

MICROORGANISMOS PROMOTORES DE CRECIMIENTO EN EL BIOCONTROL DE *Alternaria alternata* EN TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.)

Yelitza Coromoto Alcedo¹ e Isbelia Reyes²

RESUMEN

Se evaluó el efecto biocontrolador en condiciones de laboratorio y umbráculo de cinco microorganismos promotores de crecimiento de plantas (MPCP): *Trichoderma koningii* aislado Vp, *Penicillium rugulosum* aislado IR, *Penicillium* sp. aislado 20, *Enterobacter* sp. cepa CR y *Bacillus megaterium* cepa 24B2 sobre dos aislados del patógeno identificado como *Alternaria alternata* (475 y 485), en el cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Para esto, se realizaron pruebas de: 1) antagonismo y germinación en laboratorio, 2) crecimiento en semillero, y 3) crecimiento en macetas utilizando un suelo natural. El efecto biocontrolador de los MPCP mostró que *T. koningii* Vp ejerció el mayor efecto antagónico sobre los dos aislados de *A. alternata* desde el inicio hasta las 72 h de medición, y asimismo incrementó significativamente ($P \leq 0,05$) el porcentaje de germinación de las semillas de tomate. En el ensayo de semillero se encontró que las plántulas de *S. lycopersicum* inoculadas con los MPCP, *T. koningii* Vp y *P. rugulosum* IR presentaron el menor porcentaje de infección del patógeno. En la etapa de maceta, el porcentaje de manchas de infección en la hoja de la planta del tratamiento inoculado con *T. koningii* Vp mostró un biocontrol significativo ($P \leq 0,05$) sobre los patógenos, seguido del aislamiento de *Enterobacter* sp. cepa CR. Los MPCP evaluados en los diferentes bioensayos mostraron variabilidad en sus competencias de biocontrol y de promoción del crecimiento de las plantas de tomate, en relación al aislado del patógeno *A. alternata* y al estado de crecimiento de la planta.

Palabras clave adicionales: Antagonismo, *Enterobacter* sp., MPCP, *Penicillium rugulosum*, *Trichoderma koningii*

ABSTRACT

Plant growth promoting microorganisms on biocontrol of *Alternaria alternata* in tomato (*Solanum lycopersicum* L.)

The biocontrol effect of five plant growth promoting microorganisms (PGPM): *Trichoderma koningii* strain Vp, *Penicillium rugulosum* strain IR, *Penicillium* sp. strain 20, *Enterobacter* sp. strain CR, and *Bacillus megaterium* strain 24B2 was evaluated in laboratory and greenhouse conditions on two isolates of the pathogen *Alternaria alternata* identified as 475 and 485, during the cultivation of tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.). For this, it was stated the following steps: 1) antagonism and germination in laboratory conditions, 2) plantlet growth in propagation trays, and 3) plant growth in pots using a natural soil. The biocontrol effect of these PGPM showed that *T. koningii* Vp induced the most antagonistic effect since the beginning until 72 hours of measuring on the two isolates of *A. alternata*, and also the germination percentage of seeds was increased significantly ($P \leq 0.05$). Likewise, at greenhouse conditions, it was found that plantlets inoculated with both PGPM, *T. koningii* Vp and *P. rugulosum* IR, showed the lowest percentage of infection for the two pathogen isolates. In the pot experiment, the percentage of leaf spot infection on the plants inoculated with *T. koningii* Vp showed a significant ($P \leq 0.05$) biocontrol over pathogens, followed by those inoculated with *Enterobacter* sp. strain CR. It is concluded that PGPR evaluated over different experiments showed variability in their biocontrol competence and plant growth promotion of tomato, related to the pathogen *A. alternata* and the plant growth state.

Additional key words: Antagonism, *Enterobacter* sp., *Penicillium rugulosum*, PGPM, *Trichoderma koningii*

INTRODUCCIÓN

Una de las hortalizas más difundidas y de mayor valor económico mundial es el tomate,

cuya demanda aumenta continuamente y con ella su producción y comercio. Sin embargo, dentro de los factores limitantes de la producción juegan un papel primordial aquellos de orden fitosanitario

Recibido: Febrero 5, 2017

Aceptado: Noviembre 13, 2017

¹ Instituto Nacional de Salud Agrícola Integral Laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario INSAI Táchira, San Cristóbal, Venezuela. e-mail: yeli_alcedo@hotmail.com

² Universidad Nacional Experimental del Táchira, Laboratorio de Biofertilizantes. Apdo. 5001. San Cristóbal, Venezuela. e-mail: isreyes@unet.edu.ve (autor de correspondencia)

como los hongos del género *Alternaria*, particularmente *A. alternata* que causa severas pérdidas económicas, especialmente en el producto para la industria (Mejía y Hernández, 2001).

