976 520 1422 869">Se observa la capacidad micoparasítica de <i>Trichoderma</i> sp sobre el fitopatógeno, que se evidencia en evitar su crecimiento siendo capaz de extenderse y colonizar sobre la colonia de <i>Fusarium oxysporum</i>, enrollando sus hifas sobre este.</p>

Fuente: elaboración propia.

Una vez seleccionada la cepa que posee mayor potencial, es decir, mayor capacidad antagónica frente a *Fusarium oxysporum*, se hizo necesario realizar la identificación genotípica (Tabla 7) de esta cepa para asegurar con altos niveles de confianza la naturaleza de la cepa biocontrol.

Adicionalmente al realizar los respectivos repiques de este microorganismo en diferentes medios modificados para establecer las características propias del género *Trichoderma* (Figura 8) a nivel fenotípico, se evidenció una coincidencia total con lo descrito por Pitt y Hocking (2009).



Fuente: Elaboración propia

Figura 7: Características morfológicas del aislado "C1". **A** crecimiento en medio OGY, **B** crecimiento en medio OGY enriquecido con arroz, **C** crecimiento en medio OGY enriquecido con avena, **D** crecimiento en medio YGC, **E** reverso del crecimiento fúngico en medio MEA (evaluado en tasa de crecimiento). **F** Conidióforo- microscopía (100x) obtenida del crecimiento de la cepa en el medio A, **G** Conidióforo- microscopía (100x) obtenida del crecimiento de la cepa en el medio B, **H- I** Conidióforos, conidios- microscopía (100x) obtenida del crecimiento de la cepa en el medio.

Las características morfológicas que presentó la cepa nativa C1 corresponden al género *Trichoderma* con hifas hialinas y conidióforos hialinos muy ramificados no verticilados, fiálides individuales o en grupos, de 3.5-7.5 μ x 2.5-3.8 μ de largo por ancho, fuertemente constreñidas en su base, conidias unicelulares, subglobosas, ovoides o elipsoidales, el largo y ancho osciló entre 3.3 μ x 2.9 μ , color verde fuerte a verde olivo; clamidosporas intercalares, terminales o solitarias de 5 μ a 13 μ de diámetro (Pitt y Hocking 2009).

La identidad de las especies se confirmó con la identificación molecular mediante la comparación de secuencias con el banco de genes, lo que confiere confiabilidad en los resultados obtenidos.

Resultados de la identificación molecular de la cepa (Tabla 8), incluye: código de los aislados, longitud de las secuencias de los marcadores moleculares (ITS y EF1) y resultados de las búsquedas en la base de datos NCBI.

La amplificación de los productos de PCR de la región 16S del ADNr con los primers ITS generaron fragmentos de aproximadamente 566 pb, y para el caso de EF1 874 pb. Una vez realizada la secuenciación a partir de la amplificación de la región espaciadora de transcrito interno (ITS) del ADN de cada cepa con la ayuda de los primer ITS, se exportaron las secuencias de proteínas o nucleótidos con el uso del programa BLAST y estas se compararon con todas las secuencias contenidas en la base de datos del NCBI (GenBank) con el fin de encontrar

similitudes u homologías de nuestras secuencias problemas con otras secuencias ya registradas. Un valor de similitud aproximado al 100% indicaría que era una secuencia conocida con anterioridad. El análisis de secuencias de nucleótidos, reveló que el microorganismo presenta un porcentaje de identidad de 99,66% con *Trichoderma koningiopsis*.

Tabla 8: Identificación molecular de la cepa

 AISLAMIENTO 		 Fr
ITS- Longitud de la secuencia		566 pb
 Resultados ITS hongos y material de referencia NCBI 	Microorganismo	<i>Trichoderma dorotheae</i> <i>Trichoderma koningiopsis</i>
	% Identidad	100- 100
	% Cobertura	100- 91
 EF1- Longitud de la secuencia 		874 pb
 Resultados nr/nt NCBI 	Microorganismo	<i>Trichoderma koningiopsis</i>
	% Identidad	99,66
	% Cobertura	100
 CONCLUSIÓN 	Género	<i>Trichoderma</i>
	Especie	<i>koningiopsis</i>

