



UNL

Universidad
Nacional
de Loja

Universidad Nacional de Loja

Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables

Carrera de Agronomía

Uso de microorganismos antagonistas, para el control de *Alternaria solani* en tomate (*Solanum lycopersicum* L), bajo condiciones controladas.

Trabajo de Integración
Curricular, previa a la obtención
del título de Ingeniera Agrónoma.

AUTORA:

Evelyn Anahí Cando Calderón

DIRECTOR:

Ing. Ángel Rolando Robles Carrión PhD.

Loja – Ecuador

2024

Educamos para **Transformar**

Certificación

Loja, 24 de agosto de 2023

Ing. Ángel Rolando Robles Carrión PhD.

DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

CERTIFICO:

Que he revisado y orientado todo el proceso de elaboración del Trabajo de Integración Curricular denominado: **Uso de microorganismos antagonistas, para el control de *Alternaria solani* en tomate (*Solanum lycopersicum* L), bajo condiciones controladas**, previo a la obtención del título de **Ingeniera Agrónoma** de la autoría de la estudiante **Evelyn Anahí Cando Calderón**, con **cédula de identidad Nro. 1105120396**, una vez que el trabajo cumple con todos los requisitos exigidos por la Universidad Nacional de Loja, para el efecto, autorizo la presentación del mismo para su respectiva sustentación y defensa.



Ing. Ángel Rolando Robles Carrión PhD.

DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Autoría

Yo, **Evelyn Anahí Cando Calderón**, declaro ser autor del presente Trabajo de Integración Curricular y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos, de posibles reclamos y acciones legales, por el contenido del mismo. Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja la publicación de mi Trabajo de Integración Curricular, en el Repositorio Digital Institucional-Biblioteca Virtual.

Firma:



Cédula de identidad: 1105120396

Fecha: 07 de agosto de 2023

Correo electrónico: evelyn.cando@unl.edu.ec

Teléfono: 0982577556

Carta de autorización por parte de la autora, para consulta, reproducción parcial o total y/o publicación electrónica del texto completo, del Trabajo de Integración Curricular.

Yo, **Evelyn Anahí Cando Calderón**, declaro ser autora del Trabajo de Integración Curricular denominado: **Uso de microorganismos antagonistas, para el control de *Alternaria solani* en tomate (*Solanum lycopersicum* L), bajo condiciones controladas**, como requisito para optar por el título de **Ingeniero Agrónomo**, autorizo al sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que, con fines académicos, muestre la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido en el Repositorio Institucional.

Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo en el Repositorio Institucional, en las redes de información del país y del exterior con las cuales tenga convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja, no se responsabiliza por el plagio o copia del Trabajo de Integración Curricular que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los diecinueve días del mes de febrero de dosmil veintidós.

Firma:



Autora: Evelyn Anahí Cando Calderón

Cédula: 1105120396

Dirección: Loja - Pindal

Correo electrónico: evelyn.cando@unl.edu.ec

Teléfono: 0982577556

DATOS COMPLEMENTARIOS:

Director del Trabajo de Integración Curricular: Ing. Ángel Rolando Robles Carrión PhD.

Dedicatoria

El presente trabajo está dedicado a Dios y a la Magnífica por darme la salud y valentía para enfrentar las adversidades a lo largo de mi carrera y poder aprender de cada uno de los errores y sobre todo para no rendirme en el arduo camino a esta meta.

A mis queridos padres Ángel Cando y Miriam Calderón, quienes siempre estuvieron a mi lado con sus palabras de aliento y amor incondicional. A mi hermano, Ángel Agustín, que desde el cielo me cuida y me guía para que todo salga bien.

A mis compañeros y amistades, quienes sin esperar nada a cambio compartieron conmigo grandes momentos de alegrías y tristezas, a todas las personas que de una u otra manera me brindaron su apoyo y lograron que hoy se haga realidad uno de mis más grandes anhelos.

Evelyn Anahí Cando Calderón

Agradecimiento

Agradezco a la Universidad Nacional de Loja por abrirme las puertas de su alma mater, a la Carrera de Ingeniería Agronómica y a su personal docente, por todos los valiosos conocimientos impartidos y su constante apoyo para seguir adelante con mi formación como profesional.

A mi director, PhD. Ángel Robles, por haberme brindado la oportunidad de acudir a su capacidad y conocimiento científico, así como por haber tenido toda la paciencia del mundo durante el desarrollo de este Trabajo de Integración Curricular.

Mi agradecimiento al personal técnico del Laboratorio de Biotecnología y Fitopatología, por su apoyo durante la ejecución de mi tesis, quienes me impartieron sus conocimientos, experiencias y me guiaron para que este trabajo culmine de la mejor forma.

Evelyn Anahí Cando Calderón

Índice de Contenidos

Portada.....	i
Certificación	ii
Autoría.....	iii
Carta de Autorización.....	iv
Dedicatoria	v
Agradecimiento	vi
Índice de Contenidos	vii
Índice de Tablas.....	ix
Índice de Figuras	x
Índice de Anexos	xi
1. TEMA.....	1
2. RESUMEN	2
Abstract	3
3. INTRODUCCIÓN	4
Objetivo General	6
Objetivos Específicos	6
4. MARCO TEÓRICO	7
4.1. Importancia del Cultivo de Tomate.....	7
4.2. Taxonomía.....	7
4.3. Morfología de la Planta de Tomate	8
4.3.1. Raíz.....	8
4.3.2. Tallo	8
4.3.3. Hojas.....	8
4.3.4. Flores	8
4.3.5. Frutos y semillas.....	8
4.4. Características de <i>Alternaria solani</i>	8
4.4.1. Importancia económica de la enfermedad.....	8
4.4.2. Factores Predisponentes	9
4.4.3. Sintomatologías o Tipología de Daños	9
4.4.4. Ciclo Biológico de la Enfermedad	10
4.5. Control Biológico	11
4.6. Características de <i>Pseudomonas</i> sp.....	11

4.7. Características de <i>Azospirillum</i> sp.....	12
4.8. Características de <i>Azotobacter</i> sp.....	13
5. METODOLOGÍA	14
5.2. Localización del Estudio.....	14
5.3. Metodología General	14
5.4. Diseño Experimental	15
5.5. Metodología para el Primer Objetivo: “Determinar la capacidad antagónica de algunos microorganismos para el control de <i>Alternaria solani</i> bajo condiciones <i>in vitro</i> ”	16
5.6. Metodología para el Segundo Objetivo: “Verificar la eficiencia del uso de microorganismos antagonistas, en plantas de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.), infectadas por <i>Alternaria solani</i> ”	18
5.7. Análisis Estadístico.....	21
6. RESULTADOS	22
6.1. Resultados para el Primer Objetivo: “Determinar la capacidad antagónica de algunos microorganismos para el control de <i>Alternaria solani</i> bajo condiciones <i>in vitro</i> ”	22
6.2. Resultados para el Segundo Objetivo: “Verificar la eficiencia del uso de microorganismos antagonistas, en plantas de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.), infectadas por <i>Alternaria solani</i>	23
7. DISCUSIÓN.....	28
7.1. Discusión para el Primer Objetivo.....	28
7.2. Discusión para el Segundo Objetivo	29
8. CONCLUSIONES	32
9. RECOMENDACIONES	33
10. BIBLIOGRAFÍA.....	34
11. ANEXOS.....	38

Índice de Tablas

Tabla 1. Escala utilizada por Ezziyyani et al. (2004) para la evaluación de la capacidad antagónica de los biocontroladores.....	18
Tabla 2. Escala para evaluar el grado de afectación en la planta, causada por <i>Alternaria solani</i> , en condiciones controladas.	19
Tabla 4. Índices de Severidad de <i>Alternaria solani</i> , días después de la aplicación de los tratamientos.	23

Índice de Figuras

Figura 1. Manchas concéntricas de color café en hojas (a), tallos (b) y frutos de tomate (c) (INTA, 2012).....	10
Figura 2. Ciclo de vida y síntomas de la enfermedad causada por <i>Alternaria</i> (Agrios 1985).	11
Figura 3. Ubicación del Laboratorio de Microbiología Vegetal, del Centro de Biotecnología y de la Quinta Experimental La Argelia, de la Universidad Nacional de Loja, cuyas ubicaciones están marcadas de rojo (Google Earth, 2023).....	14
Figura 4. Esquema del diseño experimental de la primera fase de estudio desarrollada en laboratorio, donde se trabajó con tres tratamientos cada uno con 5 repeticiones y un tratamiento control por cada tratamiento.....	15
Figura 5. Esquema del diseño experimental de la segunda fase de estudio desarrollado con plantas in vivo, donde se trabajó con cinco tratamientos cada uno con diez repeticiones.	15
Figura 6. Representación gráfica del método de difusión en medio de cultivo, para determinar la capacidad de biocontrol de las bacterias frente al patógeno. Fuente: Autora.	17
Figura 7. Macroscopía del cultivo de <i>Alternaria solani</i> en medio PDA, al cuarto día de incubación (a) y microscopía en un lente de 40X, con azul de metileno (b). Fuente: Autora.	22
Figura 8. Efecto antagónico de los tratamientos a los 7 días; a) T1, con <i>Azotobacter</i> ; b) T2, con <i>Azospirillum</i> ; c) T3, con <i>Pseudomonas</i> ; d) T0, testigo con agua estéril. Fuente: Autora.	22
Figura 9. Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR) a los siete días de estudio.	23
Figura 10. Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE), causada por la inoculación de <i>A. solani</i> sobre hojas de tomate bajo condiciones controladas 30 días post inoculación.	24
Figura 11. Área bajo la curva escalonada del progreso de la enfermedad (ABCPEE), causada por la inoculación de <i>A. solani</i> sobre hojas de tomate bajo condiciones controladas 30 días post inoculación.	25
Figura 12. Tasa de progreso de la enfermedad (TPE), causada por la inoculación de <i>A. solani</i> sobre hojas de tomate bajo condiciones controladas 30 días post inoculación.....	25
Figura 13. Eficacia del biocontrol (ECB) causado por la inoculación de <i>A. solani</i> sobre hojas de tomate bajo condiciones controladas 30 días post inoculación.	26
Figura 14. Índice de Sanidad (IS) causado por la inoculación de <i>A. solani</i> sobre hojas de tomate bajo condiciones controladas 30 días post inoculación.....	27

Índice de Anexos

Anexo 1. Recolección del material vegetal infectado con el patógeno.....	38
Anexo 2. Cultivo del patógeno (<i>A. solani</i>).....	38
Anexo 3. Colonia pura del hongo y repique.	39
Anexo 4. Técnica de difusión en medio de cultivo. a) Orificios en el medio de cultivo (PDA); b) Aplicación de suspensiones bacterianas; c) Colocar el patógeno en el centro del medio de cultivo.	39
Anexo 5. Sellar y etiquetar las cajas con los nombres de los tratamientos de estudio.....	39
Anexo 6. Toma de datos, con calibrador digital.	40
Anexo 7. Análisis de varianzas.	40
Anexo 8. Prueba Tukey.....	40
Anexo 9. Plantas de tomate bajo condiciones controladas.	41
Anexo 10. Síntomas característicos de <i>Alternaria solani</i> , en hojas de tomate.	41
Anexo 11. Certificación de la traducción de resumen.	42

1. TEMA

Uso de microorganismos antagonistas, para el control de *Alternaria solani* en tomate (*Solanum lycopersicum* L), bajo condiciones controladas.

2. RESUMEN

El cultivo de tomate se ve amenazado por múltiples plagas y enfermedades, entre ellas *Alternaria solani* causante del tizón temprano, una enfermedad que se presenta a lo largo del ciclo de cultivo y que genera altas pérdidas en la producción. El control de esta enfermedad generalmente se da por métodos químicos, pero últimamente se ha incursionado por métodos de control biológico, por lo que en el presente estudio se trabajó con suspensiones microbianas ajustadas a una concentración de 10^8 , con *Pseudomonas* sp., *Azotobacter* sp., y *Azospirillum* sp., para determinar la eficiencia en el control de *A. solani* bajo condiciones controladas, donde se realizó un enfrentamiento antagónico *in vitro* y se determinó que los índices más altos de inhibición del crecimiento radial se dieron en el tratamiento donde se aplicó *Azotobacter* sp. (60,70 %), mostrando un buen potencial biocontrolador, mientras que los tratamientos con *Azospirillum* sp. (33,92 %) y *Pseudomonas* sp. (33,84 %), presentan un control deficiente, en comparación con el testigo. En plantas *in vivo*, se usaron las mismas bacterias (concentración 10^8), un control químico de base de Azoxytobin + Tebuconazole y un testigo absoluto, se evaluó: incidencia, severidad, ABCPE, ABCPEE, TPE, ECB e IS, y de forma general se observó que el tratamiento químico controló con mayor eficacia la enfermedad, y los tratamientos bacterianos alcanzaron índices estadísticamente similares en el control de *A. solani* y en comparación con el testigo absoluto si se notó el potencial biocontrolador de las bacterias antagonistas empleadas.

Palabras Clave: Control biológico, bacterias, tomate, *Alternaria solani*, *in vivo*, *in vitro*.