En la agricultura convencional moderna los fungicidas son la principal herramienta empleada para el control de hongos fitopatógenos. El uso continuo y excesivo de estos productos químicos ha traído como consecuencia el desarrollo de resistencia a los fungicidas utilizados. Por otra parte, existe una gran variedad de microorganismos susceptibles de ser usados como elementos biológicos de control de enfermedades por interferir en la biología de los microorganismos patógenos de plantas, denominados agentes de biocontrol. Algunos de estos agentes son reconocidos como microorganismos promotores del crecimiento de plantas (MPCP) ya que colonizan las raíces con efectos benéficos en el desarrollo y crecimiento vegetal (Compant et al., 2005).

Diversos géneros de MPCP han sido utilizados para incrementar la producción de múltiples cultivos, bien sea por su participación en el control biológico de hongos y bacterias fitopatógenas (Carrillo et al., 2000), por su relación con la resistencia sistémica inducida (RSI) (Pieterse et al., 2014), por mejorar la salud vegetal al fijar nitrógeno atmosférico (Carrillo et al., 2000), disolver fosfatos inorgánicos (Reyes et al. 2008; Peña y Reyes, 2007). Este tipo de microorganismos benéficos ofrece una alternativa ambiental y económica al uso de fungicidas químicos, mediante la protección sistémica de los cultivos (Berg, 2009). Dada la importancia de estos microorganismos para el manejo sustentable de los cultivos, el objetivo del presente trabajo fue evaluar MPCP como agentes biocontroladores del hongo *Alternaria* spp. en tomate.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento e identificación de *Alternaria* spp.

Para aislar el hongo, se realizó un muestreo en plantas de tomate atacadas por este patógeno provenientes de los municipios Jáuregui y José María Vargas del estado Táchira. Los aislados de *Alternaria* spp. se identificaron utilizando microcultivos en PDA (Vera et al., 2005). Se sembró el patógeno en estudio y se llevó a una incubadora a una temperatura 27 ± 2 °C. A los 4

días de incubación se colocó una muestra en un portaobjeto, se tiñó con lactofenol azul de algodón y utilizando un microscopio compuesto se observó la formación de los conidios característicos del patógeno. Para su identificación se utilizó la clave de Actualización en los Sistemas de Clasificación e Identificación de Hongos Hifomicetos (Castañeda, 2004).

Pruebas de antagonismo. Estas pruebas se realizaron en condiciones de esterilidad utilizando una cámara de flujo laminar (Telfparbio II B) y se ejecutó el procedimiento según la metodología empleada por Vera et al. (2005). Para esto, los aislados de *Alternaria* spp. se evaluaron mediante pruebas de antagonismo con diferentes MPCP del banco de bacterias y hongos rizosféricos del Laboratorio de Biofertilizantes de la Universidad Nacional Experimental del Táchira (UNET), en San Cristóbal, de donde se seleccionaron tres hongos, *Trichoderma koningii* aislado Vp, *Penicillium rugulosum* aislado IR y *Penicillium* sp. aislado 20, y dos cepas bacterianas, *Enterobacter* sp. cepa CR y *Bacillus megaterium* cepa 24B2, como potenciales biocontroladores. La velocidad de crecimiento de los aislados seleccionados se evaluó mediante seis mediciones del crecimiento del diámetro de las colonias a intervalos de 12 h. Se realizaron comparaciones para determinar los microorganismos más eficientes como antagónicos (Vera et al., 2005). Se utilizaron como testigos los aislados de *Alternaria* spp. sembrados en el mismo medio sin los MPCP, a los cuales se les midió el crecimiento de manera similar a la ya descrita.

Efecto de los MPCP sobre la germinación de las semillas de tomate infectadas por los patógenos.

