



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Evaluación de sustancias bioactivas
como alternativa para el manejo de la
marchitez vascular causada por
Fusarium oxysporum f. sp.
*lycopersici***

Magda Rocío Gómez Marroquín

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agrarias
Bogotá, Colombia
2019

Evaluación de sustancias bioactivas como alternativa para el manejo de la marchitez vascular causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Magda Rocío Gómez Marroquín

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias Agrarias con énfasis en Fitopatología

Director:

Ph.D. Mauricio Soto Suárez

Codirectora:

Ph.D. Adriana González Almario

Línea de Investigación:

Fitopatología

Grupo de Investigación:

Mejoramiento genético, uso y aprovechamiento de la
agrobiodiversidad-AGROSAVIA

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencia Agrarias

Bogotá, Colombia

2019

A mi esposo Jhon Alejandro por su apoyo incondicional, mi soporte y a mi hija Kataleya, por ser el motor de mi vida, mi fuente de inspiración.

A mis padres por su apoyo, confianza y aliento de continuar como ejemplo.

Agradecimientos

¡Llegando al final, todo se ve diferente...!

A Dios y a la Virgen María por la vida, por ser mi guía en los momentos de dificultad.

A la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria sede Tibaitatá, por la financiación de este proyecto a través de su agenda quinquenal y permitirme desarrollar este trabajo.

Al Doctor Mauricio Soto Suárez, por permitirme hacer parte de su grupo de trabajo y realizar este proyecto, por su paciencia y consejos, por sus palabras de ánimo y sus aportes y apoyo durante el desarrollo del proyecto.

A la profesora Adriana González, por su formación y orientación, por su apoyo, consejos y por todas las enseñanzas, durante este proceso.

A la Universidad Nacional de Colombia, a la facultad de Ciencias Agrarias y a los docentes de la Maestría.

A Lorena Carmona y Diana Burbano, las profesionales de apoyo de AGROSAVIA, por su apoyo constante, enseñanzas y aprendizaje durante el desarrollo del proyecto.

A Jimmy Zapata, investigador de AGROSAVIA por sus consejos y recomendaciones durante el desarrollo de mi trabajo.

Al departamento de estadística, especialmente a Ronnal Ortiz Cuadros por su apoyo con el análisis estadístico.

A mis compañeras de trabajo Carolina Olave y Andrea del pilar Villarreal por los momentos compartidos, mientras trabajaba en el desarrollo de este proyecto.

A cada una de las personas que de una u otra manera contribuyeron y estuvieron presentes del desarrollo de esta investigación.

Resumen

La marchitez vascular causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*) es una de las enfermedades más predominante y destructivas en el cultivo del tomate. Su control ha sido ampliamente dependiente del uso de plaguicidas. Una de las alternativas más promisorias para el manejo de la enfermedad es el uso de sustancias bioactivas, como aquellas basadas en fosfitos y silicios. En este trabajo, se propuso establecer un método de inoculación efectivo para el modelo Tomate-*Fol*, además de evaluar el efecto de fosfitos y silicio en la reducción de la severidad ocasionada por *Fol* a nivel *in vitro* y en planta. 119 aislamientos fueron obtenidos de cuatro regiones productoras. Se realizó el análisis comparativo de tres métodos de inoculación y se estandarizó un protocolo para la infección de plántulas. A nivel *in vitro*, se observó una disminución del área de crecimiento del patógeno con sustancias bioactivas a concentraciones específicas. En las evaluaciones *in planta*, las plantas tratadas con fosfitos y silicio minimizaron la severidad hasta en un 42%.

La información generada constituye un insumo para el entendimiento del modelo Tomate-*Fol*, además provee insumos para nuevas investigaciones en el uso del método de inoculación para otras *solanáceas*, además del uso de sustancias bioactivas, como fosfitos y silicios que permitan mitigar el efecto negativo del patógeno *Fusarium* en suelos y plantas de otros cultivos.

Palabras clave: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Solanum lycopersici*, Raza, inoculación, Fosfito, Silicio

Abstract

Tomato is one of the most important vegetable crops worldwide. However, its production is severely affected by diseases caused by pathogens. Among these, the vascular wilt caused by the *formae speciales* of the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*) is responsible for substantial yield losses up to 80% in severe epidemics. Due to the constant risk of developing fungicide resistance and environmental contamination, alternative methods such as the use of resistance inducers and bioactive substances should be studied. In this project, we wanted to establish an effective inoculation method for the tomato-*Fol* pathosystem. Then, to evaluate the effect of two bioactive substances, phosphites and silicon, on *Fol* using and in vitro analysis, and to determine the effect of such bioactive substances in the reduction of severity caused by *Fol* in tomato plants. 119 fungal isolates were obtained in four different departments of the Central Andean Region in Colombia, from tomato crops with disease wilting symptoms. A comparative analysis of three inoculation methods: soil suspension (SS), root dipping (RD) and SS-RD combination, was performed infecting tomato seedlings (two, three and four weeks old), from the cultivar Santa Cruz Kada (susceptible to all three races of *Fol*), with the Colombian isolates UDCFOL10 and *Fol*59. A protocol for the infection of tomato seedlings with *Fol*59 was standardized. At the *in vitro* level, a decrease of *Fol* growth was observed after treatment with bioactive substances at specific concentrations. In in plant evaluations, plants treated with phosphites up to 42%. The knowledge generated in this study will contribute to the understanding of bioactive substances, such as phosphites and silicon, as alternative methods to control vascular wilt that could mitigate the negative effect of *Fusarium* on tomato crops.

Keywords: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Solanum lycopersici*, Race, Inoculation, Phosphite, Silicon

Contenido

	Pág.
Objetivo general.....	23
1. Análisis comparativo de métodos de inoculación con <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> en plantas de tomate	24
1.1 Resumen.....	24
1.2 Palabras claves:.....	25
1.3 Introducción.....	25
1.4 Materiales y métodos	26
1.4.1 Colecta de muestras.....	26
1.4.1.1 Procesamiento de muestras.....	27
1.4.1.2 Obtención de cultivos puros.....	27
1.4.1.3 Identificación de los aislamientos.....	27
1.4.2 Lugar de estudio, Material Vegetal y cepas de <i>Fol.</i>	28
1.4.3 Producción inóculo de <i>Fol.</i>	28
1.4.4 Evaluación de patogenicidad en plantas	29
1.4.4.1 Análisis comparativo de tres métodos de inoculación	29
1.4.4.2 Evaluación del protocolo seleccionado de inoculación en diferentes estados de desarrollo de la planta	30
1.4.4.3 Evaluación del protocolo seleccionado de inoculación en híbridos comerciales de tomate	31
1.4.5 Análisis de datos.....	31
1.5 Resultados y Discusión	33
1.5.1 Obtención de 119 aislamientos.....	33
1.5.2 Caracterización fenotípica de aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i>	36
1.5.3 Evaluación de patogenicidad	38
1.5.3.1 Selección del método de inoculación	38
1.5.3.2 Selección del estado de desarrollo.....	40
1.5.3.3 Evaluación de híbridos comerciales de tomate.....	44
1.6 Conclusiones.....	49
1.7 Agradecimientos	49
2. Evaluación de sustancias bioactivas para el manejo de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> en tomate.....	50
2.1 Resumen.....	50
2.2 Palabras Claves:	51
2.3 Introducción.....	51
2.4 Materiales y métodos	53
2.4.1 Material Vegetal.....	53

2.4.2	Producción de Inóculo e infección de plantas.....	53
2.4.3	Sustancias bioactivas evaluadas.....	54
2.4.4	Evaluación de sustancias <i>in vitro</i>	54
2.4.5	Evaluación de sustancias <i>in planta</i>	56
2.4.6	Análisis de datos.....	57
2.5	Resultados y Discusión.....	60
2.6	Conclusiones.....	86
2.7	Agradecimientos.....	86
3.	Discusión General.....	87
4.	Conclusiones y recomendaciones.....	90
4.1	Conclusiones.....	90
4.2	Recomendaciones.....	90
5.	Bibliografía.....	108

Lista de figuras

Figura 1.1. Escala diagramática para la evaluación de la severidad de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 2 en tomate. Expresión de síntomas de marchitez vascular de 0 a 5 grados, ajustadas a partir de Rongai *et al.*,(2017). Fotografía tomada por Gómez. M. R. Laboratorio Microbiología Agrícola, AGROSAVIA..... 32

Figura 1.2. Puntos de muestreo de zonas productoras de tomate (*Solanum lycopersicum*) bajo invernadero..... 34

Figura 1.3. Síntomas de marchitez vascular en tomate causados por *Fusarium oxysporum*. Plantas mostrando amarillamiento y marchitez (A y B), planta seca y muerta (C), corte transversal del tallo, mostrando el oscurecimiento de los haces vasculares (xilema) (D-F). Las flechas indican el daño vascular. Fotografías tomadas en campo por el grupo de Microbiología Agrícola de AGROSAVIA. 36

Figura 1.4. Características de las muestras de *F. oxysporum* en PDA. Se observan diferentes colores y texturas A. Forma pionotal; B. Rosa pálido; C. violeta oscuro. Fotografías tomadas por el grupo de Microbiología Agrícola, AGROSAVIA. 37

Figura 1.5. Estructuras características de *F. oxysporum* identificadas en medio CLA para el aislamiento *Fo/59*. Las flechas indican en detalle A. grupos de pseudocabezas formados en hifas (10X); B. microconidios dispuestos en pseudocabezas (10X); C. macroconidios formando esporodoquios en las hifas (10x); D. macroconidios y microconidios con formas curvilíneas y tabiques típicos (100x); E y F. Clamidosporas intercalares o terminales en las hifas (40x y 10x, respectivamente). Fotografías tomadas por Carmona S.L. Laboratorio Microbiología Agrícola, AGROSAVIA. 38

Figura 1.6. Área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE) expresada como incidencia y severidad producida por el aislamiento UDCFOL10 de *FoI* en plantas de tomate. *IR=Inmersión de raíz; SS=Suspensión a suelo y IR+SS=combinación inmersión de raíz y suspensión a suelo. Las barras de error representan \pm EE. Letras diferentes indican diferencia significativa de acuerdo con la comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$). La gráfica representa el consolidado de las réplicas biológicas, en donde se comparan tres métodos de inoculación en plantas de 15 días de edad, evaluadas durante 18 días después de inoculación. 40

Figura 1.7. Área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE) expresada como severidad producida por el aislamiento UDCFOL10 de *FoI* en plantas de tomate. * Los diferentes tratamientos, corresponde a la edad de plantas de tomate 15, 25 y 30 días. Las barras de error representan \pm EE. Letras diferentes indican diferencia significativa de acuerdo con la comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$). La gráfica representa las

réplicas biológicas independientes, en donde se comparan tres edades de las plantas de tomate evaluadas durante 18 días después de inoculación. 41

Figura 1.8. Prueba de patogenicidad en plantas de tomate en tres edades. A. Fotografías que muestran el desarrollo de la enfermedad (clorosis y tamaño ligeramente reducido) de cinco plantas representativas y el control a los 12 días después de inoculación en plantas de a. 15; b. 25 y c. 30 días después de siembra. Fotografías tomadas por Gómez M.R. B. Área bajo la curva de la enfermedad de la severidad de dos réplicas biológicas. Las barras de error representan \pm EE. Letras diferentes indican diferencia significativa de acuerdo con la comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$). La gráfica representa las réplicas de forma independiente, en donde se comparan tres edades diferentes de plantas de tomate evaluadas durante 14 ddi. 43

Figura 1.9. Expresión de síntomas evidenciados durante el desarrollo de los ensayos en plantas con *Fol59*. A. Planta con amarillamiento generalizado, 8 ddi; B. defoliación, 10 ddi; C. marchitamiento, 12 ddi y D. pérdida de turgencia y volcamiento, 14 ddi. Fotografías tomadas por Gómez. M. R. Laboratorio Microbiología Agrícola, AGROSAVIA. 44

Figura 1.10. Prueba de patogenicidad en plantas de 30 días con híbridos comerciales de tomate y variedad susceptible con *Fol59*. A. Evaluación de la enfermedad según puntuaciones en haces vasculares en plantas infectadas con *Fol59* a los 21 ddi, a partir de dos réplicas ($n=40$ plantas por tratamiento) (Rep, 2005). B. Evaluación de la enfermedad, mediante síntomas observados en plantas infectadas con *Fol59* a los 21 ddi, a partir de dos réplicas ($n=40$ plantas por tratamiento), Rongai *et al.*, (2017). Letras diferentes indican diferencia significativa de acuerdo con la comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$) C. Fotografías de plantas infectadas con *Fol59*, tomadas a los 21 ddi, mostrando 10 plantas inoculadas y 5 plantas control por cada tratamiento. Fotografías tomadas por Gómez M.R de AGROSAVIA. 46

Figura 2.1. Escala diagramática para la evaluación de la severidad de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 2 en tomate. Expresión de síntomas de marchitez vascular de 0 a 5 grados, ajustadas a partir de Rongai *et al.*, (2017). Fotografía tomada por Gómez. M. R. Laboratorio Microbiología Agrícola, AGROSAVIA. 58

Figura 2.2. Crecimiento micelial *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol59*) en respuesta a diferentes concentraciones de KPhi1. A. Crecimiento micelial de KPhi1 en PDA suplementado con las diferentes concentraciones de 0 ppm (a); 100 ppm (b); 500 ppm (c); 1000 ppm (d); 2000 ppm (e); 5000 ppm (f); 10000 ppm (g); 20000 ppm (h) a los 7 días de incubación y B. Área de crecimiento de las colonias de *Fol59* crecidas en diferentes concentraciones de 0 a 20000 ppm de KPhi1, 7 días después de incubación. Promedio de tres réplicas biológicas. 61

Figura 2.3. Crecimiento micelial *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol59*) en respuesta a diferentes concentraciones de KPhi2. A. Crecimiento micelial de KPhi2 en PDA suplementado con las diferentes concentraciones de 0 ppm (a); 100 ppm (b); 500 ppm (c); 1000 ppm (d); 2000 ppm (e); 5000 ppm (f); 10000 ppm (g); 20000 ppm (h) a los 7 días de incubación y B. Área de crecimiento de las colonias de *Fol59* crecidas en diferentes concentraciones de 0 a 20000 ppm de KPhi2, 7 días después de incubación. Promedio de tres réplicas biológicas. 62

Figura 2.4. Crecimiento micelial *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fo159) en respuesta a diferentes concentraciones de CaPhi. A. Crecimiento micelial de CaPhi en PDA suplementado con las diferentes concentraciones de 0 ppm (a); 10 ppm (b); 50 ppm (c); 100 ppm (d); 250 ppm (e); 500 ppm (f); a750 ppm (g); 1000 ppm (h) y 2000 ppm (i) a los 7 días de incubación y B. Área de crecimiento de las colonias de *Fo159* crecidas en diferentes concentraciones de 0 a 2000 ppm de CaPhi, 7 días después de incubación. Promedio de tres réplicas biológicas. 65

Figura 2.5. Crecimiento micelial *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fo159) en respuesta a diferentes concentraciones de (Si). A. Crecimiento micelial de CaPhi en PDA suplementado con las diferentes concentraciones de 0 ppm (a); 1000 ppm (b); 2000 ppm (c); 5000 ppm (d); 6500 ppm (e); 8500 ppm (f); 10000 ppm (g) y 20000 ppm (h) a los 7 días de incubación y B. Área de crecimiento de las colonias de *Fo159* crecidas en diferentes concentraciones de 0 a 20000 ppm de (Si), 7 días después de incubación. Promedio de tres réplicas biológicas. 67

Figura 2.6. Germinación de semillas de tomate variedad susceptible mediante la aplicación de tres dosis de sustancias bioactivas. Las barras de error representan \pm DE. Letras diferentes indican diferencia significativa de acuerdo con la comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$), de dos réplicas biológicas para cada tratamiento evaluando la germinación de semillas de tomate tratadas y no tratadas con sustancias bioactivas. ... 71

Figura 2.7. Efecto del CaPhi en plantas de tomate a los 25 días después de su aplicación. A. Plantas tratadas con Fosfito de calcio a la mitad de la concentración recomendada (CaPhi-C1) 1000 ppm; B. Plantas tratadas con Fosfito de calcio a la concentración recomendada (CaPhi-C2) 2000 ppm; C. Plantas control absoluto (Sin aplicación de CaPhi). 72

Figura 2.8. Efecto de KPhi y (Si) en plantas de tomate 25 días después de transplante. A. Concentración aplicada la mitad de la recomendada (C1); B. Concentración aplicada la mitad de la recomendada (C2); C. Control absoluto (Sin aplicación de sustancias bioactivas). 72

Figura 2.9. Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) expresada como incidencia y severidad, causada por el aislamiento *Fo159* inoculado en plantas de tomate. El tratamiento con las respectivas sustancias bioactivas se hizo en dos momentos, en semilla y 24 horas antes de la inoculación con el patógeno. La inoculación con *Fo159* se hizo en plantas de 30 días de edad. Las barras de error representan \pm EE. Letras diferentes indican diferencia significativa de acuerdo con la comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$). Se representa las réplicas, donde se evalúa el efecto de dos concentraciones de KPhi, CaPhi y (Si)..... 74

Figura 2.10. Expresión de síntomas de la marchitez vascular de tomate tratadas con KPhi, 11 ddi. A. *Fo159* (Control patógeno); B. Plantas control (Control Absoluto); C. Plantas tratadas con KPhi1-C1 e inoculadas con *Fo159*; D. Plantas tratadas con KPhi (Control KPhi1-C1). E. Plantas tratadas con KPhi1-C2 e inoculadas con *Fo159*; F. Plantas tratadas con KPhi (Control KPhi1-C2); G. Plantas tratadas con Control KPhi2-C1 e inoculadas con *Fo159*; H. Plantas tratadas con KPhi (Control KPhi2-C1). I. Plantas tratadas con KPhi2-C2 e inoculadas con *Fo159*; J. Plantas tratadas con KPhi (Control KPhi2-C2). La figura representa una de las réplicas biológicas. Fotografías tomadas por Gómez M.R de AGROSAVIA. 76

Figura 2.11 Expresión de síntomas de la marchitez vascular de tomate tratadas con Fosfito de calcio (CaPhi), 11 ddi. A. *Fo/59* (Control patógeno); B. Plantas control (Control Absoluto); C. Plantas tratadas con CaPh-C1 e inoculadas con *Fo/59*; D. Plantas tratadas con CaPhi-C1 (Control CaPhi-C1). E. Plantas tratadas con CaPh-C2 e inoculadas con *Fo/59*; D. Plantas tratadas con CaPhi-C2 (Control CaPhi-C2). La figura representa una de las réplicas biológicas. Fotografías tomadas por Gómez M.R de AGROSAVIA. 77

Figura 2.12 Expresión de síntomas de la marchitez vascular de tomate tratadas con Silicio (Si), 11 ddi. A. *Fo/59* (Control patógeno); B. Plantas control (Control Absoluto); C. Plantas tratadas con (Si-C1) e inoculadas con *Fo/59*; D. Plantas tratadas con (Si-C1)-Control (Si-C1). E. Plantas tratadas con (Si-C2) e inoculadas con *Fo/59*; D. Plantas tratadas con (Si-C2)-Control (Si-C2). La figura representa una de las réplicas biológicas. Fotografías tomadas por Gómez M.R de AGROSAVIA. 78

Figura 2.13 Área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE) expresada como incidencia y severidad, causada por el aislamiento *Fo/59* en plantas de tomate de 30 días de edad tratadas con KPhi. Las barras de error representan \pm EE. Letras diferentes indican diferencia significativa de acuerdo con la comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$). La gráfica representa el consolidado de las réplicas. 85

Figura 2.14. Expresión de síntomas de la marchitez vascular de tomate tratadas con fosfito de potasio (KPhi), 14 ddi. A. *Fo/59* (Control patógeno); B. Plantas tratadas con Kphi (2000 ppm) e inoculadas con *Fo/59*; C. Plantas control (Control Absoluto); D. Plantas tratadas con Kphi (2000 ppm) (Control KPhi)..... 85

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1.1. Escala descriptiva de severidad de la marchitez vascular producida por <i>F. oxysporum</i> , adaptada de Rongai <i>et al.</i> ,(2017)	31
Tabla 1.2. Escala descriptiva de severidad de la marchitez vascular producida por <i>F. oxysporum</i> , adaptada de Rep (2005)	32
Tabla 1.3. Principales cultivares de tomate reportados en fincas productoras en Cundinamarca, Boyacá, Antioquia y Caldas.....	34
Tabla 1.4. Incidencia (%) del aislamiento de <i>Fol</i> UDCFOL10 en plantas de tomate.	39
Tabla 2.1. Sustancias Bioactivas usadas durante ensayos <i>in vitro</i> e <i>in planta</i>	54
Tabla 2.2. Concentraciones de sustancias bioactivas evaluadas en semillas y planta....	56
Tabla 2.3. Escala descriptiva de severidad de la marchitez vascular producida por <i>F. oxysporum</i> , adaptada de Rongai <i>et al.</i> ,(2017)	58
Tabla 2.4. Porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) de KPhi a diferentes concentraciones sobre <i>Fol59</i> en medio PDA 7 días después de incubación.	60
Tabla 2.5. Porcentaje de inhibición de CaPhi sobre <i>Fol59</i> en medio PDA incubados a 25°C por 7 días.	63
Tabla 2.6. Porcentaje de inhibición del (Si) sobre <i>Fol59</i> en medio PDA incubados a 25°C por 7 días.	66
Tabla 2.7. Concentración efectiva al 50% (CE ₅₀) del crecimiento micelial del aislamiento <i>Fol59</i> frente a las sustancias bioactivas.	68
Tabla 2.8. Efecto de la germinación de conidios de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (<i>Fol59</i>)	69
Tabla 2.9. Concentraciones de sustancias bioactivas evaluadas en semillas y planta....	73
Tabla 2.10. Porcentaje de Eficacia de las sustancias bioactivas sobre la severidad e incidencia a los 14 ddi con <i>Fol59</i>	75
Tabla 2.11. Promedio del porcentaje de incidencia y severidad causada por <i>Fol59</i> en plantas de tomate 14 días después de inoculación (ddi).	75
Tabla 2.12. Productos comerciales de Fosfitos y silicios disponibles en el mundo.	82
Tabla 2.13 Efecto del KPhi sobre la severidad de la marchitez vascular en tomate 14 días después de inoculación (ddi).	84

Lista de Anexos

ANEXO 1. Protocolo para la obtención de <i>Fusarium oxysporum</i> a partir de material vegetal de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	91
ANEXO 2. Análisis de suelo usado para ajustes de ensayos con <i>Fol</i> en tomate.....	95
ANEXO 3. Análisis comparativo de tres métodos de inoculación para <i>Fol59</i>	95
ANEXO 4. Análisis para el aislamiento UDCFOL10	96
ANEXO 5. Análisis para el aislamiento <i>Fol59</i>	99
ANEXO 6. Análisis estadísticos de los experimentos <i>in planta</i> de 30 días con <i>Fol59</i>	101
ANEXO 7. Gráficas de Incidencia y severidad del ABCPE de las sustancias bioactivas	105
ANEXO 8. Análisis estadísticos de los experimentos <i>in planta</i> con KPhi.....	106

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos

Unidad SI	Término
T	Tonelada
Ha	Hectárea
G	Gramo
Mm	Milímetro
µg	Microgramo
µm	Microlitro
mL	Mililitro
C	Temperatura
HR	Humedad Relativa
cm ²	Área
EE	Error estándar
DE	Desviación estándar

Abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>Fox</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
<i>Fol</i>	<i>Fusarium oxysporum f. sp lycopersici</i>
<i>Forl</i>	<i>Fusarium oxysporum f. sp radidis lycopersici</i>
Dds	Días después de siembra
Ddi	Días después de inoculación
Min	Minutos
PDB	Potato Dextrose Broth
PDA	Potato Dextrose Agar
ADE	Agua Destilada Estéril
ABCPE	Área bajo la curva de progreso de la enfermedad
CE ₅₀	Concentración efectiva 50%
Inc	Incidencia
Sev	Severidad
Phi	Fosfito
KPhi	Fosfito de Potasio
CaPhi	Fosfito de Calcio
Si	Silicio

Introducción

El cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*) es una de las hortalizas de gran importancia económica por su alto consumo en fresco y como materia prima en la agroindustria. En Colombia, para los últimos cinco años, el cultivo de tomate bajo condiciones protegidas ha presentado un aumento en área y productividad, alcanzando en el último año 2870 ha y 244.434 ton, con un rendimiento de 78.24 ton/ha (AGRONET, 2018). Según la FAO la producción se ha incrementado a nivel mundial en un 29% más que 10 años atrás (Cardona, 2018). La producción por planta en ambientes protegidos, condiciones normales y bajo niveles aceptables de tecnología está alrededor de seis a ocho kg, mientras que en campo abierto se reporta entre cuatro a seis kg (DANE, 2014).

Su origen es en la Región Andina de América del Sur (Chile, Ecuador, Bolivia, Perú y Colombia), existiendo en esta zona la mayor variabilidad genética y abundancia de tipos silvestres; su domesticación se inició en el sur de México y Norte de Guatemala, llegando luego a Europa (Jaramillo *et al.*, 2013). El cultivo en condiciones protegidas se ve afectado por la presencia de enfermedades, que limitan su rentabilidad y competitividad en el mercado. En este sentido en la actualidad, las enfermedades prevalentes reportadas en cultivos de tomate se encuentran: La marchitez bacteriana (*Ralstonia solanacearum*), el moho blanco (*Sclerotinia sclerotiorum*), la marchitez vascular por *Fusarium* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*), *Verticillium dahliae* y la mancha bacteriana causada por *Xanthomonas vesicatoria* (Tans-Kersten *et al.*, 2001; Jaramillo *et al.*, 2013).