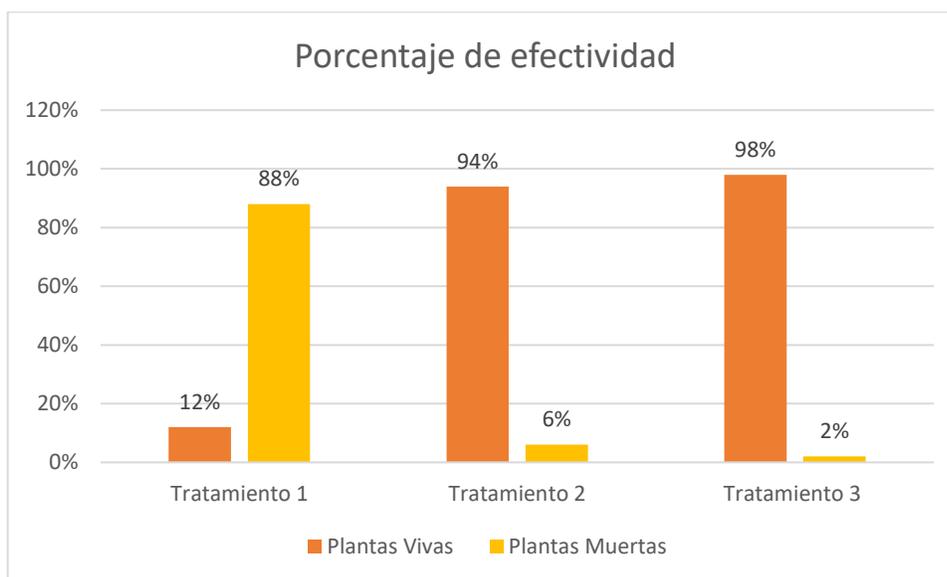
Fuente: Elaboración propia

4.6 Evaluación de la efectividad de *Trichoderma koningiopsis* frente a *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate cherry

La evaluación de la efectividad del biopreparado (*Trichoderma koningiopsis*) dio como resultado un porcentaje de efectividad del 94% (Figura 8) , teniendo en

cuenta el porcentaje de mortalidad de las plantas causada por la inoculación de *Fusarium oxysporum* y *Trichoderma koningiopsis*, lo cual indica un alto nivel de actividad biocontroladora, sin embargo es importante resaltar que en el experimento en donde se inoculó *Fusarium Oxysporum* con una cepa comercial de *Trichoderma* el porcentaje de efectividad fue del 98% siendo este mayor en un 4% al del biopreparado de la cepa nativa.

El biocontrol de enfermedades tiene como propósito cambiar el equilibrio a favor del ecosistema, mediante un incremento artificial de microorganismos benéficos contra poblaciones patógenas con la finalidad de favorecer la producción agrícola (Harman, 2006). Las especies de *Trichoderma* muestran acción biorreguladora de forma indirecta, promueven mecanismos de defensa fisiológicos y bioquímicos en la planta para inducir resistencia sistémica a enfermedades, lo que mejora su crecimiento y desarrollo (Ghazanfar *et al.*, 2018; Guzmán-Guzmán *et al.*, 2019); lo que coincide con el número de plantas vivas obtenidas en el experimento 2 (*Fusarium oxysporum* / *Trichoderma koningiopsis*).



Tratamiento 1	Inoculación de las plantas con <i>Fusarium oxysporum</i> ($\times 10^8$ conidios/ml)
Tratamiento 2	Inoculación de las plantas con <i>Fusarium oxysporum</i> ($\times 10^8$ conidios/ml) + la cepa de <i>Trichoderma koningiopsis</i> .

Tratamiento 3	Inoculación de las plantas con <i>Fusarium oxysporum</i> ($\times 10^8$ conidios/ml) + una cepa comercial de <i>Trichoderma</i> sp.
---------------	--

Fuente: Elaboración propia

Figura 8: Efectividad de *Trichoderma koningiopsis* frente a *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate cherry

Se encontró que el aislamiento de *Trichoderma koningiopsis*, obtenido a partir del suelo del tomate cherry presentó actividad antagónica frente a *Fusarium oxysporum*, lo cual lo convierte en un excelente agente biocontrolador de este fitopatógeno, lo que redundará en la seguridad e inocuidad de los cultivos del tomate cherry ya que su introducción en la práctica productiva permitirá reducir o eliminar el uso de fungicidas sintéticos, lo que se corresponde con la normativa colombiana Ley 9 de 1979: de las sustancias peligrosas, plaguicidas y artículos pirotécnicos (ICA, 1979), en su artículo 130 sobre la importación, fabricación, almacenamiento, transporte, comercio, manejo o disposición de sustancias peligrosas deberán tomarse todas las medidas y precauciones necesarias para prevenir daños a la salud humana, animal o al ambiente, de acuerdo con la reglamentación del Ministerio de Salud.

Así como también el decreto 775 del 16 de abril de 1990 del Ministerio de salud en su artículo 1 sobre el control y la vigilancia epidemiológica en el uso y manejo de plaguicidas, el cual, deberá efectuarse con el objeto de evitar que afecten la salud de la comunidad, la sanidad animal y vegetal o causen deterioro del ambiente.

Trichoderma koningiopsis ha mostrado ser eficaz en el control de patógenos foliares (Moreno y Cotes, 2007) y patógenos del suelo (Cotes et ál., 2001; Cotes et ál., 2007); este microorganismo constituye el principio activo de una formulación (WG) que también ha demostrado alta eficacia (Cotes et ál., 2007). En estudios previos Cotes et ál., 1996, y Clavijo y Cotes, 1998, encontraron que este hongo

estimuló la actividad de proteínas relacionadas con la patogénesis, del tipo β -1,3-endoglucanasas y endoquitinasas en plantas de frijol y tomate respectivamente, sugiriendo un efecto inductor de respuestas de defensa. Así mismo, Castillo et ál., 2007, mediante la técnica de microarreglos, encontraron que plantas de tomate tratadas con *Trichoderma* expresaron 42 genes diferenciales, en contraste con plantas no tratadas, lo que coincide con el porcentaje de efectividad de la cepa utilizada en el tratamiento dos frente a *Fusarium oxysporum*.