Se utilizaron semillas certificadas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) variedad Río Grande de crecimiento determinado. Éstas se desinfectaron por inmersión en etanol al 80 % por 5 min bajo condiciones de asepsia utilizando una cámara de flujo laminar (Telfparbio II B), luego se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio comercial al 5,25 % durante 5 min y por último, se enjuagaron con abundante agua destilada desionizada. Posteriormente se les dejó escurrir bajo las mismas condiciones de esterilidad descritas anteriormente. Los aislados, tanto de los patógenos como de los MPCP, fueron masificados de acuerdo al mejor medio de cultivo para su crecimiento (Peña y Reyes, 2007), los cuales

fueron el medio agar papa dextrosa (PDA) en el caso de los patógenos y el medio completo mineral (CM) (Reyes et al., 2002) para los MPCP.

Se realizaron suspensiones de los bioinóculos en una solución salina al 0,89 % y se midió su densidad en una cámara de Neubauer. La suspensión de los inóculos se mezcló con una solución de alginato de sodio al 1 % hasta obtener una densidad microbiana de $8-10 \times 10^8$ UFC·mL⁻¹, se agitó durante 20 min, se agregaron las semillas y se llevó nuevamente a agitación durante 40 min (Valery y Reyes, 2013). Seguidamente se colocaron 50 semillas previamente inoculadas en bandejas de aluminio con 150 g de arena estéril, inoculada con los patógenos a una densidad de $1-5 \times 10^5$ UFC·mL⁻¹ y humedecidas con agua destilada estéril.

Cada una de las bandejas se cubrió con una película transparente (Envoplast) y se hicieron pequeñas perforaciones a la misma para permitir la aireación; luego se mantuvieron bajo condiciones semi-estériles y de oscuridad dentro de una cámara de flujo laminar y finalmente, se realizaron observaciones de la emergencia de las plántulas cada dos días durante una semana.

Efecto de los MPCP sobre el crecimiento de las plántulas en semillero e infectadas por los patógenos. Las semillas de tomate se sembraron e inocularon con los microorganismos que presentaron los mejores resultados en las pruebas de antagonismo como MPCP. Las semillas se desinfectaron y los microorganismos patógenos y los promotores del crecimiento seleccionados se masificaron de acuerdo a la metodología explicada anteriormente. Se utilizaron bandejas de propagación y se colocaron tres semillas por celda con 100 g de sustrato constituido por turba canadiense.

Se utilizó una bandeja de 36 celdas para cada tratamiento. Los MPCP fueron inoculados en el sustrato al momento de la siembra agregando 1 mL de las diferentes suspensiones de $8-10 \times 10^8$ UFC·mL⁻¹ por celda. Las inoculaciones de los patógenos se realizaron tanto en el sustrato como en las plántulas en forma foliar y en la emergencia de las primeras hojas verdaderas. Para la inoculación en el sustrato se agregó 1 mL de cada suspensión por celda a una densidad de $1-5 \times 10^5$ UFC·mL⁻¹, 10 días después de la germinación. Luego, con esta misma densidad microbiana se realizó una reinoculación de los patógenos en

aspersión foliar a los 21 días de crecimiento de la planta. Las bandejas fueron regadas cada 2 días y fertilizadas dos veces cada 7 días con la solución nutritiva de Hoagland al 25 % de fortaleza. A los 7 días después de la germinación se realizó un raleo dejando una plántula por celda. Se realizaron observaciones de la presencia de síntomas (manchas marrones) cada 7 días después de la inoculación. Finalmente se calculó el porcentaje de infección considerando que una planta estaba infectada al presentar los primeros síntomas de la enfermedad. Se emplearon 36 plántulas por bandeja, con 4 semanas de crecimiento, en los diferentes tratamientos.