La marchitez vascular ocasionada por (*Fusarium oxysporum*) es una de las enfermedades más destructivas y prevalentes (Amini, 2009). En cultivos de tomate a nivel mundial es considerada una de las enfermedades más devastadoras, ya que ocasiona pérdidas que pueden alcanzar hasta el 60% de la producción y un 80% en el rendimiento (Raza *et al.*, 2017; Nirmaladevi *et al.*, 2016; Villa-Martínez *et al.*, 2014; Dean *et al.*, 2012). Los daños ocasionados en planta están relacionados con el amarillamiento, retraso de crecimiento, pudrición radicular, lesiones

necróticas extensas en el cuello y la base del tallo y senescencia (McGovern, 2015). Es un patógeno cosmopolita y está clasificado entre los diez fitopatógenos más importantes, desde el punto de vista científico y económico (Dean *et al.*, 2012). Se han reportado tres razas, las cuales se diferencian por su virulencia frente a materiales que contienen genes específicos de resistencia (*I-1*, *I-2* e *I-3*) (Carrillo-fasio *et al.*, 2003).

El control de las enfermedades en el cultivo ha sido ampliamente dependiente del uso y aplicación de fungicidas de síntesis química, generando resistencia de los patógenos, y teniendo como consecuencia un detrimento a los recursos y la salud de las personas. Se considera que el uso de cultivares resistentes es una de las alternativas más eficientes y sostenibles con el ambiente, reduciendo la incidencia y severidad de las enfermedades (Kim *et al.*, 2016). Sin embargo, la emergencia de nuevas razas de hongos afecta el potencial para superar su resistencia, lo que conlleva a la búsqueda de nuevas estrategias para el control de patógenos bajo esquemas de Manejo Integrado de Enfermedades (Horinouchi *et al.*, 2011).

Una de las aproximaciones más promisorias en el manejo de la enfermedad es el uso de alternativas ecológicamente sostenibles y no tóxicas para los seres humanos. Entre esas alternativas se cuentan aquellas basadas en la aplicación de sustancias bioactivas, las cuales tienen tanto un efecto biocida como inductor de la resistencia en la planta. Dichas sustancias bioactivas pueden tener un origen biótico (plantas o microorganismos) o abiótico (sustancias químicas). Dentro de los productos alternativos más investigados en los últimos diez años se encuentran las sustancias bioactivas, basadas en fosfitos y silicio. En la agricultura el Fósforo (P), desempeña un papel fundamental como componente estructural de ácidos nucleicos, estructuras de membrana, vías de señalización y en el metabolismo. Por lo tanto, es considerado esencial en todas las formas de vida existentes en la tierra, incluyendo plantas inferiores y superiores (Ashley *et al.*, 2011). Es uno de los nutrientes menos móvil y disponible para las plantas en la mayoría de las condiciones de suelo (Gómez & Trejo, 2015). De hecho, P está clasificado como el segundo elemento más vital para la planta en crecimiento y desarrollo después del Nitrógeno (Trejo-téllez & Gómez-merino, 2018). Por lo tanto, el P es considerado como un factor limitante para la agricultura y la producción de alimentos en el mundo (Gómez & Trejo, 2015). Una de las tecnologías más novedosas en las últimas tres décadas, es el uso del fosfito (Phi ; H_2PO_3^-) o ácido conjugado de fósforo (H_3PO_3), una forma reducida de fosfato (Pi) ha sido cada vez más utilizado como plaguicida, fertilizante suplementario y bioestimulante (Gómez & Trejo, 2015).

Estudios recientes han demostrado el uso de fosfitos como agentes inductores de resistencia frente al ataque por patógenos, estimulan la producción de fitoalexinas y la expresión de genes relacionados en defensa (Felipini *et al.*, 2016, Araújo *et al.*, 2010). Adicionalmente, ha sido probado el efecto inhibitorio que tienen los fosfitos sobre el crecimiento micelial y la esporulación de hongos fitopatógenos (Lobato *et al.*, 2010; Monsalve *et al.*, 2012; Burra *et al.*, 2014; Rosyidah *et al.*, 2017). Por lo anterior, se ha clasificado el KPhi como bioplaguicida (Kromann *et al.*, 2012, Gómez-Merino & Trejo-Téllez 2015). La evidencia reciente apunta a que los fosfitos tienen un papel como potenciador de diferentes procesos metabólicos en las plantas, mejorando el rendimiento y la calidad, así como las respuestas a condiciones ambientales.

El silicio (Si), es el segundo elemento más abundante sobre la corteza de la tierra después del oxígeno, la mayoría de los suelos presentan cantidades considerables de este elemento. El efecto benéfico del (Si) contra diferentes tipos de estrés biótico y abiótico, nutrición (crecimiento y desarrollo) y estado sanitario de los cultivos, ha sido reportado en diversas ocasiones (Zhou *et al.*, 2018; Debona *et al.*, 2017; Han *et al.*, 2016; Whan *et al.*, 2016; Kiirika *et al.*, 2013; Romero *et al.*, 2011). No obstante, la resistencia a patógenos mediada por (Si) no se encuentra completamente caracterizada. Se ha sugerido que la acumulación de (Si) en las hojas actúa como barrera física contra la penetración de patógenos (Han *et al.*, 2016; Cai *et al.*, 2009). De igual manera, se han demostrado que el (Si) puede inducir en la planta respuestas de defensa que son funcionalmente similares a la Resistencia Sistémica Adquirida (SAR). Las plantas tratadas con (Si) pueden incrementar los niveles de enzimas antioxidantes, producción de compuestos antifúngicos, e inducción de genes asociados con defensa, que activan importantes vías de señalización, como aquellas relacionadas con el Ácido Salicílico (AS), Ácido Jasmónico (AJ) y Etileno (ET) (Çak & Yolageldi, 2014). La aplicación de (Si) como una estrategia para reducir la incidencia de enfermedades fúngicas ha sido probada con éxito en casos como *Alternaria* sp., *Magnaporthe* sp., *Fusarium* sp., y *Phytophthora* sp., entre otros (Debona *et al.*, 2017; Romero *et al.*, 2011).

Esta investigación tuvo como objetivo contribuir a la evaluación de sustancias bioactivas, formuladas a partir de fosfitos y silicio, como alternativa de manejo de la marchitez causada por *Fusarium oxysporum*. La información obtenida podría contribuir al manejo integrado de esta enfermedad en cultivos de tomate bajo condiciones de invernadero, así mismo disminuir las aplicaciones de agroquímicos, logrando obtener un producto más inocuo y sostenible ambientalmente.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto de las sustancias bioactivas frente al desarrollo de la enfermedad ocasionada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en el cultivo de tomate bajo condiciones protegidas.

Objetivos específicos

- Identificar y optimizar un método para evaluar la patogenicidad de aislamientos fúngicos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* asociados a la marchitez vascular en plantas de tomate.
- Determinar bajo condiciones *in vitro* el efecto de silicio y fosfitos sobre el crecimiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.
- Determinar el efecto de silicio y fosfitos sobre la reducción de la severidad de la marchitez vascular en plantas de tomate bajo condiciones controladas.

1. Análisis comparativo de métodos de inoculación con *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en plantas de tomate

1.1 Resumen

En el cultivo de tomate, la incidencia de la marchitez vascular causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*), ocasiona pérdidas que pueden alcanzar hasta el 60% de la producción y un 80% en el rendimiento, a nivel mundial. Las cepas patogénicas de *Fusarium oxysporum* pueden ser agrupadas en *formae speciales* (ff. spp.), en función de las especies de plantas que puede infectar (i.e. especificidad frente al hospedero). En tomate, las formas especiales *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (*Forl*) y *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*), son el agente causal de la pudrición de raíz y la marchitez vascular, respectivamente. En este capítulo se presenta y desarrolla el objetivo de establecer y optimizar un método para evaluar la patogenicidad de aislamientos fúngicos de *Fol*. 119 aislamientos fueron colectados y purificados entre el 2016 y 2017 en zonas productoras de Cundinamarca, Boyacá, Antioquia y Caldas, incluyendo aislamientos suministrados por el grupo de investigación y proyección producción agropecuaria (GIPPA), de la universidad de Caldas. Se realizó una caracterización morfológica a nivel macro y microscópico de las colonias, sugiriendo que los aislamientos corresponden a *Fox*. Dos de estos aislamientos fueron identificados como *Fol* raza 2, mediante análisis molecular usando genes *SIX* de virulencia (*del inglés, Secreted In Xylem*). Los aislamientos colombianos de *Fol* (llamados UDCFOL10 y *Fol59*), se utilizaron en pruebas de patogenicidad bajo un diseño de bloques completos al azar con cuatro tratamientos. Se realizó el análisis comparativo de tres métodos de inoculación: (i) inmersión de raíz (IR), (ii) Suspensión a suelo (SS) y (iii) Inmersión de raíz y Aplicación en suelo (IR+SS). Para la evaluación de los ensayos, se usó la escala de severidad propuesta por Rongai *et al.*, 2017. Los métodos de inoculación variaron en dosis y forma de aplicación del inóculo. Los resultados indican que los primeros síntomas de la enfermedad se evidenciaron a los 10 días después de inoculación (ddi). Siendo IR el método más efectivo, donde la enfermedad presentó una incidencia del 100%, seguida de la combinación IR + SS, con un 98%. La suspensión a suelo (SS) del inóculo alcanzó un 78% de incidencia, mientras que la severidad (%) fue de 95, 86 y 41%, respectivamente, a los 18 ddi. Al evaluar la inoculación con *Fol* en tres estados de desarrollo diferentes, 15, 25 y 30 días después de siembra (dds), para UDCFOL10 y *Fol59* se observaron diferencias significativas en sintomatología de la enfermedad

en plantas a los 15 y 25 dds en comparación con las plantas inoculadas a los 30 dds en términos de síntomas. El porcentaje de severidad fue mayor en plantas de 15 y 25 días, presentando diferencias significativas con plantas de 30 días. Se encontró un comportamiento similar en los dos aislamientos. Sin embargo, las plantas inoculadas con *Fo/59* presentaron síntomas más tempranos a los 6 ddi, a diferencia de UDCFOL10 que fue a los 10 ddi. Los cultivares resistentes evaluados demostraron una respuesta diferencial en comparación al cultivar susceptible, lo que podría darse por poseer genes de resistencia a *Fol*.

1.2 Palabras claves:

Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici*, forma *specialis*, genes *SIX*, método de infección.

1.3 Introducción

El cultivo de tomate enfrenta limitaciones de tipo fitosanitarias, entre las que se destacan la marchitez vascular ocasionada por *Fusarium oxysporum*, responsable de pérdidas en los cultivos del tomate a nivel mundial que pueden alcanzar el 60% de la producción y un 80% en el rendimiento (Villa-Martínez *et al.*, 2015; Solanki *et al.*, 2015; Ramyabharathi *et al.*, 2012; Raigosa *et al.*, 2009). La marchitez vascular, se encuentra entre los diez problemas fitosanitarios más importantes del cultivo en Colombia (Espitia *et al.*, 2014).

Este patógeno se caracteriza por su potencial destructivo, su facilidad de propagación y persistencia en el suelo. *F. oxysporum* se puede encontrar desde suelos de tipo ártico hasta en suelos desérticos, sin contar con el amplio número de hospederos que puede infectar. *F. oxysporum* está incluido dentro de los organismos patogénicos causantes de marchitez vascular, problemas de *damping-off* y pudrición de corona y raíz. La mayoría de los aislamientos de *F. oxysporum* pueden infectar una o diferentes especies de plantas y, por consiguiente, se subdividen en diferentes formas específicas según el rango de hospederos que son capaces de infectar, denominadas *formae speciales* (ff. spp.) (Lievens *et al.*, 2009). De este modo, la cepa patogénica que causa la marchitez vascular en tomate se denomina f. sp. *lycopersici*.

F. oxysporum f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen (*Fol*), es un patógeno extracelular que penetra por la raíz y coloniza los vasos de xilema. Hasta ahora se han reportado tres razas de *Fol*, las cuales se diferencian por su virulencia en materiales que contienen genes específicos de resistencia (*I-1*, *I-2* e *I-3*) (Carrillo-fasio *et al.*, 2003).

Durante la infección el hongo *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* secreta en el xilema varias proteínas únicas, denominadas proteínas SIX, del inglés “Secreted in xylem” (Lievens *et al.*, 2009; Houterman *et al.*, 2007). Estas proteínas juegan un papel significativo en la virulencia y determinación de la especificidad de hospedero. Las proteínas AVR1 (=SIX4), AVR2 (=SIX3) y AVR3 (=SIX1) son reconocidas por las proteínas de resistencia de tomate I, I-2 e I-3, respectivamente (Houterman *et al.*, 2008). Los genes que codifican para las proteínas SIX, pueden ser usados en *Fol* para diferenciar aislamientos en razas y otras *formae speciales* de *F. oxysporum* (McGovern, 2015).

En trabajos previos (Carmona S.L *et al.*, 2018 no publicado), se realizó la identificación y caracterización molecular de todos los aislamientos obtenidos en campo (119 aislamientos), logrando identificar dos aislamientos correspondientes a *Fol* raza 2, uno de ellos fue donado por la Universidad de Caldas y el otro aislamiento de la colección de trabajo del proyecto de AGROSAVIA, codificados como: UDCFOL10 y *Fol*59, respectivamente. Por lo cual, el objetivo de esta primera parte del proyecto fue estandarizar un método de inoculación en plantas de tomate y evaluar la virulencia de los dos aislamientos de *Fol*.

1.4 Materiales y métodos

1.4.1 Colecta de muestras

Se realizaron colectas de muestras de tejidos sintomático en cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum*) bajo condiciones de invernadero en cuatro zonas productoras de Colombia, proveniente de fincas de agricultores de los municipios de mayor producción Cáqueza, Quetame, Fómeque, Villa de Leyva, Santa Sofía, Sutamarchán, Rionegro, El peñol, Urao, San Vicente, Guarne, Chinchiná en los departamentos de Cundinamarca, Boyacá, Antioquia y Caldas (Figura 1.2). La selección de las plantas a muestrear se realizó según criterios de incidencia y síntomas característicos de la enfermedad (Figura 1.3) (Anexo 1). Las muestras fueron tomadas en diferentes cultivares, debidamente identificadas y depositadas en bolsas de papel y plásticas, luego se almacenaron en una nevera de polipropileno acondicionadas con bolsas de hielo para conservar baja temperatura.

1.4.1.1 Procesamiento de muestras

Los aislamientos de *Fusarium* sp. fueron obtenidos a partir de tejido sintomático de tomate conformando una colección de trabajo compuesta por 119 aislamientos, incluyendo diez aislamientos suministrados por el grupo de investigación y proyección producción agropecuaria (GIPPA), de la universidad de Caldas. Se realizó el aislamiento del patógeno de porciones de tallo y raíz principal infectadas. Los tallos y raíces de material vegetal infectado fueron desinfectados superficialmente usando una solución de Hipoclorito de sodio al 2% (NaOCl) durante 20 minutos, etanol al 70% durante un minuto (min) y finalmente tres enjuagues con agua estéril (Kusunoki *et al.*, 2012). El tejido vegetal fue procesado en cabina de flujo laminar. Tanto del tallo como de la raíz fueron seleccionados segmentos de 0.5 a 1 cm y los explantes fueron sembrados en medio PDA (Potato Dextrosa Agar Oxoid™) suplementado con Tritón 100X al 0,1% (Sigma™) y cloranfenicol al 0,3% para evitar contaminación bacteriana. Las cajas de Petri se incubaron a 25°C ± 2 en condiciones de luz por 24 horas durante cinco días. Se realizó seguimiento diario a los cultivos y posteriormente se hicieron subcultivos en cajas nuevas con PDA hasta obtener aislamientos puros (Anexo 1).

1.4.1.2 Obtención de cultivos puros

Para la obtención de cultivos monospóricos, se realizaron tres diluciones seriadas a partir del crecimiento de conidias únicas de los aislamientos, agregando 100 µl de la última dilución en PDA con 0.1% de tritón. Se incubó a 25°C durante 4 días. Después de este tiempo se transfirió de manera individual cada una de las colonias obtenidas a un medio y se incubaron a 25°C durante 8 días. Para la conservación de los aislamientos se usaron dos métodos, el primero en papel de filtro, donde los aislamientos se cultivaron en PDA con fragmentos de papel de filtro durante 15 días hasta su esporulación. Luego el papel de filtro se recogió y se secó en la cabina de flujo laminar, para ser almacenados dentro de una bolsa de papel pergamino a -20 °C. Para el segundo método se usó glicerol en 30% (v/v) de agua y glicerol, se obtuvo una suspensión concentrada de esporas proveniente de los aislamientos monospóricos crecidos en PDA de dos semanas de edad la cual fue almacenada a -80 °C.

1.4.1.3 Identificación de los aislamientos

Los medios de cultivo PDA y agar hojas de clavel (CLA por sus siglas en inglés, Carnation Leaf Agar) (Leslie & Summerell, 2006), se utilizaron para la caracterización macro y microscópica de

los aislamientos. El micelio del hongo se colocó en el centro de la caja petri con PDA, el crecimiento micelial y los caracteres de las colonias fueron evaluados 8 días después de su incubación a 25°C.

Para la caracterización microscópica, se desinfectaron hojas de clavel con hipoclorito al 2% durante dos minutos, alcohol al 70% por un minuto y tres lavados con abundante agua destilada estéril (ADE). Luego, se cortaron las hojas de clavel en cuadros de 1 cm² aproximadamente, y se distribuyeron cuatro cuadros por caja Petri, se colocó una parte de micelio en contacto con los cuadros de clavel desinfectados en medio de cultivo CLA, proveniente de un aislamiento monospórico de *Fusarium* sp. Las cajas petri se colocaron en cuarto de crecimiento a 25°C durante cinco días. Posteriormente, las estructuras propagativas se observaron usando un microscopio óptico (Olympus Cx31).

1.4.2 Lugar de estudio, Material Vegetal y cepas de *Fol*

Este estudio se realizó en áreas de Invernaderos y laboratorio de Microbiología Agrícola del Centro de Investigación Tibaitatá, de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-AGROSAVIA.

Plantas de tomate de la variedad Santa Cruz Kada (impulsemillas S.A.S.) susceptible a las tres razas de *Fol* (R1, R2 y R3) y tres híbridos comerciales. Las cepas colombianas de *Fol*, una cedida por la Universidad de Caldas (UDCFOL10) y uno de los aislamientos caracterizados durante el proyecto de AGROSAVIA (*Fol*59), las cuales fueron utilizadas en este estudio.

1.4.3 Producción inóculo de *Fol*

El inóculo se preparó a partir de cultivos monospóricos de aislamientos almacenados a -80 °C. Posteriormente, las colonias fueron transferidas a medio de cultivo Potato Dextrosa Agar (PDA) suplementado con extracto de tomate (EV) usando 4.6 g/l, durante 8 días en incubación a 25°C en oscuridad. Cuando se hizo el incremento de inóculo para el ensayo de inoculación por el método de suspensión a suelo (SS), se partió de 5 discos de 5 mm con crecimiento del hongo en PDA por un tiempo ocho días, y luego fueron transferidos a medio líquido en 300 mL de caldo Potato Dextrose Broth (PDB), y mantenidos durante ocho días adicionales en incubación a 25°C±2 y agitación a 125 rpm. Después de este tiempo, el caldo se colocó en tubos para centrifuga, primero se centrifugó a 7000 rpm por 15 minutos, luego se retiró el sobrenadante y se

lavó con 20 mL ADE sobre el botón celular y se resuspendió por 15 minutos, este último procedimiento se realizó dos veces. La solución obtenida fue usada para conteo de conidios en cámara de Neubauer y llevada a una concentración de 1×10^7 microconidios. mL^{-1} para realizar el ensayo de inoculación por el método de suspensión a suelo (SS) usando 40 mL por planta (como se describe más adelante en la sección 1.4.4).

En relación al método de infección de inmersión de raíz, se utilizaron cajas con colonias del hongo, se agregaron 10 mL de ADE y se realizó un raspado en la superficie del medio con el fin de desprender el micelio y conidios. Una vez obtenida la solución de microconidios, esta fue contada en cámara de Neubauer y llevada a una concentración de 5×10^6 microconidios. mL^{-1} para realizar la inoculación en plántulas.

1.4.4 Evaluación de patogenicidad en plantas

1.4.4.1 Análisis comparativo de tres métodos de inoculación

Se realizaron dos réplicas biológicas utilizando un diseño de bloques completos al azar, con cuatro tratamientos, correspondientes a: IR Inmersión de raíz; SS Suspensión a suelo; IR+SS combinación de inmersión de raíz y aplicación en suelo y un tratamiento testigo que no fue inoculado. Se establecieron 4 bloques cada uno con cinco plantas individualizadas en vasos de 16 onzas. Se realizó un análisis de varianza, en los casos donde se encontraron efectos significativos, se usó la prueba de comparación de medias de Tukey de ($P \leq 0,05$) para asegurar la significancia estadística entre medias de los tratamientos. Los análisis se realizaron utilizando del programa SAS Enterprise Guide 7.1.

Las semillas de Santa Cruz Kada, se desinfectaron previamente con una solución de hipoclorito de sodio al 2% por 15 minutos y alcohol al 70% por un minuto, se realizaron tres enjuagues consecutivos con agua destilada estéril (ADE) por dos minutos cada uno, el exceso de agua se eliminó con papel absorbente estéril. Posteriormente, las semillas fueron transferidas a bandejas de 50 alveolos con turba estéril, bajo condiciones controladas y regadas diariamente.

Para la selección del mejor método de inoculación se realizó la infección en plantas de 15 días con el aislamiento identificado como UDCFOL10, usando tres metodologías: i) Inmersión de raíz en una concentración de 5×10^6 microconidios. mL^{-1} durante 15 minutos (IR); ii) Suspensión a suelo 40 mL alrededor de la planta a una concentración de 1×10^7 microconidios. mL^{-1} (SS) y iii) la combinación de ambos (IR+ SS). Luego, las plántulas inoculadas fueron transferidas a una

mezcla de sustrato “suelo: vermiculita” estéril, en proporción 3:1, con 3 gramos de fertilizante que contiene Nitrógeno, Fósforo y Potasio en proporción (15-15-15) por kilogramo de la mezcla, de acuerdo con las recomendaciones generadas a partir del análisis químico de suelo (Anexo 2). Los ensayos se realizaron en vasos de 16 onzas, que contenían 400 g de la mezcla, las plántulas fueron mantenidas en un cuarto de crecimiento ubicado en el laboratorio de Microbiología Agrícola de AGROSAVIA bajo condiciones controladas de temperatura de $28^{\circ}\text{C}\pm 2$ y humedad del 60 %, con un fotoperiodo de 12 horas/luz.

Se realizó seguimiento del desarrollo de la enfermedad y registro de datos cada 4 días después de la inoculación, tras la aparición de los primeros síntomas, evaluando la enfermedad hasta los 18 días mediante el uso de una escala de severidad descrita por Rongai *et al.*, (2017) y modificada de acuerdo con los síntomas visuales observados. La incidencia de la enfermedad, fue evaluada en porcentaje teniendo en cuenta el número de las plantas enfermas con respecto al total de las plantas evaluadas y el porcentaje de severidad, basado en el índice de la severidad de la enfermedad, de acuerdo con la ecuación 1.1 (Chiang *et al.*, 2017). Adicionalmente, se determinó el Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE), usando la ecuación 1.2 descrita por Pedroza & Samaniego, (2009).

1.4.4.2 Evaluación del protocolo seleccionado de inoculación en diferentes estados de desarrollo de la planta

Una vez seleccionado el método más eficiente de inoculación, se evaluó la patogenicidad de los dos aislamientos previamente caracterizados como *Fol* comparando diferentes estados de desarrollo de la planta. Para ello, se procedió a realizar ensayos usando plantas de 15, 25 y 30 días después de siembra (dos, tres y cuatro hojas verdaderas, respectivamente), con el objetivo de seleccionar un estado de desarrollo óptimo para la inoculación con *Fol*. En experimentos independientes para cada aislamiento, se realizaron dos réplicas biológicas con diseño de bloques completos al azar, se establecieron 4 bloques cada uno con cinco plantas por tratamiento y se evaluó la incidencia y severidad de los aislamientos en las tres edades. Para el análisis estadístico, se realizó una ANOVA y la prueba de comparación de medias de Tukey con nivel de significancia de ($P\leq 0,05$). Los análisis se realizaron utilizando del programa SAS Enterprise Guide 7.1.

1.4.4.3 Evaluación del protocolo seleccionado de inoculación en híbridos comerciales de tomate

Posteriormente, se procedió a realizar ensayos con híbridos comerciales resistentes a las razas de *Fol* y la variedad susceptible, usando el protocolo seleccionado de inoculación, en plántulas de 30 días. La evaluación se realizó mediante una escala descriptiva (Tabla 1-1) Rongai *et al.*,(2017) y la escala (Tabla 2-1) descrita por Rep *et al.*,(2005) donde se considera síntomas en los haces vasculares. Se observaron síntomas a partir de los 6 días posteriores a la inoculación en la variedad susceptible, evaluando la enfermedad hasta los 21 ddi mediante un muestreo destructivo.

Se realizaron dos réplicas biológicas con diseño de bloques completos al azar, se establecieron 4 bloques cada uno con cinco plantas por tratamiento y se evaluó la incidencia y severidad de los aislamientos en las tres edades. Para el análisis estadístico, se realizó una ANOVA y la prueba de comparación de medias de Tukey con nivel de significancia de ($P \leq 0,05$). Los análisis se realizaron utilizando del programa SAS Enterprise Guide 7.1.

1.4.5 Análisis de datos

La evaluación de patogenicidad en plantas se midió con la escala de severidad descrita por Rongai *et al.*,(2017) y modificada de acuerdo con la sintomatología observada (Tabla 1.1, Figura 1.1).