Abstract

The tomato crop is threatened by multiple pests and diseases, among them *Alternaria solani*, which causes early blight, a disease that occurs throughout the crop cycle and generates high production losses. The control of this disease is usually done by chemical methods, but recently biological control methods have been used, so in this study we worked with microbial suspensions adjusted to a concentration of 10^8 , with *Pseudomonas* sp., *Azotobacter* sp. and *Azospirillum* sp, to determine the efficiency in the control of *A. solani* under controlled conditions, where an in vitro antagonistic confrontation was carried out and it was determined that the highest rates of inhibition of radial growth occurred in the treatment where *Azotobacter* sp. was applied (60.70 %), showing a good biocontrol potential, while the treatments with *Azospirillum* sp. (33.92 %) and *Pseudomonas* sp. (33.84 %), presented a poor control, compared to the control. In in vivo plants, the same bacteria were used (concentration 10^8), a chemical control based on Azoxystrobin + Tebuconazole and an absolute control. Incidence, severity, ABCPE, ABCPEE, TPE, ECB and IS were evaluated, and in general it was observed that the chemical treatment controlled the disease more effectively, and the bacterial treatments reached statistically similar rates in the control of *A. solani* and in comparison with the absolute control, the biocontrol potential of the antagonistic bacteria used was noted.

Key words: Biological control, bacteria, tomato, *Alternaria solani*, in vivo, in vitro.

3. INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es de gran importancia a nivel mundial, debido a su alta demanda y valor nutricional, además su producción se ha incrementado en los últimos años (Hernández-Herrera et al., 2014). En Ecuador, el cultivo tiene un área sembrada de 1 691 ha⁻¹, sin embargo, el área cosechada es de 1 650 ha, con una producción de 55 277 t, de las cuales en la provincia de Loja se cultivan 11 ha con un rendimiento de 4,5 t/ha (ESPAC, 2022).

El cultivo se ve afectado por diversos patógenos, entre ellos *Alternaria solani*, causante de una de las enfermedades más importantes del tomate conocida como el tizón temprano, la misma que en condiciones de alta incidencia y severidad provoca pérdidas de rendimiento que se han estimado hasta en un 79 % (Adhikari et al., 2017). *A. solani* ocasiona daños en el área foliar, los mismos que se evidencian con manchas pequeñas, circulares o angulares, marcadas con anillos concéntricos en las hojas, en tallo y peciolo, donde se producen lesiones negras alargadas (Morán, 2008). El control de esta enfermedad se realiza por varios métodos, como son el control químico, cultural, orgánico y biológico, siendo el químico el más utilizado (Paz et al., 2013).

García (2016), menciona que los límites máximos de residuos (LMR) de pesticidas para el cultivo de tomate registrados en la provincia de Loja son de 62 partes por billón (ppb), cuando los permitidos son de 10 ppb. Además, se estima que aproximadamente el 85 % de la fabricación mundial de plaguicidas se emplean en la agricultura, donde el incremento en la producción de alimentos induce a un abuso de insumos químicos, lo cual genera resistencia a enfermedades y plagas, también da lugar a que restos de químicos se dispersen en el ambiente y se conviertan en contaminantes para los sistemas bióticos y abióticos (del Puerto Rodríguez et al., 2014). Así mismo, la Organización de las Naciones Unidas (2021) estima que cada año se producen 385 millones de casos de envenenamiento involuntario y no mortal por plaguicidas, y alrededor de 11 000 muertes, conjuntamente, es causante de daños a la salud humana como cánceres y efectos neurológicos, inmunológicos y reproductivos.

Por otra parte, en los últimos años se ha estudiado el control biológico como un mecanismo eficiente para disminuir el uso de pesticidas, el mismo que se basa en utilizar organismos antagonistas de patógenos, con la finalidad de que disminuyan el daño en el cultivo sin ocasionar daños al ambiente (Vinchira-Villarraga y Moreno-Sarmiento, 2019).

Se han llevado a cabo diversos estudios en laboratorio con microorganismos antagonistas para controlar diversas enfermedades que afectan a cultivos de interés agrícola; al respecto, Kipgen et al.

(2021), evaluaron el control biológico con el uso de la bacteria *Pseudomonas fluorescens* en *Alternaria alternata*, donde se determinó que la bacteria inhibe el crecimiento micelial y la germinación de conidios de *A. alternata*, se presentó como un agente de efecto antifúngico. Así mismo, se han llevado a cabo estudios de la interacción bacteria-microalga en el control biológico de *A. solani*, por lo cual Cassan et al. (2021), sostienen que *Azospirillum brasilense* es capaz de asociarse con la microalga *Chlorella sorokiniana* aumentando el rendimiento metabólico de dicho microorganismo y por ende proporciona actividades antagónicas contra una serie de patógenos de plantas. También, estudios realizados por Rodríguez et al. (2016), para determinar la efectividad de cepas de *Azotobacter* sp. y *Bacillus* sp. para el control de especies fúngicas asociadas a hortalizas, encontraron que las cepas de los dos géneros bacterianos poseen actividad antagonista contra varias enfermedades fungosas evaluadas en el estudio.

Los estudios mencionados anteriormente han funcionado muy bien en condiciones de laboratorio y con diversos cultivos de interés agrícola donde se han controlado diversos tipos de hongos, incluyendo al género *Alternaria*, sin embargo, la gran mayoría no se han evaluado específicamente en la especie *Alternaria solani* en el cultivo de tomate, por lo que se pretende analizar si dichos microorganismos presentan un biocontrol eficiente frente al patógeno en condiciones de laboratorio y con plántulas de tomate en invernadero.

Por consiguiente, el presente proyecto se genera a partir de la necesidad de desarrollar nuevos métodos de control biológico, con el uso de microorganismos antagonistas, para el control de *A. solani* en tomate bajo condiciones controladas, siendo una alternativa para aumentar la producción orgánica de tomate en la provincia de Loja con el fin de disminuir el uso de agroquímicos, los cuales contaminan los recursos naturales y la salud humana. El presente trabajo se relaciona con el Objetivo de Desarrollo Sostenible (ODS) 12 “Producción y Consumo responsable”, con la línea de investigación de la Universidad Nacional de Loja denominada “Sistemas Agropecuarios sostenibles para la soberanía alimentaria”, ya que se utiliza microorganismos benéficos para el estudio de alternativas novedosas de biocontrol.

Bajo este contexto, se pretende analizar ¿Cuál es el efecto del uso de microorganismos antagonistas, para el control de *A. solani* en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) bajo condiciones controladas?

Para el cumplimiento del propósito de la investigación, se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo General

Evaluar el uso de microorganismos antagonistas para el control de *Alternaria solani* en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) bajo condiciones controladas.

Objetivos Específicos

- Determinar la capacidad antagónica de algunos microorganismos para el control de *Alternaria solani* bajo condiciones *in vitro*.
- Verificar la eficiencia del uso de microorganismos antagonistas, en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), infectadas por *Alternaria solani*.

4. MARCO TEÓRICO

4.1. Importancia del Cultivo de Tomate

En la última década, la producción de tomate se ha incrementado notablemente, tal es el caso que en el periodo 2011-2021 la producción aumentó aproximadamente 3 millones de t; para el año 2021 la producción mundial de tomate fue de 189 133 955 t, donde el continente asiático fue el mayor productor de tomate con el 60,1 % de la producción total, seguido del continente americano con un 14,8 % y el europeo con el 13,2 % (FAOSTAT, 2022).

En Ecuador, según el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG, 2022), el cultivo de tomate se produce a nivel nacional, tanto en los valles cálidos de la serranía como en el litoral; aporta con el 0,6 % al Valor Agregado Bruto Agropecuario y su producción se caracteriza por conformar Unidades de Producción Agropecuaria (UPA) con una superficie menor a 1 ha, actualmente se cultiva una superficie de 1 691 ha, lo que representa el 0.2 % de la superficie sembrada bajo cultivos transitorios. Por otra parte, para el 2021 en la producción del tomate riñón participaron 25 428 personas, de los cuales el 86 % fueron productores o familiares y el 14 % restante representa trabajadores remunerados ocasionalmente (ESPAC, 2022).

4.2. Taxonomía

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Subclase: *Asteridae*

Orden: *Solanales*

Familia: *Solanaceae*

Género: *Solanum*

Especie: *Solanum lycopersicum*

(Iglesias, 1988).

4.3. Morfología de la Planta de Tomate

4.3.1. Raíz

Su sistema radicular es una raíz principal pivotante, de aproximadamente 60 cm de profundidad, produce raíces adventicias y ramificaciones, además, se estima que el 75 % se encuentra en los 45 cm superiores del suelo (Saavedra et al., 2019).

4.3.2. Tallo

Es ligeramente anguloso, de grosor mediano, semileñoso y con tricomas simples y glandulares. El eje central tiene un grosor que oscila entre 2-4 cm en su base, sobre el cual se van a desarrollar las hojas, tallos secundarios e inflorescencias. En la parte distal se encuentra el meristemo apical, donde se inician los nuevos primordios foliares y florales (Reyes, 2016).

4.3.3. Hojas

Son compuestas y se insertan en nudos de forma alterna, el limbo puede tener de siete a once folíolos, la epidermis inferior cuenta con un alto número de estomas (Saavedra et al., 2019).

4.3.4. Flores

Es perfecta, regular e hipógina, los sépalos, pétalos y estambres están adheridos al receptáculo por debajo del gineceo, tiene 5 o más sépalos e igual número de pétalos de color amarillo dispuestos de forma helicoidal (Saavedra et al., 2019). Presentan el mismo número de estambres que se alternan con los pétalos y las flores se agrupan en inflorescencias llamadas comúnmente racimos; la primera flor se instala en la yema apical, mientras que las demás se ubican de forma lateral por debajo de la primera, alrededor del eje principal (Reyes, 2016).

4.3.5. Frutos y semillas

Es una baya bi o plurilocular constituida por el pericarpio y las semillas, es de forma de óvalo aplastado, de color grisáceo, cubierto de vellosidades, de unos 3 a 5 mm de tamaño (Saavedra et al., 2019).

4.4. Características de *Alternaria solani*

4.4.1. Importancia económica de la enfermedad

Dentro del género *Alternaria* se encierran muchas especies saprófitas, endofíticas y patógenas que se han distribuido considerablemente en el suelo y la materia orgánica en descomposición. También abarca especies perjudiciales que pueden dañar cultivos vegetales antes y después de la cosecha; además, es responsable de considerables pérdidas económicas, debido a que limita el

rendimiento de las cosechas y produce alteraciones en los vegetales durante su almacenamiento (Pavón et al., 2012).

El tizón temprano, causado por *A. solani*, es una de las enfermedades más comunes y de mayor importancia económica, debido a que puede afectar el cultivo en cualquier etapa de su desarrollo, el cual produce lesiones en el tallo, peciolo, flores y frutos (Tandazo, 2015). En Ecuador, Chanaluisa-Saltos et al., (2022) determinaron que *A. solani* puede alcanzar índices de incidencia de un 66 % y de severidad del 52 %, en plantas de tomate en condiciones de invernadero.

4.4.2. Factores Predisponentes

El Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA, 2012), manifiesta que el tizón temprano es una enfermedad policíclica debido a que puede manifestarse varias veces en el mismo ciclo de cultivo, sobrevive en los restos de cosecha y en el suelo y se dispersa con facilidad. Los factores que favorecen el desarrollo óptimo de la enfermedad son: las temperaturas moderadas de 27 a 30 °C, sumado a una alta humedad relativa de un 90 %, con días nublados y llovizna, ya que estos benefician la entrada de esporas por aperturas naturales como los estomas o directamente por la cutícula.

4.4.3. Sintomatologías o Tipología de Daños

Sepúlveda (2018) manifiesta que *A. solani* se presenta en la parte aérea y en todos los estados de crecimiento de la planta de tomate, sin embargo, tiene mayor incidencia en hojas maduras. Los síntomas característicos de la enfermedad es la presencia de lesiones circulares de color café a negro en hojas maduras, las mismas que pueden estar rodeadas de un halo clorótico. Las lesiones que se presentan de forma circular pueden tener un diámetro de 8 a 10 mm a varios centímetros con climas favorables o cuando se unen a otras lesiones, pudiéndose presentar en tallos, pecíolos, pedúnculos y flores, lo que produce la caída de frutos desde etapas tempranas. Las plantas con infecciones severas comienzan a perder hojas, los frutos corren el riesgo de quedar expuestos al sol y presentar daños; en frutos cercanos a la madurez se presentan lesiones hendidas, firmes, de color café oscuro o verde oliváceo (figura 1).

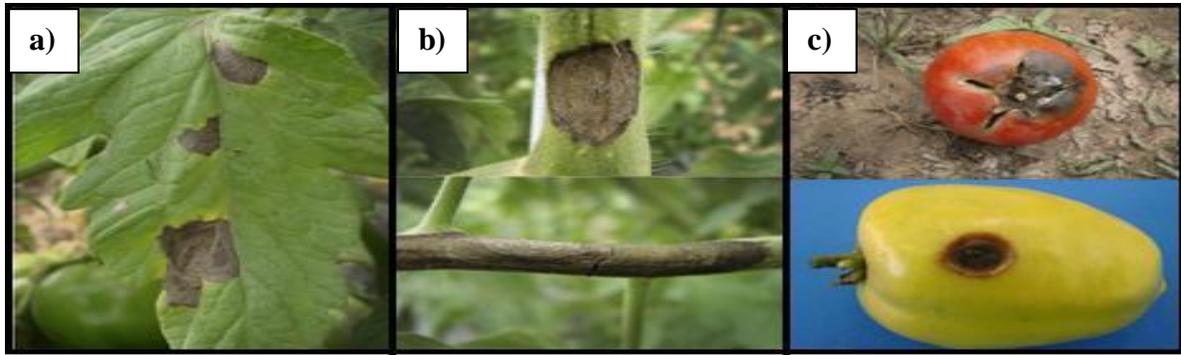


Figura 1. Manchas concéntricas de color café en hojas (a), tallos (b) y frutos de tomate (c) (INTA, 2012).