A nivel mundial, las pérdidas económicas en los cultivos, debido al daño causado por fitopatógenos, son considerables. De los métodos de control, el químico ha demostrado ser eficiente, pero sus efectos secundarios han sido cuestionados por su impacto ambiental, a la salud humana y la resistencia que desarrollan los microorganismos, lo cual ha generado una creciente y justificada preocupación por la contaminación, el deterioro ambiental, la inocuidad y seguridad alimentaria y el desequilibrio de los ecosistemas (Torres y Capote, 2004), por lo tanto se hacen indispensable herramientas amigables y seguras que provean por el bienestar de la población y del medio ambiente, tales como el uso de microorganismos controladores que hacen parte de los mismos ecosistemas.

La habilidad de esta cepa nativa de *Trichoderma koningiopsis* para parasitar y sobrecrecer a *Fusarium oxysporum* es de importancia para futuras estrategias para el manejo de la marchitez del tomate. En la actualidad, existen en la región productos comerciales a base de *Trichoderma* spp. que se promocionan para reducir diferentes enfermedades; sin embargo, el empleo de cepas nativas más adaptadas a las condiciones agroecológicas de la región es más ventajosa. La presencia de *Fusarium oxysporum* como agente causal de la marchitez de tomate cherry, coincide con lo establecido por Carmona y Burbano (2020) que realizaron la caracterización de aislados patógenos y no patógenos de *Fusarium oxysporum* asociados a cultivos comerciales de tomate en la región Andina de Colombia, donde se evidenció la presencia de 120 aislados fúngicos en cuatro de

sus departamentos, los cuales correspondían a diferentes especies de *Fusarium* según la identificación molecular realizada.

Ahora bien, la presencia de *Trichoderma* spp en el suelo de uso agrícola en el municipio de Pamplona, reafirma la presencia cosmopolita y ubicua de este hongo, adicionalmente la introducción de métodos evolutivos moleculares resultó en la expansión exponencial de la taxonomía de *Trichoderma*, con hasta 50 nuevas especies reconocidas por año, como lo expone Feng Cai y Irina Druzhinina, en donde se establece que para la identificación molecular de *Trichoderma* sp se hace necesario el análisis de los tres códigos de barras de ADN (ITS, tef1 y rpb2) y posterior a esto se utilizan todas las cepas de *Trichoderma* secuenciadas del genoma completo que están disponibles en bases de datos públicas, para proporcionar ejemplos prácticos versátiles de identificación molecular, lo cual es la base fundamental para el protocolo de identificación molecular y coincide con el utilizado en este estudio en donde se identificó a *Trichoderma koningiopsis* como la cepa nativa aislada del suelo del cultivo de tomate cherry.

Este estudio representa una contribución al conocimiento de la interacción local entre tomate cherry y *F. oxysporum* en Colombia, adicionalmente la capacidad antagónica de una cepa nativa de la región de *Trichoderma* sp como posible agente biocontrolador con grandes porcentajes de efectividad frente a *Fusarium oxysporum*.

5 CONCLUSIONES

- Se logró aislar e identificar a *Fusarium oxysporum*, como el agente causal del marchitamiento en las plantas de tomate cherry en la finca las Plazuelas del municipio de Pamplona Norte de Santander.
- En la población fúngica aislada a partir del suelo del cultivo de tomate cherry se lograron identificar cinco cepas de *Trichoderma* sp como posibles agentes biocontroladores.
- Se demostró que las cepas C1 y C5 de *Trichoderma* spp presentaron un muy buen potencial biocontrolador con un porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) de 95,33 % y 93,5% respectivamente.
- La caracterización genotípica de la cepa autóctona C1 indicaron un porcentaje de identidad del 99,66% con *Trichoderma koningiopsis*.
- Se demostró que la cepa C1 de *Trichoderma koningiopsis*, presentó una capacidad biocontroladora sobre *Fusarium oxysporum*, lo que permitió reducir la incidencia de la enfermedad de marchitez del tomate cherry en un 94%.

6 RECOMENDACIONES

- Continuar con las pruebas in vivo en el cultivo de tomate Cherry
- Iniciar los trabajos de producción masiva de *Trichoderma koningiopsis* y proporcionar a los productores el bioinsumo para que pueda ser utilizado a gran escala y de esta manera reducir el uso de agroquímicos
- Aplicar caracterización molecular en los procedimientos de identificación de agentes fitopatógenos del género *Fusarium* y de cepas autóctonas de *Trichoderma*.