Tabla 1.1. Escala descriptiva de severidad de la marchitez vascular producida por *F. oxysporum*, adaptada de Rongai *et al.*,(2017)

Síntoma	Grado
Sin síntomas/ Planta sana	0
Ligero amarillamiento en una o dos hojas	1
Amarillamiento en hojas basales y del tercio medio, con algunas hojas marchitas	2
Amarillamiento severo de hojas; 50% de las hojas marchitas	3
Síntomas generalizados, todas las hojas amarillas, retraso severo en el crecimiento	4
Planta muerta	5



Figura 1.1. Escala diagramática para la evaluación de la severidad de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 2 en tomate. Expresión de síntomas de marchitez vascular de 0 a 5 grados, ajustadas a partir de Rongai *et al.*,(2017). Fotografía tomada por Gómez. M. R. Laboratorio Microbiología Agrícola, AGROSAVIA.

Ecuación 1.1 Índice de severidad (Chiang *et al.*, 2017)

$$IS (\%) = \frac{\sum(\text{Frecuencia de cada nivel de enfermedad} * \text{nivel de enfermedad})}{(\# \text{ total de observaciones}) * (\text{nivel máximo de la enfermedad})} * 100$$

Ecuación 2.1 Área bajo la curva del progreso de la enfermedad, descrita por (Pedroza & Samaniego, 2009)

$$ABCPE = \sum_i \frac{y_i + y_{i+1} + 1}{2} * (t_{i+1} - t_i)$$

donde: Y: Porcentaje de la enfermedad (Incidencia o severidad), según evaluación y t: Periodo de evaluación en días después, en función del tiempo.

Después de 21 días posteriores a la inoculación, se evaluó a nivel de cotiledones los síntomas los cuales consistieron en pardeamiento vascular evaluado como el número de haces afectados, mediante un corte transversal en la base de la planta), siendo usados para medir la enfermedad de acuerdo con los criterios descritos por Rep (2005) en una escala de 0 a 4 grados.

Tabla 1.2. Escala descriptiva de severidad de la marchitez vascular producida por *F. oxysporum*, adaptada de Rep (2005)

Síntoma	Grado
Sin síntomas	0
Hipocótilo ligeramente hinchado o doblado	1
Uno o dos haces vasculares marrones en el hipocótilo	2
Al menos dos haces vasculares marrones y distorsión en el crecimiento (fuerte flexión del tallo y desarrollo asimétrico)	3
Todos los haces vasculares son marrones, las plantas muerta o muy pequeña y marchita	4

Análisis estadístico

Los datos se procesaron mediante un análisis de estadístico con un ajuste del modelo de medidas repetidas. La observación γ_{ij} es la respuesta del sujeto j al tratamiento i y sólo se usan n sujetos.

$$\text{El modelo se escribe como: } \gamma_{ij} = \mu + B_i + T_j + \varepsilon_{ij}$$

donde:

γ_{ij} : Variable respuesta

μ : Intercepto modelo (media general)

B_i : Efecto del i -ésimo bloque, $i=1,,4$

T_j : Efecto del j -ésimo tratamiento, $j =1,2,3,4$

ε_{ij} : Efecto del error experimental.

En los casos donde se encontraron efectos significativos, se usó la prueba de comparación de medias de Tukey con nivel de significancia de ($P \leq 0.05$). La valoración de los supuestos de distribución normal de los residuales y homocedasticidad se realizó mediante métodos gráficos. Los análisis se realizaron utilizando del programa SAS Enterprise Guide 7.

1.5 Resultados y Discusión

1.5.1 Obtención de 119 aislamientos

Se conformó una colección de 119 aislamientos pertenecientes a *Fusarium oxysporum*, de los cuales provienen 28 de Cundinamarca, 26 de Boyacá, 52 de Antioquia y 13 de Caldas (Figura

1.2), durante el recorrido se visitaron 32 fincas productoras de tomate bajo condiciones de invernadero entre el 2016 y 2017, incluyendo aislamientos suministrados por el grupo de investigación en proyección producción agropecuaria (GIPPA) de la universidad de Caldas.

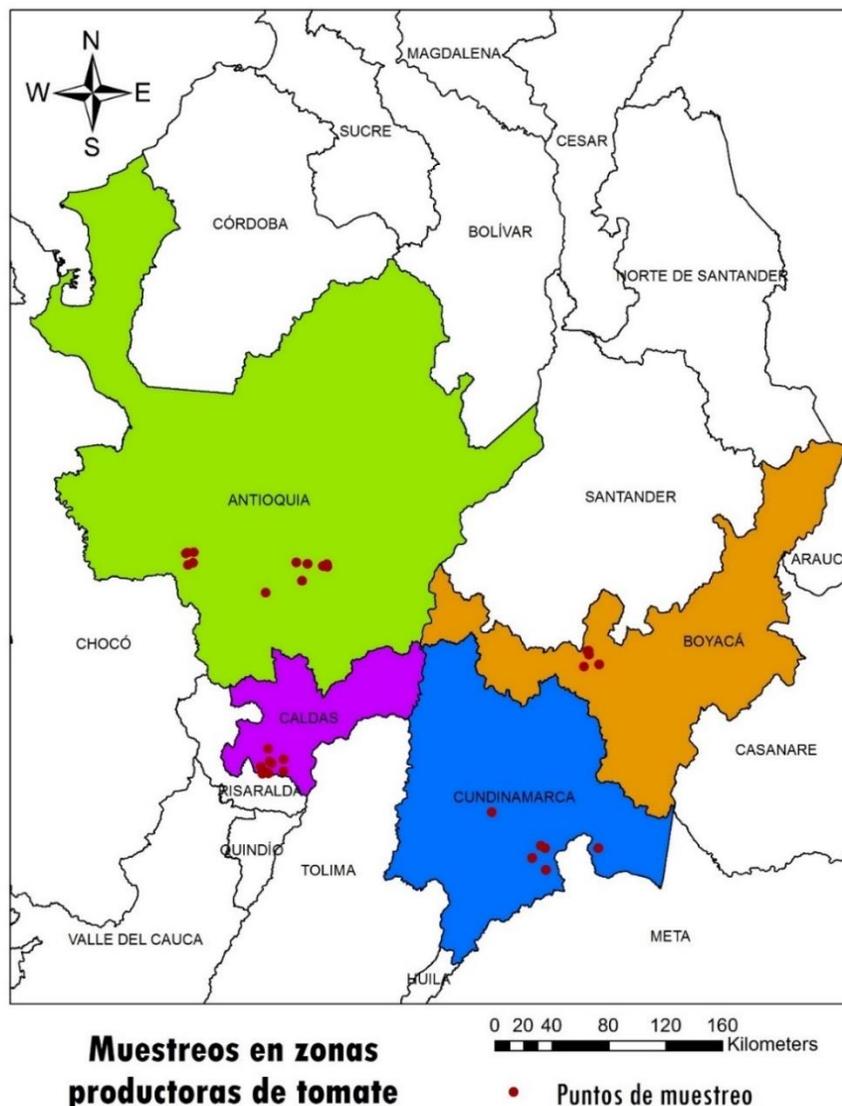


Figura 1.2. Puntos de muestreo de zonas productoras de tomate (*Solanum lycopersicum*) bajo invernadero.

La mayoría de los aislamientos se obtuvieron de híbridos del genotipo Milano Nicolas (16%), seguido de Chonto Aslam (14%), Roble (12%), Libertador y Torrano (11%), respectivamente (Tabla 1.3).

Tabla 1.3. Principales cultivares de tomate reportados en fincas productoras en Cundinamarca, Boyacá, Antioquia y Caldas.

Cultivar	Resistencia	Procedencia	Número de aislamientos
Cherry Tropical	<i>Fol</i> R1 y R2	Rionegro	10
Chonto Aslam	<i>Fol</i> R1, R2 y R3	El Peñol, Urrao, Villa de Leyva	17
Chonto Calima	<i>Fol</i> R1 y R2	Chinchiná	4
Chonto Ciénaga	<i>Fol</i> R1 y R2	Palestina	1
Chonto Conquistador	<i>Fol</i> R1 y R2	Santa Sofía	2
Chonto Gem604	<i>Fol</i> R1 y R2	El Peñol	2
Chonto Libertador	<i>Fol</i> R1 y R2	Cáqueza, Fómeque, Villa de Leyva, Sutamarchán, Santa Sofía	13
Chonto Monterone	<i>Fol</i> R2	Villa de Leyva, Santa Sofía	2
	<i>Fol</i> R1, R2 y R3	Fómeque, Villa de Leyva, Palestina, Urrao y Villamaría	14
Chonto Roble			
Chonto Santa Clara	No Reporta	Mosquera	1
Chonto Torrano	<i>Fol</i> R1 y R2	El peñol, Urrao	13
Chonto Venanzio	No Reporta	Manizales, Urrao	5
Injerto Armada-Carguero	<i>Fol</i> R1 y R2	Chinchiná	2
Milano Nicolas	<i>Fol</i> R1 y R2	Cáqueza, Fómeque, Quetame, Santa Sofía	19
No identificados		San Vicente-Guarne	14
			119

A partir de las muestras de tejido con síntomas de marchitez vascular, coloración amarilla en hojas senescentes, marchitez generalizada y necrosis vascular, al hacer un corte transversal en el tallo se observó necrosis vascular de color marrón (Figura 1.3), y se aisló e identificó *Fusarium oxysporum*, agente causal de esta enfermedad. Estos síntomas típicos se han reportado en tomate por Di Pietro *et al.*, (2003) y Agrios (2005), quienes encontraron síntomas de marchitamiento vascular, epinastia floral, retraso en el crecimiento, color amarillento de hojas bajas, marchitamiento progresivo en hojas y tallo, defoliación y finalmente muerte de la planta. Además, al cortar el tallo en secciones trasversales, puede observarse una coloración marrón en los haces vasculares.



Figura 1.3. Síntomas de marchitez vascular en tomate causados por *Fusarium oxysporum*. Plantas mostrando amarillamiento y marchitez (A y B), planta seca y muerta (C), corte trasversal del tallo, mostrando el oscurecimiento de los haces vasculares (xilema) (D-F). Las flechas indican el daño vascular. Fotografías tomadas en campo por el grupo de Microbiología Agrícola de AGROSAVIA.

De acuerdo con lo reportado en literatura, la producción de tomate bajo invernadero se basa principalmente en la siembra de variedades híbridas, dada sus ventajas como: alta producción y calidad, desarrollo uniforme y la incorporación de resistencia a enfermedades (Jaramillo *et al.*, 2007).

1.5.2 Caracterización fenotípica de aislamientos de *Fusarium oxysporum*

Los aislamientos monospóricos obtenidos en medio PDA mostraron características típicas de *F. oxysporum*. A nivel macroscópico, de acuerdo con la morfología de las colonias presentaron

características heterogéneas (Figura 1.4), coloraciones que variaron entre rosa claro y violeta oscuro, con crecimiento liso y algodonoso de micelio, los resultados coinciden con aislamientos de *F. oxysporum* (Manikandan *et al.*, 2018). Algunos aislamientos presentaron crecimiento pionotal, lo que se considera una degeneración del cultivo, con coloraciones crema-amarillentas, apariencia cremosa y baja producción de micelio aéreo. Leslie & Summerell (2006) reportan que este crecimiento puede ocasionarse por los pases sucesivos realizados en el proceso de purificación, usando medios de cultivo ricos en carbohidratos como PDA, aunque los mecanismos que regulan estos cambios aún se encuentran por esclarecerse.

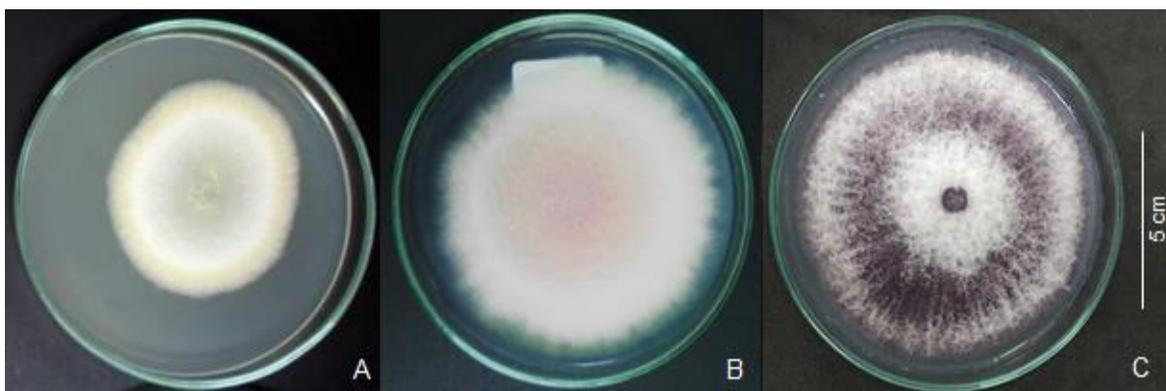


Figura 1.4. Características de las muestras de *F. oxysporum* en PDA. Se observan diferentes colores y texturas A. Forma pionotal; B. Rosa pálido; C. violeta oscuro. Fotografías tomadas por el grupo de Microbiología Agrícola, AGROSAVIA.

Al realizar la siembra en medio CLA, los aislamientos mostraron estructuras fúngicas, que al ser comparadas con las reportadas por Leslie & Summerell (2006), permitieron ubicar los aislamientos en la especie *Fusarium oxysporum* (Figura 1.5). *Fox* se caracteriza por formar tres tipos de estructuras propagativas conocidas para las formas asexuales de *Fusarium*: microconidias, macroconidias y clamidosporas (Leslie & Summerell, 2006). *F. oxysporum* persiste en el suelo, usando estructuras de resistencia denominadas clamidosporas, las cuales se caracterizan por poseer una pared gruesa, que le permite sobrevivir durante varios años de forma latente (Dean *et al.*, 2014), convirtiéndose en una restricción a largo plazo para la producción de cultivos en campos infestados.

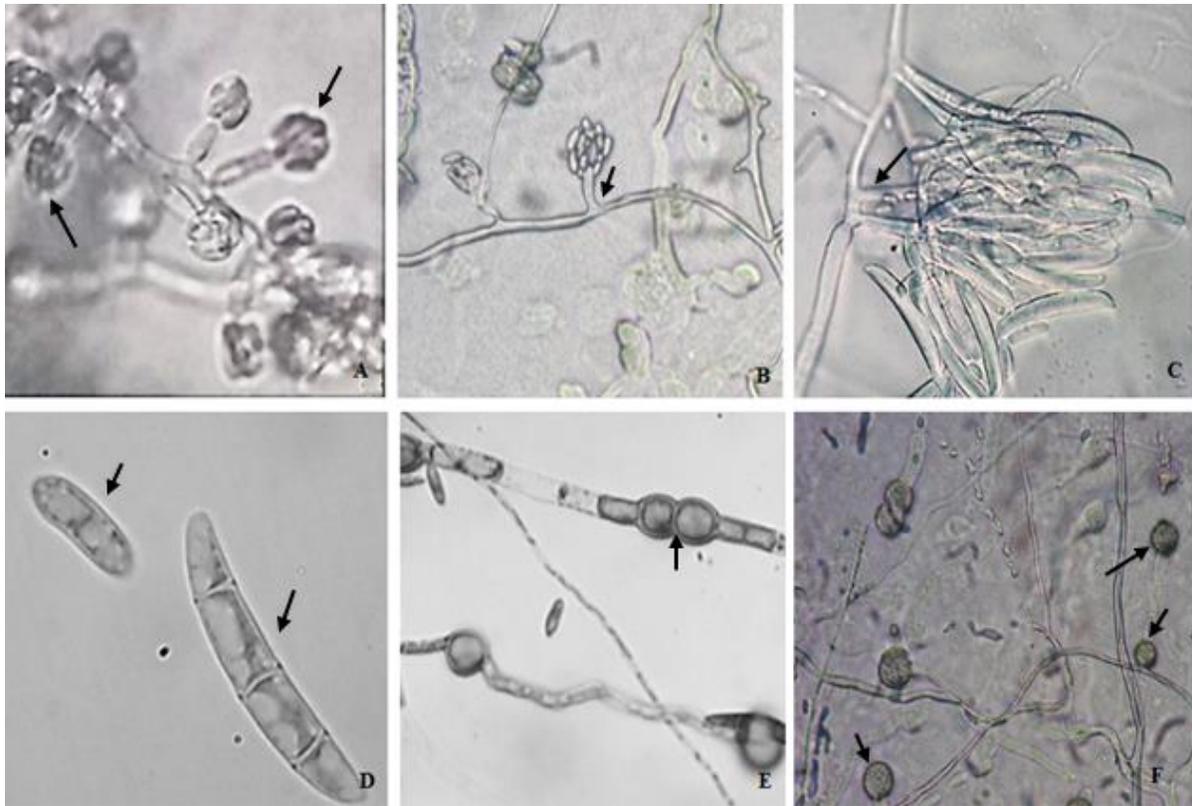


Figura 1.5. Estructuras características de *F. oxysporum* identificadas en medio CLA para el aislamiento *Fol59*. Las flechas indican en detalle A. grupos de pseudocabezas formados en hifas (10X); B. microconidios dispuestos en pseudocabezas (10X); C. macroconidios formando esporodocios en las hifas (10x); D. macroconidios y microconidios con formas curvilíneas y tabiques típicos (100x); E y F. Clamidosporas intercalares o terminales en las hifas (40x y 10x, respectivamente). Fotografías tomadas por Carmona S.L. Laboratorio Microbiología Agrícola, AGROSAVIA.

1.5.3 Evaluación de patogenicidad

1.5.3.1 Selección del método de inoculación

Con respecto a la prueba de patogenicidad, al evaluar tres métodos de inoculación los cuales variaron en dosis y forma de aplicación del inóculo. Los resultados indican que todas las plantas inoculadas con *Fol* presentaron síntomas de la enfermedad (Tabla 1.1, Figura 1.1) a los 10 ddi. De acuerdo con el análisis estadístico se observaron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (Anexo 3). Para las variables de incidencia y severidad (ABCPE), se presentaron diferencias significativas entre los métodos de inoculación. Para los métodos inmersión de raíz (IR) y la combinación (IR+SS), no se presentaron diferencias significativas, mientras que la suspensión a suelo (SS) presentó diferencias significativas, como se muestra en la Figura 1.6. En otras palabras, el protocolo de inoculación por aplicación de la suspensión al suelo (SS) resulta ser menos efectivo para que *Fol* colonice la planta y genere síntomas de

marchitez. El porcentaje de incidencia a los 18 ddi fue del 100% para IR, seguido de un 98% para la combinación IR+SS y del 78% en suelo (SS) (Tabla 1.4). De acuerdo con los resultados de este estudio, el método de inoculación IR fue el más práctico, eficiente y reproducible. La IR garantiza el establecimiento del inóculo en la roza rizosférica, puesto que los conidios podrían germinar al hacer contacto rápidamente con el tejido vegetal (Lagopodi *et al.*, 2002). Este método optimizado y ajustado representó el punto de partida sobre el cual se desarrollaron todos los estudios de búsqueda de alternativas para el manejo de la marchitez por *Fusarium* en nuestro grupo de investigación, incluyendo el uso de sustancias bioactivas, el cual es tema del segundo capítulo del presente proyecto.

La colonización del patógeno se corroboró mediante indexación del tallo de plantas inoculadas y no inoculadas (testigo) con UDCFOL10, realizando una desinfección superficial del tallo, seccionando segmentos de 1cm² y sembradas en PDA e incubadas a 25 °C. Se evidenció el crecimiento del patógeno en el tejido inoculado, comprobando los postulados de Koch (Volcy, 2008). En plántulas empleadas como testigos no se observaron síntomas, ni crecimiento de *Fol* en ninguno de los segmentos del tallo sembrado.

La evaluación de métodos de inoculación en diferentes especies de plantas ha sido ampliamente estudiada y documentada. Amini (2009) al usar inmersión de raíz por 10 minutos en plántulas de tomate, a una concentración de 1x10⁶ conidios.mL⁻¹ obtuvo síntomas característicos de *Fol*; del mismo modo (van der Does *et al.*, 2018) , evaluaron el método de inmersión y corte raíz usando una concentración de 1x10⁷ conidios.mL⁻¹ durante 1 minuto, logrando una colonización entre el 20 y 60 % en plantas resistentes y susceptibles, respectivamente. Por otro lado, Sidharthan *et al.*, (2018), usaron inmersión de raíz por 3 horas a una concentración de 1x10⁴ conidios.mL⁻¹, logrando caracterizar la virulencia en diferentes aislamientos, reportando además una incidencia del 100% en uno de sus aislamientos. Nuestros resultados ratifican que exponer las raíces a una suspensión de esporas resulta eficiente, puesto que las esporas se depositan de forma directa en la superficie de la raíz, donde se adhieren y germinan (Gordon, 2017).

Tabla 1.4. Incidencia (%) del aislamiento de *Fol*/UDCFOL10 en plantas de tomate.

Días después de	Variable (%)	Tratamiento		
		Inmersión de raíz (IR)	Suspensión a suelo (SS)	Combinación (IR+SS)

inoculación				
(ddi)				
10	Inc	81±2,9805 a	20±3,3806 b	60±4,1403 ab
	Sev	31± 2,0006 a	5± 1,0556 b	24±2,8970 a
14	Inc	94±1,6603 a	65±6,2678 b	90±1,6903 a
	Sev	68±3,3932 a	26±2,9277 b	67±2,5509 a
18	Inc	100±0,0 a	78±4,2886 b	98±2,9423 a
	Sev	95±1,0657 a	41±1,1180 b	86±1,6903 a

Se presenta la media ± error estándar (EE) de dos réplicas biológicas de plantas de tomate evaluadas durante 18 días después de inoculación. Columnas con diferentes letras son significativamente diferentes de acuerdo con la comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$).

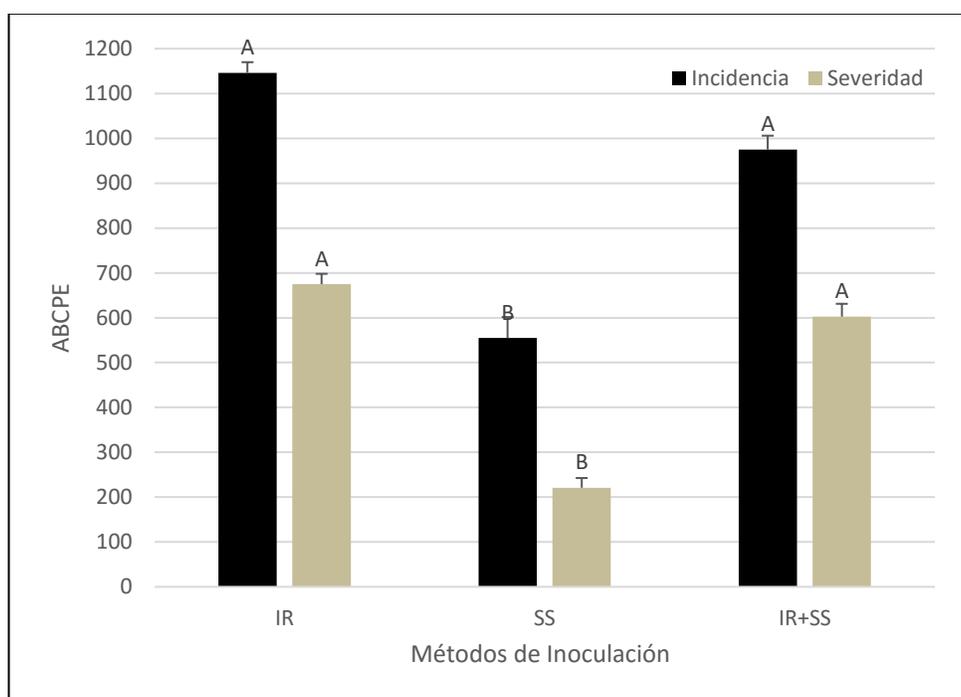


Figura 1.6. Área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE) expresada como incidencia y severidad producida por el aislamiento UDCFOL10 de *Fol* en plantas de tomate. *IR=Inmersión de raíz; SS=Suspensión a suelo y IR+SS=combinación inmersión de raíz y suspensión a suelo. Las barras de error representan ± EE. Letras diferentes indican diferencia significativa de acuerdo con la comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$). La gráfica representa el consolidado de las réplicas biológicas, en donde se comparan tres métodos de inoculación en plantas de 15 días de edad, evaluadas durante 18 días después de inoculación.

1.5.3.2 Selección del estado de desarrollo

Una vez seleccionado el método más eficiente de inoculación, se procedió a realizar ensayos con los aislamientos UDCFOL10 y *Fol59*, usando plantas de 15, 25 y 30 días después de siembra (dos, tres y cuatro hojas verdaderas, respectivamente). Con el fin de seleccionar un estado de

desarrollo óptimo, donde se pudiera evaluar el efecto de las sustancias bioactivas que constituyen la segunda fase del proyecto. El diseño experimental que se utilizó fue bloques completamente al azar, con 3 tratamientos (estado de desarrollo de las plantas) y un testigo. Para cada aislamiento la unidad experimental consistió en una planta, para cada tratamiento se utilizaron 10 repeticiones por cuatro bloques.

Análisis prueba de patogenicidad con el aislamiento UDCFOL10

Para el aislamiento UDCFOL10, la aparición de los primeros síntomas de marchitamiento vascular se observó a partir del día 10 post inoculación y la evaluación se realizó cada cuatro días hasta los 18 días, fecha en la cual la mayoría de las plantas presentaron síntomas de clorosis en hojas bajas, marchitez generalizada, necrosis y muerte de plantas. En la Figura 1.7 se muestra el ABCPE para severidad del aislamiento UDCFOL10.