Efecto de los MPCP en el crecimiento de plantas infectadas en condiciones de umbráculo. Se utilizaron tres plántulas de tomate, de 4 semanas de crecimiento provenientes de los semilleros, en macetas con 5 kg de sustrato. Como sustrato se utilizó un suelo natural, no tratado, sin historia de siembra del cultivo. Los aislados, tanto de los patógenos como de los microorganismos con potencial bio-controlador, fueron masificados como se señaló anteriormente. A los 7 días después del trasplante se realizó el respectivo raleo dejando una planta por maceta y a los 15 días se realizó el tutorado de las plantas. Al cabo de 40 días de crecimiento se realizó la primera fertilización y a los 45 días se inocularon los MPCP en el suelo agregando 10 mL de la dilución microbiana respectiva por maceta. Los patógenos fueron inoculados en el suelo 8 días después de haberse agregado los MPCP y se aplicó 10 mL de la suspensión de $1-5 \times 10^5$ UFC·mL⁻¹. La inoculación de los patógenos también se realizó en forma foliar en aspersión dos veces, a 16 días después de la aplicación de los MPCP y a 69 días de crecimiento. El riego se aplicó diariamente y se fertilizó tres veces cada 5 días con la solución nutritiva de Hoagland al 100 %. Quince días después de la última inoculación con los patógenos se observaron los primeros síntomas de la enfermedad en las plantas y se realizaron las evaluaciones del nivel de infección, tal como se describió anteriormente. Se realizaron ocho réplicas por cada tratamiento y el testigo no inoculado.

Los resultados de las pruebas de antagonismo se compararon mediante estadística descriptiva, mientras que las pruebas de germinación y bio-control se analizaron mediante la prueba no

paramétrica por rangos de Kruskal-Wallis empleando el programa SPSS, versión 10.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación de los aislados de *Alternaria* spp.

Se obtuvieron dos aislados de *Alternaria* spp., uno del municipio José María Vargas y otro del municipio Jáuregui, los cuales fueron codificados como 475 y 485, respectivamente. Dichos aislados fueron identificados mediante las siguientes características: conidios catenulados, verruculosos, elipsoides, con un rostro cilíndrico, provistos de 3-8 septos transversales y 1-5 longitudinales u oblicuos, 15-45 x 7-20 µm; con el rostro pardo

pálido, correspondiendo dichos aislados a la especie *Alternaria alternata*. Dada las diferentes características presentadas por los dos aislados identificados como *A. alternata*, se presume que deben pertenecer a diferentes subespecies.

Selección de los MPCP mediante pruebas de antagonismo con *A. alternata*. De los tres hongos utilizados se encontró que *T. koningii* Vp fue el que ejerció mayor efecto antagonístico entre 36 y 72 horas con ambos aislados de *A. alternata*, seguido de *Penicillium* sp. 20. En el caso de las bacterias seleccionadas, los resultados de las pruebas de antagonismo mostraron que sólo *Enterobacter* sp. CR ejerció un mejor efecto antagonístico con los dos aislados (Cuadros 1 y 2).

Cuadro 1. Efecto de hongos y bacterias PCP en el diámetro de la colonia (mm) del hongo fitopatógeno *A. alternata* aislado 485 (media±SD)

Tratamientos	T1(12h)	T2(24h)	T3(36h)	T4(48h)	T5(60h)	T6 (72h)
Alt485	10,7 ± 0,6	11,7 ± 0,6	18,0 ± 3,6	18,7 ± 3,1	23,3 ± 2,9	26,0 ± 1,0
Alt485-24B2	9,6 ± 0,9	10,8 ± 1,0	12,2 ± 1,3	12,6 ± 0,9	17,4 ± 1,5	18,2 ± 1,3
Alt485-CR	8,8 ± 0,8	9,6 ± 1,3	10,8 ± 0,8	10,8 ± 0,8	12,8 ± 0,8	13,2 ± 0,8
Alt485-IR	11,8 ± 0,4	12,8 ± 0,4	20,2 ± 1,5	21,6 ± 1,1	23,8 ± 1,5	25,0 ± 1,9
Alt485-20	9,0 ± 0,0	11,0 ± 0,0	13,6 ± 2,3	15,2 ± 3,6	18,0 ± 6,0	20,0 ± 8,2
Alt485-Vp	8,8 ± 0,4	9,2 ± 0,8	11,6 ± 0,5	11,6 ± 0,5	12,4 ± 0,5	12,4 ± 0,5

SD: desviación estándar

Cuadro 2. Efecto de hongos y bacterias PCP en el diámetro de la colonia (mm) del hongo fitopatógeno *A. alternata* aislado 475 (media±SD)