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRONET, (2018) Tomado de:
<https://www.agronet.gov.co/Noticias/Paginas/Noticia196.asp>. Revisado 03-12-2022
- Badii, M. H., & Abreu, J. L. (2006). Control biológico una forma sustentable de control de plagas (Biological control a sustainable way of pest control). *International Journal of Good Conscience* (Vol. 1). Retrieved from www.daenajournal.org82
- Bhale U. N., P. M. Wagh and J. N. Raj Konda (2013) Antagonistic confrontation of *Trichoderma* spp. against fruit rot pathogens on sapodilla (*Manilkara zapota* L.). *Journal of Yeast and Fungal Research* 4:5 11, <https://doi.org/10.5897/JYFR12.029>
- Bickel, U. (2018). Uso de plaguicidas por productores familiares en Bolivia. *Universität Rostock*.
- Castro, P. A., Ramos, J. P., Estévez, S. L., & Rangel, A. (2004). Determinación de residuos de plaguicidas organofosforados en muestras de tomate de la ciudad de Bogotá. *Revest de Ingenerate*, (20), 14–22.
- Clavijo G, Cotes, AM. (2007) Evaluación de la actividad quitinasa en procesos de control biológico de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* en tomate, mediante tratamientos de pregerminación controlada de semillas en presencia de *Trichoderma koningii*. *Rev Colomb Biotecnol*.
- Constitución política de Colombia (1991). Corte constitucional. Tomado de:
<https://www.corteconstitucional.gov.co/inicio/Constitucion%20politica%20de%20Colombia%20-%20202015.pdf>
- Copping, L. G., & Monn, J. J. (2000). Biopesticides: A review of their action, applications and efficacy. *Pest Management Science*, 56(8), 651–676.
[http://doi.org/10.1002/1526-4998\(200008\)56:83.0.CO;2-U](http://doi.org/10.1002/1526-4998(200008)56:83.0.CO;2-U)

- Cotes, Alba Marina. (2019) Nuevas estrategias para el control biológico de fitopatógenos. Capítulo 20. Repositorio Agrosavia. Tomado de: <https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/34158/CB%20CAPITULO%2020%20-%20WEB.pdf?sequence=5&isAllowed=y#:~:text=Para%20desarrollar%20agentes%20de%20control,de%20inter%C3%A9s%20en%20entornos%20agr%C3%ADcolas%20>.
- Cotes AM, Lepoivre P, Semal J. (1996) Correlation between hydrolytic enzymes activities measured in bean seedlings after *Trichoderma koningii* combined with pregermination and the protective effect against *Pythium splendens*. Eur J Plant Pathol.;102:487-506.
- Cotes AM, Cárdenas A, Pinzón H. (2001) Effect of seed priming in the presence of *Trichoderma koningii* on seed and seedling disease induced in tomato by *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. IOBC/WPRS Bull.
- Cotes AM, Moreno C, Molano L, Villamizar L, Piedrahita W. (2007) Prospects for integrated management of *Sclerotinia sclerotiorum* in lettuce. IOBC/WPRS Bull.
- C. Srinivas, D. Nirmala Devi, (2019). *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* causal agent of vascular wilt disease of tomato: Biology to diversity– A review. Tomado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6864208/>
- Dean, R. A., Lichens-Park, A., & Kole, C. (2014). Genomics of plant-associated fungi and oomycetes: Dicot pathogens. Genomics of Plant-Associated Fungi and Oomycetes: Dicot Pathogens, 1–239. <http://doi.org/10.1007/978-3-662-44056-8>
- Decreto 775 de 1990. Por el cual se reglamentan parcialmente los títulos III, V, VI, VII Y XI de la ley 09 de 1979, sobre uso y manejo de plaguicidas.
- Decreto 1376 de 2013. Por el cual se reglamenta el permiso de recolección de especímenes de especies silvestres de la diversidad biológica con fines de

investigación científica no comercial. Tomado de:
<https://www.minambiente.gov.co/documento-entidad/decreto-1376-de-2013/#:~:text=Junio%2027%20de%202013%2C%20%2ABPor,de%20investigaci%C3%B3n%20cient%C3%ADfica%20no%20comercial%20BB.>

Decreto 1449 de 1977. Ministerio de Ambiente. Tomado de:
<https://www.minambiente.gov.co/wp-content/uploads/2022/01/decreto-1449-de-1977.pdf>

Decreto 1843 de 1991. Por el cual se reglamentan parcialmente los títulos III, V, VI, VII Y XI de la ley 09 DE 1979, sobre uso y manejo de plaguicidas. Tomado De:
<https://www.ica.gov.co/normatividad/decreto-unico-reglamentario/decretos-modificatorios>

Desaeger, J., Dickson, D. W., & Locascio, S. J. (2017). Methyl Bromide Alternatives for Control of Root-knot Nematode (*Meloidogyne* spp.) in Tomato Production in Florida. *Journal of Nematology* (Vol. 49).

Di Pietro, A., Madrid, M. P., Caracuel, Z., Delgado-Jarana, J., & Roncero, M. I. G. (2003). *Fusarium oxysporum*: Exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Molecular Plant Pathology*, 4(5), 315–325. <http://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00180.x>

FAO, (2013). Directrices para la producción, elaboración, etiquetado y comercialización de alimentos producidos orgánicamente.