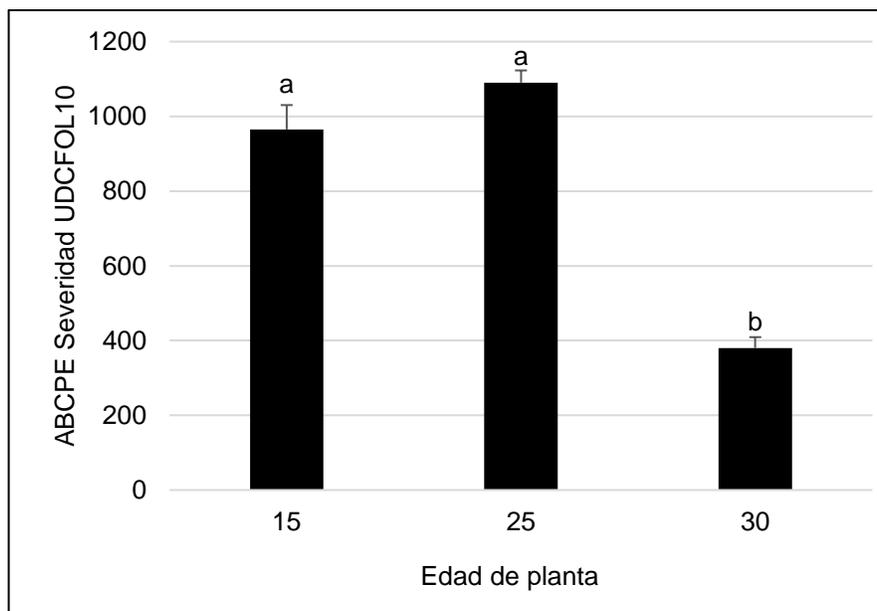


Figura 1.7. Área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE) expresada como severidad producida por el aislamiento UDCFOL10 de *FoI* en plantas de tomate. * Los diferentes tratamientos, corresponde a la edad de plantas de tomate 15, 25 y 30 días. Las barras de error representan \pm EE. Letras diferentes indican diferencia significativa de acuerdo con la comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$). La gráfica representa las réplicas biológicas independientes, en donde se comparan tres edades de las plantas de tomate evaluadas durante 18 días después de inoculación.

El análisis de varianza mostró que se presentaron diferencias significativas en ABCPE entre plantas inoculadas con *FoI* a los 30 días después de siembra y aquellas inoculadas a los 15 y 25 días (Figura 1.7). La figura 1.7 indica que una progresión menor de la infección, y síntomas asociados, cuando se inoculan plantas a los 30 días después de siembra, este hecho es muy importante porque hace posible realizar un seguimiento más preciso del progreso de la

enfermedad y ajustar las categorías de la escala de síntomas, por tal motivo, resulta mucho mejor realizar inoculaciones en plantas de 30 días después de siembra.

Análisis prueba de patogenicidad con el aislamiento *Fol59*

Los resultados para *Fol59*, mostraron los primeros síntomas de marchitez vascular a los 6 días después de inoculación (ddi) y la evaluación se realizó hasta los 14 días, fecha en la cual la mayoría de las plantas presentaron síntomas de clorosis en hojas bajas, marchitez generalizada, necrosis y muerte de plantas, como se observa a los 12 ddi en la Figura 1.8 A y B, donde plantas de 15 y 25 días presentan síntomas de marchitez más rápido en comparación con las plantas de 30 días.

Se realizó el cálculo del ABCPE para comparar a través del tiempo, la severidad e incidencia causada por el aislamiento *Fol59*. El análisis de varianza muestra que se presentan diferencias significativas entre plantas inoculadas con *Fol* a los 30 días después de siembra y aquellas inoculadas a los 15 y 25 días, mientras que para incidencia no hubo diferencias significativas en ninguna de las réplicas evaluadas, lo que indica que todas las plantas fueron afectadas de forma independiente de la edad, pero con una progresión menor de la infección cuando se inoculan plantas de 30 días después de siembra. La metodología de inoculación usando el aislamiento *Fol59* es eficiente para estudiar el modelo de Tomate-*Fol*.

En la Figura 1.8 B, se observa que las plantas de 15 y 25 días presentan síntomas de marchitez más rápido en comparación con plantas de 30 días, las cuales soportaron un poco más la sintomatología producida por *Fol59*. Durante el primer ensayo se observan diferencias significativas entre los tratamientos, presentando una menor severidad en plantas de 30 días. Sin embargo, la incidencia no mostró diferencias estadísticas, dado que a los 14 ddi las plantas se encuentran en un estado avanzado de la enfermedad (plantas muertas) (Anexo 5, numeral 2). Se corroboró que la metodología establecida de inoculación es eficiente en las tres edades de las plantas de tomate de la variedad susceptible.

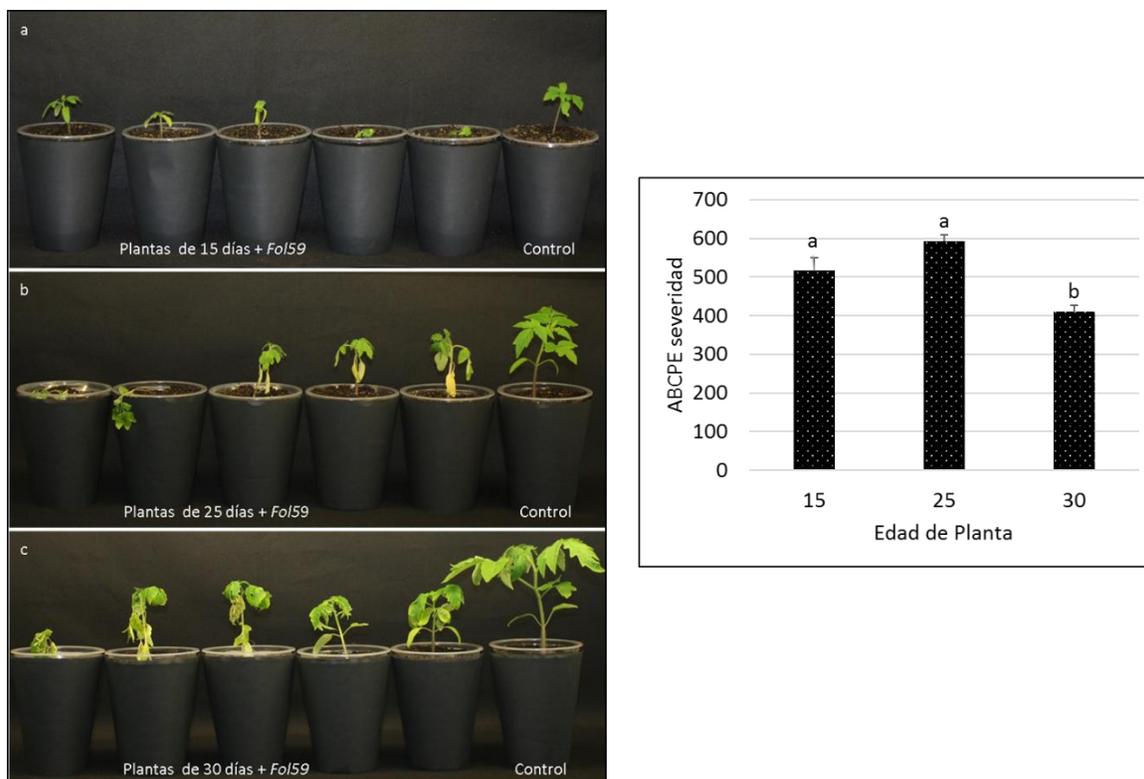


Figura 1.8. Prueba de patogenicidad en plantas de tomate en tres edades. **A.** Fotografías que muestran el desarrollo de la enfermedad (clorosis y tamaño ligeramente reducido) de cinco plantas representativas y el control a los 12 días después de inoculación en plantas de a. 15; b. 25 y c. 30 días después de siembra. Fotografías tomadas por Gómez M.R. **B.** Área bajo la curva de la enfermedad de la severidad de dos réplicas biológicas. Las barras de error representan \pm EE. Letras diferentes indican diferencia significativa de acuerdo con la comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$). La gráfica representa las réplicas de forma independiente, en donde se comparan tres edades diferentes de plantas de tomate evaluadas durante 14 ddi.

Por tal razón se seleccionaron plantas de 30 dds y el aislamiento *Fol59* para continuar con los ensayos presentados en el capítulo dos del presente proyecto, puesto que permitieron evidenciar claramente los síntomas durante un periodo de tiempo, esta condición permitirá realizar un seguimiento de la enfermedad después de aplicar sustancias bioactivas como fosfitos y silicios en una estrategia alternativa para el manejo de la enfermedad.

Adicionalmente, se realizaron pruebas de patogenicidad en plantas de 30 días en una concentración de 1×10^6 microconidios. mL^{-1} con el aislamiento *Fol59*, obteniendo expresión de síntomas de la enfermedad a partir de sexto día (datos no mostrados) Figura 1.9. Brevemente, durante los ensayos de patogenicidad se logró optimizar una metodología de inoculación para el patosistema tomate-*Fol*. En particular, la temperatura fue un factor determinante para la infección. Boix-Ruíz *et al.*, 2014 indican que la temperatura óptima en el suelo para el desarrollo de la

marchitez vascular causada por *Fo1* es de 28 °C, tolerando un máximo de 33 °C y un mínimo de 20 °C.

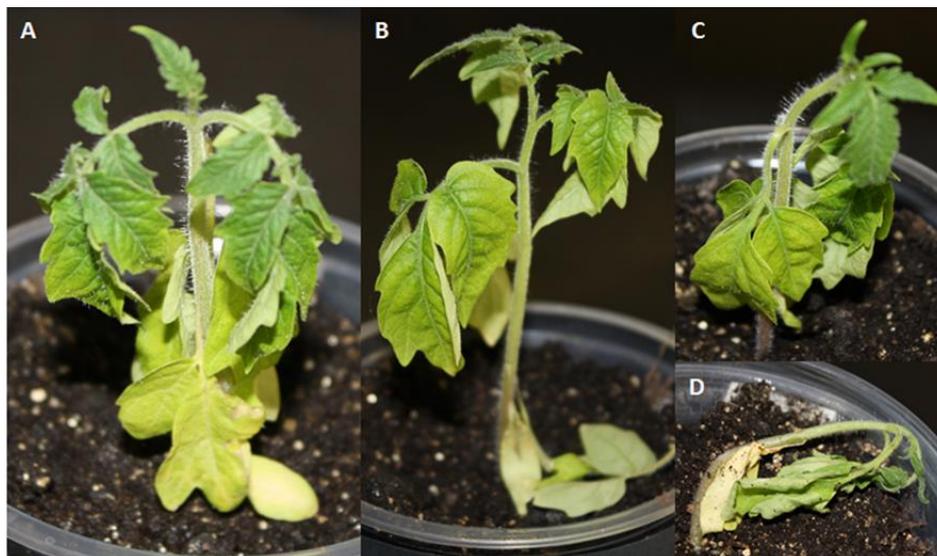


Figura 1.9. Expresión de síntomas evidenciados durante el desarrollo de los ensayos en plantas con *Fo1/59*. A. Planta con amarillamiento generalizado, 8 ddi; B. defoliación, 10 ddi; C. marchitamiento, 12 ddi y D. pérdida de turgencia y volcamiento, 14 ddi. Fotografías tomadas por Gómez. M. R. Laboratorio Microbiología Agrícola, AGROSAVIA.

1.5.3.3 Evaluación de híbridos comerciales de tomate

Con el fin de evaluar el protocolo de inoculación en plantas resistentes de tomate, se llevó a cabo la evaluación de tres híbridos comerciales de tomate tipo Chonto, que presentan resistencia a las razas de *Fo1*, así híbrido 2 (R1 y R2) e híbridos 1 y 3 (R1, R2 y R3) y la variedad susceptible “Santa Cruz Kada”. La inoculación con el patógeno se realizó usando plántulas de 30 días y una concentración de 5×10^6 microconidios. mL^{-1} de inóculo, mediante inmersión de raíz. Se hizo seguimiento de la enfermedad con la escala descrita por Rep (2005) (Tabla 1.2), adicionalmente con la escala diagramática y descriptiva (Figura 1.1, Tabla 1.1), medidos a los 21 ddi.

La prueba de patogenicidad se realizó por duplicado, donde se observaron diferencias significativas entre híbridos y la variedad susceptible de acuerdo con el análisis de varianza y la prueba de comparación de medias de Tukey de ($P \leq 0.05$), para ambas escalas (Figura 1.10, A y B). En la Figura 1.10, A y B se comparan las dos escalas de evaluación del desarrollo de la enfermedad descritas en las tablas 1.1 y 1.2 de la sección materiales y métodos. Ambas escalas resultan ser eficientes en la identificación de diferencias de severidad entre cultivares de tomate. Sin embargo, la escala propuesta por Rongai *et al.*, (2017) no es destructiva y permite hacer un seguimiento más detallado de los síntomas de la enfermedad. Por tal razón, para todos los

posteriores experimentos se decidió usar esta escala. Durante los ensayos los híbridos tuvieron un mejor comportamiento, con respecto a la variedad susceptible, como se muestra en la Figura 1.10 C, en el panel (a) se presentan plantas de los diferentes tratamientos inoculadas con *FoI59*, evidenciando algunas clorosis en hojas bajas de los híbridos y marchitamiento a los 21 ddi. Sin embargo, para la variedad susceptible, las plantas inoculadas alcanzaron su grado más alto para ambas escalas evaluadas. En el panel (b), se muestran los controles no inoculados con *FoI59* de las plantas tanto de híbridos como de la variedad susceptible, confirmando que los síntomas observados hacen parte del progreso de la enfermedad y no están asociados a deficiencias nutricionales o alguna otra condición.

El uso de cultivares genéticamente resistentes, es uno de los métodos más eficaces y sostenibles con el medio ambiente para el control de este tipo de enfermedades (Di Pietro *et al.*,2003; Kim *et al.*,2016). Esta resistencia está determinada, entre otras causas, por la presencia de los genes R, que determinan especificidad en el sistema inmune de las planta, reconociendo de forma directa o indirecta los efectores secretados por microorganismos adaptados (Jones & Dangl, 2006). Estudios posteriores planteados dentro del proyecto de manejo de enfermedades del suelo en tomate de AGROSAVIA, buscarán caracterizar la relación entre patogenicidad de *FoI59* en híbridos comerciales de tomate y la existencia de genes de resistencia en dichos cultivares.

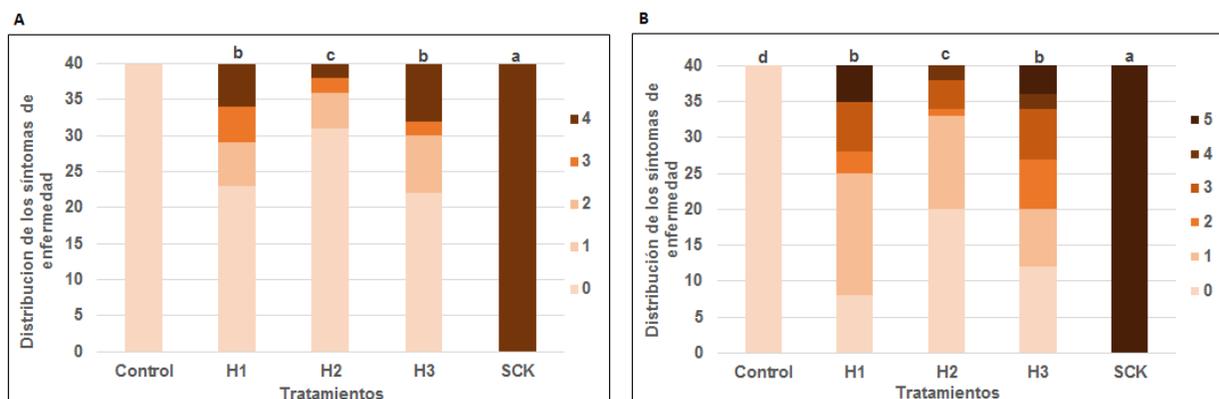




Figura 1.10. Prueba de patogenicidad en plantas de 30 días con híbridos comerciales de tomate y variedad susceptible con *Fol59*. **A.** Evaluación de la enfermedad según puntuaciones en haces vasculares en plantas infectadas con *Fol59* a los 21 ddi, a partir de dos réplicas ($n=40$ plantas por tratamiento) (Rep, 2005). **B.** Evaluación de la enfermedad, mediante síntomas observados en plantas infectadas con *Fol59* a los 21 ddi, a partir de dos réplicas ($n=40$ plantas por tratamiento), Rongai *et al.*, (2017). Letras diferentes indican diferencia significativa de acuerdo con la comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$) **C.** Fotografías de plantas infectadas con *Fol59*, tomadas a los 21 ddi, mostrando 10 plantas inoculadas y 5 plantas control por cada tratamiento. Fotografías tomadas por Gómez M.R de AGROSAVIA.

1.5.1 Optimización del método de inoculación para la evaluación de la marchitez vascular en plantas de tomate de 30 días

Recomendaciones previas

Durante la investigación se estableció una metodología de inoculación ajustada y probada para la evaluación en el patosistema tomate-*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Se recomienda garantizar la viabilidad de los aislamientos patogénicos mediante la reactivación en medio PDA+EV o en planta *in vitro*. Las plántulas pueden tener un rango entre 15-30 días después de siembra, para garantizar una infección exitosa, de acuerdo con los resultados obtenidos durante esta investigación.

1. Realizar la activación de la cepa de *Fol* sobre plantas *in vitro* de tomate, crecidas en medio MS agregando 10 µl de inóculo por plántula e incubar en cuarto de crecimiento.
2. Posteriormente extraer el micelio y sembrar en medio de cultivo PDA suplementado con extracto de tomate, durante 8 días en incubación a 25°C.
3. Una vez la cepa del patógeno alcance el estado de desarrollo indicado, agregar a cada caja 5 a 10 mL de agua destilada estéril con ayuda de una pipeta y realizar el raspado en la superficie del medio de cultivo con el fin de desprender el micelio y microconidios.
4. Ajustar la concentración a 1×10^6 microconidios. mL^{-1} para plantas susceptibles y 5×10^6 microconidios. mL^{-1} para plantas con resistencia (híbridos), haciendo un conteo en cámara de Neubauer en microscopio, colocar 20 mL de la solución del inóculo en un vaso de precipitado y llevar al sitio donde realizará la inoculación.
5. Hacer una mezcla de suelo: vermiculita estéril, en proporción 3:1, adicione 3 gramos (g) de fertilizante que contenga Nitrógeno, Fósforo y Potasio, en proporción (15-15-15), por cada kilogramo (kg) de la mezcla, homogenizar la mezcla.
6. Llenar y marcar vasos plásticos de 16 onzas, colóquelos dentro de una canastilla, por tratamiento.

7. Tome plántulas de 30 días de edad (días después de siembra), sembradas en sustrato turba estéril y retire cuidadosamente el exceso de sustrato, sin causar daño en raíces.
8. Colocar las raíces de las plántulas en contacto con la solución del inóculo, durante 15 minutos. Para el caso de las plantas control, sumergir la raíz en agua destilada estéril.
9. Luego, sembrar las plántulas en cada uno de los vasos y llévelas al cuarto de crecimiento, bajo las siguientes condiciones: temperatura y humedad controladas de $28^{\circ}\text{C}\pm 2$ y 60 % respectivamente, con un fotoperiodo de 12 horas/luz.
10. Incubar en cuarto de crecimiento durante todo el ensayo, otra opción es dejar incubar durante 6 días y posteriormente llevar las plantas a invernadero.
11. Finalmente, adicionar 40 mL de agua destilada estéril a cada una de las plántulas sembradas, por tratamiento, iniciar con los testigos.
12. Hacer seguimiento a la expresión de síntomas de la enfermedad marchitamiento vascular y registrar periódicamente la incidencia (proporción de individuos de la unidad experimental con síntomas de la enfermedad) y la severidad (intensidad de los síntomas de la enfermedad en cada planta). Calcule el índice de severidad de acuerdo con la escala descriptiva y diagramática (Tabla 1.1 y Figura 1.1) descrita por Rongai *et al.*,(2017), si desea verificar el avance de la enfermedad puede usar la escala descrita por (Rep, 2005)
13. Una vez culmine los ensayos, descarte el suelo contaminado con *FoI* en bolsas rojas y llévelo al sitio de acopio.

Dependiendo del cultivar, los primeros síntomas de infección pueden aparecer en diferentes tiempos. De acuerdo con los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta investigación, los primeros síntomas se hicieron visibles a partir de los 6 días después de la inoculación en plantas susceptibles de 30 días después de siembra. Se observó amarillamiento de las hojas basales y un marchitamiento progresivo. A medida que aumentó el tiempo después de la inoculación, los síntomas se hicieron más visibles y diferenciados, hasta la muerte de la planta.

1.6 Conclusiones

El análisis macro y microscópico de los 119 aislamientos colectados permitieron concluir que se trata de aislamientos de *Fusarium oxysporum*, dos de los cuales (*Fol59* y UDCFOL10) son altamente patogénicos en tomate.

Se obtuvo una metodología con profundo detalle para inoculación con *Fol* usando un protocolo de inmersión de raíz en plantas de tomate. Esta metodología es altamente reproducible con aislamientos colombianos de *Fol*, además, describe aspectos claves imprescindibles para obtener expresión de la enfermedad marchitez vascular en plantas de tomate, entre ellos, el control de la temperatura y la humedad relativa.

HIBRIDOS

1.7 Agradecimientos

Se agradece a la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-AGROSAVIA por la financiación de este proyecto, a los Drs. Adriana Gonzalez y Mauricio Soto Suárez, a las profesionales de apoyo a la investigación Sandra Lorena Carmona y Diana Burbano, durante el montaje de experimentos.

2. Evaluación de sustancias bioactivas para el manejo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en tomate

2.1 Resumen

El control de las enfermedades en el cultivo de tomate ha sido ampliamente dependiente del uso y aplicación de plaguicidas, lo que genera un detrimento a los recursos naturales y la salud de las personas. Las sustancias bioactivas son una de las alternativas más promisorias investigadas para mejorar el manejo de la marchitez, y un ejemplo de éstas son los fosfitos y silicios. El fosfito (Phi) o ácido conjugado de fósforo (H_3PO_3), una forma reducida de fosfato (Pi) ha sido utilizado como plaguicida, fertilizante suplementario y bioestimulante. Investigaciones previas han revelado que los fosfitos son efectivos en el manejo de enfermedades de forma directa e indirecta. En el primer caso, actuando sobre el crecimiento, desarrollo micelial y esporulación de patógenos fúngicos y de forma indirecta como inductores de resistencia en la planta frente al ataque de patógenos, estimulando la producción de fitoalexinas y expresión de genes relacionados con defensa. En relación con el silicio (Si), aún no es considerado como un elemento esencial y la resistencia a patógenos mediada por este elemento no se encuentra completamente caracterizada. En la actualidad, algunos estudios han sugerido que la acumulación de (Si) en las hojas actúa como barrera física contra la penetración de patógenos y activa en la planta respuestas de defensa una resistencia sistémica inducida. El presente trabajo fue desarrollado para evaluar el efecto de sustancias bioactivas, frente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 2 (*Fo/59*). Se probaron fuentes de fosfitos y silicio a nivel *in vitro* frente al aislamiento *Fo/59*, durante 7 días en cámara de crecimiento obteniendo una inhibición en el crecimiento del patógeno. Para los fosfitos de potasio (KPhi) evaluados, se encontró que el crecimiento de *Fo/59* fue inhibido entre un 70 y 99% a concentraciones mayores a 1000 ppm. Por otro lado, el fosfito de calcio (Caphi), inhibió el crecimiento de *Fo/59* un 70% a concentraciones mayores a 50 ppm. Para el caso del silicio (Si), se presentó inhibición en un 77% a concentraciones mayores a 5000 ppm, dado que por debajo 2000 ppm estimularon el crecimiento del patógeno. En ensayos realizados en planta completa, la incidencia y severidad en plantas susceptibles a *Fo/59* fue incrementando a través del tiempo, presentando un porcentaje del 100% y 96% respectivamente, a los 14 ddi en plantas sin aplicación de ninguna sustancia bioactiva. No obstante, en plantas

inoculadas con *FoI59*, que fueron tratadas previamente con fosfitos o silicio, tuvo como resultado una disminución de la severidad en un 42% para (Kphi1-C2); 22% para Si-C2; 20% para los tratamientos Kphi1-C1, Kphi2-C1 y Si-C1, 17% para Kphi2-C2; 12.5% para Caphi-C2 y 10.4% para Caphi-C1, en comparación al tratamiento únicamente inoculado con *FoI59*. Finalmente, la sustancia bioactiva más eficiente fue KPhi1-C2, por su consistencia en las réplicas biológicas obteniendo un 42% de eficacia sobre *FoI59*.

2.2 Palabras Claves:

Marchitez vascular, Fosfito, Silicio, *in vitro*, *in planta*

2.3 Introducción

El manejo de las enfermedades en el cultivo de tomate en Colombia ha sido ampliamente dependiente del uso excesivo de fungicidas de síntesis química, los cuales no necesariamente son aplicados bajo los estándares de calidad, seguridad y buenas prácticas agrícolas, causando un incremento en la resistencia de los patógenos, deterioro y contaminación ambiental, además de riesgos para productores y consumidores. Todo esto ha motivado el desarrollo de nuevas estrategias de manejo con el objetivo de reducir aplicaciones de productos químicos (Villa-Martínez *et al.*, 2014).

Una de las estrategias más promisorias para mejorar el manejo de las enfermedades es la agricultura ecológicamente sostenible, la cual cuenta con aproximaciones tales como el uso de diversos inductores de resistencia y sustancias bioactivas de origen biótico y abiótico. Los fosfitos y silicios son sustancias bioactivas que actúan de forma directa inhibiendo al patógeno (Felipini *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2012; Araújo *et al.*, 2010; Lobato *et al.*, 2010, 2008) e indirecta potencializando los mecanismos de defensa en la planta (Yáñez-Juárez *et al.*, 2018; Whan *et al.*, 2016; Gómez-Merino & Trejo-Téllez 2015; Castaño-Monsalve *et al.*, 2015; Burra *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2013; Monsalve *et al.*, 2012; Sanchez-Vallet *et al.*, 2012). Además aporta beneficios en la germinación de semillas (Carmona & Sautua 2017; Carmona *et al.*, 2017).