4.4.4. Ciclo Biológico de la Enfermedad

A. solani es un hongo que tiene la capacidad de sobrevivir en el suelo, en forma de micelio o esporas, asociándose a materia orgánica y restos de cultivos enfermos; también puede permanecer en hospederos alternativos, como otras especies del género *Solanum* y plantas arvenses a partir de aquí, las esporas son capaces de dispersarse a grandes distancias a través del viento. En las primeras etapas de desarrollo del cultivo se origina una infección primaria en las hojas más viejas, mientras que el tejido joven no presenta síntomas. La mayor diseminación de la enfermedad se da de manera secundaria (desde tejido inicialmente infectado a hojas más nuevas) y generalmente se presenta después de la floración, cuando existe una mayor presión del inoculo. Las condiciones húmedas y secas, donde mañanas con abundante rocío seguidas de temperaturas altas y humedad relativa alta son óptimas para la esporulación del patógeno y su diseminación (figura 2) (Reyes, 2016).

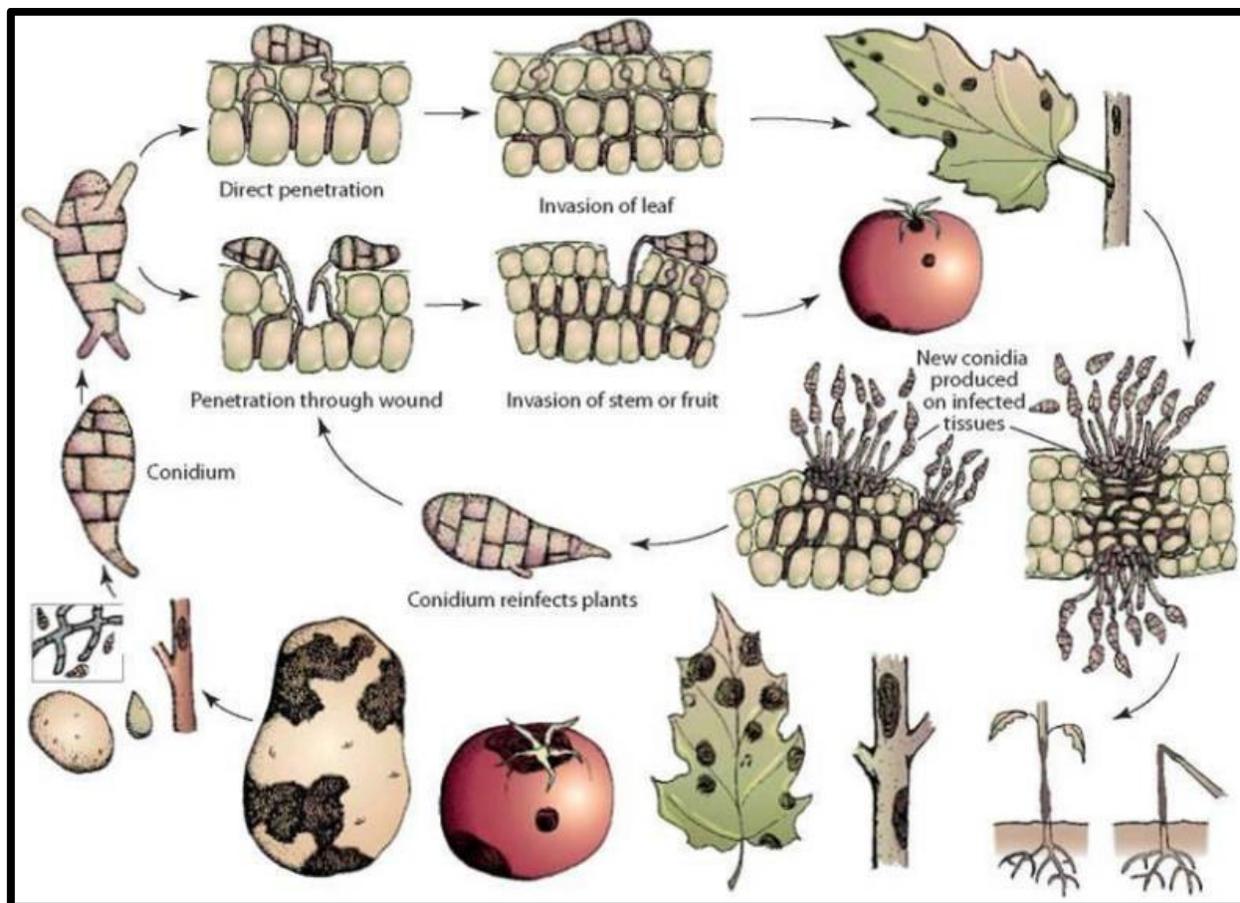


Figura 2. Ciclo de vida y síntomas de la enfermedad causada por *Alternaria* (Agris 1985).

4.5. Control Biológico

El control biológico se basa en el uso de microorganismos antagonistas o enemigos naturales que disminuyan la población de plagas o enfermedades a densidades menores, ya sea de forma temporal o permanente (Rodríguez y Arredondo, 2007). Además, Gutierrez et al. (2013) mencionan que el uso de organismos benéficos, como son los depredadores, entomopatógenos y parasitoides, regulan el patógeno, sin ser nocivos para la salud del ser humano y sin contaminar el medioambiente, por lo que representan una estrategia sustentable y ecológica que no afecta el equilibrio biológico.

4.6. Características de *Pseudomonas* sp.

En el género *Pseudomonas* hay más de 100 especies, el cual constituye un control biológico efectivo, donde se incluye el antagonismo directo y la inducción de resistencia en la planta, dentro del género encontramos a una de las bacterias más estudiadas, *Pseudomona fluorescens*, debido a que produce metabolitos como sideróforos, antibióticos, compuestos volátiles, enzimas y fitohormonas (Pérez et al., 2015). Así mismo, Dimkić et al., (2022) evaluaron cepas de biocontrol

de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* y sus metabolitos secundarios bioactivos pueden considerarse beneficiosos para la salud de las plantas, donde se demostró que *Bacillus* y *Pseudomonas* sp. producen quitinasas, glucanasas y proteasas involucradas en la supresión de muchas enfermedades fúngicas. Cepas de *Bacillus* indujeron la vacuolización y degradación mitocondrial en células patógenas, mientras que *Pseudomonas* sp. produce una serie de metabolitos secundarios antimicrobianos que participan activamente con interacciones antagonistas en complejos fitopatógenos.

Por otra parte, se efectuaron estudios del control biológico con *Pseudomonas* sobre patógenos del género *Alternaria*, por lo que se cita a (Rodríguez-Romero et al., 2019), que al trabajar con Quitosano y extractos de *Pseudomona fluorescens* para el control de *Alternaria alternata* en el cultivo de tomate, han notado que estos agentes, ya sea de forma individual o la mezcla de ellos, en condiciones *in vitro* inhiben el crecimiento micelial y la germinación de conidios de *A. alternata*, siendo la mezcla de ambos agentes la más efectiva con efecto antifúngico, además al aplicar estos tratamientos bajo invernadero no se notaron diferencias significativas frente al control químico, por lo que estos agentes pueden ser una estrategia biocontroladoras de fitopatógenos.

4.7. Características de *Azospirillum* sp.

El género *Azospirillum* se encuentra distribuido a nivel mundial, del cual se han aislado distintas cepas y especies de varios países, considerándose un género versátil porque ha sido aislado de diferentes ambientes (Reis et al., 2015). Posee varios mecanismos para promover el crecimiento de las plantas y un gran número de estudios han detallado los efectos beneficiosos de la inoculación con estas rizobacterias. La mejora del crecimiento vegetal por *Azospirillum* sp. se ha atribuido principalmente a su capacidad para fijar N atmosférico y producir fitohormonas; se atribuye menos a la biodisposición de nutrientes, expresión de enzimas, síntesis de compuestos relacionados con la mitigación del estrés de las plantas y competencia contra fitopatógenos, entre otros mecanismos (Bashan y de-Bashan, 2010).

Azospirillum es capaz de producir ácido indol-3-acético (AIA), hormonas de tipo auxinas que estimulan cambios morfológicos en las raíces de las plantas, también pueden actuar como moléculas de señalización en la interacción planta-bacteria. Al incitar el crecimiento vegetal ha permitido la formulación de biofertilizantes como una alternativa sostenible dentro de la agricultura y se ha estudiado su efecto antagónico contra algunos patógenos de interés agrícola (Gómez et al., 2014).

4.8. Características de *Azotobacter* sp.

Dentro del género *azotobacter*, existen bacterias asociativas de vida libre; entre sus principales cualidades resaltan la fijación biológica del nitrógeno atmosférico y la producción de hormonas vegetales (Rodríguez et al., 2016). Bacterias que se requieren en sistemas de agricultura sostenible, debido a que aumentan la fertilidad del suelo y tiene un amplio rango de actividad antagónica hacia fitopatógenos, además tienen la capacidad de producir exopolisacáridos, sideróforos, vitaminas y factores de crecimiento en la perspectiva agrícola (Gauri et al., 2012).

5. METODOLOGÍA

5.2. Localización del Estudio

El presente estudio se realizó en el cantón Loja de la provincia de Loja, la primera fase del ensayo se realizó en el Laboratorio de Microbiología Vegetal del Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja, cuyas coordenadas son Latitud: 04° 03' 74" Sur, longitud 79° 20' 46" Oeste, y altitud de 2 134 msnm (figura 3), mientras que la segunda fase se realizó en la Quinta Experimental La Argelia, cuyas coordenadas son en 4° 02' 15" de Latitud Sur, 79° 11' 59" de Longitud Oeste y a una altitud de 2 133 m.s.n.m (Google Earth, 2023).



Figura 3. Ubicación del Laboratorio de Microbiología Vegetal, del Centro de Biotecnología y de la Quinta Experimental La Argelia, de la Universidad Nacional de Loja, cuyas ubicaciones están marcadas de rojo (Google Earth, 2023).

5.3. Metodología General

El presente trabajo investigativo tiene un enfoque cuantitativo y cualitativo, con un alcance descriptivo y comparativo-causal, el mismo que consta de dos fases, ambas bajo condiciones controladas. En la primera fase se realizó la inoculación del hongo en cajas de Petri con suspensiones bacterianas de *Pseudomonas* sp., *Azotobacter* sp., y *Azospirillum* sp., respectivamente; mientras que en la segunda fase se trabajó con plántulas de tomate que fueron infectadas por *A. solani*, donde se probó la efectividad de los tratamientos de biocontrol en plantas *in vivo*.

5.4. Diseño Experimental

La investigación se llevó a cabo bajo condiciones controladas, por lo que se implementó un diseño completamente al azar (DCA). Para la primera fase del estudio, se emplearon tres tratamientos con cinco repeticiones, más un testigo por tratamiento y se utilizaron cajas de Petri como unidad experimental (Figura 4). Para la segunda fase, se trabajó con suspensiones bacterianas para controlar al patógeno, en la figura 5 se presenta un esquema del diseño experimental; las unidades experimentales fueron plántulas de tomate de 40 días aproximadamente después del trasplante y se realizaron diez repeticiones por cada tratamiento, donde de forma general se evaluó el control biológico que ejercen los microorganismos antagonistas sobre el fitopatógeno *A. solani*.

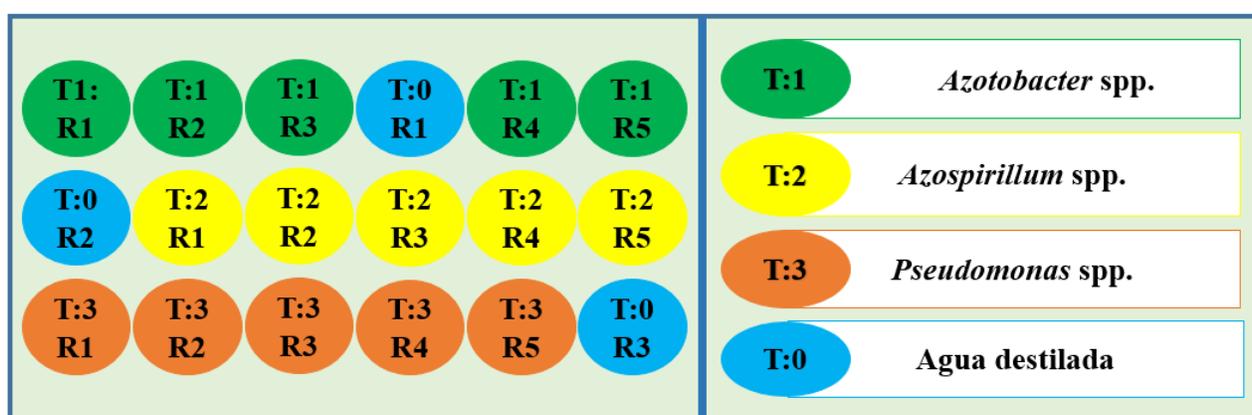


Figura 4. Esquema del diseño experimental de la primera fase de estudio desarrollada en laboratorio, donde se trabajó con tres tratamientos cada uno con 5 repeticiones y un tratamiento control por cada tratamiento.