FAO, F. and A. O. of the U. N. (2018). Faostat: Production quantities of Tomatoes by country. Retrieved from <http://faostat.fao.org/beta/en/#data/QC/visualize>

FAO, (s, f) Los contaminantes agrícolas: una grave amenaza para el agua del planeta. Tomado de: <https://www.fao.org/news/story/es/item/1141818/icode/>

Jensen, D., & Wolffhechel, H. (1995). The use of fungus, particularly *Trichoderma* spp. and *Gliocladium* spp. to control root rot and damping diseases. *Heikki M., T. Hokkanen*

y M. James (eds.). *Biological control: benefits and risks*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 117-189.

Ghazanfar M. U., M. Raza, W. Raza and M. I. Qamar (2018) Trichoderma as potential biocontrol agent, its exploitation in agriculture: a review. *Plant Protection* 2:109-135.

Gisi, U., & Cohen, Y. (1996). Resistance to phenylamine fungicides: a case study with *Phytophthora infestans* involving mating type and race structure. *Annual Review of Phytopathology*, 34, 549–72. <http://doi.org/10.1146/annurev.phyto.34.1.549>

Gómez P. A. (2000). *Agricultura Orgánica: una alternativa posible*. http://www.ceuta.org.uy/files/Agricultura_organica_una_alternativa_posible.pdf. Consultado el 3 de mayo del 2022

González, M., Torres, I., & Guzmán, H. (2002). Búsqueda de resistencia natural contra patógenos de raíz *Phytophthora capsici*, *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum* en colectas de Chile. En *Proc. 16th Intl. Pepper Conf.* Tampico y Tamaulipas, México

González Gordillo, D. de J. (2007). Efectividad Biológica de un Fulvato de Fierro en la Calidad y Producción de Tomate Cherry (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Var. Red Cherry.

Gutiérrez, A., Robles, A., Santillán, C., Ortiz, M., & Cambero, O. (2013). Control biológico como herramienta sustentable en el manejo de plagas y su uso en el estado de Nayarit, México. *Revista Bio Ciencias* Junio, 2(3), 102–112. <https://doi.org/10.15741/revbio>

Gutiérrez, J. A., & Londoño, A. (2009). Determinación de plaguicidas organoclorados y organofosforados en tomates de mercados de cadena en las ciudades de Pereira y Armenia, Colombia. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(3), 165–171.

- Howell, C. R. (2003). Mechanisms Employed by Trichoderma Species in the Biological Control of Plant Diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease*, 87(1), 4–10. <http://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.1.4>
- Jensen, D., & Wolffhechel, H. (1995). The use of fungus, particularly Trichoderma spp. and Gliocladium spp. to control root rot and damping diseases. *Heikki M., T. Hokkanen y M. James (eds.). Biological control: benefits and risks. Cambridge University Press, Cambridge, UK*, 117-189
- Kredics L., L. Hatvani, S. Naeimi, P. Körmöczi, L. Manczinger, C. Vágvölgyi and I. Druzhinina (2014). Biodiversity of the genus *Hypocrea/ Trichoderma* in different habitats. *In: Biotechnology and Biology of Trichoderma*. V. K. Gupta, M. Schmoll, A. Herrera-Estrella, R. S. Upadhyay, I. Druzhinina and M. G. Tuohy (eds.). Elsevier. Amsterdam, The Netherlands. pp:3- 24, <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59576-8.00001-1>
- Klosterman, S. J., Subbarao, K. V., Kang, S., Veronese, P., Gold, S. E., Thomma, B. P. H. J., ... Ma, L.-J. (2011). Comparative Genomics Yields Insights into Niche Adaptation of Plant Vascular Wilt Pathogens. *PLoS Pathogens*, 7(7), 19. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002137>
- Kuramae, E. E., Buzeto, A. L., Ciampi, M. B., & Souza, N. L. (2003). Identification of *Rhizoctonia solani* AG 1-IB in lettuce, AG 4 HG-I in tomato and melon, and AG 4 HG-III in broccoli and spinach, in Brazil. *European Journal of Plant Pathology*, 109(4), 391–395. <http://doi.org/10.1023/A:1023591520981>
- Ley 9 de 1979. Congreso de Colombia. Medidas sanitarias y protección del medio ambiente.
- Liu, S. Y., Chen, J. Y., Wang, J. L., Li, L., Xiao, H. L., Adam, S. M., & Dai, X. F. (2013). Molecular characterization and functional analysis of a specific secreted protein from highly virulent defoliating *Verticillium dahliae*. *Gene*, 529(2), 307–316. <http://doi.org/10.1016/j.gene.2013.06.089>