En las últimas tres décadas, el Phi o ácido conjugado de fósforo (H_3PO_3), una forma reducida de fosfato (Pi) ha sido cada vez más utilizado como plaguicida, fertilizante suplementario y bioestimulante en la horticultura (Gómez-Merino & Trejo-Téllez, 2015). El uso de los Phi se ha investigado en la agricultura principalmente en relación con sus efectos contra enfermedades de

las plantas en lugar de la nutrición vegetal (Yáñez-Juárez *et al.*, 2018 ;Deliopoulos *et al.*, 2010) y su efecto es más eficiente al aplicarlo de forma preventiva. El Phi contiene mayores cantidades de Fósforo (P) en comparación al Pi, siendo más soluble (Lovatt & Mikkelsen, 2006). Sin embargo, no proporciona una fuente nutricional de P en la planta y por lo tanto no se puede sustituir por el Pi (Thao & Yamakawa, 2009).

Al aplicar Phi en suelo este sufre una transformación gradual, mediante el contacto con bacterias que puedan oxidarlo como Pi, sin embargo las tasas a las que ocurren este tipo de acciones es lenta, demoran meses o hasta años, dependiendo del tipo de suelo (McDonald *et al.*, 2001). El Phi juega un papel importante como potenciador de diferentes procesos metabólicos en las plantas, participando en la formación de raíces y hojas, suministrado a través del suelo o por aplicación foliar mejora el rendimiento y la calidad en plantas (Lobato *et al.*, 2010; Lovatt & Mikkelsen 2006). Los Phi poseen la habilidad de estimular la producción de metabolitos biológicamente activos dentro de la planta, reduciendo la severidad de las enfermedades. Sin embargo, el efecto es transitorio y los síntomas pueden desarrollarse tiempo después de las aplicaciones (Lobato *et al.*, 2010, 2008). Las sales de Phi son conocidas por su actividad fungicida y como inductores de resistencia en plantas (Cerqueira *et al.*, 2017). Sin embargo, su potencial aún no se ha reconocido en el patosistema *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*-Tomate.

El silicio (Si), es el segundo elemento más abundante en la superficie de la corteza terrestre después del oxígeno (Liang *et al.*, 2007). Los compuestos del (Si) constituyen más del 60% de la estructura del suelo, se encuentra en rocas, arenas y arcillas en forma de dióxido de silicio (SiO₂) y asociado con algunos elementos como el aluminio, magnesio, calcio, sodio y potasio (Rodrigues & Datnoff 2015). Se ha sugerido que la acumulación de (Si) en las hojas actúa como barrera física contra la penetración de patógenos (Cai *et al.*, 2009; Han *et al.*, 2016). Otros estudios han demostrado que el (Si) es usado como una estrategia para reducir la incidencia de enfermedades fúngicas, causadas por *Alternaria* sp., *Magnaporthe* sp., *Fusarium* sp. y *Phytophthora* sp., entre otros (Debona *et al.*, 2017; Whan *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2013; Romero *et al.*, 2011).

Estudios recientes indican un efecto positivo al aplicar (Si) para mitigar el daño causado por *F. oxysporum* en cultivos de solanáceas. En tomate Huang *et al.*,(2011), determinaron que el (Si) en solución nutritiva disminuyó la pudrición de la raíz causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* (Forl) hasta un 82.1%. En tomatillo (*Physalis isocarpa*) se demostró que al aplicar (Si) vía foliar, las plantas fueron más resistentes a la marchitez causada por *Fol*

disminuyendo hasta un 80% la severidad. Así mismo, Castro-Rosalez, (2017) observaron una disminución en un 13,2 % la severidad de los síntomas causados por *Fol* en plantas tratadas con (Si), sugiriendo que el (Si) ayuda a reforzar los mecanismos de defensa en plantas.

En este contexto, el presente capítulo tiene como objetivos, evaluar a nivel *in vitro* el efecto directo del silicio y los fosfitos sobre el crecimiento de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, y evaluar *in vivo* la capacidad que tiene estas sustancias bioactivas para retrasar el desarrollo de la marchitez por *Fusarium* en plantas de tomate inoculadas con el patógeno.

2.4 Materiales y métodos

Material fúngico y lugar de investigación

Este estudio se realizó en el Laboratorio de Microbiología Agrícola del Centro de Investigación Tibaitatá, de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria- AGROSAVIA.

Para el desarrollo de los experimentos *in vitro* e *in planta* se utilizó el aislamiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 2 denominado *Fol59*, aislado de tallo del híbrido comercial de tomate llamado Calima, en el departamento de Caldas (Gómez M.R *et al.*, 2018 en preparación), descrito como altamente virulento de acuerdo con experimentos detallados en el primer capítulo.

2.4.1 Material Vegetal

Los ensayos *in planta* se realizaron en plantas de tomate de 30 días de edad de la variedad Santa Cruz Kada susceptible a *Fol*. Para esto, las semillas se desinfectaron previamente con una solución de hipoclorito de sodio al 2% por 15 minutos y alcohol al 70% por 1 minuto, se realizaron tres enjuagues consecutivos con agua destilada estéril (ADE) por 2 minutos cada uno, el exceso de agua se eliminó con papel absorbente estéril. Las semillas fueron transferidas a bandejas de 50 alveolos con turba estéril, bajo condiciones controladas. Después de dos semanas de germinación se fertilizó con 1mL/L del complejo NPK (Wuxal®tapa negra) cada semana.

2.4.2 Producción de Inóculo e infección de plantas

El inóculo se preparó a partir del aislamiento monospórico *Fol59* almacenado a -80 °C, el cual fue reactivado en medio PDA suplementado con extracto vegetal de tomate (EV) y se hizo un pase de la colonia a medio PDA el cual se incubó 8 días en oscuridad a 25°C. Para el proceso

de infección de las plantas, las raíces de estas fueron inmersas en una suspensión de 1×10^6 microconidios. mL^{-1} obtenida a partir de raspado de la superficie del cultivo del hongo en PDA con cuchilla y 10 mL de agua destilada estéril (ADE) y conteo de conidios en cámara de Neubauer.

2.4.3 Sustancias bioactivas evaluadas

Las sustancias bioactivas fueron seleccionadas basándose en reportes de literatura (Carmona *et al.*, 2017; D'Addazio *et al.*, 2016; Castaño-Monsalve *et al.*, 2015; Tambascio *et al.*, 2014; Lobato *et al.*, 2010) y encuestas aplicadas a productores de tomate bajo invernadero en distintos municipios (datos no publicados), realizados durante el desarrollo del proyecto “Recomendaciones para el manejo integrado de gota y marchitez por *Fusarium*, dos enfermedades prevalentes en el cultivo de tomate bajo condiciones protegidas”, que adelanta investigaciones en cultivo de tomate (Tabla 2.1). Para el desarrollo de los experimentos *in vitro* e *in planta*, se seleccionaron productos comerciales basados en fosfitos y silicio.

Tabla 2.1. Sustancias Bioactivas usadas durante ensayos *in vitro* e *in planta*

Sustancias Bioactivas*	Composición	Contenido	Dosis Recomendada Ficha Técnica	Concentraciones (ppm) para dosis recomendada
Fosfito de Potasio 1 (KPhi)	Fósforo asimilable (P_2O_5)	420 g/L	400 cc/ha ó 2 mL/L	2000
	Potasio soluble en agua (K_2O)	280 g/L		
Fosfito de Potasio 2 (KPhi)	Fósforo asimilable (P_2O_5)	434 g/L	2 a 4 L/ha ó 10 a 20 mL/L	10000 a 20000
	Potasio soluble en agua (K_2O)	403 g/L		
Fosfito de Calcio (CaPhi)	Fósforo asimilable (P_2O_5)	176 g/l	2 mL/L	2000
	Óxido de Calcio (CaO)	45,6 g/l		
Silicio (Si)	Oxido de Silicio (SiO_2)	179,4 g/L	1 l/ha ó 5 mL/L	5000
	Potasio soluble en agua (K_2O)	342 g/L		

*Las recomendaciones técnicas de las sustancias bioactivas son como fuente de fertilización foliar más no para el manejo de *Fol* en cultivos de tomate.

2.4.4 Evaluación de sustancias *in vitro*

Las concentraciones utilizadas *in vitro* de las sustancias bioactivas “fosfitos y silicios”, fueron seleccionadas a partir de una revisión de literatura (Carmona *et al.*, 2017; D'Addazio *et al.*, 2016;

Castaño-Monsalve *et al.*, 2015; Lobato *et al.*, 2010). Las concentraciones en (ppm) recomendadas por la casa comercial para las sustancias bioactivas usadas en este estudio fueron: KPhi1 2000 ppm, KPhi2 10000-20000 ppm, CaPhi 2000 ppm y Si 5000 ppm (Tabla 2.1). Con el fin de abordar para cada sustancia bioactiva concentraciones que estuvieran por encima y por debajo de las recomendadas, en este proyecto se usaron las siguientes concentraciones para cada sustancia bioactiva en estudio: Fosfitos de potasio (KPhi), se establecieron concentraciones de 0, 100, 500, 1000, 2000, 5000, 10000 y 20000 ppm; CaPhi 0, 10, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 y 2000 ppm y para silicio (Si) 0, 1000, 2000, 5000, 6500, 8500, 10000 y 20000 ppm.

La solución concentrada de los fosfitos y silicios se realizó mediante una filtración (0,22 μm) para eliminar posibles contaminantes. El medio PDA fue suplementado con las diferentes concentraciones de sustancias bioactivas y como control se usó PDA (sin sustancias bioactivas). Se realizó el ajuste del pH a 5.6 con hidróxido de sodio (NaOH) 1 M.

Discos de 7 mm de diámetro fueron tomados del cultivo de *Fo/59* crecido por ocho días en oscuridad a 25°C, y luego fueron transferidos al centro de una caja de petri que contenía PDA suplementado con las sustancias bioactivas y en medio no suplementado como control. Cinco repeticiones fueron incluidas en cada tratamiento, el ensayo se realizó tres veces (réplicas biológicas). Cada ensayo se incubó a 25°C en oscuridad por 7 días.

Después de este tiempo, se hizo un registro fotográfico de cada tratamiento y las imágenes fueron procesadas mediante el uso del software imageJ, donde se determinó el área de las colonias. El porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) de colonias en presencia de fosfitos y silicios fue calculado en relación al control sin sustancias bioactivas, usando la ecuación 1.2. Adicionalmente se calculó el valor de la concentración efectiva a la que se redujo el 50% (CE_{50}) del crecimiento micelial para cada sustancia bioactiva.

Efecto de las sustancias bioactivas en la germinación de conidios

Para la evaluación de la germinación de microconidios se emplearon dos concentraciones de cada sustancia bioactiva que corresponden a la concentración recomendada por la casa comercial (C2, Tabla 2.2) y la mitad de la concentración recomendada (C1, Tabla 2.2). La evaluación se realizó en caldo PDB suplementado con cada una de las sustancias bioactivas a las diferentes concentraciones mencionadas; como control absoluto se empleó medio de cultivo sin suplementar.

La suspensión de microconidios se obtuvo realizando un raspado de micelio del aislamiento *Fo159* de 8 días de crecimiento. El micelio obtenido se depositó en 5 mL de agua destilada estéril, posteriormente la solución fue filtrada y se ajustó a una concentración de 1×10^6 microconidios. mL^{-1} . La inoculación se realizó con una solución de 500 μL a 1×10^6 microconidios. mL^{-1} por triplicado (réplicas biológicas). El inóculo fue depositado en tubos de ensayo con 5 mL de PDB que contenían las diferentes concentraciones de las sustancias bioactivas (C1 y C2) descritas en la tabla 2.2. Posteriormente, los tubos fueron incubados en agitación a 125rpm, $25^\circ\text{C} \pm 2$ durante 24 horas. Después de este tiempo, los microconidios fueron examinados microscópicamente, fueron realizados dos conteos por réplica biológica empleando cámara de Neubauer. Para la evaluación de la germinación, un conidio era considerado germinado si el tubo germinal era dos veces mayor que el diámetro del conidio.

2.4.5 Evaluación de sustancias *in planta*

Evaluación en semillas:

Para la evaluación del porcentaje de germinación de semillas de tomate, se emplearon tres concentraciones de cada sustancia bioactiva que corresponden a la concentración recomendada por la casa comercial (C2, Tabla 2.2), la mitad de la concentración recomendada (C1, Tabla 2.2) y dos veces la concentración recomendada (C3, Tabla 2.2). Para cada uno de los 12 tratamientos fueron usadas 50 semillas de tomate y dos réplicas biológicas (Tabla 2.2). Las semillas para el control absoluto fueron tratadas con ADE. Finalmente, las semillas se mantuvieron durante 1 h en agitación a 125 rpm, antes de ser sembradas en sustrato.

Tabla 2.2. Concentraciones de sustancias bioactivas evaluadas en semillas y planta

Concentración	Tratamientos*			
	KPhi1	KPhi2	CaPhi	Si
C1 (ppm)	1000	5000	1000	2500
C2 (ppm)	2000	10000	2000	5000
C3 (ppm)	4000	20000	4000	10000

*KPhi1: fosfito de potasio 1; KPhi2: fosfito de potasio 2; CaPhi: fosfito de calcio; Si: silicio. Las concentraciones corresponden a C1: Dosis mitad recomendada; C2: Dosis recomendada y C3: Dos veces la dosis recomendada, en ppm.

Evaluación *in planta*:

Para los ensayos *in planta* se seleccionaron sólo dos concentraciones (C1 y C2) por cada sustancia bioactiva. El tratamiento con cada sustancia bioactiva y su respectiva concentración (C1 y C2, tabla 2.2) se realizó en dos momentos diferentes, (i) en semillas de tomate antes de siembra y (ii) en semillero sobre plántulas de 30 días de edad (aplicación en suelo de 10 mL de sustancia bioactiva). Después de tratamiento con cada sustancia bioactiva, se esperaron 24 horas, para luego inocular con *Fo/59* a una concentración de 1×10^6 microconidios. mL⁻¹ mediante el método de inmersión de raíz (descrito en el capítulo 1).

Posteriormente, se realizó seguimiento del desarrollo de la enfermedad y registro de datos cada 2 días después tras la aparición de los primeros síntomas (6 ddi), evaluando la enfermedad hasta los 14 ddi mediante el uso de una escala de severidad descrita por Rongai *et al.*, (2017) y modificada de acuerdo con los síntomas visuales observados. La incidencia de la enfermedad fue evaluada en porcentaje teniendo en cuenta el número de las plantas enfermas con respecto al total de las plantas evaluadas, y la severidad basada en el índice de severidad de la enfermedad, de acuerdo con la ecuación 2.2 (Chiang *et al.*, 2017). Adicionalmente, se determinó el Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE), usando la ecuación 3.2 descrita por Pedroza & Samaniego (2009). Se determinó la eficacia de cada sustancia y concentración, usando la ecuación 4.2.

2.4.6 Análisis de datos

Análisis *in vitro*: Las imágenes se procesaron mediante el uso del programa imageJ, donde se determinaron áreas de crecimiento.

- a) **El porcentaje de inhibición de crecimiento radial** (PICR) se calculó sobre el patógeno *Fo/59*, usando la siguiente fórmula descrita por (Lee *et al.*, 2014).

Ecuación 1.2.

$$\%PICR = \frac{C - T}{C} * 100$$

Donde:

C= Área de colonia (cm) del control

T= Área de la Colonia (cm) de los tratamientos

b. Concentración efectiva 50 % (CE₅₀)

La concentración CE₅₀, se determinó mediante el método de regresión lineal, de acuerdo con lo reportado por (Rosgen *et al.*, 2007).

Análisis in planta: La evaluación de patogenicidad en plantas se midió con la escala de severidad descrita por Rongai *et al.*, (2017) y modificada de acuerdo con la sintomatología observada (Tabla 2.3, Figura 2.2).

Tabla 2.3. Escala descriptiva de severidad de la marchitez vascular producida por *F. oxysporum*, adaptada de Rongai *et al.*,(2017)

Síntoma	Grado
Sin síntomas/ Planta sana	0
Ligero amarillamiento en una o dos hojas	1
Amarillamiento en hojas basales y del tercio medio, con algunas hojas marchitas	2
Amarillamiento severo de hojas; 50% de las hojas marchitas	3
Síntomas generalizados, todas las hojas amarillas, retraso severo en el crecimiento	4
Planta muerta	5



Figura 2.1. Escala diagramática para la evaluación de la severidad de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 2 en tomate. Expresión de síntomas de marchitez vascular de 0 a 5 grados, ajustadas a

partir de Rongai *et al.*,(2017). Fotografía tomada por Gómez. M. R. Laboratorio Microbiología Agrícola, AGROSAVIA.

Ecuación 2.2 Índice de severidad (Chiang *et al.*, 2017)

$$IS (\%) = \frac{\sum(\text{Frecuencia de cada nivel de enfermedad} * \text{nivek de enfermedad}) * 100}{(\# \text{ total de observaciones}) * (\text{nivel máximo de la enfermedad})}$$

Ecuación 3.2 Área bajo la curva del progreso de la enfermedad, descrita por (Pedroza & Samaniego, 2009)

$$ABCPE = \sum_i \frac{y_i + y_{i+1}}{2} * (t_{i+1} - t_i)$$

donde: Y: Porcentaje de la enfermedad (incidencia o severidad), según evaluación y t: Periodo de evaluación en días después, en función del tiempo.

Ecuación 4-2. La eficacia se calculó, mediante la prueba de Abbott (1923)

$$Eficacia = \frac{a-b}{a} * 100$$

Donde: a= Porcentaje de severidad en el tratamiento patógeno y b= Porcentaje de severidad en el tratamiento con la Sustancia Bioactiva

Análisis estadístico

Los datos se procesaron mediante un análisis de estadístico con un ajuste del modelo de medidas repetidas. La observación γ_{ij} es la respuesta del sujeto j al tratamiento i y sólo se usan n sujetos.

El modelo se escribe como: $\gamma_{ij} = \mu + Bi + Tj + \epsilon_{ij}$

donde:

γ_{ij} : Variable respuesta

μ : Intercepto modelo (media general)

B_i : Efecto del i -ésimao bloque, $i=1,4$

T_j : Efecto del j -ésimo tratamiento, $j =1,2,3,4$

ϵ_{ij} : Efecto del error experimental.

En los casos donde se encontraron efectos significativos, se usa la prueba de comparación de medias de Tukey con nivel de significancia de ($P \leq 0.05$). La valoración de los supuestos de distribución normal de los residuales y homocedasticidad se realizó mediante métodos gráficos. Los análisis se realizaron utilizando del programa SAS Enterprise Guide 7.

2.5 Resultados y Discusión

1.5.1 Evaluación de fosfitos y silicio *in vitro*

Fosfitos de potasio (KPhi)

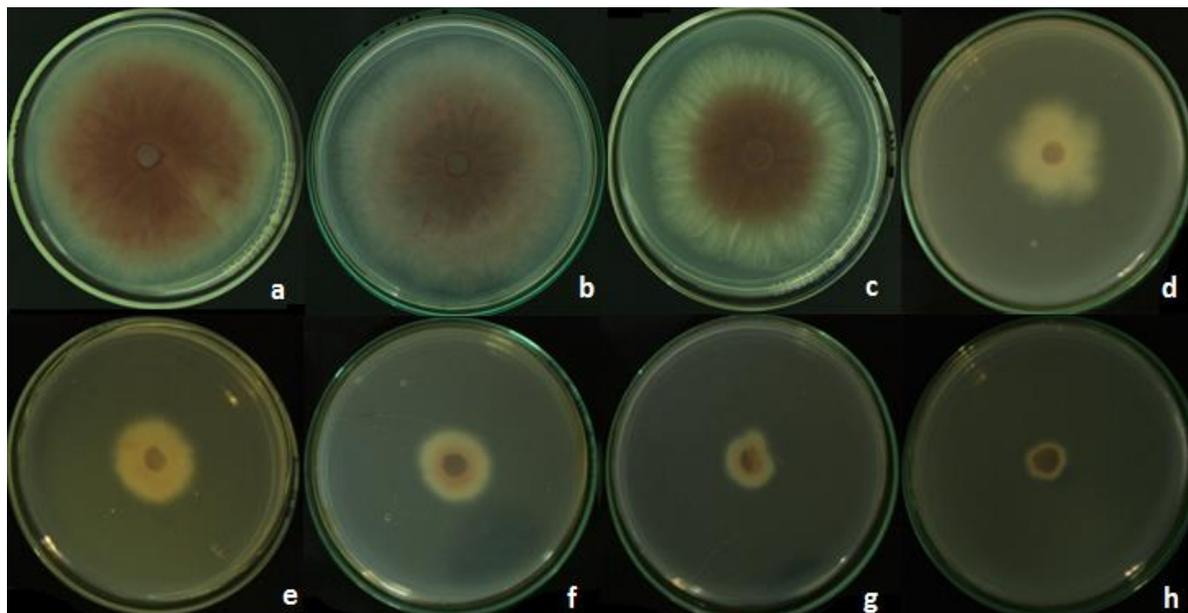
Al finalizar el séptimo día de incubación, todas las concentraciones de las sustancias bioactivas presentaron una reducción en el crecimiento micelial de las colonias de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 2 (*Fol59*). Los resultados del bioensayo *in vitro* mostraron que un incremento en las concentraciones de KPhi resultan en una mayor inhibición del crecimiento micelial de *Fol59*. Los fosfitos de potasio (KPhi1 y KPhi2), presentaron una acción directa sobre el crecimiento micelial del patógeno, logrando un porcentaje de inhibición (PICR) entre 73 y 99% (Tabla 2.4), a partir de la concentración de 1000 ppm (Figuras 2.2 y 2.3). En la concentración más alta 20000 ppm se alcanzó un PICR del 99% con KPhi1 y 96.2% con KPhi2.

Tabla 2.4. Porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) de KPhi a diferentes concentraciones sobre *Fol59* en medio PDA 7 días después de incubación.

Concentraciones (ppm)*	PICR**	
	KPhi1 ^a	KPhi2 ^b
100	15.8±5,4129 a	7.6±4,9820 b
500	24.5±5,5758 ab	6.6±3,1816 b
1000	77.9±6,929 ab	73.4±6,2492 ab
2000	95.4±1,7272 a	74.5±5,4388 ab
5000	96.2±1,4259 a	81,0±4,4495 ab
10000	97.4±0,4919 a	90.4±2,3917 a
20000	99.0±0,2385 a	96.2±1,0711 a

^aKPhi1: Fosfito de potasio 1; ^bKPhi2: Fosfito de potasio 2. *Concentraciones de fosfito de potasio usadas en la evaluación *in vitro*. ** Los resultados mostrados corresponden al promedio de datos ± desviación estándar (DE) de tres réplicas biológicas y 5 réplicas técnicas expresada en PICR. Las letras en las columnas representan diferencias significativas entre concentraciones para cada KPhi.

A.



B.

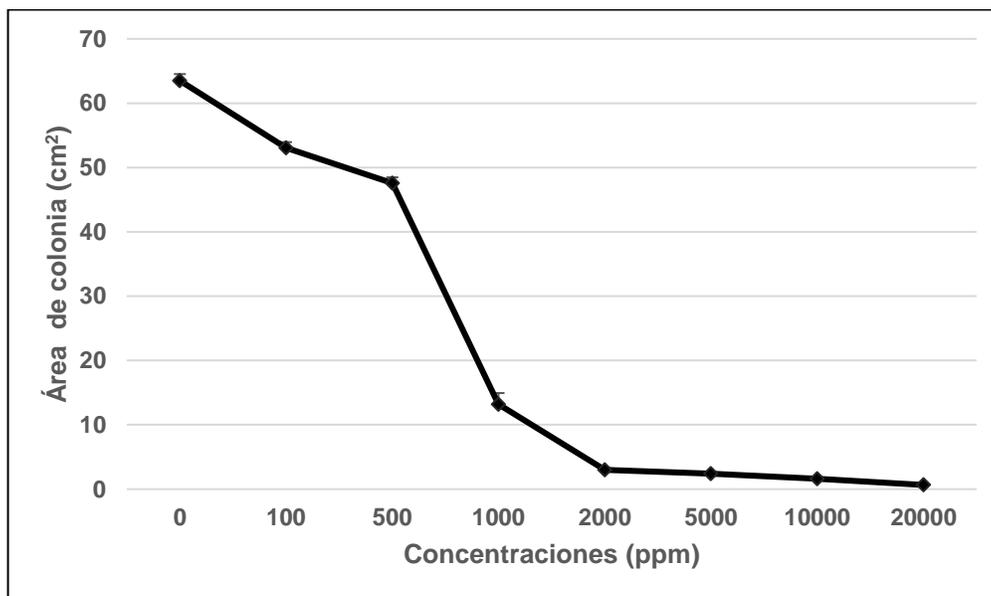
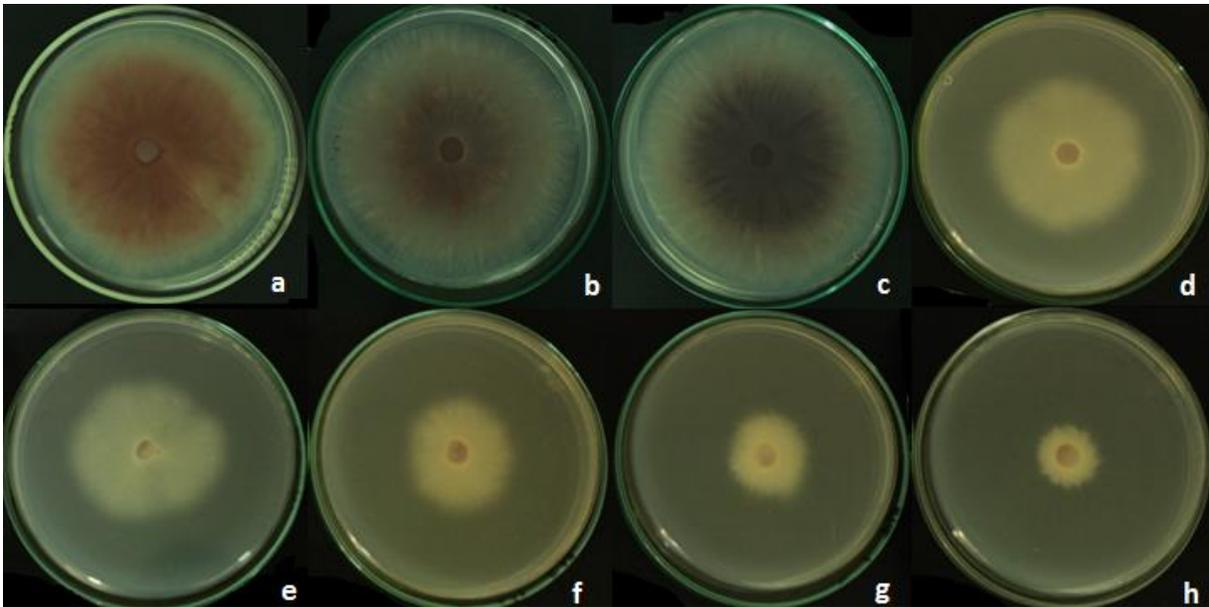


Figura 2.2. Crecimiento micelial *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol59) en respuesta a diferentes concentraciones de KPhi1. A. Crecimiento micelial de KPhi1 en PDA suplementado con las diferentes concentraciones de 0 ppm (a); 100 ppm (b); 500 ppm (c); 1000 ppm (d); 2000 ppm (e); 5000 ppm (f); 10000

ppm (g); 20000 ppm (h) a los 7 días de incubación y B. Área de crecimiento de las colonias de *Fo159* crecidas en diferentes concentraciones de 0 a 20000 ppm de KPh1, 7 días después de incubación. Promedio de tres réplicas biológicas.