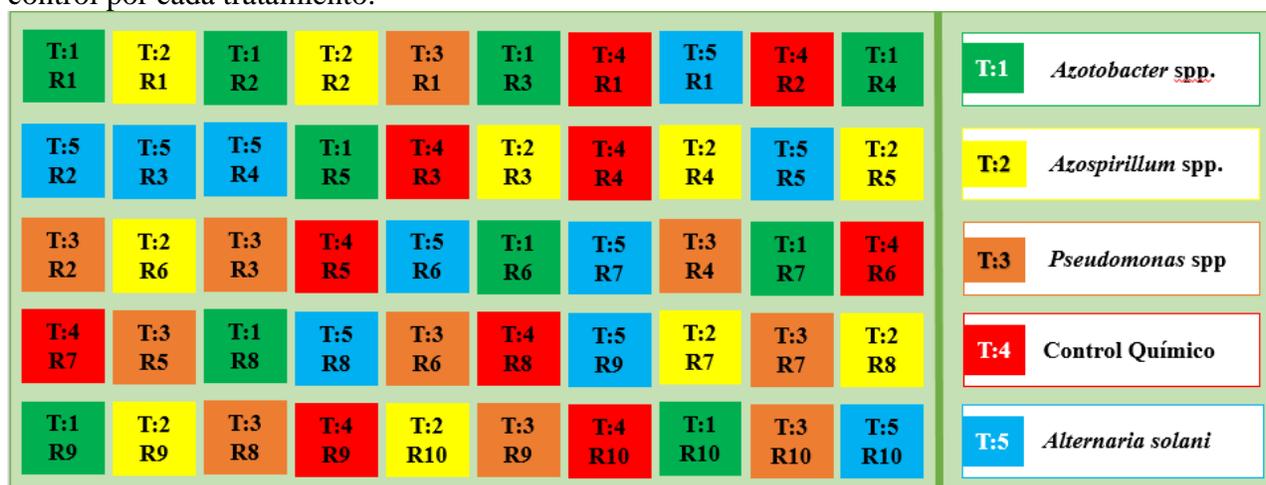


Figura 5. Esquema del diseño experimental de la segunda fase de estudio desarrollado con plantas *in vivo*, donde se trabajó con cinco tratamientos cada uno con diez repeticiones.

5.5. Metodología para el Primer Objetivo: “Determinar la capacidad antagonica de algunos microorganismos para el control de *Alternaria solani* bajo condiciones *in vitro*”

Para el desarrollo del presente trabajo se colectaron plantas de tomate con síntomas de *A. solani*, de un vivero de la ciudad de Loja, cuyas coordenadas son 3° 58' 59" S y 79° 13' 17". Se aisló y multiplicó el hongo en cajas de Petri en un medio Agar Papa Dextrosa (PDA) y para obtener colonias puras del hongo, se sembraron en el centro de las cajas de Petri fragmentos de hojas con la presencia de la enfermedad y también se realizaron cámaras húmedas con las hojas que presentaron síntomas de la enfermedad y se incubaron a 28 °C ± 2° C durante 7 días (Gakegne et al., 2017).

Otra parte imprescindible en la presente investigación fueron los microorganismos antagonistas, *Pseudomonas* sp., *Azotobacter* sp. y *Azospirillum* sp., los cuales se obtuvieron del Laboratorio de Microbiología Vegetal del Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja. Para la obtención de los inóculos a utilizar en todos los experimentos, se sembraron *Azotobacter* sp., *Azospirillum* sp. y *Pseudomonas* sp., en cajas de Petri con medio agar nutriente, y se incubaron durante aproximadamente 48 h a 28 °C. Posteriormente, se pasaron a tubos de ensayo con 5 ml de medio Caldo Nutriente (CN) y se incubaron a 30 °C, 150 rpm durante 72 h. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se cuantificó la concentración de cada una de las suspensiones bacterianas con la escala de McFarland, en el espectrofotómetro UV Visible de la marca Jenwa a 625 nm como longitud de onda (Rojas, 2020).

La interacción patógeno-microorganismo biocontrolador se realizó con pruebas de enfrentamiento, bajo la técnica de difusión en medio de cultivo (figura 6) entre los patógenos y biocontroladores en cajas de Petri de 90 mm de diámetro, para el método se realizaron cuatro perforaciones de 5 mm de diámetro en el centro de las cajas de Petri con medio PDA y en cada una de ellas se depositaron con 50 µl de *Pseudomonas* sp., *Azospirillum* sp., y *Azotobacter* sp., en concentraciones de 29, 30 x 10⁸ UFC/ml de *Pseudomonas* sp., 28, 48 x 10⁸ UFC/ml de *Azospirillum* sp. y de *Azotobacter* sp. 23, 97 x 10⁸ UFC/ml. En el centro de caja de Petri se colocó un disco de micelio de *A. solani* obtenido de colonias de siete días de crecimiento, como control negativo se utilizó agua destilada estéril. Se evaluó el crecimiento radial del micelio del patógeno con un calibrador digital, todos los días, durante 7 días (Gakegne et al., 2017).

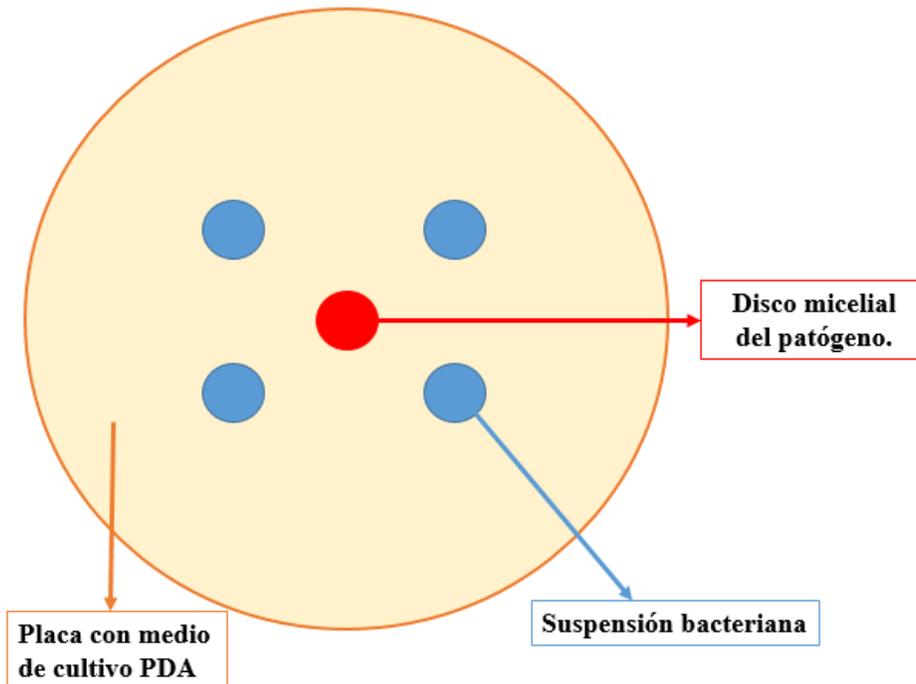


Figura 6. Representación gráfica del método de difusión en medio de cultivo, para determinar la capacidad de biocontrol de las bacterias frente al patógeno. Fuente: Autora.

En todos los tratamientos se hizo una evaluación de la capacidad biocontroladora de los microorganismos, para ello se empleó la escala utilizada por Ezziyyani et al. (2004) (Tabla 1) y se calculó el Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR), que mide el antagonismo de los microorganismos evaluados; que se obtuvo a partir del crecimiento del patógeno en cultivo dual, junto con su respectivo testigo, empleando la fórmula utilizada por Suárez et al. (2008):

Porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR).

$$PICR = \left[\frac{(R1 - R2)}{R1} \right] \times 100$$

Donde **R1** es el radio del tratamiento control y **R2** es el radio del tratamiento en cultivo dual (Anoop y Bhay, 2014; Mokhtar y Dehimat, 2015).

Tabla 1. Escala utilizada por Ezziyyani et al. (2004) para la evaluación de la capacidad antagonista de los biocontroladores.

Grado	Capacidad antagonista	Potencial biocontrolador
0	Ninguna invasión de la superficie de la cepa patógena	Muy malo
1	¼ Invasión de la superficie de la cepa patógena	Malo
2	½ invasión de la superficie de la cepa patógena	Deficiente
3	Total invasión de la superficie de la cepa patógena	Bueno
4	Total invasión de la superficie de la cepa patógena esporulación sobre ella	Muy bueno

5.6. Metodología para el Segundo Objetivo: “Verificar la eficiencia del uso de microorganismos antagonistas, en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), infectadas por *Alternaria solani*”

Se sembraron plántulas de tomate en fundas de 10x15 cm, las mismas que se llenaron con sustrato 2-1-1 (Tierra de montaña, turba y arena) para el óptimo desarrollo de la planta, 40 días después del trasplante se procedió a inocular el hongo en concentraciones de $4,7 \times 10^5$ y cuando se observaron los síntomas iniciales, se inocularon los tratamientos en forma suspensiones bacterianas con microorganismos antagonistas empleados en la primera fase, además se empleó un control químico y un control testigo.

La inoculación del patógeno, se realizó mediante raspado del hongo que estaba contenido en cajas Petri y se lo colocó en un Caldo Papa Dextrosa, el cual se incubó a 30° C; 150 rpm durante 7 días. En un lente de 40X se realizó el conteo de esporas en la cámara de Neubauer, con una concentración final de $4,7 \times 10^5$. La inoculación del hongo (*A. solani*) en todas las plantas se realizó en la tarde, con la finalidad de proveer condiciones que permitan la germinación y penetración de las conidias en el hospedero, ya que se ha comprobado que en horas oscuras el hongo logra un mayor crecimiento y desarrollo (Castro, Cortez y Martínez, 2002). La aplicación de la suspensión del inóculo de *A. solani* se realizó sobre tejidos foliares mediante la utilización de un pulverizador manual, asperjando hasta punto de goteo (Faber et al., 2022), siete días después se observaron los síntomas iniciales de la enfermedad y se procedió con la aplicación de los tratamientos (*Pseudomonas* sp., *Azotobacter* sp. y *Azospirillum* sp., y el control Químico), para la cual se usó la misma metodología de Faber et al., 2022; para las suspensiones bacterianas se usaron las mismas concentraciones del primer objetivo, el control químico se aplicó cada 7 días como indica la ficha técnica y al tratamiento testigo no se le aplicó ningún tipo de control.

La incidencia de la enfermedad se evaluó a los 7 días después de aplicar el patógeno y la evaluación de la severidad se realizó durante un mes, cada tres días, después de aplicar los tratamientos para el control de la enfermedad y se evaluaron las siguientes variables: área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE), área bajo la curva escalonada del progreso de la enfermedad (ABCPEE), tasa del progreso de la enfermedad (TPE), eficacia del biocontrol (ECB) y el índice de sanidad del cultivo (IS). Se utilizó la escala propuesta por Bernal (2006) para evaluar el área foliar afectada por *Alternaria solani*, (Tabla 2).

Tabla 2. Escala para evaluar el grado de afectación en la planta, causada por *Alternaria solani*, en condiciones controladas.

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

* AFA = Área Foliar Afectada.

Fuente: Bernal (2006)

El porcentaje de incidencia se estimó calculando el número de plantas enfermas del total de plantas evaluadas. Para el cálculo del porcentaje (%) de incidencia, se utilizó la siguiente fórmula (Ivancovich et al., 1998):

$$\text{Incidencia (I \%)} = \frac{A}{\sum(A \times B)} \times 100$$

Donde: **I** = Incidencia, **A** = Total de plantas enfermas, **B** = Total de plantas sanas y $\sum (a \times b)$ = Sumatoria total de plantas enfermas y sanas.

La severidad es la estimación del porcentaje de la superficie del órgano enfermo, la misma que se encuentra en una escala entre el 0 y 100 %. Para determinar el porcentaje de severidad de *A. solani* se utilizó la siguiente fórmula (Ivancovich et al., 1998):

$$\text{Severidad (S\%)} = \frac{\sum(a \times 1) + (a \times 2) + (a \times 3) + \dots + (a \times k)}{(n \times k)} \times 100$$

Donde: **S** = Severidad de la enfermedad, $\sum (a \times b)$ = Sumatoria del número de plantas u órganos enfermos o infectados según el grado de afectación (**1, 2, 3, 4, 5, ..., k**), **n** = Número de plantas evaluadas y **k** = Valor o grado mayor de la escala.

Con los registros de incidencia y severidad de los tratamientos se calculó el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE) para *A. solani*. La fórmula que se utilizó fue propuesta por Shaner y Finney (1977):

$$ABCPE = \sum_{i=1}^n \left[\frac{(Y_{i+n1} + Y_i)(X_{i+n1} - X_i)}{2} \right]$$

Donde **Y_i** = índice de la enfermedad en la **i** observación, **X_i** = tiempo en días a la **i**-ésima observación y **n**= número total de observaciones (Shaner y Finney, 1977).

Área bajo la curva escalonada del progreso de la enfermedad (ABCPEE)

$$ABCPEE = ABCPE + \frac{D(y_1 + y_n)}{2(n - 1)}$$

Donde **Y₁** = índice de la enfermedad en la **1** observación, **Y_n** = índice de la enfermedad en la **n**-ésima observación **D** = rango del tiempo y **n**= número total de observaciones (Shaner y Finney, 1977).

De igual forma, para evaluar el progreso de la enfermedad se utilizó la fórmula Tasa del progreso de la enfermedad (TPE), que se expresó en % día⁻¹:

$$TPE = \frac{1}{t_2 - t_1} \left[\ln \left(\frac{y_2}{1 - y_2} \right) - \ln \left(\frac{y_1}{1 - y_1} \right) \right]$$

Donde: **ln** = logaritmo natural, **Y₁** = Porción de tejido afectado al inicio de la evaluación, **Y₂** = Proporción de tejido afectado al final del periodo evaluado, **t₁** = Tiempo de inicio de la evaluación, **t₂** = Tiempo de la última evaluación.