Tratamientos	T1(12h)	T2 (24h)	T3 (36h)	T4 (48h)	T5 (60h)	T6 (72h)
Alt475	11,3±1,5	12,3±1,5	20,7±3,1	24,0±4,6	28,3±6,8	32,7±4,0
Alt475-24B2	10,8±0,4	11,6±0,5	19,8±1,3	21,6±1,3	23,8±1,5	25,2±1,3
Alt475-CR	10,4±0,5	11,2±0,4	16,2±2,7	18,2±2,7	21,0±2,5	22,0±2,5
Alt475-IR	13,0±0,0	14,0±0,0	20,4±1,1	21,6±1,3	25,2±1,9	26,2±1,9
Alt475-20	9,4±0,5	11,6±1,1	14,6±1,3	16,8±3,0	20,2±4,9	21,2±5,8
Alt475-Vp	11,4±1,1	12,8±1,3	15,6±0,9	16,8±1,6	17,6±1,1	17,8±1,1

SD: desviación estándar

Es de resaltar que los dos aislados del patógeno expresaron diferencias en su crecimiento ante la actividad biocontroladora de estos microorganismos, encontrándose al aislado *A. alternata* 475 con mayor resistencia a la actividad biocontroladora de los MPCP utilizados. En general, en relación al género *Trichoderma*, especies como *T. harzianum*, *T. atroviride*, *T. virens*, *T. koningii*, entre otras, han sido

reconocidas para su uso en la agricultura porque actúan no sólo como agentes biocontroladores mediante acciones como el micoparasitismo, la antibiosis, la competición por nutrientes y la estimulación de la resistencia sistémica de las plantas ante diferentes patógenos, sino también en la tolerancia al estrés abiótico, la promoción del crecimiento y el desarrollo vegetal en la producción del cultivo; sin embargo, estas

Alcedo y Reyes Microorganismos promotores de crecimiento vs. *Alternaria alternata*

características dependen más de los aislados de *Trichoderma*, que de la especie (Martínez et al., 2013; Waghunde et al., 2016). Es bien conocido en *Trichoderma* la producción de enzimas líticas extracelulares en mecanismos de micoparasitismo como quitinasas, glucanasas, polisacaridasas, proteasas y lipasas que degradan las paredes celulares del patógeno, y metabolitos secundarios en mecanismos de antibiosis como las alquilpironas, isonitrilos, poliquétidos, peptaiboles, sesquiterpenos, dicetopiperacinas y esteroides (Martínez et al., 2013). En trabajos realizados *in vitro*, *T. harzianum* mostró inhibición de las esporas de *Fusarium oxysporum* sp. *lycopersici* en un 33 %, mientras que *T. atroviridae* redujo la germinación de esporas del mismo patógeno en un 57 % (Hermosa et al., 2012). En *T. pseudokoningii* SMFE se demostró una actividad antibiótica contra patógenos fúngicos como *F. oxysporum* al producir el peptaiboltrichokonin VI e inducir una extensiva apoptosis o muerte celular programada (Shi et al., 2012).

Efecto de los MPCP sobre la germinación de las semillas de tomate expuestas al patógeno *A. alternata*. Se observó que la germinación de las semillas de tomate se incrementó significativamente con la inoculación del hongo *T. koningii* Vp con respecto al testigo no inoculado, lo que demuestra su actividad promotora del crecimiento (Cuadro 3). Así mismo, *T. koningii* Vp ejerció un efecto biocontrolador y mantuvo su efecto promotor en la germinación de las semillas infectadas por los dos aislados de *A. alternata*. Estos resultados sugieren que los MPCV pudiesen constituir una biotecnología prometedora en la etapa de producción de plántulas. Según Benítez et al. (2004), la colonización de semillas por *Trichoderma* puede generar plantas más robustas, con resistencia a la sequía y más eficientes en la absorción de los nutrientes del suelo.

Efecto de los MPCP en la infección de *A. alternata* en plántulas de tomate. En la Figura 1 se observa que los tratamientos inoculados con los hongos biocontroladores *T. Koningii* Vp y *P. rugulosum* IR tuvieron igual comportamiento y presentaron el menor porcentaje de infección (2,70 %) del patógeno aislado 475 en comparación con el aislado 485 (5,41 %), mientras que los testigos de *A. alternata* 475 y 485 presentaron los mayores valores de infección en las hojas,

24,32 y 27,03 %, respectivamente, con los síntomas de manchas marrones características de la enfermedad.