A.



B.

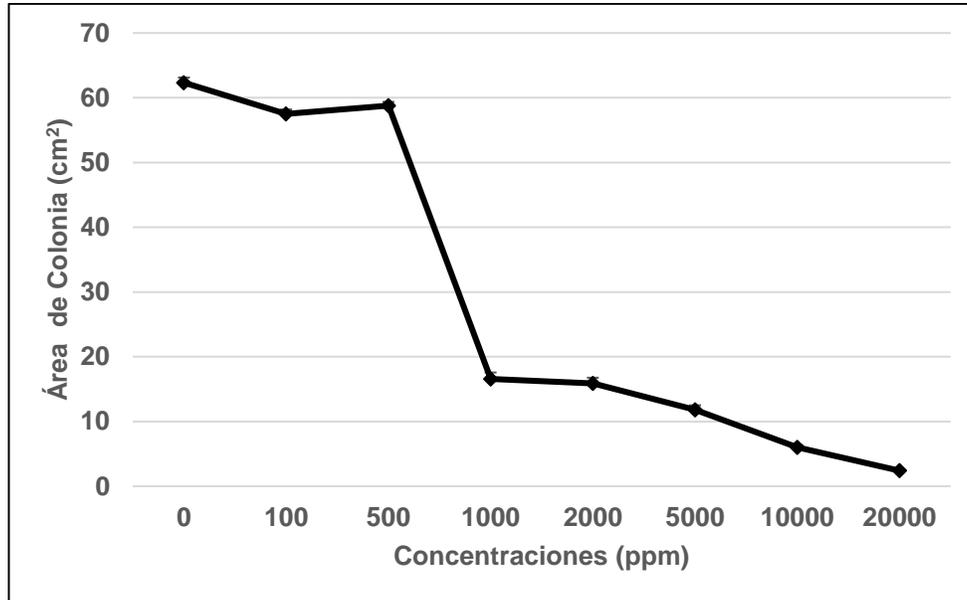


Figura 2.3. Crecimiento micelial *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fo159*) en respuesta a diferentes concentraciones de KPh2. A. Crecimiento micelial de KPh2 en PDA suplementado con las diferentes concentraciones de 0 ppm (a); 100 ppm (b); 500 ppm (c); 1000 ppm (d); 2000 ppm (e); 5000 ppm (f); 10000 ppm (g); 20000 ppm (h) a los 7 días de incubación y B. Área de crecimiento de las colonias de *Fo159* crecidas en diferentes concentraciones de 0 a 20000 ppm de KPh2, 7 días después de incubación. Promedio de tres réplicas biológicas.

Los resultados obtenidos durante los bioensayos son consistentes con los reportados por otros autores, donde indican que los Phi presentan un mecanismo directo, que consiste en inhibir el crecimiento micelial y generar cambios en la composición del micelio (Oliveira *et al.*, 2012; Lobato *et al.*, 2010). Araújo *et al.*, (2010) reportaron un 94% de inhibición en el crecimiento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* a nivel *in vitro* en presencia de Kphi a una concentración de 1500 ppm. Hofgaard *et al.*, (2010) demostraron que el KPhi restringe el crecimiento en un 60 y 80% para *F. culmorum* y *F. graminearum*, respectivamente, usando una concentración de 10 ppm.

Así mismo, Cerqueira *et al.*, (2017), reportaron que el KPhi fue eficaz al inhibir el crecimiento micelial *in vitro* de *F. circinatum* hasta en un 53%, y que esta inhibición es dependiente de la dosis usadas de Kphi. Por otra parte, Gomes *et al.*, (2016) indican que el KPhi tuvo un efecto directo sobre el crecimiento de *F. solani in vitro*, inhibiendo en un 50% el crecimiento del patógeno a una concentración de 213 ppm.

Fosfitos de calcio (Caphi)

Al evaluar el CaPhi, los resultados del bioensayo *in vitro* mostraron que al incrementar la concentración de CaPhi (Figura 2.4), el crecimiento micelial de *FoI59* disminuyó, significativamente. El CaPhi presentó una acción directa sobre el crecimiento micelial del patógeno, siendo inhibido hasta en un 70 % a una concentración de 50 ppm y alcanzando un 99% de inhibición de *FoI59* en la concentración más alta 2000 ppm (Tabla 2.5).

Tabla 2.5. Porcentaje de inhibición de CaPhi sobre *FoI59* en medio PDA incubados a 25°C por 7 días.

Concentraciones (ppm)*	PICR**
10	45.5±3,6580 ab
50	70.6±3,4772 b
100	80.6±4,3132 a
250	92.3±2,1004 a
500	94.5±2,1819 a
750	95.1±2,3756 a
1000	96.9±2,2229 a
2000	99.4±0,2298 a

*Concentraciones de CaPhi usadas en la evaluación *in vitro*. **Promedio de datos± DE de tres réplicas biológicas y 5 réplicas técnicas expresada en PICR. Las letras en las columnas representan diferencias significativas entre concentraciones de CaPhi.

De acuerdo con Lobato *et al.*, 2010, el efecto del KPhi no se debe atribuir a una sola razón, y probablemente resultaría de una serie de combinaciones entre factores como la concentración del anión fosfito, la naturaleza del catión, la acidificación del medio y la capacidad del patógeno de producir la enfermedad. Por otra parte Araújo *et al.*,(2010) atribuye un efecto directo de los fosfitos sobre la germinación de conidios y crecimiento micelial de hongos, el cual se ha verificado en otros patosistema.

De acuerdo con los resultados anteriores se hace necesario realizar ensayos *in vivo* para evaluar el impacto de las sustancias, aplicándolas en suelo y en plantas, así confirmar que el control logrado en este bioensayo *in vitro* también es alcanzable en planta. Para esto, se realizaron ensayos en semilla y planta, tratando plantas de tomate de 30 días después de siembra con fosfitos o silicios 24h antes de la inoculación con *FoI59*.

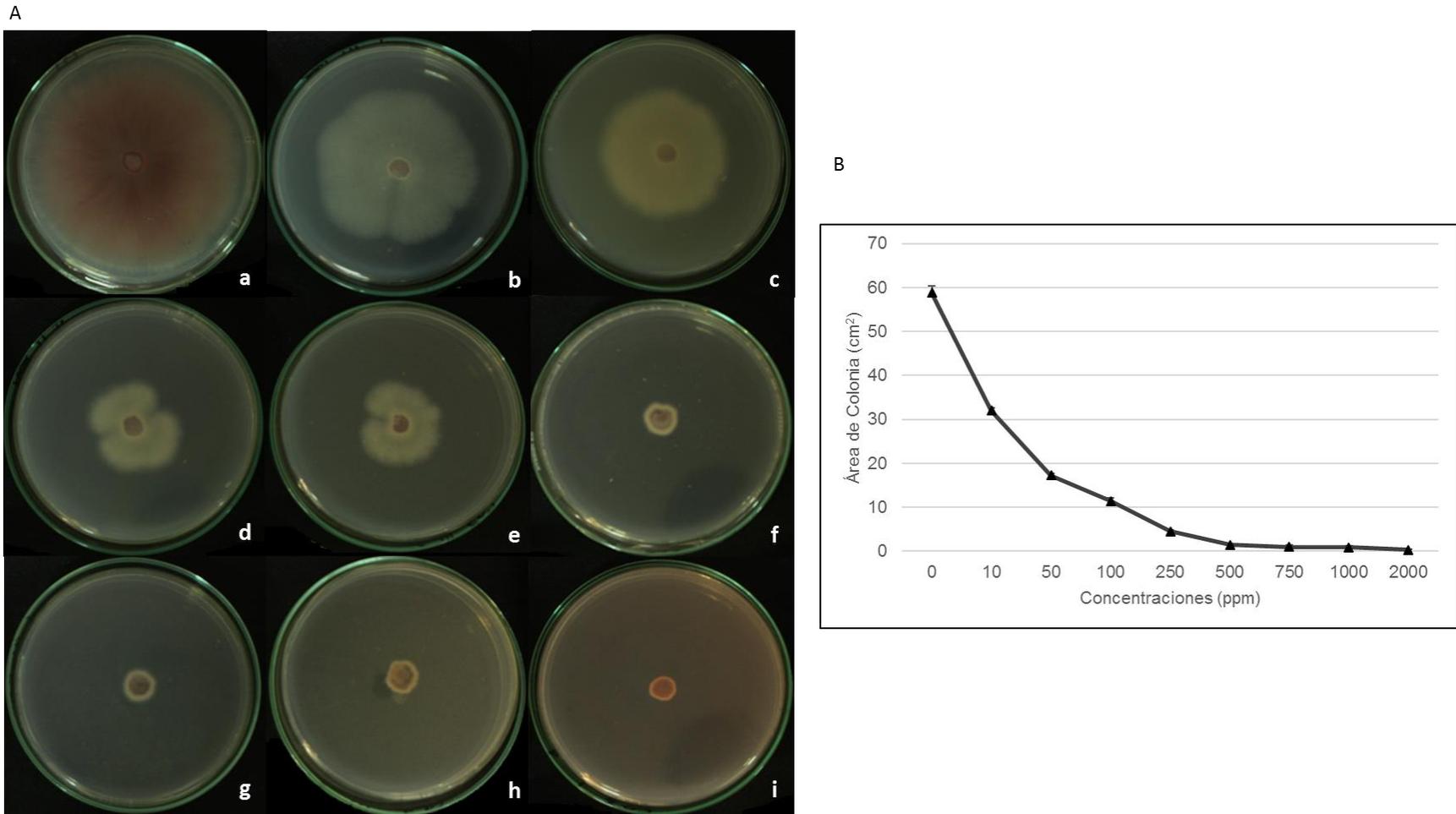


Figura 2.4. Crecimiento micelial *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol59*) en respuesta a diferentes concentraciones de CaPhi. A. Crecimiento micelial de CaPhi en PDA suplementado con las diferentes concentraciones de 0 ppm (a); 10 ppm (b); 50 ppm (c); 100 ppm (d); 250 ppm (e); 500 ppm (f); a 750 ppm (g); 1000 ppm (h) y 2000 ppm (i) a los 7 días de incubación y B. Área de crecimiento de las colonias de *Fol59* crecidas en diferentes concentraciones de 0 a 2000 ppm de CaPhi, 7 días después de incubación. Promedio de tres réplicas biológicas.

El silicio (Si)

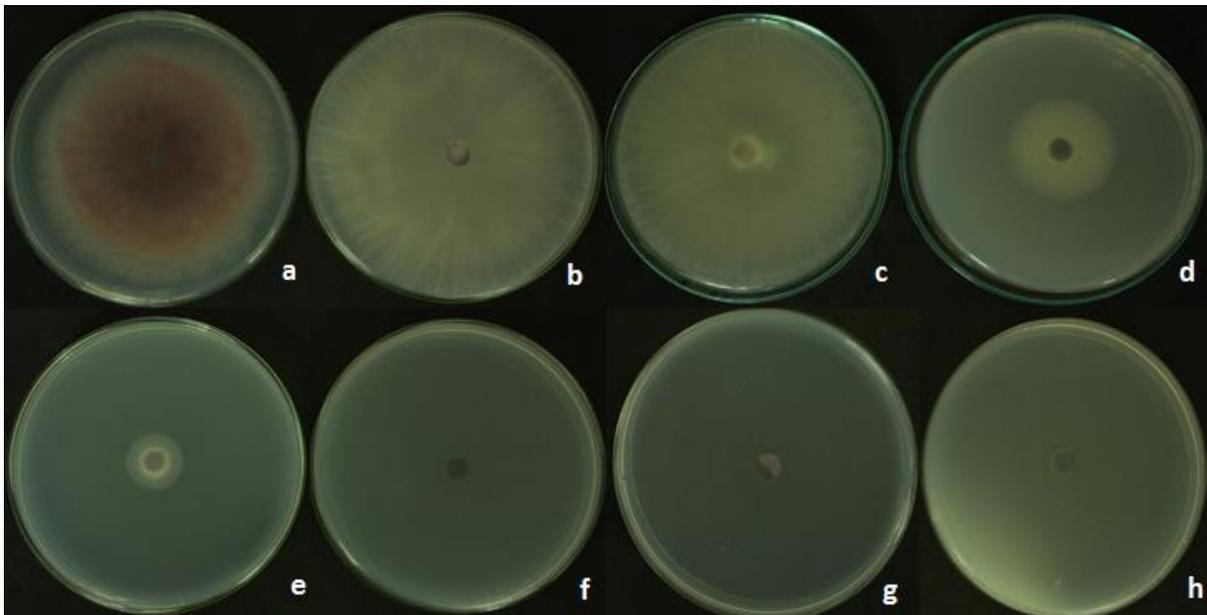
Con respecto al tratamiento con (Si) se encontró a nivel *in vitro* que en concentraciones de 10000 y 20000 ppm se inhibió en un 100% el crecimiento micelial del patógeno, como se muestra en la Figura 2.5. Algunas concentraciones bajas de (Si) promovieron el crecimiento de *Fol59* (Tabla 2.6), se presentan como valores negativos del porcentaje de inhibición (-37.3 y -35.6%), donde los tratamientos crecieron aún más que el mismo control sin (Si).

Tabla 2.6. Porcentaje de inhibición del (Si) sobre *Fol59* en medio PDA incubados a 25°C por 7 días.

Concentraciones (ppm)*	PICR**
1000	-37.3±10,314 b
2000	-35.6±7,5391 b
5000	77.1±16,336 ab
6500	97.7±2,0838 a
8500	99.7±0,0684 a
10000	100±0,0 a
20000	100±0,0 a

*Concentraciones de (Si) usadas en la evaluación *in vitro*. ** Los resultados mostrados corresponden al promedio de datos± DE de tres réplicas biológicas y 5 réplicas técnicas expresada en PICR. Las letras en las columnas representan diferencias significativas entre concentraciones para (Si).

A.



B.

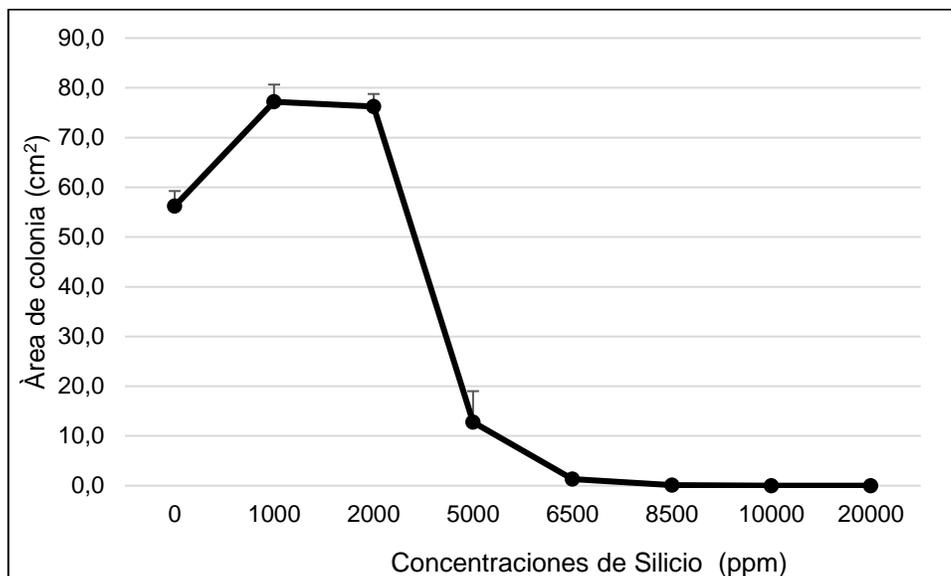


Figura 2.5. Crecimiento micelial *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fo159*) en respuesta a diferentes concentraciones de (Si). A. Crecimiento micelial de CaPhi en PDA suplementado con las diferentes concentraciones de 0 ppm (a); 1000 ppm (b); 2000 ppm (c); 5000 ppm (d); 6500 ppm (e); 8500 ppm (f); 10000 ppm (g) y 20000 ppm (h) a los 7 días de incubación y B. Área de crecimiento de las colonias de *Fo159* crecidas en diferentes concentraciones de 0 a 20000 ppm de (Si), 7 días después de incubación. Promedio de tres réplicas biológicas.

Estudios previos han mostrado el efecto directo de inhibición de crecimiento que tiene el (Si) sobre fitopatógenos. Bekker *et al.*, (2009) reportaron inhibición del crecimiento para *F. oxysporum* en 96.2% usando una concentración de 20000 ppm de (Si) y del 100% con concentraciones de 40000 y 80000 ppm. En el mismo estudio, reportaron para *F. solani* una inhibición del crecimiento del 72% con al usar una concentración de 20000 ppm de (Si) y una inhibición del 100% en concentraciones entre 40000 y 80000 ppm. Los resultados obtenidos en este proyecto, son consistentes con los reportados previamente, encontrando que el (Si) inhibió el 100% del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fo159*) usando concentraciones de (Si) entre 10000 y 20000 ppm. Las bajas concentraciones de (Si), 1000 y 2000 ppm, dieron como resultado una estimulación en el crecimiento de *Fo159* (-37.3 y -35.6%, respectivamente). Lo anterior coincide con lo reportado por Bekker *et al.*, (2009), quienes obtuvieron un porcentaje de inhibición con valores negativos para *F.oxysporum* (-8.2%) y para *F. solani* entre -8.61% y -11.27% en concentraciones de 5000 y 10000 ppm de silicato de potasio, respectivamente. El silicio mostró que en bajas concentraciones estimula el crecimiento y desarrollo de *Fo1*. Sin embargo, la razón precisa de este resultado aún está por determinarse. Este comportamiento podría estar relacionado con el fenómeno de hormesis, el cual como concepto toxicológico, se caracteriza por la estimulación del crecimiento en dosis bajas y la

inhibición en dosis altas (Garzón & Flores, 2013). Además la evaluación de silicato de sodio y potasio en especies de *Fusarium* spp. que afectan semillas de algodón fueron evaluados a nivel *in vitro*, logrando un efecto controlador del patógeno, actuando sobre el desarrollo de hifas (Yassin *et al.*, 2016).

Sin embargo, estudios más detallados serán realizados en el grupo de investigación para probar esta y otras hipótesis relacionadas con el comportamiento del (Si) a bajas concentraciones.

Concentración efectiva al 50%

La concentración de cada sustancia bioactiva en la cual son capaces de inhibir el 50% del crecimiento micelial del patógeno (CE_{50}), se presenta en la Tabla 2.7. Se obtuvo para el KPh1 en 732 ppm y para el KPhi2 en 866 ppm y en el CaPhi fue de 13.9 ppm. Estos resultados coinciden con los reportados por otros autores para *Fusarium* sp. Lobato *et al.*, (2010) evidenciaron valores mayores para *F. solani* siendo de 3560 ppm, usando un KPhi y de 1280 ppm para CaPhi. Con respecto al tratamiento con (Si), se obtuvo un CE_{50} de 4581 ppm. La concentración media obtenida en las diferentes sustancias fue inferior a la dosis recomendada en planta, lo que indica que las sustancias bioactivas tienen un efecto directo sobre el crecimiento del patógeno.

Tabla 2.7. Concentración efectiva al 50% (CE_{50}) del crecimiento micelial del aislamiento *Fol59* frente a las sustancias bioactivas.

Sustancias Bioactivas	CE_{50} *
Fosfito de potasio 1 (Kphi-1)	731.64 ± 20.665
Fosfito de potasio 2 (Kphi-2)	866.43± 35.764
Fosfito de calcio (Caphi)	13.99 ± 0.82865
Silicio (Si)	4581.5 ± 301.43

Representación del promedio de datos ± EE de tres réplicas biológicas para cada tratamiento determinando la concentración efectiva al 50% (CE_{50}).

Efecto de las sustancias bioactivas en la germinación de conidios

Los resultados demostraron que algunas sustancias reducen la germinación de microconidios con respecto al control patógeno (*Fol59*). De acuerdo con el análisis estadístico, se evidenciaron diferencias significativas entre los tratamientos. (CaPhi-C1) y (CaPhi-C2) redujo la germinación de conidios entre un 46-48%, en el caso del Silicio, después del tratamiento con (Si-C1) se evidenció que reduce un 59% la germinación de microconidios y (Si-C2) un 58%, en comparación con el control patógeno *Fol59* (Tabla 2.8). Estos resultados coinciden con los obtenidos a nivel *in vitro* en otras investigaciones que muestran el efecto directo que ejercen los Phi sobre la germinación de conidios de los patógenos y corrobora lo evidenciado en área de crecimiento bajo diferentes concentraciones. Caixeta *et al.*,(2012) reportan un efecto directo sobre la esporulación de *F. oxysporum f. sp. phaseoli*.

De acuerdo con los resultados anteriores y las investigaciones previas donde revelan que los fosfitos son efectivos en el manejo de enfermedades de forma directa e indirecta. En el primer caso, actuando sobre el crecimiento, desarrollo micelial y la esporulación de patógenos, la cual fue evidenciada a nivel *in vitro* durante el estudio

Tabla 2.8. Efecto de la germinación de conidios de *F. oxysporum f. sp. lycopersici (Fol59)*

Tratamiento*	Número de Conidios Germinados/5mL	Germinación de conidios (%) **	Reducción de la Germinación de conidios (%)
Control	9,4X10 ⁵ ^a	92 ^a	0
Kphi1-C1	2,9X10 ⁵ ^{cd}	79 ^{ab}	13
Kphi1-C2	3,8X10 ⁵ ^{bc}	85 ^{ab}	7
Kphi2-C1	2,1X10 ⁵ ^{cde}	80 ^{ab}	12
Kphi2-C2	5,5X10 ⁵ ^b	86 ^{ab}	6
Caphi-C1	1X10 ⁴ ^f	47 ^{bc}	46
Caphi-C2	1,1X10 ⁵ ^{ef}	44 ^{bc}	48
Si-C1	7,2X10 ⁴ ^{ef}	33 ^c	59
Si-C2	1,7X10 ⁵ ^{def}	34 ^c	58

Representación del promedio de datos \pm EE de tres réplicas biológicas para cada tratamiento evaluando la germinación de conidios de *Fol59* con diferentes concentraciones de sustancias bioactivas. *Las columnas representan cada uno de los tratamientos evaluados. Control=*Fol59*; KPhi1-C1=fosfito de potasio 1, C1 mitad dosis; KPhi1-C2=fosfito de potasio 1, C2 dosis recomendada; KPhi2-C1=fosfito de potasio 2, C1 mitad dosis; KPhi2-C2=fosfito de potasio 2, C2 dosis recomendada; CaPhi-C1=fosfito de calcio, mitad dosis; KPhi1-C2=fosfito de calcio C2 dosis recomendada; Si-C1= Silicio, C1 mitad dosis; Si-C2= Silicio, C2 dosis recomendada. **Letras diferentes en cada tratamiento indican diferencias significativas según la comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$).

1.5.2 Evaluación de fosfitos y silicio in planta

Análisis de germinación de semillas usando sustancias bioactivas

Durante los ensayos de germinación se encontró que las aplicaciones basadas en fosfitos y silicio estimularon la germinación de las semillas de tomate variedad “santa cruz kada”, como se muestra en la Figura 2.6. De acuerdo con el análisis de varianza y la comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$), se encontraron diferencias significativas entre algunos de los tratamientos evaluados. El porcentaje de germinación de semillas fue evaluado a los 10 días después del tratamiento con sustancias bioactivas a concentraciones correspondientes a: concentración recomendada a nivel comercial (C2), dos veces la concentración recomendada (C3) y la mitad de la concentración recomendada (C1) (Tabla 2.2).