Asimismo, para evaluar la eficacia del control de los microorganismos antagonistas sobre *A. solani* se utilizó la fórmula de eficacia del biocontrol:

$$ECB (\%) = \left[\frac{STC - STB}{STC} \right] \times 100$$

Donde: **ECB** es la eficacia del control o del biocontrol, **STC** es el índice de severidad en tratamiento control al final del periodo de evaluación y **STB** es el índice de severidad en tratamiento de biocontrol.

También se evaluó el índice de sanidad del cultivo (IS), con la siguiente fórmula:

$$IS = \ln \left[\frac{Sfc}{Sfc - Sfbc} \right] \times \frac{1}{TPE}$$

IS = Índice de Sanidad; **ln** = Logaritmo natural; **Sfc** = Severidad final del control; **Sfbc** = severidad final del biocontrol; **TPE** = Tasa de Progreso de la Enfermedad.

5.7. Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa INFOSTAT, donde se ejecutó un análisis de varianzas (ANOVA) para determinar si existen o no diferencias significativas, también se realizó una verificación de los supuestos de homogeneidad y normalidad de varianzas. Una vez comprobada la presencia de diferencias significativas y aceptado los supuestos se hizo una prueba de Tukey al 5 %, en las variables que no se aceptaron los supuestos se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para evaluar entre qué tratamientos se dan las diferencias.

6. RESULTADOS

6.1. Resultados para el Primer Objetivo: “Determinar la capacidad antagonista de algunos microorganismos para el control de *Alternaria solani* bajo condiciones *in vitro*”

Se logró obtener colonias puras mediante el aislamiento de *Alternaria solani*, donde macroscópicamente se pudo notar que las colonias con una coloración oscura y aspecto veloso, además de un tono blanquecino que rodea la colonia; por otro lado, en la observación microscópica se identificaron conidióforos de forma alargada, dividido en varios compartimientos (Figura 7).

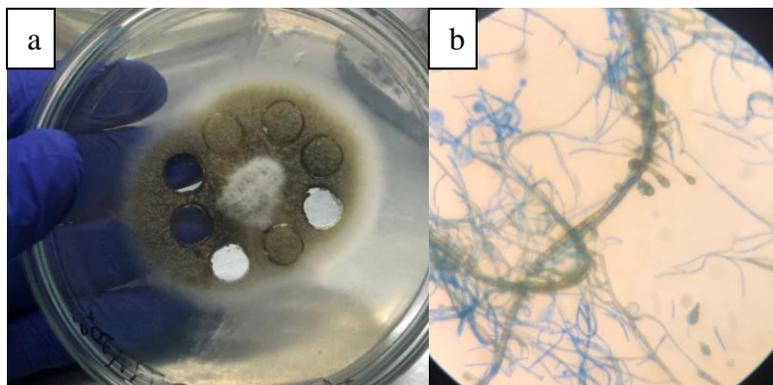


Figura 7. Macroscopía del cultivo de *Alternaria solani* en medio PDA, al cuarto día de incubación (a) y microscopía en un lente de 40X, con azul de metileno (b). Fuente: Autora.

Las suspensiones bacterianas de *Azotobacter* sp., *Azospirillum* sp. y *Pseudomonas* sp., mostraron un efecto biocontrolador sobre *A. solani*, con respecto al testigo, incluso cuando no estuvieron en contacto directo con el patógeno; además, se observó que la mayor inhibición del crecimiento del hongo se presentó en el tratamiento 1 (*Azotobacter*).

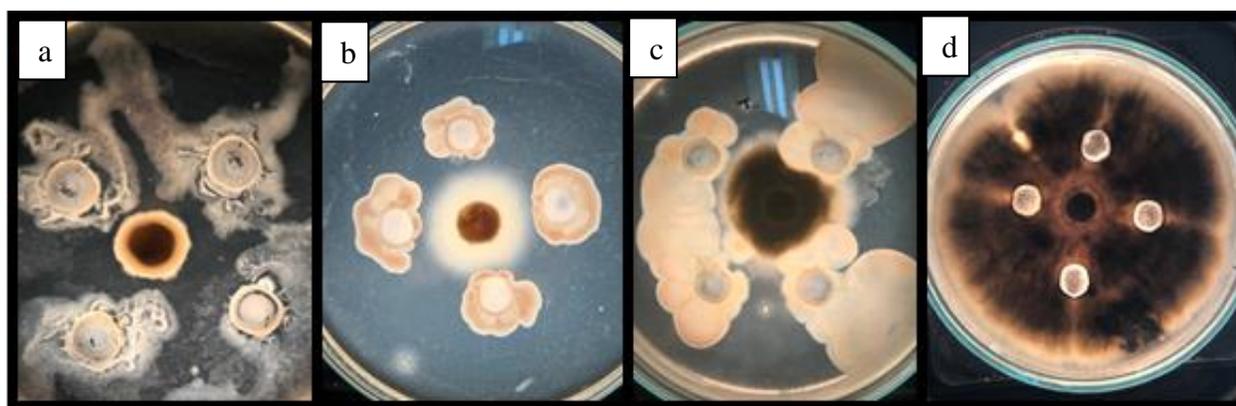


Figura 8. Efecto antagonista de los tratamientos a los 7 días; a) T1, con *Azotobacter*; b) T2, con *Azospirillum*; c) T3, con *Pseudomonas*; d) T0, testigo con agua estéril. Fuente: Autora.

Sobre la base del PICR se evidenció que el tratamiento 1 (*Azotobacter* sp.) presentó los niveles más altos de inhibición del crecimiento radial del patógeno, con valores de 38,87 [(Datos

transformados acrsen) (media real = 60,70 %)] que corresponde a un buen potencial biocontrolador, según Erzayini; mientras que los tratamientos 2 (*Azospirillum*) y 3 (*Pseudomonas*), presentan un potencial biocontrolador deficiente, con valores de entre 20,19 y 20,12 [(Datos transformados acrsen) (media real = 33,92 y el 33,84 %)], respectivamente, que no difieren estadísticamente entre sí, sin embargo, todos los tratamientos bacterianos son estadísticamente distintos del testigo (Figura 8).

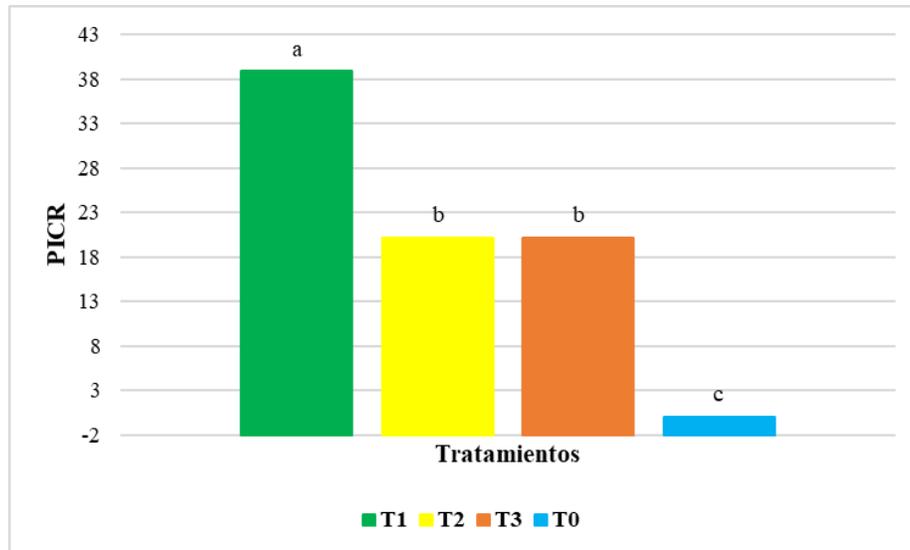


Figura 9. Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR) a los siete días de estudio.

Barras con letras desiguales difieren significativamente por la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

Leyenda: T1 (*Azotobacter* sp.); T2 (*Azospirillum* sp.); T3 (*Pseudomonas* sp.); T0 (Testigo absoluto).

6.2. Resultados para el Segundo Objetivo: “Verificar la eficiencia del uso de microorganismos antagonistas, en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), infectadas por *Alternaria solani*.”

Se observaron que los porcentajes de severidad de todos los tratamientos no tuvieron diferencias significativas en los primeros 12 días después de la aplicación de los controles, sin embargo, a partir del día 15 se evidenciaron diferencias entre el tratamiento testigo y el control químico. A los treinta días después de la aplicación de tratamientos se determinó, que el testigo presenta los índices más altos de severidad (T5) (56, 44), mientras que el tratamiento químico (T4) (31,18) presenta los índices más bajos y los tratamientos bacterianos (T1, T2 y T3), estadísticamente, no difieren entre sí (Tabla 4).

Tabla 3. Índices de Severidad de *Alternaria solani*, días después de la aplicación de los tratamientos.

SEVERIDAD																
TRATAMIENTOS	DÍAS DESPUÉS DE LA APLICACIÓN DE TRATAMIENTOS															
	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30						
T1: <i>Azotobacter</i>	14,53	17,49	20,52	23,68	30,13	ab	31,18	a	33,54	ab	35,91	a	35,91	ab	38,27	ab
T2: <i>Azospirillum</i>	16,51	18,48	20,52	25,79	31,31	ab	32,36	a	35,31	bc	38,27	ab	38,27	b	38,27	ab
T3: <i>Pseudomonas</i>	14,53	18,48	21,58	24,74	32,36	ab	33,54	a	35,01	bc	38,27	ab	40,63	b	40,63	b
T4: Químico	12,55	17,49	19,54	20,59	25,79	a	26,86	a	28,01	a	31,72	a	30,13	a	31,18	a
T5: Testigo	16,51	18,47	22,63	27,89	34,72	b	42,09	b	43,27	c	43,27	b	53,51	c	56,44	c

Letras desiguales en cada fila difieren significativamente por la prueba de Kruskal Wallis ($\alpha < 0,05$).

Con respecto al parámetro Área bajo la curva de Progreso de la Enfermedad (ABCPE) se notó un mayor progreso de la enfermedad en el tratamiento testigo (T4) (1 585), seguido de los tratamientos bacterianos que no difieren entre sí, mientras que el progreso más bajo de la enfermedad se evidenció en el tratamiento químico (T5) (1 147,5) (Figura 9).

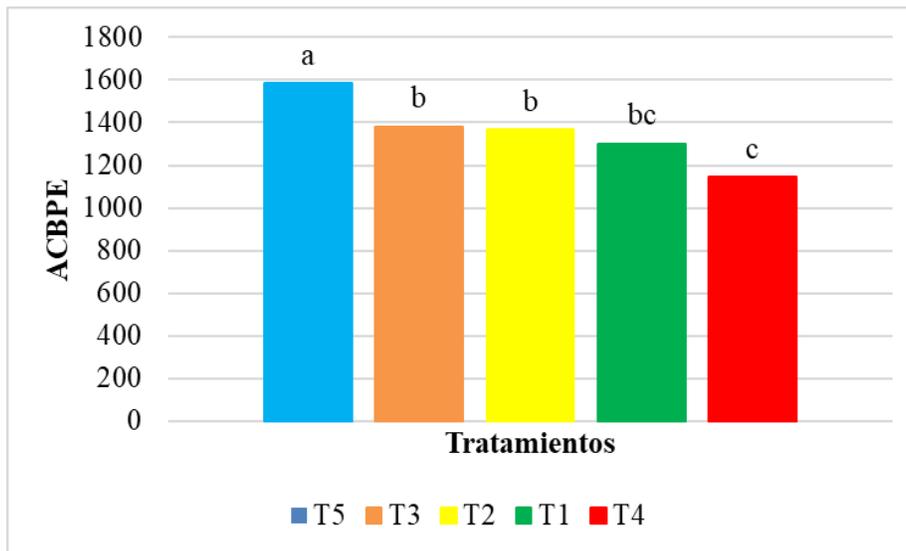


Figura 10. Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE), causada por la inoculación de *A. solani* sobre hojas de tomate bajo condiciones controladas 30 días post inoculación.

Barras con letras desiguales difieren significativamente por la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

Leyenda: T1 (*Azotobacter* sp.); T2 (*Azospirillum* sp.); T3 (*Pseudomonas* sp.); T4 (Control Químico con Azoxystrobin y Tebuconazole); T5 (Testigo absoluto).

Por otro lado, en la figura 10, se indican los resultados de la variable ABCPEE en la cual se observa que el tratamiento testigo (T4) presentó el mayor progreso escalonado de la enfermedad (16 015,9), mientras que el índice más bajo se observó en el tratamiento químico (T5) (11 602,3); por otro lado, los tratamientos 1, 2 y 3, con *Azotobacter* (13169,7), *Azospirillum* (13 827), *Pseudomonas* (13 978,6) son estadísticamente similares.