Cuadro 3. Porcentaje de germinación de semillas de tomate inoculadas con MPCP y expuestas a dos cepas del hongo fitopatógeno *A. alternata*

Tratamiento	Germinación (%)
Testigo	88,7 de
Alt 475	79,7 f
Alt 485	79,2 f
24B2	90,7 bcd
CR	90,2 cd
IR	89,2 cde
Vp	97,5 a
Alt 475-24B2	90,0 cde
Alt 475-CR	72,5 g
Alt 475-IR	92,7 b
Alt 475-Vp	97,0 a
Alt 485-24B2	91,2 bc
Alt 485-CR	88,0 e
Alt 485-IR	90,0 cde
Alt 485-Vp	96,0 a

Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba de rangos de Kruskal-Wallis ($P \leq 0,05$)

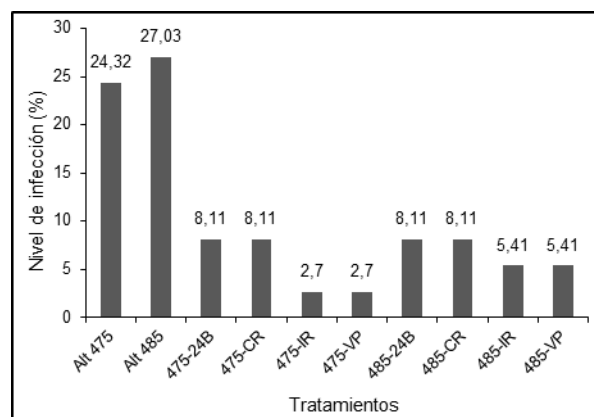


Figura 1. Infección en plántulas de tomate con la inoculación de los patógenos de *A. alternata* y la aplicación de los MPCP respecto al testigo no inoculado

Así mismo, se observa para todos los casos que el aislado *A. alternata* 485 ejerció un mayor efecto patogénico bajo estas condiciones. La habilidad de cepas de *Trichoderma* sp. para proteger plantas contra patógenos ha sido atribuida sobre todo a su efecto antagonista contra la invasión del patógeno

(Waghunde et al., 2016); sin embargo, otros trabajos demuestran que *Trichoderma* sp. (Li et al., 2015) y otros hongos como *Penicillium* sp. (Reyes et al., 2002; Murali et al. 2016) participan en la inducción del crecimiento de las plantas promovida por el desarrollo de raíces, y que combinado con mecanismos indirectos como la disolución de nutrientes minerales estarían incidiendo en plantas más robustas y resistentes al ataque de patógenos y a condiciones ambientales adversas. Estas asociaciones de raíz-hongo también estimulan los mecanismos de defensa de la planta contra diferentes clases de patógenos, mediante mecanismos de resistencia sistémica (Martínez et al., 2013).

Biocontrol de los MPCP en plantas de tomate contaminadas con *A. alternata* en condiciones de umbráculo. En cuanto al desarrollo de manchas de infección en las plantas de tomate después de la inoculación foliar de los dos aislados del patógeno, previa inoculación con los MPCP, se encontró que los potenciales biocontroladores de *A. alternata* fueron *T. koningii* Vp, para el aislado 485 y *Enterobacter* sp. CR para el aislado 475 (Cuadro 4). En trabajos realizados con *T. harzianum* éste incrementó el contenido de ácido salicílico y ácido jasmónico en melón contra el patógeno *F. oxysporum* (Contreras et al., 2016). Dependiendo de las cepas de *Trichoderma* sp. este hongo activa el mecanismo sistémico de defensas de la planta a través del ácido jasmónico y del etileno, pudiendo también intervenir en la producción del ácido salicílico, mensajero de la resistencia sistémica adquirida; sin embargo, en tomate su efecto benéfico ha sido encontrado modulado por el genotipo de la planta (Tucci et al., 2011). También existen reportes de especies reactivas de oxígeno como peróxido de hidrógeno y óxido nítrico asociadas a *Trichoderma* como mediadores de inmunidad en plantas de algodón y *Arabidopsis thaliana* (Contreras et al., 2016). Igualmente en un trabajo realizado con *A. thaliana*, la colonización de las raíces por *Penicillium* sp. cepa GP16-2 promovió la resistencia sistémica inducida (RSI) contra la infección de *P. syringae* pv. *tomato* cepa DC3000 restringiendo el crecimiento del patógeno y desarrollo de la enfermedad; la RSI mediada por GP16-2 ha sido directamente correlacionada con la producción de los ácidos salicílico y jasmónico,