Los dos KPhi evaluados (diferentes casas comerciales) no mostraron diferencias significativas en el porcentaje de germinación entre concentraciones y tipo de producto, logrando un 92% de germinación, muy similar al control absoluto con 89% de germinación. Sin embargo, el CaPhi a concentraciones C2 y C3, y el (Si) a concentración C3, mostraron diferencias significativas en relación al control absoluto (Figura 2.6). Al comparar con los fosfitos de potasio (KPhi), las concentraciones de CaPhi C2 y C3, evidenciaron un menor porcentaje de germinación, entre 64 y 73%, respectivamente. Asimismo, el (Si) mostró diferencias significativas entre concentraciones, siendo la concentración C3 la más baja con un porcentaje de germinación del 77% (Figura 2.6).

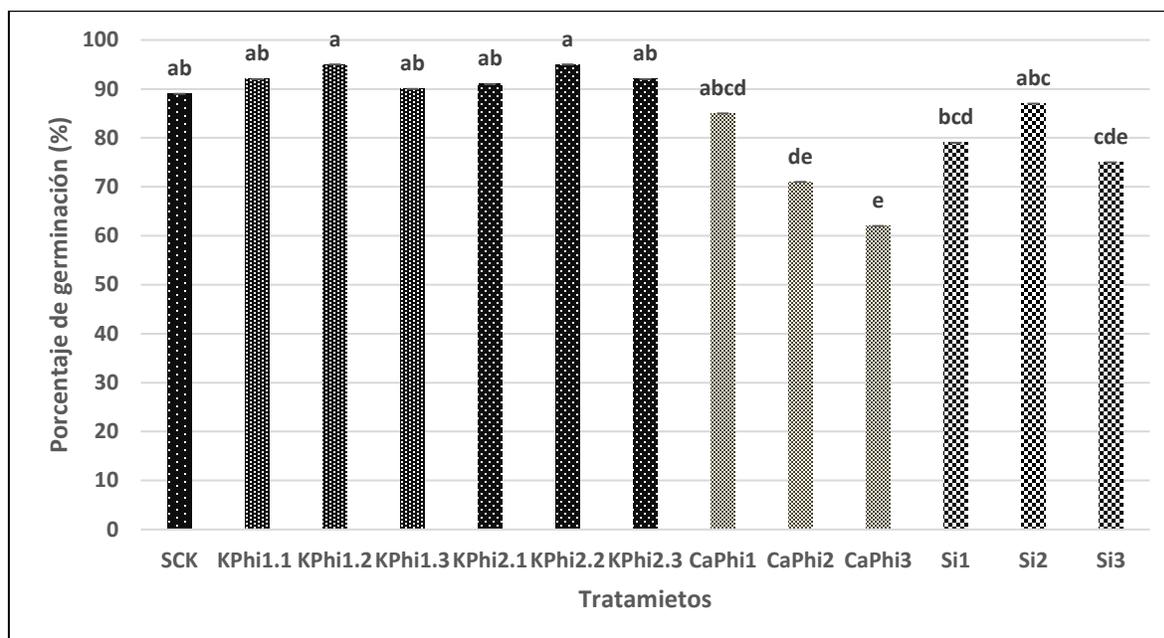


Figura 2.6. Germinación de semillas de tomate variedad susceptible mediante la aplicación de tres dosis de sustancias bioactivas. Las barras de error representan \pm DE. Letras diferentes indican diferencia significativa de acuerdo con la comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$), de dos réplicas biológicas para cada tratamiento evaluando la germinación de semillas de tomate tratadas y no tratadas con sustancias bioactivas.

Por otra parte, las plantas de tomate tratadas con CaPhi desde la concentración C2 (concentración recomendada), mostraron una disminución en el tamaño, así como hojas cloróticas, esto último debido posiblemente a una toxicidad atribuida al aumento de la concentración de CaPhi (Figura 2.7). Esto podría estar relacionado, cuando la planta se encuentra limitada por el fósforo (P) y son altamente sensibles a los Phi, mostrando síntomas de toxicidad como clorosis en las hojas y crecimiento atrofiado (Thao & Yamakawa, 2009; Ratjen & Gerendás, 2009). Otro de los efectos perjudiciales de los Phi, están relacionados con la detección del crecimiento radicular, coloración amarilla en la lámina de las hojas jóvenes y una acumulación irregular de antocianinas en hojas más viejas (Trejo-téllez & Gómez-merino, 2018). Por el contrario, plantas tratadas con KPhi y (Si) (Figura 2.8) mostraron un buen desarrollo. Los resultados obtenidos para KPhi y (Si), coinciden con lo reportado por Lobato *et al.*, (2008), los autores evidenciaron que no se presentaron diferencias en el vigor de las plantas de papa tratadas con Phi respecto al control absoluto. Sin embargo, observaron una mayor altura en las plantas tratadas con KPhi, en comparación con CaPhi. Tambascio *et al.*, (2014) reportan que la aplicación de KPhi reduce el periodo entre siembra y la emergencia en tubérculos de papa, lo que significa una ventaja a nivel fisiológico.

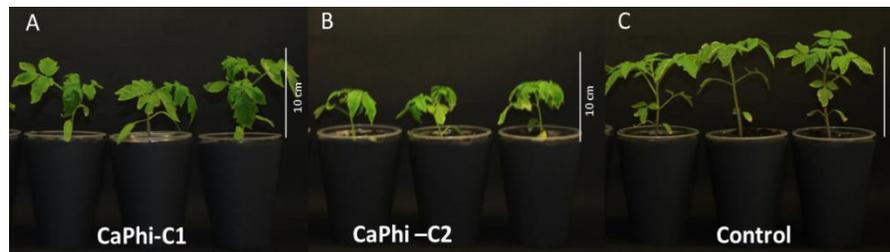


Figura 2.7. Efecto del CaPhi en plantas de tomate a los 25 días después de su aplicación. A. Plantas tratadas con Fosfito de calcio a la mitad de la concentración recomendada (CaPhi-C1) 1000 ppm; B. Plantas tratadas con Fosfito de calcio a la concentración recomendada (CaPhi-C2) 2000 ppm; C. Plantas control absoluto (Sin aplicación de CaPhi).

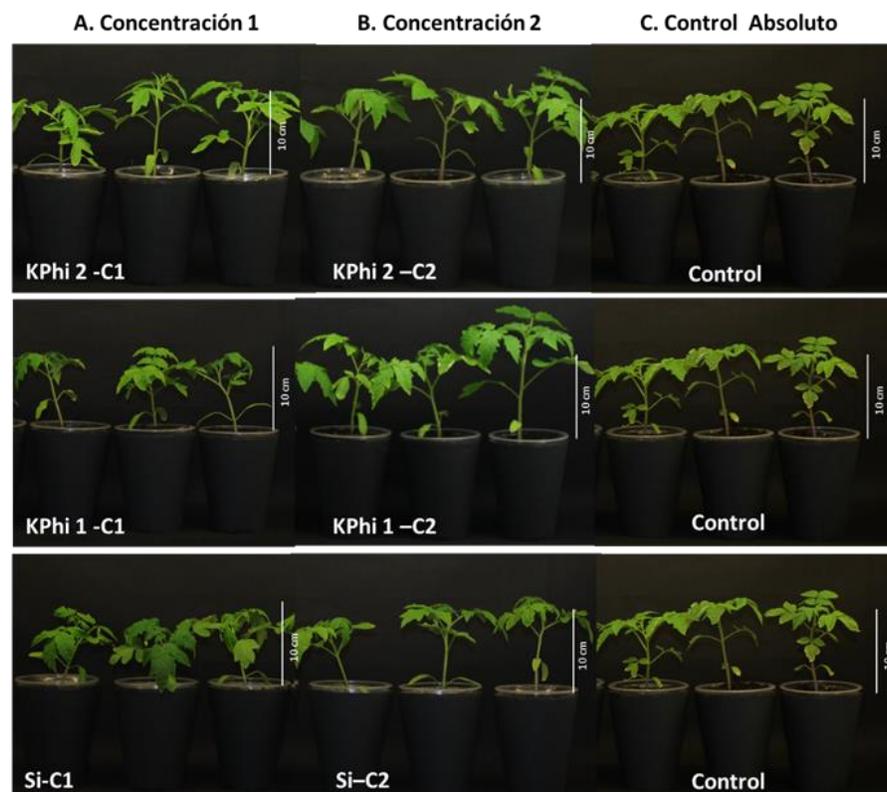


Figura 2.8. Efecto de KPhi y (Si) en plantas de tomate 25 días después de trasplante. A. Concentración aplicada la mitad de la recomendada (C1); B. Concentración aplicada la mitad de la recomendada (C2); C. Control absoluto (Sin aplicación de sustancias bioactivas).

Abbasi & Lazarovits (2006), reportaron que el fosfanato (derivado del ácido fosforoso) no genera fitotoxicidad en plantas de tomate y ejercen un efecto positivo en la germinación y crecimiento, aunque no presentaron diferencias en comparación con el control absoluto. Sin embargo, Deliopoulos *et al.*, (2010) afirman que los fosfitos podrían tener un efecto de fitotoxicidad al aplicar dosis superiores de 5 g/L a 36 kg/ha. Carmona *et al.*, (2017) evaluaron el porcentaje de emergencia en semillas de soja, usando un sustrato inoculado y no inoculado con *Pythium* bajo dos concentraciones de KPhi y MnPhi (Fosfito de manganeso). El uso de

ambas sustancias bioactivas fue capaz de mejorar el porcentaje de emergencia en semillas inoculadas con el patógeno.

Análisis de concentraciones de sustancias bioactivas evaluadas en planta infectadas con *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 2

Para los análisis *in planta*, se seleccionaron dos concentraciones de cada sustancia bioactiva: concentración estándar recomendada a nivel comercial (C2) y la mitad de la concentración recomendada (C1) (Tabla 2.9). Se evaluaron 9 tratamientos, 2 concentraciones por sustancia y el control patógeno *Fo159*.

Tabla 2.9. Concentraciones de sustancias bioactivas evaluadas en semillas y planta

Tratamientos*	Concentraciones (ppm)**	
	C1	C2
KPhi1	1000	2000
KPhi2	5000	10000
CaPhi	1000	2000
Si	2500	5000

*KPhi1: fosfito de potasio 1; KPhi2: fosfito de potasio 2; CaPhi: fosfito de calcio; Si: silicio. **Las concentraciones corresponden a C1: Dosis mitad recomendada y C2: Dosis recomendada en ppm.

De acuerdo con el análisis de varianza (Anexo 6) de los resultados obtenidos, los tratamientos Kphi1-C1, Kphi1-C2 y Kphi2-C1, mostraron un efecto significativo de reducción en el progreso de severidad de la enfermedad (expresada como área bajo la curva de progreso de la enfermedad-ABPCE), causada por *Fo159* en plantas de tomate de la variedad susceptible Santa Cruz Kada (Figura 2.9).

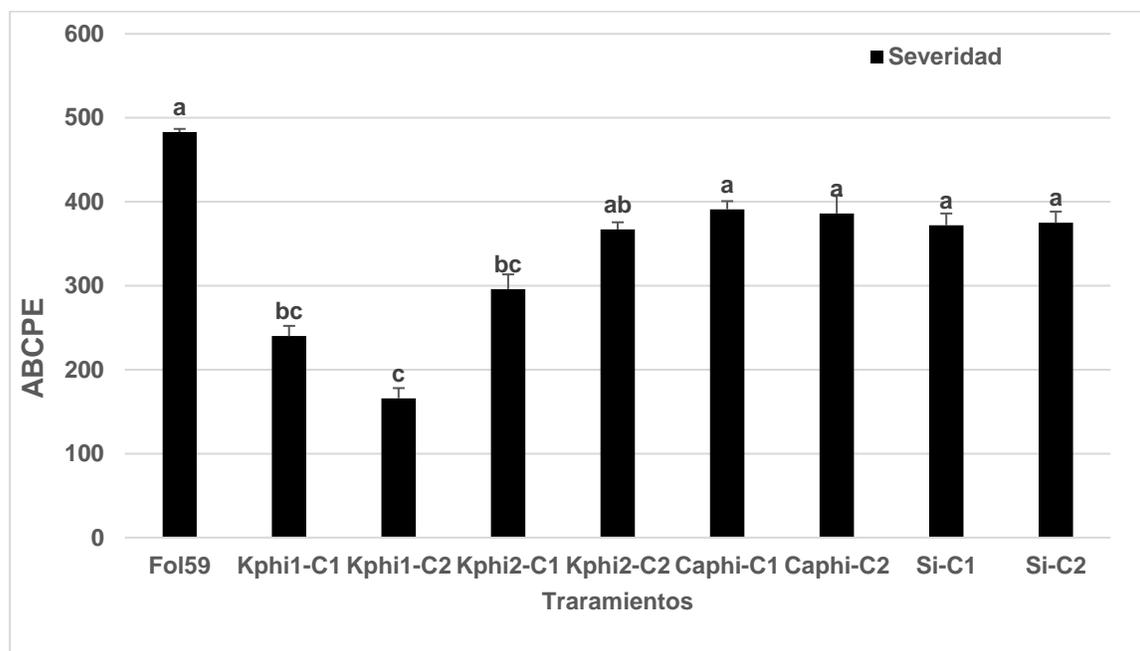


Figura 2.9. Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) expresada como incidencia y severidad, causada por el aislamiento *Fol59* inoculado en plantas de tomate. El tratamiento con las respectivas sustancias bioactivas se hizo en dos momentos, en semilla y 24 horas antes de la inoculación con el patógeno. La inoculación con *Fol59* se hizo en plantas de 30 días de edad. Las barras de error representan \pm EE. Letras diferentes indican diferencia significativa de acuerdo con la comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$). Se representa las réplicas, donde se evalúa el efecto de dos concentraciones de KPhi, CaPhi y (Si).

Como se muestra en la Figura 2.9, no se presentan diferencias significativas con el control absoluto para los tratamientos Kphi2-C1, CaPhi y (Si). Las plantas mostraron síntomas a los 6 ddi y la muerte se registró a los 12 y 14 ddi (Anexo 6), para plantas control inoculadas únicamente con *Fol59* se alcanzó el máximo grado de severidad. El registro fotográfico del ensayo se realizó a los 11 días y se evidenció el efecto de los diferentes tratamientos usando KPhi (Figura 2.10), CaPhi (Figura 2.11) y (Si) Figura 2.12 en comparación con el control patógeno (*Fol59*) y las plantas control (sin inocular).

Las plantas control tratadas con los diferentes tratamientos, tuvieron un buen desarrollo y sanidad. Es importante notar que los KPhi y (Si) no mostraron signos de toxicidad en ninguna de las concentraciones usadas. Sin embargo, el tratamiento control de CaPhi mostró clorosis en hojas bajas, entorchamiento y disminución en el tamaño de la planta (Figura 2.11). Uno de los tratamientos más destacados fue el KPhi1-C2, demostrando eficacia tanto *in vitro* como *in planta* en las dos dosis evaluadas, dosis recomendada (C2) y la mitad de esta (C1), con un porcentaje de inhibición de crecimiento del micelio de 95.4 y 77.8 %, respectivamente, a nivel

in vitro. Y además, una reducción del nivel de severidad medido *in planta* del 42 y 20%, respectivamente. Los resultados mencionados anteriormente fueron consistentes durante las tres replicas biológicas (Anexo 7). El (Si) evaluado *in planta* tuvo un efecto menor en la reducción de la enfermedad con un 20 y 22% de eficacia sobre la severidad causada por *FoI59* en las dos concentraciones evaluadas (C1 y C2), respectivamente. Así mismo, a nivel *in vitro* para la concentración recomendada mostró un PICR del 77%.

Tabla 2.10. Porcentaje de Eficacia de las sustancias bioactivas sobre la severidad e incidencia a los 14 ddi con *FoI59*

Tratamiento	Eficacia Severidad (%)	Eficacia Incidencia (%)
KPhi1-C1	20	3
KPhi1-C2	42	8
KPhi2-C1	20	3
KPhi2-C2	17	3
CaPhi-C1	10	2
CaPhi-C2	13	0
Si-C1	20	2
Si-C2	22	2

La severidad en plantas únicamente inoculadas con *FoI59* fue incrementando a través del tiempo, presentando un porcentaje de severidad del 96% y una incidencia del 100% a los 14 ddi (Tabla 2.11). No obstante, en las plantas inoculadas con *FoI59* y tratadas con KPhi, la eficacia obtenida resultó en una disminución altamente significativa en la severidad del 42% para el tratamiento con KPhi1-C2, 20% para los tratamientos KPhi1-C1 y KPhi2-C1 con respecto al tratamiento con *FoI59* (Tabla 2.10). En los otros tratamientos no se observaron diferencias significativas respecto al control.

Tabla 2.11. Promedio del porcentaje de incidencia y severidad causada por *FoI59* en plantas de tomate 14 días después de inoculación (ddi).

Tratamiento	14 ddi	
	Incidencia (%)	Severidad (%)
SCK59	100±0	96±4,19
KPhi1-C1	97±3,85	77±11,98
KPhi1-C2	92±3,33	56±12,02
KPhi2-C1	97±3,85	77±12,02
KPhi2-C2	97±3,85	80±9,62

CaPhi-C1	98±3,33	86±10,09
CaPhi-C2	100±0	84±9,20
Si-C1	98±3,33	77±12,09
Si-C2	98±3,33	75±5,83



Figura 2.10. Expresión de síntomas de la marchitez vascular de tomate tratadas con KPhi, 11 ddi. A. *Fol59* (Control patógeno); B. Plantas control (Control Absoluto); C. Plantas tratadas con KPhi1-C1 e inoculadas con *Fol59*; D. Plantas tratadas con Kphi (Control KPhi1-C1). E. Plantas tratadas con Kphi1-C2 e inoculadas con *Fol59*; F. Plantas tratadas con KPhi (Control KPhi1-C2); G. Plantas tratadas con Control KPhi2-C1 e inoculadas con *Fol59*; H. Plantas tratadas con Kphi (Control KPhi2-C1). I. Plantas

tratadas con KPhi2-C2 e inoculadas con *Fol59*; J. Plantas tratadas con KPhi (Control KPhi2-C2). La figura representa una de las réplicas biológicas. Fotografías tomadas por Gómez M.R de AGROSAVIA.



Figura 2.11 Expresión de síntomas de la marchitez vascular de tomate tratadas con Fosfito de calcio (CaPhi), 11 ddi. A. *Fol59* (Control patógeno); B. Plantas control (Control Absoluto); C. Plantas tratadas con CaPh-C1 e inoculadas con *Fol59*; D. Plantas tratadas con CaPhi-C1 (Control CaPhi-C1). E. Plantas tratadas con CaPh-C2 e inoculadas con *Fol59*; D. Plantas tratadas con CaPhi-C2 (Control CaPhi-C2). La figura representa una de las réplicas biológicas. Fotografías tomadas por Gómez M.R de AGROSAVIA.



Figura 2.12 Expresión de síntomas de la marchitez vascular de tomate tratadas con Silicio (Si), 11 ddi. A. *Fol59* (Control patógeno); B. Plantas control (Control Absoluto); C. Plantas tratadas con (Si-C1) e inoculadas con *Fol59*; D. Plantas tratadas con (Si-C1)-Control (Si-C1). E. Plantas tratadas con (Si-C2) e inoculadas con *Fol59*; D. Plantas tratadas con (Si-C2)-Control (Si-C2). La figura representa una de las réplicas biológicas. Fotografías tomadas por Gómez M.R de AGROSAVIA.

En todos los casos la incidencia fue superior al 90%, muy similar al control no tratado con sustancias bioactivas (100%), durante las tres réplicas biológicas (Anexo 7). Sin embargo, todas las sustancias bioactivas tuvieron un efecto en la reducción de la severidad al compararse con plantas únicamente inoculadas con *Fol59*. De especial interés resultó el tratamiento con KPhi1-C2 en donde sólo se presentó un 54% de severidad comparado con el control patógeno 96% (Tabla 2.11). Lo anterior demuestra que las sustancias bioactivas tienen un efecto en la disminución de la severidad, y particularmente el tratamiento KPhi1-C2, es capaz de retrasar el progreso de la enfermedad, pero no son capaces de eliminar el patógeno del suelo, dando como resultado un porcentaje de incidencia similar entre tratamientos y plantas control. Se ha demostrado ampliamente que Phi puede actuar como un pesticida eficaz contra varias especies de organismos fitopatógenos, incluidos nematodos, hongos, oomicetes y bacterias (Deliopoulos *et al.*, 2010; Puerari *et al.*, 2015). Principalmente en

relación con sus efectos contra enfermedades de las plantas en lugar de la nutrición vegetal (Yáñez-Juárez *et al.*, 2018; Deliopoulos *et al.*, 2010) y su efecto es más eficiente al aplicarlo de forma preventiva. Su capacidad de inducir resistencia (Machinandiarena *et al.*, 2012).

El patógeno *FoI59* se volvió a aislar de plantas inoculadas artificialmente y se confirmó su presencia. En las plantas control no se recuperó ningún patógeno, lo que confirma los postulados de Koch. Se ha reportado previamente que el Phi es bastante estable y persiste en los tejidos de las plantas durante meses, según Ouimette & Coffey (1990) citado por (Gómez-Merino & Trejo-Téllez 2015), puesto que las plantas carecen de mecanismos bioquímicos para asimilar los Phi rápidamente (López-Arredondo & Herrera-Estrella, 2012). Este hecho acompañado de los resultados de nuestras investigaciones pueden usarse para afirmar que (i) los Phi, no proporcionan nutrición a la planta como fuente de fósforo (P) y por lo tanto, no podrían reemplazar el fosfato (Pi) (Thao & Yamakawa, 2009), y (ii) es necesario plantear experimentos que sean capaces de determinar el tiempo de persistencia del Phi en la planta y si su capacidad protectora frente a *FoI* se mantiene durante dicha persistencia.

Lo anterior está estrechamente relacionado con lo reportado por Rosyidah *et al.*, (2017) quienes demostraron que la planta de tomate absorbe gran cantidad de potasio, aproximadamente entre 1 y 5 % del peso seco, siendo uno de los elementos importantes en el metabolismo de la planta. Al igual que el fósforo, quien es considerado como el segundo elemento más importante en la planta después del nitrógeno (Trejo-téllez & Gómez-merino, 2018). El potasio ayuda a la formación de proteínas, carbohidratos, sirve como cofactor en la actividad enzimática y promueve eficiencia en el uso del agua, además estimula el desarrollo de la raíz (M. Wang *et al.*, 2013). Por lo tanto, el potasio podría aumentar la formación de compuestos de lignina, formando paredes más fuertes, capaces de proteger la planta del ingreso de patógenos.

En este trabajo, se usaron dos técnicas de aplicación, tratamiento sobre semilla y aplicación directa al sustrato en semillero 24 h antes de la infección con *FoI59*, los resultados mostraron que el KPhi tuvo un efecto en la reducción de la severidad de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* obteniendo una eficacia en uno de los tratamientos del 42%. El método de aplicación de las sustancias bioactivas depende de la combinación del cultivo-patógeno, siendo la más común la fumigación foliar, de acuerdo con las recomendaciones para Oomycetes (Burra *et al.*, 2014). Otras técnicas de aplicación de sales de Phi son directas en raíces, por inyección al tronco,

mezclados o hidropónico (Förster *et al.*, 1998), como tratamientos en semilla (Carmona *et al.*, 2017; Abbasi & Lazarovits, 2006). Algunos estudios indican que las plantas carecen de mecanismos bioquímicos para metabolizar el Phi, este puede estar dentro de los tejidos durante meses (Trejo-téllez & Gómez-merino,2018) mostrando efectos sistémicos. Si la cantidad aplicada de Phi y el estado Pi en la planta son adecuados, dicha sustancia bioactiva puede desencadenar efectos beneficiosos como bioestimulador o inductor de mecanismos de defensa en la planta. Sin embargo, si se aplican altas concentraciones de Phi y el estado de Pi en la planta es deficiente, Phi puede acumularse y causar efectos perjudiciales (Loera-Quezada,2014). Al ser asimilado por la planta el Phi, es acumulado en tejidos de reserva (hojas) (Jost *et al.*, 2015). Los resultados de este estudio determinan que la doble aplicación de KPhi1-C2 (en semilla y directa al sustrato en semillero) permitieron una reducción de la severidad ocasionada por *Fol* en un 42%. Será importante realizar estos mismos experimentos en condiciones de invernadero comercial para validar nuestros resultados.

El efecto protector de las sustancias bioactivas fue más evidente sobre la variable severidad que sobre la incidencia, esto posiblemente por la alta presión de inóculo usada y las condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad, además de la alta virulencia de la cepa *Fol59*. Gómez-Merino & Trejo-Téllez (2015) afirman que los Phi pueden controlar eficientemente especies específicas de Oomycetes, pero tienen poco efecto en la mayoría de los hongos del suelo. Sin embargo, otros estudios han demostrado que los Phi son traslocados vía floema desde las hojas hasta la raíz, razón por la cual poseen grandes ventajas (Yáñez-Juárez *et al.*, 2018), tanto por su efecto biocida como bioestimulante (Thao & Yamakawa, 2009). Adicionalmente, el tratamiento con Phi está relacionado con la activación de respuestas de defensa en la planta. Este fenómeno de pre-activación de la defensa se llama resistencia inducida y lleva a la planta a un estado de alarma o priming (Martinez-medina *et al.*, 2016).

Estas sustancias bioactivas no sustituyen a los fungicidas en ataques severos de hongos, pero representan una estrategia complementaria para reducir su uso, contribuyendo así a la protección del medio ambiente. Es importante notar el papel que tiene el Phi como potenciador de diferentes procesos metabólicos en las plantas, formando raíces y hojas, suministrado a través del suelo o por aplicación foliar mejora el rendimiento y la calidad en plantas (Lobato *et al.*, 2010; Lovatt & Mikkelsen 2006). Los fosfitos, en general son compuestos inocuos para el medio ambiente (Kim *et al.*,2016), los cuales resultan de la reacción del ácido fosforoso con iones metales (potasio, calcio, magnesio, manganeso, cobre, zinc, aluminio, entre otros). Este

hecho, acompañado de su capacidad para aumentar la protección de los cultivos frente a patógenos representan una alternativa potencial para el manejo integrado.