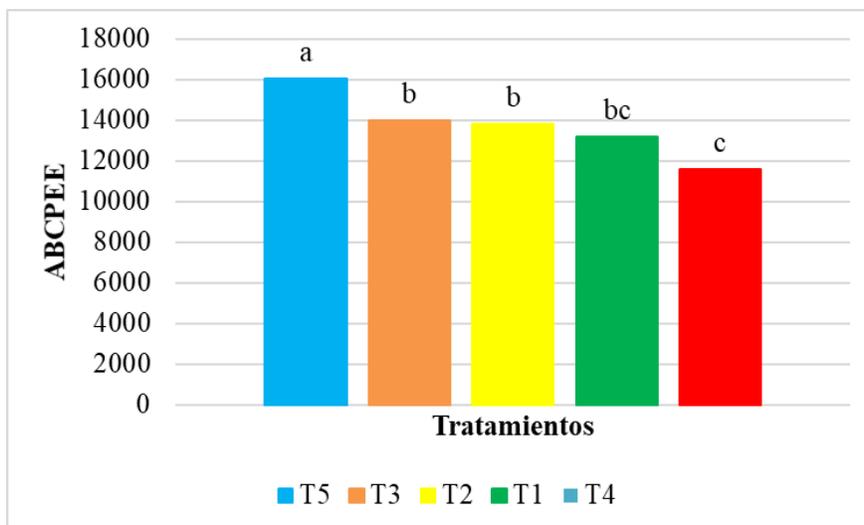


Figura 11. Área bajo la curva escalonada del progreso de la enfermedad (ABCPEE), causada por la inoculación de *A. solani* sobre hojas de tomate bajo condiciones controladas 30 días post inoculación.

Barras con letras desiguales difieren significativamente por la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

Leyenda: T1 (*Azotobacter* sp.); T2 (*Azospirillum* sp.); T3 (*Pseudomonas* sp.); T4 (Control Químico con Azoxystrobin y Tebuconazole); T5 (Testigo absoluto).

Al evaluar la Tasa de Progreso de la Enfermedad (TPE), se encontró que a los 30 días después de la aplicación de los tratamientos se muestra un crecimiento que va desde 0,32 a 0,45 % por día del inóculo de la enfermedad (Figura 11).

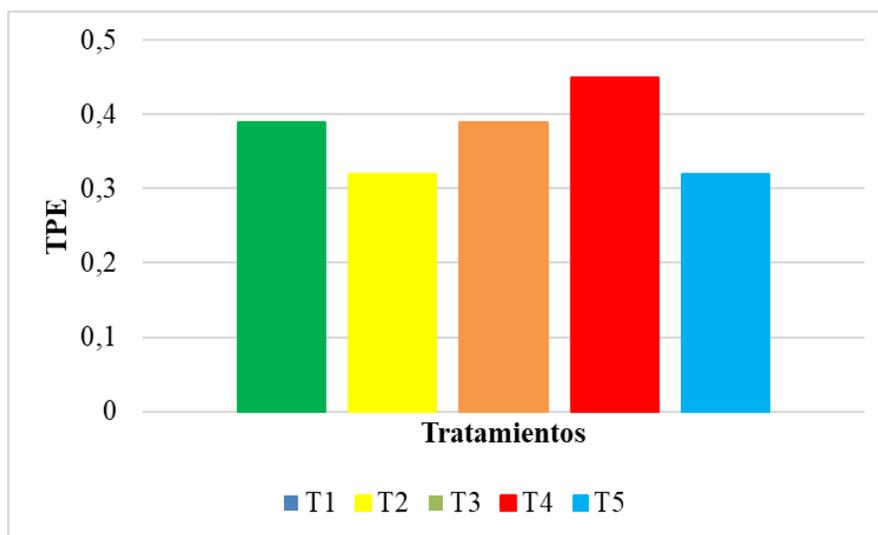


Figura 12. Tasa de progreso de la enfermedad (TPE), causada por la inoculación de *A. solani* sobre hojas de tomate bajo condiciones controladas 30 días post inoculación.

Barras con letras desiguales difieren significativamente por la prueba de Kruskal Wallis ($\alpha < 0,05$).

Leyenda: T1 (*Azotobacter* sp.); T2 (*Azospirillum* sp.); T3 (*Pseudomonas* sp.); T4 (Control Químico con Azoxystrobin y Tebuconazole); T5 (Testigo absoluto).

Así mismo se determinó la eficacia del control o del biocontrol, donde la mayor eficacia se da en el tratamiento 4, correspondiente al control químico (44,76), mientras que los tratamientos 1, 2 y 3, con *Azotobacter* (32,2), *Azospirillum* (32,2) y *Pseudomonas* (28,01), difieren con el tratamiento químico, pero estadísticamente no presentan diferencias significativas entre sí.

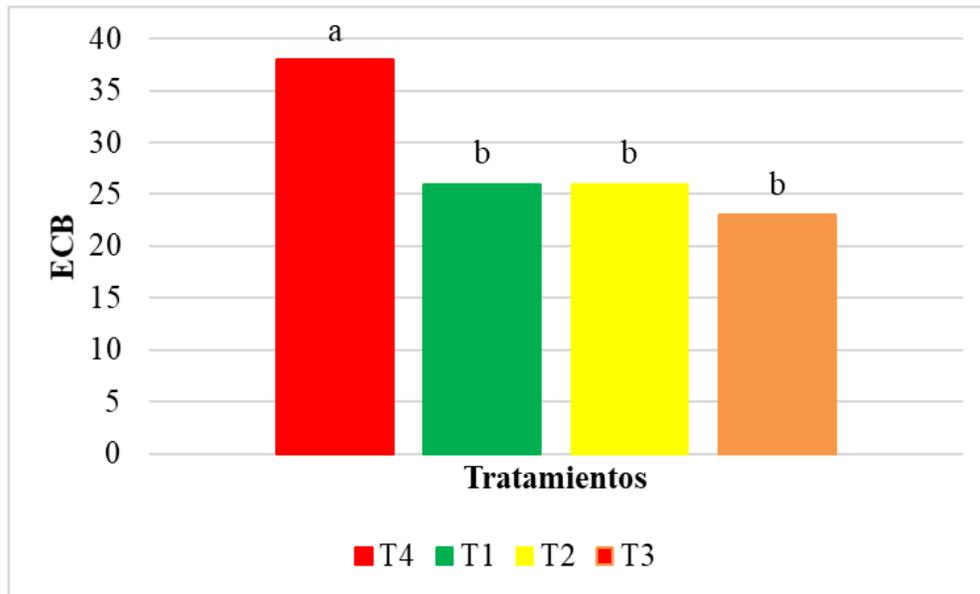


Figure 13. Eficacia del biocontrol (ECB) causado por la inoculación de *A. solani* sobre hojas de tomate bajo condiciones controladas 30 días post inoculación.

Letras que están en cada barra, presentan diferencias entre rangos según la prueba de Kruskal Wallis ($\alpha < 0,05$).

Leyenda: T1 (*Azotobacter* sp.); T2 (*Azospirillum* sp.); T3 (*Pseudomonas* sp.); T4 (Control Químico con Azoxystrobin y Tebuconazole).

El índice de sanidad representa los días que se necesitan para bajar los índices de severidad en el cultivo de tomate, con ello se determinó que en el tratamiento químico (T4) la enfermedad se puede reducir en 2 días y 23 minutos, mientras que los tratamientos bacterianos no difieren entre sí, donde *Azotobacter* (T1) reduce la enfermedad en 3 días y 71 minutos, *Azospirillum* (T2) en 4 días y 09 minutos y *Pseudomonas* (T3) en 3 días y 93 minutos; por lo que en los tratamientos bacterianos no se presentan diferencias significativas y la enfermedad puede disminuir en un rango de entre 3 y 4 días.

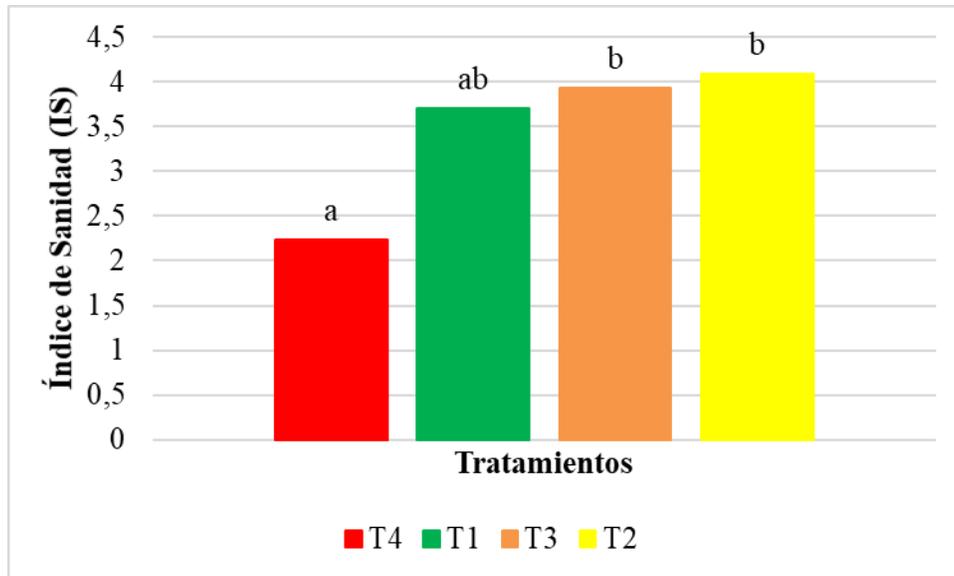


Figura 14. Índice de Sanidad (IS) causado por la inoculación de *A. solani* sobre hojas de tomate bajo condiciones controladas 30 días post inoculación.

Letras que están en cada barra, presentan diferencias entre rangos según la prueba de Kruskal Wallis ($p < 0,05$).

Leyenda: T1 (*Azotobacter* sp.); T2 (*Azospirillum* sp.); T3 (*Pseudomonas* sp.); T4 (Control Químico con Azoxystrobin y Tebuconazole); T5 (Testigo absoluto).

7. DISCUSIÓN

7.1. Discusión para el Primer Objetivo

Se encontró que la bacteria *Azotobacter* sp., tiene un buen potencial de para el control biológico de *A. solani*, lo que coincide con estudios anteriores de Rodríguez et al (2016) que demuestran la efectividad de *Azotobacter* sp. y *Bacillus* sp. para el control de hongos fitopatógeno en hortalizas. Así mismo, un estudio de Mushtaq et al., (2018) demostraron que la especie de *Azotobacter nigricans* inhibe el crecimiento de *A. solani* en un 31,56 %. Sin embargo, en el presente estudio *Azotobacter* sp. tuvo el mayor PICR con el 60,70 %, esto podría darse debido a que la cepa usada está caracterizada en género; por consecuencia, los resultados obtenidos confirman el potencial de la bacteria en el control biológico de enfermedades fungosas, con porcentajes de inhibición más altos que en estudios previos, debido a la posible variedad de especies encontradas dentro de la cepa empleada.

Por otro lado, *Azospirillum* sp., y *Pseudomonas* sp. mostraron un nivel de biocontrol deficiente al inhibir el crecimiento radial del hongo en un 33,92 % y un 33,84 %, respectivamente; resultados que se difieren con lo obtenido por Mehmood et al., (2021) quienes estudiaron diversos géneros y especies bacterianas, para el control de *A. solani* en papa y demostraron un efecto antagónico fuerte y moderado, con valores de inhibición del 72,1 % en *Azospirillum lipferum* y 27,6 % en *Azospirillum brasillense*. Así mismo, Joseph et al., (2017) estudiaron la efectividad de varias bacterias en el control de *A. solani* y determinaron que dos aislados de *Pseudomonas fluorescens* inhiben el crecimiento del hongo en un 47,22 % y 45,55 %, correspondientemente, en condiciones *in vitro*. Además, Gakegne et al. (2017) trabajaron con varias especies de *Pseudomonas* y demostraron que la efectividad de biocontrol depende de la cepa usada, en su estudio la cepa de *P. protegens* PF-5 tiene efecto inhibitorio, fungicida y fungistático sobre *A. solani*. Resultados que indican que el nivel de biocontrol varía en función de la especie usada, donde las bacterias, a pesar de ser del mismo género, presentan mayor o menor biocontrol en función de la especie utilizada, al comparar los estudios previos con los obtenidos actualmente se refuerzan la idea de que *Azospirillum* sp., y *Pseudomonas* sp. son una alternativa de biocontrol bajo condiciones *in vitro*.

De forma general se observó que *Azotobacter* sp., *Azospirillum* sp. y *Pseudomonas* sp., presentaron un efecto biocontrolador de *A. solani* en comparación al testigo, esto puede deberse a que las bacterias antagonistas son capaces de limitar el crecimiento fitopatógeno debido a la competencia por nutrientes, minerales y espacio; además, son capaces de producir metabolitos secundarios y espectro de antibióticos, incluido el ácido fenacina-1-carboxílico (PCA),

pirrolnitrina, pioluteorina, 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG), zwittermicina. y los sideróforos, pioquelina y pioverdina, que pueden suprimir los patógenos (Hernández-Rodríguez et al.,2014).

7.2. Discusión para el Segundo Objetivo

El tratamiento químico (Azoxystrobin + Tebuconazole) presentó los niveles más bajos de severidad, coincidiendo con Alvarado (2017), quien utilizó varios fungicidas químicos para el control de *Alternaria* sp., en el cultivo de ají, y determinó que el tratamiento con principio activo Azoxystrobin + Tebuconazole, controló el 80 % del daño efectuado por *Alternaria* sp., en cultivo de ají escabeche. Así mismo, Savitha y Ajithkumar (2016), evaluaron Azoxystrobin + Tebuconazole en el control de *Alternaria porri* en cebolla y concluyó que podría usarse para el manejo efectivo de la mancha morada de la cebolla, ya que redujo la enfermedad y obtuvo mayores rendimientos, así mismo menciona que Azoxystrobin y Tebuconazole pertenecen al grupo de estobilurina y triazol, que podría haber matado las esporas de hongos, lo que dio como resultado una menor incidencia de enfermedades y un mayor rendimiento. De igual manera, Serdyuk et al. (2021), estudiaron la capacidad de los fungicidas para reducir la susceptibilidad de las plantas a *Alternaria*, en el cultivo de mostaza parda, donde Azoxystrobin y Tebuconazole disminuyeron la enfermedad en un 71 y 83 %, respectivamente. Por lo que todos los estudios mencionados, avalan la efectividad de Azoxystrobin + Tebuconazole en el control de *Alternaria*, en diversos cultivos de interés agrícola.