- Mandal, S., Mallick, N., & Mitra, A. (2009). Salicylic acid-induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(7), 642–649. <http://doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.03.001>
- Michielse, C. B., & Rep, M. (2009). Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology*, 10(3), 311–324. <http://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00538>.
- Minagricultura, 2017. Lineamientos y estrategias de articulación de asohofrucol con la agroindustria en pro del desarrollo hortifrutícola en Colombia. Tomado de: <https://sioc.minagricultura.gov.co/DocumentosContexto/S2561-Lineamientos%20ASOHOFrucol.pdf>
- Misawa, T., & Kuninaga, S. (2010). The first report of tomato foot rot caused by *Rhizoctonia solani* AG-3 PT and AG-2-Nt and its host range and molecular characterization. *Journal of General Plant Pathology*, 76(5), 310–319. <http://doi.org/10.1007/s10327-010-0261-2>
- Moreno C, Cotes AM. (2007) Survival in the phylloplane of *Trichoderma koningii* and biocontrol activity against tomato foliar pathogens. *IOBC/WPRS Bull.*
- Mungole A. and A. Chaturvedi (2011) *Hibiscus sabdariffa* L. a rich source of secondary metabolites. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 6:83-87.
- Pitt, J, I. Hocking, A. D. 2009. *Fungi and food spoilage*. New York. Tercera edición.
- Resolución 693 del 2007 del Ministerio de ambiente. Por la cual se establecen criterios y requisitos que deben ser considerados para los Planes de Gestión de Devolución de Productos Posconsumo de Plaguicidas. Tomado de: <https://www.car.gov.co/uploads/files/5b58d29976b05.pdf>.
- Resolución 68370 de 2020 “Por medio de la cual se establecen los requisitos para el registro de productor, productor por contrato, envasador, importador y

departamentos técnicos de ensayos de eficacia agronómica de Bioinsumos para uso agrícola; así como los requisitos para el registro de Bioinsumos para uso agrícola”.

Rubio-Reque, G. L., Baltodano-Sánchez, F. D. M., Liliana, I., Wilson-Krugg, J. H., & Muñoz-Ríos, M. A. (2008). Resistencia in vitro de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* a los fungicidas Benzomil 500, Rhizolex-T y Homai-WP. *Revista Biológica de La Universidad de Trujillo*, 28.

Samaniego F Luz, en el 2018 en su artículo titulado: *Aislamiento, identificación y evaluación de cepas autóctonas de Trichoderma spp. antagonistas de patógenos del suelo*. Tomado de: <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v33n3/2224-4697-rpv-33-03-e02.pdf>.

Sánchez, A. D., Barrera, V., Reybet, G. E., & Sosa, M. C. (2015). Biocontrol con *Trichoderma spp.* de *Fusarium oxysporum* causal del “mal de almácigos” en pre y post emergencia en cebolla. *Revista de La Facultad de Agronomía, La Plata*, 114(1), 61–70.

Sanger, F, (1974) A Rapid Method for Determining Sequences in DNA by Primed Synthesis with DNA Polymerase. Tomado de: <https://sci-hub.ru/10.1016/0022-2836%2875%2990213-2>

Serrano Carreón L, Galindo Fentanes E. 2007. Control biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario. *Ciencia*: 77-88.

Sivila, N., & Álvarez, S. (2013). Producción artesanal de *Trichoderma*. *CEDAF*, 13

Solanki, V. H., Patel, R. M., & Patel, K. G. (2015). Biochemical Alteration in Tomato Varieties Resistant and Susceptible to *Fusarium oxysporum*, 15(2), 5029–5036.

Srinivas C. et all (2019). *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* causal agent of vascular wilt disease of tomato: Biology to diversity– A review. Tomado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6864208/>

- Tangarife, Nayith. (2021). Control biológico, la nueva era de la agricultura. Tomado de: <https://repository.udca.edu.co/bitstream/handle/11158/4001/LOS%20MICROORGANISMOS%20Nayith%20Tangarife.pdf?sequence=1>
- Tans-Kersten, J., Huang, H., & Allen, C. (2004). *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. *Journal of Bacteriology*, 34(1), 173–178. <http://doi.org/10.1128/JB.183.12.3597>.
- Torrado, Anita (2011). Uso de plaguicidas y exigencias del mercado agroalimentario. Tomado de: https://www.ica.gov.co/getdoc/d3eecf95-6146-412b-be83-e1e507db9cd6/articulo_usodeplaguicidas.aspx
- USDA, U. S. D. of A. (2014). Programa de datos de Plaguicidas (PDP) 2011 – 2014. Retrieved from <http://www.panna.org/your-health/food>
- Van Wees, S. C., van der Ent, S., & Pieterse, C. M. (2008). Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(4), 443–448. <http://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.05.005>
- Walters, D. R., Ratsep, J., & Havis, N. D. (2013). Controlling crop diseases using induced resistance: Challenges for the future. *Journal of Experimental Botany*, 64(5), 1263–1280. <http://doi.org/10.1093/jxb/ert026>
- Warnock, S. J. 1988. A Review of Taxonomy and Phylogeny of the Genus *Lycopersicon*. *HortScience*, 23(4).
- Watanabe, Tsuneo (2010) Pictorial Atlas of soil and seed fungi and key to species. Tercera edition.
- Willer H. and Yussefi M. (2007). *The World of Organic Agriculture. Statistics and Emerging Trends*. International Federation of Organic Agriculture Movements IFOAM, Bonn, Germany & Research Institute of Organic Agriculture FiBL, Frick, Switzerland. 1-42. <http://orgprints.org/10506/1/willer-yussefi-2007-pl44.pdf>. Consultado el 2 de mayo del 2011.