y del etileno (Hossain et al., 2008). Por otra parte, *T. virens* cepa G-6 mostró protección de las plantas de algodón contra el patógeno *Rhizoctonia solani* y redujo la enfermedad en un 78 %; similarmente *T. harzianum* cepa NF-9 inoculado en plantas de arroz, produjo resultados significativos en la RSI contra los patógenos *Magnaporthe grisea* y *Xanthomonas oryzae* (Contreras et al., 2016).

Cuadro 4. Desarrollo de manchas de infección con la inoculación foliar de dos aislados de *A. alternatae* inoculación con los MPCP en plantas de tomate a los 93 días de crecimiento

Tratamiento	Nivel de infección
Alt 475	9,81 e
Alt 485	6,39 de
475-24B2	3,91 ab
475-CR	2,89 ab
475-IR	4,45 cd
475-VP	3,41 ab
485-24B2	2,73 ab
485-CR	3,75 bc
485-IR	4,01 bc
485-VP	1,98 a

Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba de rangos de Kruskal-Wallis ($P \leq 0,05$)

Finalmente este trabajo muestra la importancia de evaluar en distintas etapas experimentales y con el cultivo de interés, a los microorganismos benéficos con potencial biocontrolador y promotor del crecimiento vegetal, los cuales siempre deben ser caracterizados previamente en relación a su taxonomía y bioquímica (Peña y Reyes, 2007; Reyes et al., 2008). En general, se pudo observar que en los experimentos con la planta, *T. koningii* Vp expresó un mayor biocontrol del porcentaje de infección de las plántulas con el patógeno *Alternaria*-475, mientras que en el desarrollo de las manchas de infección, a los 93 días de crecimiento del cultivo de tomate, el mayor biocontrol lo ejerció sobre *Alternaria*-485. Estos resultados sugieren que existen diversos factores que inciden en esta relación microorganismo-microorganismo-planta, y donde probablemente el sustrato y la biología inherente de cada organismo en sus distintas interrelaciones despliega en sus genomas un potencial de posibilidades de

supervivencia que puede ser considerado.

CONCLUSIONES

Se reportan dos aislados diferenciados de *A. alternata* en relación a las pruebas de biocontrol con los MPCP, observándose *in vitro* con el hongo *T. koningii* cepa Vp y la bacteria *Enterobacter* sp. cepa CR los mayores efectos antagónicos. Así mismo *T. koningii* Vp, además de ejercer un alto efecto biocontrolador, mantuvo su actividad promotora del crecimiento de las plántulas y germinación de semillas de tomate expuestas con los aislados de los patógenos. Durante la etapa de semillero las plántulas de tomate inoculadas con *T. koningii* Vp y *P. rugulosum* IR presentaron el menor porcentaje de infección con los dos aislados de *A. alternata*; sin embargo, en la etapa de umbráculo *T. koningii* Vp y *Enterobacter* sp. CR mostraron diferente respuesta como controladores específicos a los aislados de este patógeno.

En general, en las diferentes etapas experimentales desde laboratorio hasta desarrollo en maceta, se encontró consistentemente una respuesta de biocontrol hacia *A. alternata* por el hongo *T. koningii* Vp. El doble efecto ejercido por este hongo como promotor de crecimiento del tomate e inductor de resistencia contra este patógeno, muestra la importancia de este hongo para el manejo de una agricultura sustentable del tomate. Finalmente se plantea para investigaciones posteriores si la respuesta ejercida por *T. koningii* Vp puede ser observable para otras solanáceas afectadas por *A. alternata* y hacia otros patógenos de importancia comercial.