Por otra parte, los tratamientos donde se usaron *Azotobacter* sp., *Azospirillum* sp. y *Pseudomonas* sp., no mostraron diferencias significativas entre sí, alzando niveles de severidad de 38 a 40 %; donde *Azotobacter* sp., y *Azospirillum* sp. Coincidiendo con Mehmood et al., (2021) estudiaron el biocontrol de *Azospirillum* sp., en plantas de papa y determinaron que *A. lipoferum* AL-3 redujo significativamente la incidencia de la enfermedad del tizón temprano, donde el índice de enfermedad se disminuyó entre un 37,5 % y un 53,4 %, tanto en condiciones de invernadero como en campo. Conjuntamente, Bhosale (2021), evaluó el biocontrol de *Azotobacter* sp., y demostró que la cepa de *Azotobacter chroococcum* SR-14 mostró mayor potencial antifúngico contra muchas enfermedades fungosas, entre ellas *Alternaria*; igualmente Mali y Bodhankar (2009), informaron la inhibición de *Aspergillus terrus*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus* y *Fusarium oxysporum* por *Azotobacter chroococcum* aislado del suelo de la rizosfera de plantas de maní. Por otro lado, un estudio de Jagadeesh et al. (2009) encontraron que *Pseudomonas gladioli* B25 controla la enfermedad del tizón temprano en un 60,2 %, sin embargo, esto difiere con lo

encontrado en el presente estudio, debido a que la aplicación del biocontrol se realizó por el método de aspersión foliar, a diferencia del estudio de Jagadeesh et al., (2009), quienes optaron por la combinación de varios métodos (método de tratamiento de semillas + método de aplicación al suelo + método de vivero + método de aspersión foliar + método de inmersión de raíces), obteniendo un control más eficiente de la enfermedad. Por otro lado, Rodríguez y Stefanova (2005), demostraron que *Pseudomona aeruginosa* controla la severidad de *A. solani* hasta en un 41,07 %, lo cual es similar al presente estudio. Con todos los estudios previos mencionados, se refuerza la idea de que las bacterias presentan distintos niveles de biocontrol en función a la cepa y especie utilizada, además, se ha demostrado que el método de aplicación también es parte esencial en el control de enfermedades, donde la combinación de varios métodos de aplicación presenta niveles más altos de biocontrol, lo que se visualiza con incidencia y severidad más baja.

En referencia al parámetro ABCPE y ABCPEE, se evidenció una mayor concentración de inóculo en el tratamiento testigo y la menor concentración en el tratamiento químico, siendo los tratamientos bacterianos, estadísticamente similares. Un estudio realizado por Faberi et al. (2022), donde estudiaron el control biológico con *Trichoderma harzianum*, en el cultivo de papa, aplicaron el biocontrol cada 7 y cada 15 días y determinaron que el progreso de la enfermedad (*A. solani*) es más lenta con la aplicación semanal, en comparación con el tratamiento testigo; lo que indica que la aplicación continua de los biocontroladores ayuda a reducir el área bajo la curva del progreso de la enfermedad.

La tasa de progreso de la enfermedad no presentó diferencias significativas y varía de 0,32 a 0,45 %, lo cual coincide con los resultados obtenidos por Faberi et al., (2022) donde determinaron que tasa de crecimiento de *Alternaria* sp., sin la aplicación del biocontrol, fue de 0,49 % por día y de 0,13 % por día con la aplicación de *Trichoderma harzianum*, indicando que al aplicar un biocontrol la tasa de progreso de la enfermedad disminuye.

En base al parámetro de eficacia del biocontrol, no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos bacterianos evaluados porque están en un rango de 28 a 32 %, sin embargo, la mayor eficacia se evidencia en el tratamiento químico con valores del 44,76 %. Un estudio realizado por Rodríguez y Stefanova (2005), determinaron que un biocontrolador a base de *Pseudomona aeruginosa* presentó una eficacia del 48,82 %, aumentando el rendimiento de papa al aplicar el biocontrol 4 veces, cada 7 días; esto difiere con los resultados obtenidos para la eficacia

de los biocontroladores bacterianos y puede deberse principalmente a que la aplicación del biocontrol se realizó solamente una vez, además no se trabajó con una especie en específico, por lo que se cree que las especies encontradas dentro de las cepas empleadas no poseen altas características biocontroladoras. Por otra parte, se ha observado que el principio activo Azoxystrobin + Tebuconazole es eficiente en el control de *Alternaria* sp., por lo que Jambhulkar et al. (2012) informaron que la pulverización de azoxistrobina mostró una efectividad del 38,9 % en comparación con el control, en *Alternaria*. Así mismo, Sahu et al., (2013) determinaron que el fungicida de estrobilurina Pristine 38 % es eficiente en el control de *A. solani* en tomate, mostrando una eficacia de hasta un 31,88 %. Estudios previos corroboran la efectividad del tratamiento 5 (químico), el cual es altamente eficaz en el control de *A. solani*, según García (2011), la axozitrobina, al pertenecer al grupo de las estrobilurinas intervienen sobre la respiración mitocondrial, lo que impide la germinación de esporas y el crecimiento de micelios; mientras que el grupo de los triazoles (Tebuconazole) inhibe la biosíntesis del ergosterol, disminuyendo la fluidez e integridad de la membrana celular del patógeno.

Finalmente, se pudo observar, en relación con el índice de sanidad del cultivo que, la enfermedad se puede reducir en un rango de 2 a 4 días, donde el tratamiento químico presenta los mejores índices de sanidad. La reducción de la enfermedad puede deberse principalmente a los mecanismos de acción empleada tanto por las bacterias antagonistas, como por los principios activos del tratamiento químico. Chulze (2023), menciona que los agentes de control biológico de origen micobiano pueden ejercer acción directa o indirecta sobre los patógenos, directa afectando sus procesos reproductivos, impidiendo su alimentación o causando la muerte, e indirectos cuando estimulan mecanismos de defensa propios de la planta. Así mismo, Miles et al. (2004), determinaron que los triazoles y las estrobilurinas son eficientes para controlar enfermedades fungosas y necesario para obtener frutos saludables.

8. CONCLUSIONES

- Con base en los resultados obtenidos, se determinó que bajo condiciones *in vitro*, la capacidad antagónica de *Pseudomonas* sp. y *Azospirillum* sp. es deficiente con un PICR de 33,92 % y 33,84 %, respectivamente, mientras que *Azotobacter* sp. tiene un PICR mayor al 60,70 %, el mismo que ejerce un nivel de biocontrol bueno para *Alternaria solani*, en comparación del tratamiento control.
- El tratamiento químico presentó los índices más bajos de severidad y de forma general fue el más eficaz en el control de la enfermedad, mientras que las bacterias *Azotobacter* sp., *Azospirillum* sp, y *Pseudomonas* sp., no presentan diferencias entre sí al momento de controlar la enfermedad; sin embargo, mostraron un biocontrol significativo en comparación con el testigo.

9. RECOMENDACIONES

- ✓ En futuros ensayos probar diferentes concentraciones de suspensiones bacterianas e identificar las bacterias a nivel de especie, para que se puedan encontrar especies más eficientes en el control de *A. solani*, ya que en el presente estudio solo se trabajó con una concentración bacteriana identificada en género, más no en especie.
- ✓ Para la aplicación del patógeno se puede experimentar con varias formas de aplicación, por aspersión, inmersión de raíces, aplicación edáfica, etc.
- ✓ Para el control biológico de *A. solani* se recomienda usar *Azotobacter* sp., *Azospirillum* sp. y *Pseudomonas* sp. en concentraciones de 10^8 o superiores.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Adhikari, P., Oh, Y., & Panthee, D. R. (2017). Current Status of Early Blight Resistance in Tomato: An Update. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10), 2019.
- Agrios, G. (1985). Introducción a la fitopatología. En Agrios, *Fitopatología* (pp. 360-362). España: Limusa.
- García, L. (2016). LMR en el cultivo de tomate, basado en el mapa de Agrocalidad. Recuperado de: <https://www.agrocalidad.gob.ec/mapa-de-lmr/>
- Bashan, Y., & de-Bashan, L. E. (2010). Chapter Two—How the Plant Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum* Promotes Plant Growth—A Critical Assessment. En D. L. Sparks (Ed.), *Advances in Agronomy* (Vol. 108, pp. 77-136). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(10\)08002-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(10)08002-8)
- Cassan, F. D., Coniglio, A., Amavizca, E., Maroniche, G., Cascales, E., Bashan, Y., & de-Bashan, L. E. (2021). The *Azospirillum brasilense* type VI secretion system promotes cell aggregation, biocontrol protection against phytopathogens and attachment to the microalgae *Chlorella sorokiniana*. *Environmental Microbiology*, 23(10), 6257-6274. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15749>
- Chanaluiza-Saltos, J. S., Sánchez, A. R. Á., Reyes-Pérez, J. J., & Lizarde, N. A. (2022). Respuesta Agronómica y Fitosanitaria de plantas de Tomate (*solanum lycopersicum* L.) a la aplicación de Quitosano en condiciones controladas. *Revista Científica Agroecosistemas*, 10(1), Article 1.
- Chulze, S. N. (2023). Agentes de control biológico de origen microbiano para reducir el impacto de hongos patógenos y toxicogénicos. *Revista Argentina de Microbiología*, 55(1), 1-2. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2023.02.001>
- del Puerto Rodríguez, A. M., Suárez Tamayo, S., & Palacio Estrada, D. E. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 52(3), 372-387.
- Dimkić, I., Janakiev, T., Petrović, M., Degrassi, G., & Fira, D. (2022). Plant-associated *Bacillus* and *Pseudomonas* antimicrobial activities in plant disease suppression via biological control mechanisms—A review. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 117, 101754. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2021.101754>
- ESPAC. (2022). Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua. Recuperado el 15 de enero de 2023 de <https://www.ecuadorencifras.gob.ec/estadisticas-agropecuarias-2/>

- Faberi, A. J., Sanchez, M. C., Ramirez, N. M. P., & Hansen, M. (2022). Biocontrol de *Alternaria solani* y *A. alternata* en el cultivo de papa con *Trichoderma harzianum*. *Revista Latinoamericana de la Papa*, 26(N1), Article N1. <https://doi.org/10.37066/ralap.v26iN1.438>
- FAOSTAT. (2022). FAOSTAT. <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL/visualize>
- Gakegne, E. R., Plasencia Márquez, O., Hernández-Rodríguez, A., de La Fe Pérez, Y., & Martínez Coca, B. (2017). Actividad antagónica de *Pseudomonas* spp. Fluorescentes ante *Alternaria solani* Sorauer, patógeno de la papa (*Solanum tuberosum* L.). *Revista de Protección Vegetal*, 32(3), 00-00.
- Gauri, S. S., Mandal, S. M., & Pati, B. R. (2012). Impact of *Azotobacter* exopolysaccharides on sustainable agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(2), 331-338. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4159-0>
- Gómez, M. M., Mercado, E. C., & Pineda, E. G. (2014). *Azospirillum* una rizobacteria con uso potencial en la agricultura. *Biológicas Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*, 16(1), 11-18.
- Gutierrez, A., Robles, A., Santillan, C., Ortiz, M., & Cambero, O. J. (2013). CONTROL BIOLÓGICO COMO HERRAMIENTA SUSTENTABLE EN EL MANEJO DE PLAGAS Y SU USO EN EL ESTADO DE NAYARIT, MEXICO. <http://revistabiociencias.uan.edu.mx/index.php/BIOCIENCIAS/article/download/40/38>.
- Hernández-Herrera, R. M., Santacruz-Ruvalcaba, F., Ruiz-López, M. A., Norrie, J., & Hernández-Carmona, G. (2014). Effect of liquid seaweed extracts on growth of tomato seedlings (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of Applied Phycology*, 26(1), 619-628.
- Hernández-Rodríguez A, Ruíz Y, Acebo Y, Miguélez Y, Heydrich M. Antagonistas microbianos para el manejo de la pudrición negra del fruto en *Theobroma cacao* L. Estado actual y perspectivas de uso en Cuba. *Rev. Protección Veg.* 2014; 29 (1): 11-19. ISSN: 2224-4697.
- Joseph, A., Igbinsola, O. B., Alori, E. T., Ademiluyi, B. O., & Aluko, A. P. (2017). Effectiveness of *Pseudomonas* species in the management of tomato early blight pathogen *Alternaria solani*. *African Journal of Microbiology Research*, 11(23), Article 23.
- Kipgen, T. L., Bora, L. C., Goswami, G., Barooah, M., Borah, P. K., & Puzari, K. C. (2021). Isolation and characterization of fluorescent *Pseudomonas* with bio-control potential against *Ralstonia solanacearum*. *Indian Phytopathology*, 74(4), 1055-1064. <https://doi.org/10.1007/s42360-021-00400-9>

MAG. (2022).