- Woo, S. L., Scala, F., Ruocco, M., & Lorito, M. (2006). The Molecular Biology of the Interactions Between *Trichoderma* spp., Phytopathogenic Fungi, and Plants. *Phytopathology*, 96(2), 181–185. <http://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0181>
- Yoon, M. Y., Cha, B., & Kim, J. C. (2013). Recent trends in studies on botanical fungicides in agriculture. *Plant Pathology Journal*, 29(1), 1–9.

8 ANEXO 1



ACTA (CHARTER) DEL PROYECTO FINAL DE GRADUACIÓN (PFG)

Nombre y apellidos: Lina María Arrieta Mercado

Lugar de residencia: Cr 2 N° 13-78 Casa 5-Los Alpes. Pamplona, Norte de Santander. Colombia

Institución: Universidad de Pamplona

Cargo / puesto: Microbióloga/ Coordinación de Laboratorio de microbiología y Control de calidad.

Información principal y autorización del PFG	
Fecha: 15-08-2022	AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE <i>Trichoderma koningiopsis</i> , PARA EL CONTROL DE <i>Fusarium oxysporum</i> EN TOMATE CHERRY (<i>Solanum lycopersicum</i>)
Fecha de inicio del proyecto: 15-08-2022	Fecha tentativa de finalización: -30-12-2022
Tipo de PFG: Tesina	
Objetivos del proyecto	
Objetivo General	Objetivos específicos
Elaborar un biocontrolador a partir de la microbiota presente de forma autóctona en el cultivo de Tomate Cherry, para la sustitución del uso de agroquímicos	--Realizar el screening del microorganismo patógeno y el microorganismo biocontrolador, presentes en el cultivo del tomate cherry mediante análisis microbiológicos para la identificación del agente causal y el agente controlador -- Analizar la actividad antagónica de los microorganismos identificados, mediante bioensayos <i>in vitro</i> , para el sondeo de su posible uso como bioinsumo

	-Evaluar el comportamiento del biopreparado sobre el cultivo del tomate cherry para el establecimiento de su uso en el manejo agropecuario de este cultivo.
<p>Descripción del producto:</p> <p>El control biológico es el uso de organismos (o de sus metabolitos o subproductos) que son enemigos naturales de una plaga o patógeno, con el fin de reducir o eliminar sus efectos dañinos en las plantas o sus productos (Serrano Carreón y Galindo Fentanes, 2007).</p> <p>Esta herramienta de manejo se sustenta en microorganismos beneficiosos que establecen interacciones directas de tipo antagonista con el patógeno y de tipo indirectas como la estimulación de defensas del huésped (Harman, 2000). Los mecanismos de efecto directo incluyen la competencia por el espacio y los nutrientes, la inactivación de los sistemas de ataque del patógeno, la modificación de la rizosfera, la secreción de metabolitos con efecto antibiótico y el ataque directo a otros hongos (micoparasitismo) (Rincón et al., 2008).</p> <p>Teniendo en cuenta, lo antes mencionado, se puede establecer que los biocontroladores son productos, de origen biológico, que actúan como antagonistas frente a microorganismos patógenos que producen daño en los cultivos. Este tiene la característica de no dejar residuos, y no ser perjudiciales para la salud humana, como tampoco para el medio ambiente.</p> <p>El producto que se pretende obtener a partir de aislados autóctonos, debe ser una suspensión en concentraciones adecuadas de microorganismos en soluciones inertes para la dispersión del agente biológico y su potencial acción antagónica frente a agentes fitopatógenos que actualmente están causando pérdidas en la producción del Tomate Cherry</p>	
<p>Necesidad del proyecto:</p> <p>La finca “Las Plazuelas” está ubicada en el departamento de Norte de Santander-Colombia, en el municipio de Pamplona en la vereda Chichira, la finca cuenta con 60 hectáreas, las cuales están dispuestas para la actividad agrícola, piscícola y ganadera. Actualmente, esta cuenta con cultivos de tomate Cherry, fresa, cebolla y papa.</p> <p>Los proyectos agrícolas son realizados en asociación comunitaria con ASPAGRO* y estos están destinados al consumo de familias y de la sociedad Pamplonesa en general. La producción de tomate Cherry se realiza bajo invernaderos, se producen anualmente tres toneladas de éste.</p> <p>Los socios de ASPAGRO han pensado en la necesidad de realizar prácticas que permitan dar manejo sostenible a la presencia de plagas y enfermedades que anualmente acarrear grandes pérdidas en las producciones, por tal razón se hace indispensable disponer de recursos biológicos que mitiguen el impacto económico, social y de salud pública generado por las enfermedades y plagas de los cultivos, así como el impacto ambiental generado por el uso de plaguicidas.</p>	

Justificación de impacto del proyecto:

El uso de biocontroladores y bioinsumos contribuye tanto a favorecer la sanidad, el rendimiento y la inocuidad de los productos agrícolas, como a disminuir el impacto ambiental causado por el uso frecuente de productos químicos para el control de plagas y enfermedades de las plantas (Serrano Carreón y Galindo Fentanes, 2007).