LITERATURA CITADA

1. Benítez, T., M. Rincón, C. Limón y A. Codón. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* 7: 249-260.
2. Berg, G. 2009. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlling use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology Biotechnology* 84: 11-18.
3. Carrillo, G., J. Juárez, D. Ruíz y R. Müller. 2000. Aumento del rendimiento de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cuando la raíz se desarrolla colonizada por microorganismos. *Biotecnología Aplicada* 17: 171-176.
4. Castañeda, R. 2004. Actualización en los sistemas de clasificación e identificación de hongos hifomicetos. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). Maracaibo. pp. 3-61.
5. Compant, S., B. Duffy, J. Nowak, C. Ciement, y E. Barka, 2005. Use of plant growthpromotingbacteria for biocontrol of plant. diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology* 71(9): 4951-4959.
6. Contreras-Cornejo, H., L. Macías, E. Del Val y J. Larsen 2016. Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: Interactions with plants. *FEMS Microbiology Ecology* 92(4): fiw036.
7. Hermosa, R., A. Viterbo, I. Chet, y E. Monte. 2012. Plant beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology* 158: 17-25.
8. Hossain, M., F. Sultana, M. Kubota y M. Hyakumachi, 2008. Differential inducible defense mechanisms against bacterial speck pathogen in *Arabidopsis thaliana* by plant-growth-promoting-fungus *Penicillium* sp. GP16-2 and its cell free filtrate. *Plant Soil* 304: 227-239.
9. Mejía, J. y M. Hernández. 2001. Evaluación de azoxystrobin en el control de la candelilla temprana (*Alternaria solani*) en el cultivo de tomate. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 18: 106-116.
10. Martínez, B., D. Infante y Y. Reyes. 2013. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista de Protección Vegetal* 28(1): 1-11.
11. Murali, M., M. Thriveni, S. Manjula, S. Mythrashee y K. Amruthesh. 2016. Isolation of phosphate solubilization fungi from rhizosphere soil and its effect on seed growth parameters of different crop plants. *Journal of Applied Biology and Biochemistry* 4(06): 22-26.
12. Peña, H. e I. Reyes, 2007. Aislamiento y evaluación de bacterias fijadoras de nitrógeno y disolventes de fosfatos en la promoción del crecimiento de la lechuga (*Lactuca sativa* L.). *Interciencia* 32(8): 560-65.

13. Pieterse, C., C. Zamioudis, R. Berendsen, D. Weller, S. Van Wees y P. Bakker. 2014. Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology* 52: 347-375.
14. Reyes, I., L. Bernier y H. Antoun. 2002. Rock phosphate solubilization and colonization of maize rhizosphere by wild and genetically modified strains of *Penicillium rugulosum*. *Microbiology Ecology* 44: 39-48.
15. Reyes, I., L. Alvarez, H. El-Ayoubi, y A. Valery. 2008. Selección y evaluación de rizobacterias promotoras del crecimiento en pimentón y maíz. *Bioagro* 20(1): 37-48.
16. Li, R., F. Cai, G. Pang, Q. Shen, R. Li y W. Chen. 2015. Solubilization of phosphate and micronutrients by *Trichoderma harzianum* and its relationship with the promotion of tomato plant growth. *PLoS One* 10(6): e0130081.
17. Shi, M., L. Chen, X. Wang, T. Zhang, P. Zhao, Y. Song et al. 2012. Antimicrobial peptaibols from *Trichoderma pseudokoningii* induce programmed cell death in plant fungal pathogens. *Microbiology* 158: 166-175.
18. Tucci, M., M. Ruocco, L. De Masi, M. De Palma y M. Lorito. 2011. The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by the plant genotype. *Molecular Plant Pathology* 12: 341-354.
19. Valery, A. e I. Reyes 2013. Evaluación de rizobacterias promotoras del crecimiento bajo diferentes esquemas de fertilización en el cultivo de maíz variedad *Himeca-95*. *Revista Colombiana de Biotecnología* 15(2): 81-88.
20. Vera, R., B. Moreno, R. Acevedo y E. Trujillo. 2005. Caracterización de aislamientos de *Trichodermas* pp. por tipo de antagonismo y electroforesis de isoenzimas. *Fitopatología Venezolana* 18(1): 2-8.
21. Waghunde, R., R. Shelake y A. Sabalpara 2016. *Trichoderma*: A significant fungus for agriculture and environment. *African Journal of Agricultural Research* 11(22): 1952-1965.