Mehmood, T., Li, G., Anjum, T., & Akram, W. (2021). Azospirillum lipoferum strain AL-3 reduces early blight disease of potato and enhance yield. *Crop Protection*, 139, 105349. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105349>

Miles, A.K.; Willingham, S.L.; Cooke, A.W. (2004). Field evaluation of strobilurins and a plant activator for the control of citrus black spot. *Aust. Plant Pathol.* 33, 371-378

Morán, M. E. (2008). Aislamiento, caracterización y análisis funcional del gen «Thpg1» de «*Trichoderma harzianum*». <https://doi.org/10.14201/gredos.22506>

Mushtaq, S., Shafiq, M., Ashfaq, M., Khan, F., Afzaal, S., Hussain, U., Hussain, M., Balal, R. M., & Haider, M. S. (2018). Isolation and morphological characterization of novel bacterial endophytes from citrus and evaluation for antifungal potential against *Alternaria solani*. *Biologia (Pakistan)*, 64(1), 119-128.

Pavón, M. Á., González Alonso, I., Martín de Santos, R., & García Lacarra, T. (2012). Importancia del género *Alternaria* como productor de micotoxinas y agente causal de enfermedades humanas. *Nutrición Hospitalaria*, 27(6), 1772-1781. <https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.6.6017>

Paz, N. S. R., Aballe, Á. G. P., Gómez, S. R., & Noris, P. N. (2013). Comportamiento del tizón temprano del tomate (*Alternaria solani*) en las condiciones del municipio de Holguín, Cuba. *Fitosanidad*, 17(2), 75-81.

Pérez, S., Coto Arbelo, O., Echemendía Pérez, M., & Ávila Quezada, G. (2015). *Pseudomonas fluorescens* Migula, ¿control biológico o patógeno?: *Pseudomonas fluorescens*, biological control or pathogen? *Revista de Protección Vegetal*, 30(3), 225-234.

Reis, V. M., Baldani, V. L. D., & Baldani, J. I. (2015). Isolation, Identification and Biochemical Characterization of *Azospirillum* spp. And Other Nitrogen-Fixing Bacteria. En F. D. Cassán, Y. Okon, & C. M. Creus (Eds.), *Handbook for Azospirillum: Technical Issues and Protocols* (pp. 3-26). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-06542-7_1

Reyes. (2016). Control de tizón en tomate industrial mediante un sistema de alerta temprana.

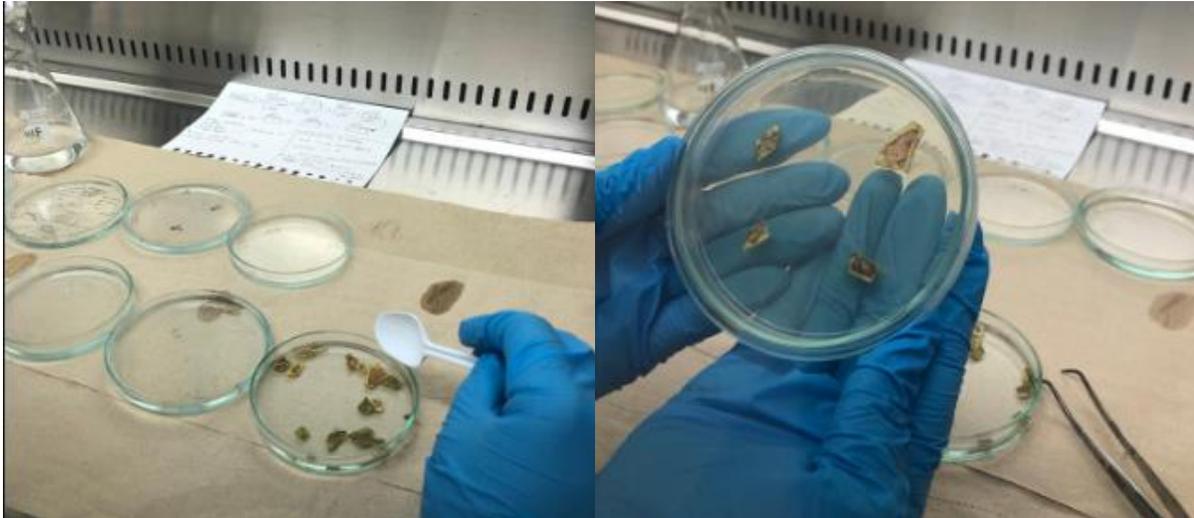
Rodríguez, J., Ríos Rocafull, Y., & Baró Robaina, Y. (2016). Efectividad de cepas de *Azotobacter* sp. Y *Bacillus* sp. Para el control de especies fúngicas asociadas a hortalizas. *Cultivos Tropicales*, 37, 13-19.

- Rodríguez-Romero, V. M., Villanueva-Arce, R., Trejo-Raya, A. B., & Bautista-Baños, S. (2019). Chitosan and *Pseudomonas fluorescens* extracts for *Alternaria alternata* control in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Mexican Journal of Phytopathology*, 37(2), Article 2. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1812-2>
- Rojas Figueroa, K. E. (2020). Extracción del compuesto químico de la especie *Carijoa Riisei* para la evaluación de la acción inhibitoria de cepas bacterianas: *Staphylococcus aureus*, *salmonella choleraesuis*, *escherichia coli*, *bacillus subtilis* y *aspergillus niger*. <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/51084>
- Saavedra del R., G., Jana A., C., & Kehr M., E. (eds). (2019). Hortalizas para procesamiento agroindustrial. <https://biblioteca.inia.cl/handle/20.500.14001/6818>
- Savitha, A., & Ajithkumar, K. (2016). Evaluation of Newer Combination of Azoxystrobin and Tebuconazole for the Management of Purple Blotch of Onion. *Madras Agricultural Journal*, 103. <https://doi.org/10.29321/MAJ.10.001026>
- Sepúlveda R., P. (2018). *Alternaria* en tomate. N°12, 12.
- Serdyuk, O., Trubina, V., & Gorlova, L. (2021). The effect of fungicides on reducing the harmfulness of *Alternaria* blight of brown mustard. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 699(1), 012018. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/699/1/012018>
- Tandazo, N. (2015). Efecto de *Hypocrea lixii* sobre el tizón temprano del tomate *Alternaria solani* en condiciones de invernadero Guayas 2014 [masterThesis]. Facultad de Ciencias Agrarias Universidad de Guayaquil.
- Vinchira-Villarraga, D. M., & Moreno-Sarmiento, N. (2019). Control biológico: Camino a la agricultura moderna. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 21(1), 2-5. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v21n1.80860>.

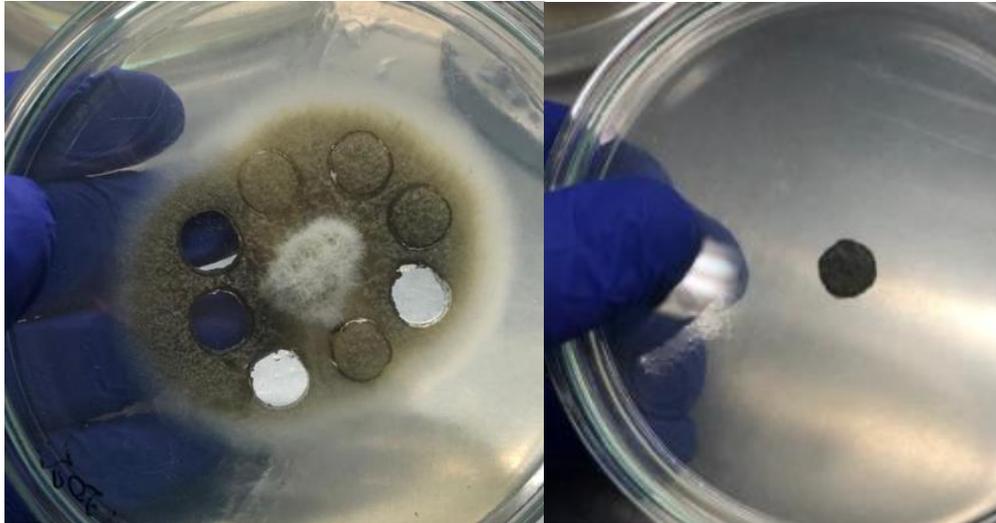
11. ANEXOS



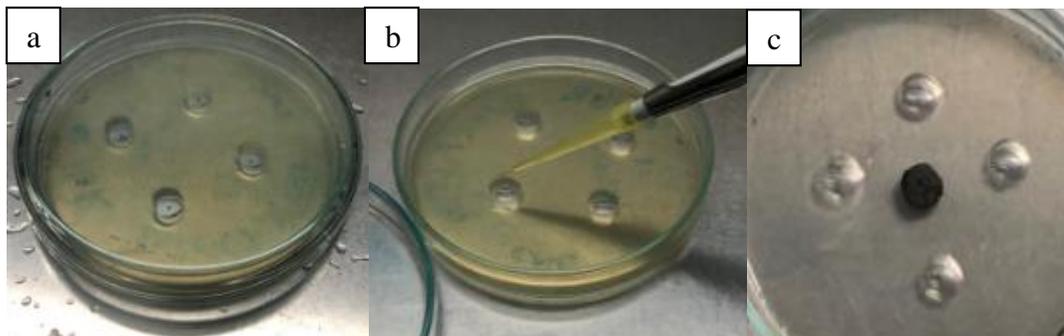
Anexo 1. Recolección del material vegetal infectado con el patógeno.



Anexo 2. Cultivo del patógeno (*A. solani*).



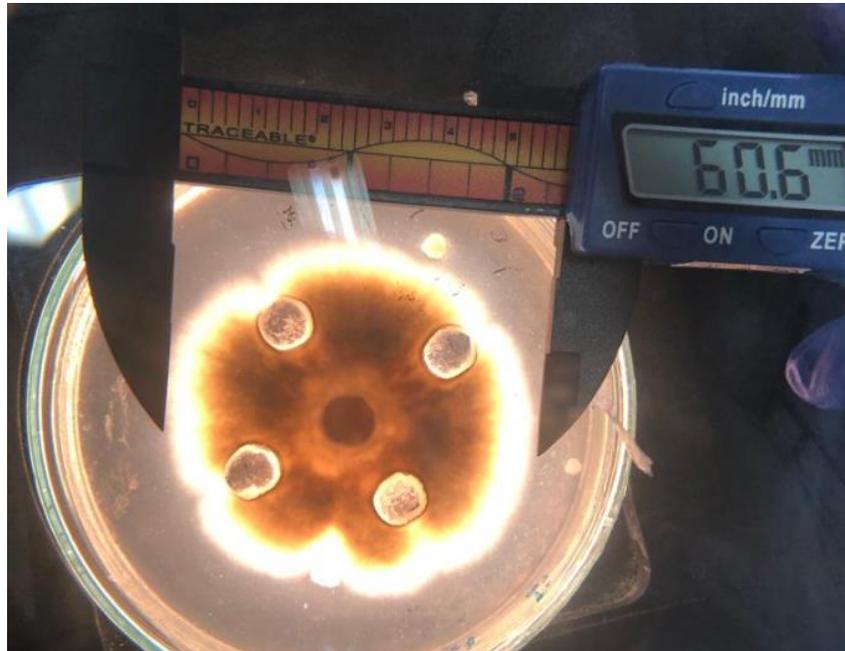
Anexo 3. Colonia pura del hongo y repique.



Anexo 4. Técnica de difusión en medio de cultivo. a) Orificios en el medio de cultivo (PDA); b) Aplicación de suspensiones bacterianas; c) Colocar el patógeno en el centro del medio de cultivo.



Anexo 5. Sellar y etiquetar las cajas con los nombres de los tratamientos de estudio.



Anexo 6. Toma de datos, con calibrador digital.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
PICR	28	0,63	0,58	57,81

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	5292,47	3	1764,16	13,47	<0,0001
Tratamiento	5292,47	3	1764,16	13,47	<0,0001
Error	3143,18	24	130,97		
Total	8435,65	27			

Anexo 7. Análisis de varianzas.

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=16,87465

Error: 130,9657 gl: 24

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
1	38,87	7	4,33	A
2	20,19	7	4,33	B
3	20,12	7	4,33	B
0	0,00	7	4,33	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 8. Prueba Tukey.



Anexo 9. Plantas de tomate bajo condiciones controladas.



Anexo 10. Síntomas característicos de *Alternaria solani*, en hojas de tomate.

Lic. Alexander Masache Escobar, Mgs

0987216493

alexander.masache@educacion.gob.ec

Loja - Ecuador

Loja, 16 de enero del 2024

El suscrito, Alexander Masache Escobar, Mgs, **DOCENTE EDUCACION BASICA**
(registro de la SENESCYT número: 1031-2023-2668502), **ÁREA DE INGLÉS-UNIDAD EDUCATIVA**
PADRE JULIAN LORENTE, a petición de la parte interesada y en forma legal

CERTIFICA:

Que la traducción del resumen del documento adjunto, solicitado por la señorita: **Evelyn Anahí Cando Calderón** con cédula de ciudadanía N° **1105120396**, cuyo tema de investigación se titula: *"Use of antagonistic microorganisms for the control of Alternaria solani on tomato (Solanum lycopersicum L) under controlled conditions."* *Agronomy Career*, ha sido realizado y aprobado por mi persona, Alexander Masache Escobar, Mgs. Docente de Educación Básica en la enseñanza del inglés como lengua extranjera.

El apartado del Abstract es una traducción textual del Resumen aprobado en español.

Particular que comunico en honor a la verdad para los fines académicos pertinentes, facultando al portador del presente documento, hacer uso legal pertinente.



Lic. Alexander Masache Escobar, Mgs.
English Professor

Anexo 11. Certificación de la traducción de resumen.