Se requiere de un cambio en el manejo tradicional de la sanidad vegetal, que permita disminuir el alto impacto negativo generado por el uso de pesticidas con alternativas de manejo integrado y la inclusión de microorganismos con el fin de regular biológicamente las poblaciones de plagas agrícolas, mejorar la calidad e inocuidad de los alimentos y restablecer el equilibrio ambiental.

La producción agrícola mundial ha presentado avances técnicos y tecnológicos importantes en el control de plagas agrícolas (insectos, enfermedades y arvenses) ligados principalmente al uso de productos de síntesis química para la protección de cultivos, conocidos como plaguicidas, pesticidas o agroquímicos, para lograr mayores volúmenes de producción, con el fin de cubrir la demanda de alimentos y materias primas. Aunque se ha logrado incrementar la producción agrícola, esto ha generado un alto impacto negativo sobre la inocuidad y calidad de los alimentos, la salud humana y, el medio ambiente, repercutiendo directamente en el cambio climático. El desconocimiento y uso indiscriminado de plaguicidas afectan todo el entorno, específicamente a especies silvestres, provocando un desequilibrio en el ecosistema; esto, sumado al desconocimiento técnico de las aplicaciones de agroquímicos como lo son: dosis, frecuencias de aplicación, manejo y rotación de grupos toxicológicos y químicos, sitio, mecanismo y modo de acción, calidad de la aspersión o aplicación (falta de calibración de equipos), condiciones que favorecen que esto se haya convertido en un problema complejo a nivel social, económico y ambiental (Gutiérrez, Robles, Santillán, Ortiz, & Cambero, 2013).

Por lo anterior, la evolución natural de los sistemas de producción agrícola ha tenido que direccionarse de acuerdo a los gustos y preferencias de los consumidores y a la vertiginosa demanda de productos naturales de alta inocuidad y calidad, provenientes de sistemas productivos que implementan métodos de control de plagas agrícolas con visión más respetuoso con el medio ambiente y amigable con el pensamiento de desarrollo sustentable (Badii & Abreu, 2006), teniendo como alternativa el conocimiento y uso de un gran grupo importante y creciente de insectos, hongos, bacterias, virus y nematodos que presentan efectos antagónicos con otros microorganismos o insectos, y esta acción puede reducir el uso de agroquímicos en pro de una agricultura sostenible.

Teniendo en cuenta, lo antes mencionado, se hace necesario producir un biocontrolador a partir de la microbiota presente de forma autóctona en el cultivo de tomate Cherry, para sustituir el uso de agroquímicos.

Restricciones:

Costos de producción

Manejo del tiempo en la germinación de plántulas para ensayos *in vitro*

Entregables: -Avances periódicos del desarrollo del PFG al tutor (a). - Entrega del documento aprobado al lector (a) para su revisión y para su posterior aprobación y calificación. -Tribunal evaluador tutor(a) y lector (a)	
Identificación de grupos de interés: Cliente(s) directo(s): ASPAGRO Universidad de Pamplona Cliente(s) indirecto(s): Consumidores	
Aprobado por director MIA: Félix Modesto Cañet Prades	Firma:
Aprobado por profesora Seminario Graduación: MIA. Ana Cecilia Segreda Rodríguez	Firma:
Estudiante: <i>Lina María Arrieta Mercado</i>	Firma 

*ASPAGRO: Asociación de productores agropecuarios de Pamplona

REFERENCIAS:

Serrano Carreón L, Galindo Fentanes E. 2007. Control biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario. *Ciencia*: 77-88.

Rincón AM, Codón AC, Benítez T. 2008. Hidrolasas y genes fúngicos de interés en biocontrol. En: Pallás V, Escobar C, Rodríguez PP, Marcos JF (Eds.). *Herramientas biotecnológicas en Fitopatología*. Madrid: Mundi-Prensa.

Harman GE. (2000). Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22". *Plant Dis*. 84: 377-393

Gutiérrez, A., Robles, A., Santillán, C., Ortiz, M., & Cambero, O. (2013). Control biológico como herramienta sustentable en el manejo de plagas y su uso en el estado de Nayarit, México. *Revista Bio Ciencias* Junio, 2(3), 102–112. <https://doi.org/10.15741/revbio>

Badii, M. H., & Abreu, J. L. (2006). Control biológico una forma sustentable de control de plagas (Biological control a sustainable way of pest control). *International Journal of Good Conscience* (Vol. 1). Retrieved from www.daenajournal.org82