Otra de las alternativas promisorias para el manejo de las enfermedades en planta es el (Si), presente en forma de dióxido de silicio (SiO_2), asociado con algunos elementos como el aluminio, magnesio, calcio, sodio y potasio (Rodrigues & Datnoff 2015). Estudios recientes indican un efecto positivo al aplicar (Si) en cultivos de solanáceas. Huang *et al.*, (2011) determinaron una disminución en la pudrición de la raíz causada por *F. oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* (Forl) hasta en un 82.1% aplicando (Si) en solución nutritiva. Así mismo, Castro-Rosalez, (2017) informaron que la aplicación con (Si) permitió una disminución en la severidad del 13,2 % en síntomas causados por *Fol* en tomate, sugiriendo cambios en la micromorfología de raíz, tallo y hoja, ayudando a reforzar las estructuras de defensa en plantas. En este trabajo, el (Si) logró un retraso de la enfermedad con una eficacia del 22 y 20% en las dos dosis evaluadas Si-C2 y Si-C1 sobre la severidad. Sin embargo, los resultados no fueron estadísticamente significativos en relación con el control. Estos resultados abren una ventana para investigar más a fondo el efecto del (Si) sobre *Fol* en aplicaciones preventivas en plantas de tomate y su efecto protectante al ataque de patógenos. Por su parte, Heine *et al.*, (2007) reportaron que la capacidad del Si para inhibir la propagación de hongos en los ápices de la raíz depende en gran medida de la absorción de Si en los simplastos de la raíz. Además, la acumulación de Si en las paredes celulares de la raíz no representan una barrera física para la propagación de *Pythium aphanidermatum* en tomate o calabaza.

Nuevos fertilizantes de fósforo basados en Phi son comercializados en diferentes formulaciones, estos productos están disponibles en los mercados a nivel mundial. Actualmente en Colombia se encuentran una gran variedad de productos que contienen en sus formulaciones fosfitos y silicios, y son recomendados como fertilizantes y algunos pocos como fungicidas, que son distribuidos por casas comerciales colombianas y registrados en ICA (Instituto Colombiano Agropecuario), como se indica en la Tabla 2.12.

Todos estos productos están formulados como sales alcalinas de ácido fosforoso (H_3PO_3) y han sido registrados en su mayoría como fertilizantes y otros pocos como fungicidas o estimuladores de proceso biológicos en plantas (Lovatt & Mikkelsen, 2006). Sin embargo, la representación y el uso de los Phi para el manejo de enfermedades sigue siendo objeto de controversia. Lo que genera una confusión para los distribuidores y productores.

Tabla 2.12. Productos comerciales de Fosfitos y silicios disponibles en el mundo.

Producto	Tipo de Sustancia	Empresa Productora	Uso	Tipo de producto	Formulación	País de origen
Musacare	Phi	Ceradis Colombia LTDA	Foliar	Fungicida	Polvo soluble	Colombia
Phostrol® SL	Phi	Nufarm Colombia S. A	Foliar	Fungicida	Solución líquida	Estados Unidos
Ceraquint® SP	Phi	Ceradis Colombia LTDA	Foliar	Fungicida	Polvo soluble	Colombia
Biafos (Fosfito de potasio)	Phi	Bioagro Valencia	Foliar	Fertilizante	Solución líquida	España
Agrofeed*Fosfeed (Fosfito de potasio)	Phi	Brenntag Colombia S. A	Suelo	Fertilizante	Concentración Soluble	Colombia
Agrofeed*Fosfeed (Fosfito de potasio)	Phi	Brenntag Colombia S. A	Suelo	Fertilizante	Concentración Soluble	Colombia
Kamon (Fosfito de Potasio) 0-30-18	Phi	Disan Colombia S. A	Suelo	Fertilizante	Concentración Soluble	España
Haifa protek 0-53-39	Phi	Haifa Colombia S.A.S	Suelo fertirriego	Fertilizante	Cristales solubles	Israel
Fosfito Monopotásico	Phi	Flores Del Rio S. A	Suelo	Fertilizante	Polvo soluble	China
Fosfito Monopotásico	Phi	Flores Del Rio S. A	Fertirriego	Fertilizante	Polvo soluble	China
Phytogard® Fosfito	Phi	Talex® S.A.S	Suelo fertirriego	Fertilizante	Concentración Soluble	Italia
B-Fosfito	Phi	Polymers Crop S. A	Suelo	Fertilizante	Concentración Soluble	Colombia
Foskal (Fosfito de potasio)	Phi	SanoAgro Agroinsumos S.A.S	Suelo	Fertilizante	Concentración Soluble	

Fertinvesa Fosfite de potasio	Phi	Invesa S. A	Foliar	Fertilizante	Concentración Soluble	
Fosfite de Magnesio	Phi	Grune Welt CIA LTDA	Suelo fertirriego	Fertilizante	Concentración Soluble	Colombia
Fitasio Fosfite potasico	Phi	Agrinova Science S.A.S.	Foliar	Fertilizante	Concentración Soluble	España
Foscrop PK	Phi	Colinagro S. A	Foliar	Fertilizante	Concentración Soluble	España
		Irricol Grado: 20-5-10 + Microelementos	Suelo fertirriego	Fertilizante	Cristales solubles	México
Nutriphite 0-52-0	Phi	Magro S.A. (Mayoristas Agrícolas S.A.)	Suelo fertirriego	Fertilizante	Concentración Soluble	Estados Unidos
Nutriphite P+K	Phi		Foliar	Fertilizante	Concentración Soluble	México
Codaphos Ca- (Fosfite de Calcio)	Phi	Hortitec Colombia S. A	Foliar	Fertilizante	Concentración Soluble	España
Si-agro	(Si)	Cales y Derivados Calcareos Rio Claro	Suelo	Acondicionador inorgánico	Polvo seco	Colombia
Sili-Mag 30 -30	(Si)	Cales y Derivados Calcáreos Rio Claro	Suelo	Acondicionador inorgánico	Polvo seco	Colombia
Magsil 35 Silicato de Magnesio	(Si)	Granyplo	Suelo	Acondicionador inorgánico	Polvo seco	Colombia
Agrosil Zeo	(Si)	Agromil S. A	Suelo	Fertilizante	Granulado	Colombia
Oxicalsil 49	(Si)	Fertillano	Suelo	Acondicionador inorgánico	Granulado	Colombia
Silix-K	(Si)	Feragrocol	Suelo	Acondicionador inorgánico	Granulado	Colombia

(ICA, 2018)

Adicionalmente, se realizaron dos ensayos con la sustancia bioactiva que mostró una eficacia superior al 40% durante las tres réplicas biológicas y alta consistencia entre ellas (Anexo 9).

Con el fin de confirmar su eficiencia en la reducción de la enfermedad, siendo la sustancia seleccionada el KPhi1-C2 una dosis recomendada de 2000 ppm. De acuerdo con el análisis de varianza, se observan diferencias significativas entre los tratamientos *Fo/59* y KPhi1-C2, según la comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$).

Tabla 2.13 Efecto del KPhi sobre la severidad de la marchitez vascular en tomate 14 días después de inoculación (ddi).

Tratamiento	% Severidad					Media
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Ensayo 5	
* <i>Fo/59</i>	96±3,27 ^a	99 ±2,00 ^a	92 ±7,30 ^a	90 ±10,0 ^a	99±2,00 ^a	95.2
**KPhi	67±8,87 ^b	56 ±8,00 ^b	46±19,18 ^b	50±4,00 ^b	64±9,8 ^b	56.6

**Fo/59*=Plantas inoculadas no tratadas; **KPhi= fosfito de potasio dosis recomendada 2000 ppm. Las letras indican las diferencias significativas según la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Los resultados obtenidos mostraron un efecto en la reducción de la severidad de los síntomas causados por *Fo/59* en plantas de tomate de la variedad susceptible Santa Cruz Kada (Figura 2.13). Las plantas con el tratamiento de Kphi1-C2 presentaron menor nivel de daño, en comparación con las plantas inoculadas sin tratamiento previo (Figura 2.13). Los síntomas se manifestaron a partir de los 6 días después de inoculación (ddi), siendo evaluados cada dos días desde la aparición de síntomas hasta el día 14, fecha en la cual las plantas control inoculadas únicamente con *Fo/59* estaban completamente muertas.

La severidad de la enfermedad causada por *Fo/59* fue incrementando a través del tiempo, en la Tabla 2.11 se resume los diferentes ensayos realizados con KPhi1-C2 en comparación con plantas no tratadas e inoculadas con *Fo/59*. Se realizaron un total de 5 réplicas biológicas para confirmar y validar el efecto sobre la reducción de la severidad causado por el tratamiento con KPhi1-C2. En los resultados se observa una severidad del 95.2% a los 14 ddi en plantas que fueron inoculadas con *Fo/59* sin aplicación de ninguna sustancia bioactiva, frente a una severidad del 57% en plantas de tomate tratadas con KPhi, logrando una eficacia promedio

del 40% en la reducción de la severidad y retrasando el progreso de la enfermedad en comparación al control inoculado con *Fol59*.

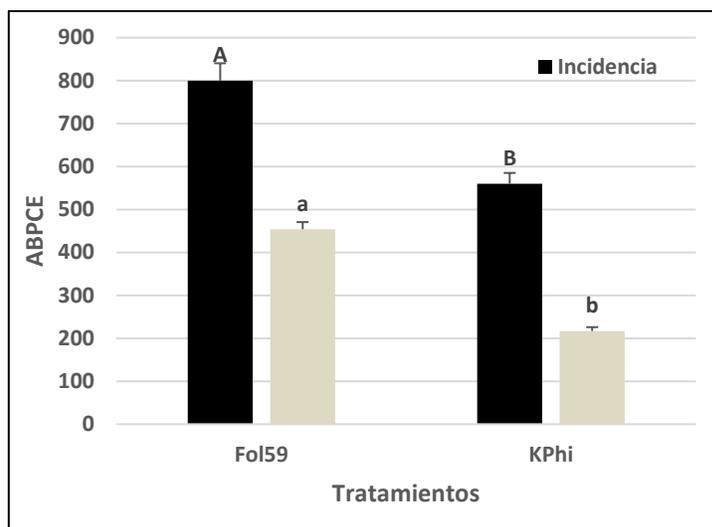


Figura 2.13 Área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE) expresada como incidencia y severidad, causada por el aislamiento *Fol59* en plantas de tomate de 30 días de edad tratadas con KPhi. Las barras de error representan \pm EE. Letras diferentes indican diferencia significativa de acuerdo con la comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$). La gráfica representa el consolidado de las réplicas.

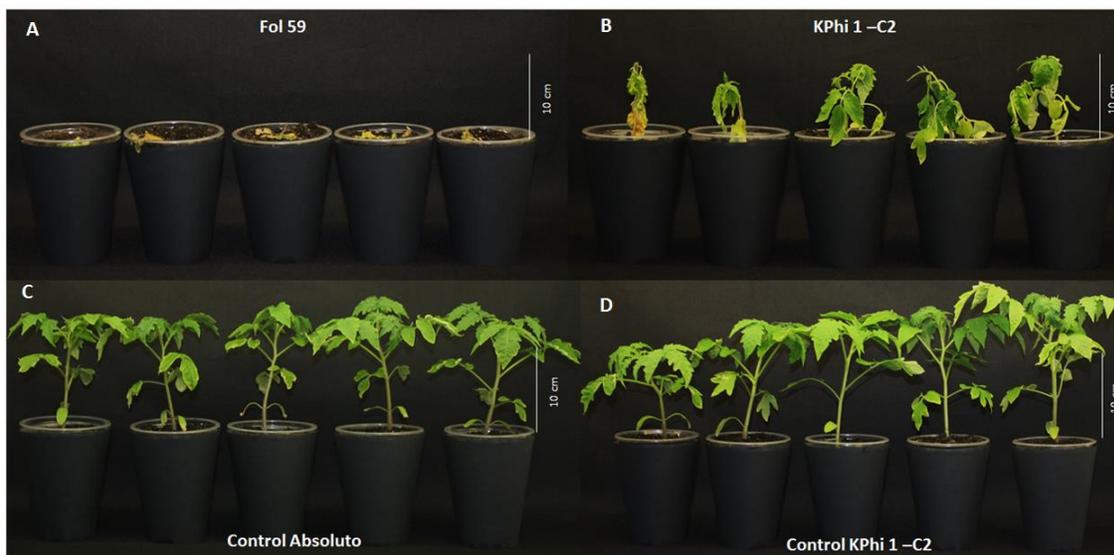


Figura 2.14. Expresión de síntomas de la marchitez vascular de tomate tratadas con fosfito de potasio (KPhi), 14 ddi. A. *Fol59* (Control patógeno); B. Plantas tratadas con Kphi (2000 ppm) e inoculadas con *Fol59*; C. Plantas control (Control Absoluto); D. Plantas tratadas con Kphi (2000 ppm) (Control KPhi).

2.6 Conclusiones

Todas las sustancias bioactivas evaluadas mostraron un control a nivel *in vitro* en las diferentes concentraciones usadas sobre el área de crecimiento *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 2, mostrando una relación directa entre el aumento de la concentración de la sustancia bioactiva y la disminución del crecimiento de la colonia.

La sustancia bioactiva más eficiente de acuerdo con los ensayos realizados *in planta* fue Fosfite de potasio 1 (KPhi1-C2), obteniendo un 42% de eficacia sobre *FoI59*. KPhi1-C2 constituye una alternativa con potencial para la reducción de esta enfermedad.

2.7 Agradecimientos

Se agradece a la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-AGROSAVIA por la financiación de este proyecto, a la profesional de apoyo a la investigación Diana Burbano, durante montaje de experimentos. A los auxiliares Inés Roldan, Stella Mendieta y José Neuta del laboratorio de Microbiología Agrícola, por la preparación de medios.

3. Discusión General

En el cultivo de tomate, la incidencia de la marchitez vascular causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol), ocasiona pérdidas que pueden alcanzar hasta el 60% de la producción y un 80% en el rendimiento, a nivel mundial (Raza *et al.*, 2017; Nirmaladevi *et al.*, 2016; Villa-Martínez *et al.*, 2014; Dean *et al.*, 2012). Puesto que el manejo de la enfermedad se basa principalmente en el uso y aplicación de fungicidas de síntesis química; es necesario integrar alternativas que propendan a un manejo sostenible del cultivo. El uso de sustancias bioactivas como fosfitos y silicios, que pueden actuar tanto directamente sobre el patógeno como inducir respuestas de defensa, se convierten en una de las alternativas más promisorias y con alto potencial para la agricultura.

Investigaciones previas han revelado que estas sustancias bioactivas son efectivas en el manejo de enfermedades, dado su efecto biocida e inductor de resistencia. Lo cual abre nuevas puertas a la investigación su uso. En relación al efecto directo, actúan sobre el crecimiento, desarrollo micelial y esporulación de patógenos fúngicos y de forma indirecta como inductores de resistencia en la planta frente al ataque de patógenos, estimulando la producción de fitoalexinas y expresión de genes relacionados con defensa. El fosfito (Phi), ha sido utilizado como plaguicida (Kromann *et al.*, 2012), fertilizante suplementario y bioestimulante (Felipini *et al.*, 2016, Araújo *et al.*, 2010), además, inhibe el crecimiento micelial y esporulación de hongos fitopatógenos (Lobato *et al.*, 2010; Monsalve *et al.*, 2012; Burra *et al.*, 2014; Rosyidah *et al.*, 2017). Por su parte el silicio (Si), aunque aún no es considerado como un elemento esencial en la nutrición para las plantas y la resistencia a patógenos mediada por este elemento no se encuentra completamente caracterizada, se le ha descrito como un elemento benéfico, puesto que promueve el crecimiento, desarrollo, rendimiento y calidad de los frutos en cultivos. De la misma manera, promueve la inducción de resistencia y protección contra diversos factores ambientales bióticos y abióticos (Zhou *et al.*, 2018; Debona *et al.*, 2017; Han *et al.*, 2016; Whan *et al.*, 2016; Kiirika *et al.*, 2013). La resistencia a patógenos mediada por (Si) no se encuentra completamente caracterizada. Se ha sugerido que la acumulación de (Si) en las hojas actúa como barrera física contra la penetración de patógenos (Han *et al.*, 2016; Cai *et al.*, 2009).

Durante el desarrollo de esta investigación, se obtuvieron 119 aislamientos colectados y purificados entre el 2016 y 2017 provenientes de 32 zonas productoras de Cundinamarca, Boyacá, Antioquia y Caldas, incluyendo aislamientos suministrados por el grupo GIPPA, de

la universidad de Caldas. En el presente estudio, se realizó una caracterización morfológica a nivel macro y microscópico de las colonias, sugiriendo que los aislamientos corresponden a *Fox*, de acuerdo con las claves taxonómicas establecidas por Leslie & Summerell (2006). Dos de estos aislamientos fueron identificados como *Fol* raza 2, mediante análisis molecular usando genes *SIX* de virulencia (*del inglés, Secreted In Xylem*) (Lievens *et al.*, 2009; Houterman *et al.*, 2007, Carmona *et al.*, en preparación), uno de ellos fue donado por la Universidad de Caldas y el otro aislamiento de la colección de trabajo del proyecto de AGROSAVIA, codificados como: UDCFOL10 y *Fol59* respectivamente. Con los dos aislamientos colombianos de *Fol* identificados, se logró optimizar un protocolo de inoculación por inmersión de raíz con profundo detalle y altamente reproducible para obtener la expresión de la enfermedad marchitez vascular en plantas de tomate bajo condiciones controladas.

Específicamente, en este estudio se observó un efecto positivo por parte de las fuentes de fosfitos (Phi) y silicio (Si) evaluadas a nivel *in vitro* e *in planta* frente al aislamiento *Fol59*, perteneciente de la raza 2. A nivel *in vitro* se encontró que el crecimiento del patógeno fue inhibido entre un 70 y 99% usando diferentes concentraciones de estas sustancias bioactivas, cabe resaltar que el (Si) en bajas concentraciones mostró un efecto benéfico sobre el crecimiento del patógeno. Estos resultados concuerdan con los descritos por Araújo *et al.*, (2010), los autores reportaron un 94% de inhibición en el crecimiento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* a nivel *in vitro* en presencia de KPhi. Según investigaciones previas, el fosfito de potasio presenta un mecanismo directo, que consiste en inhibir el crecimiento micelial y generar cambios en la composición del micelio (Oliveira *et al.*, 2012; Lobato *et al.*, 2010). Además, restringe el crecimiento de *F. culmorum* y *F. graminearum* en un 60 y 80%, respectivamente (Hofgaard *et al.*, 2010). Por otra parte, Gomes *et al.*, (2016) indican que el crecimiento *in vitro* de *F. solani* fue inhibido en un 50% después del tratamiento con KPhi. Con el presente trabajo, también se demuestra el efecto directo que ejercen los Phi sobre la germinación de conidios, Caixeta *et al.*, (2012) reportan un efecto directo de los Phi sobre la esporulación de *F. oxysporum f. sp. phaseoli*.

En semillas de tomate, se evidenció un estímulo en la germinación usando sustancias bioactivas, lo cual coincide con lo reportado por Tambascio *et al.*, (2014), los autores indican que la aplicación de fosfitos reduce el periodo entre siembra y emergencia en tubérculos de papa, lo que significa una ventaja a nivel fisiológico. En el caso del fosfito de calcio, en este estudio se observó un retraso en el crecimiento de la planta y clorosis en hojas, lo que

coincide con lo reportado Thao & Yamakawa, (2009) y Ratjen & Gerendás, (2009), quienes indican que este fenómeno podría estar relacionado con plantas con bajos niveles de fósforo (P), siendo más sensibles a los Phi, puesto que expresan síntomas de toxicidad como clorosis en las hojas y crecimiento atrofiado.

Así mismo, en ensayos realizados en plantas inoculadas con *FoI59*, que fueron tratadas previamente con fosfitos o silicio, hubo una disminución de la severidad a los 14 ddi entre un 10.4% a un 42%, en comparación con las plantas no tratadas, donde la incidencia y severidad, presentaron porcentajes del 100% y 96%, respectivamente. En general, todas las sustancias bioactivas tuvieron un efecto en la reducción de la severidad al compararse con plantas únicamente inoculadas con *FoI59*. Sin embargo, la sustancia bioactiva más eficiente fue fosfito de potasio, en la concentración recomendada comercialmente, obteniendo un 42% de eficacia sobre *FoI59*. Estos resultados concuerdan con los reportados por varios autores, donde destacan el uso de fosfitos como una de las alternativas eficientes para el control de enfermedades, dado que son compuestos con alto poder de control y además son inocuos para el medio ambiente (Kim *et al.*, 2016). Los Phi son traslocados vía floema desde las hojas hasta la raíz, razón por la cual poseen grandes ventajas (Yáñez-Juárez *et al.*, 2018), tanto por su efecto biocida como bioestimulante (Thao & Yamakawa, 2009), sin embargo su efecto está en función del suministro de fosfato (Pi) el cual garantizará un efecto eficiente por parte de los fosfitos.

Finalmente, los resultados del presente estudio sugieren que los fosfitos, y especialmente KPhi presentó un efecto directo e indirecto sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, logrando a nivel *in vitro* una reducción del 99% y una eficacia *in planta* del 42% frente al progreso de la enfermedad. No obstante, es importante continuar con estudios que revelen como el Phi puede activar una serie de mecanismos moleculares, bioquímicos y fisiológicos para mejorar parámetros de producción y rendimiento del cultivo.

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

- El análisis macro y microscópico de los 119 aislamientos colectados permitieron concluir que se trata de aislamientos de *Fusarium oxysporum*.
- Se obtuvo una metodología estandarizada de inoculación con *Fol* en plantas de tomate, con resultados altamente consistentes.
- A nivel *in vitro* las sustancias bioactivas, mostraron un efecto de inhibición en las diferentes concentraciones usadas sobre el área de crecimiento *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.
- La sustancia bioactiva más eficiente según los ensayos realizados *in planta* fue el fosfito de potasio 1-C2 obteniendo un 42% de eficacia sobre *Fol59*.

4.2 Recomendaciones

- Los resultados de este estudio sugieren que el fosfito de potasio (KPhi1-C2), constituye una alternativa promisoría en la reducción de la enfermedad; por lo cual se considera esencial profundizar en el estudio del tratamiento con esta sustancia bioactiva en condiciones experimentales similares a las comerciales, que permitan conocer en detalle el impacto que tiene la sustancia bioactiva en la fisiología, transcriptoma, proteoma y metabolómica, tanto de la planta como del patógeno.
- La integración de estrategias alternativas de manejo del marchitamiento vascular causado por *Fol* podría permitir en el futuro cercano una reducción del número de aplicaciones convencionales requeridas de agroquímicos. Por tal motivo, resulta necesario continuar investigaciones que profundicen en el uso de sustancias bioactivas para el manejo de enfermedades.

ANEXO 1. Protocolo para la obtención de *Fusarium oxysporum* a partir de material vegetal de tomate (*Solanum lycopersicum*)

Metodología de Colecta

El hongo penetra en la planta por raíces, luego invade algunos vasos de la xilema afectando el sistema vascular. Los síntomas más característicos son el amarillamiento en hojas bajas, marchitamiento, pérdida de turgencia y defoliación de la planta. *F. oxysporum* se puede aislar de tejidos vegetales que presenten síntomas típicos de la enfermedad, es decir, de la raíz y de parte del hipocótilo. Generalmente el hongo infecta estas dos estructuras de la planta.

Para recolectar las muestras de tejido infectado en el campo, se requiere tener en cuenta los siguientes puntos:

1. Seleccionar el lote, parcela o invernadero del cultivo a muestrear.
2. Realizar una inspección total del cultivo para lo cual se debe caminar en forma de una letra X o Z e identificar las plantas sintomáticas con clorosis, pérdida de turgencia, focos o agregados y relacionar con condiciones ambientales del sitio.
3. Una vez identificada la planta con síntomas de marchitez vascular, arranque la planta del terreno.
4. Colectar la muestra (raíces/tallo), haga un corte con una tijera de podar, en el tallo a unos 30 cm de la base y colóquelas sobre las tollas de papel o servilletas, envolviendo por separado, logrando así absorber la humedad.
5. Tomar suelo del sitio donde colecto la muestra sintomática y colecte suelo de plantas sanas.
6. Las muestras de tejido recolectadas se colocan en bolsas de papel. Se recomienda no usar bolsas plásticas puesto que permite la acumulación de humedad, favoreciendo el crecimiento de microorganismos saprofitos, lo que dificulta el aislamiento del patógeno de estudio.

7. Marcar las muestras e identificar la siguiente información: Material de siembra híbrido (o genotipo), sitio de muestreo (localidad, provincia, departamento, país), fecha de recolección, nombre del recolector y datos de ubicación con GPS, en lo posible.
8. Pegar el rotulo en cada bolsa que contenga las muestras (raíz y tallo).
9. Depositar las muestras en una nevera de icopor con gel refrigerante, provisionalmente hasta llegar al laboratorio.
10. Se recomienda recolectar plantas muertas o material excesivamente descompuesto.
11. Realizar la desinfección de las herramientas entre cada planta muestreada con alcohol al 70%.

Aislamiento y purificación de *Fusarium* spp. a partir de material vegetal (tallos y raíces)

Este procedimiento se aplica para garantizar la detección e identificación de *Fusarium* asociado a plantas de tomate. El proceso inicia con la colecta de plantas sintomáticas de tomate de lotes establecidos en campo. En el laboratorio, el material pasa por un proceso de lavado, desinfección e indexación en segmentos del tejido, aislamiento y purificación. Para lograr este proceso, siga los siguientes pasos:

1. Lavar el material vegetal con agua corriente, luego haga un lavado con jabón extran 1 mL/L dentro de un recipiente plástico o frasco tapa rosca agitando vigorosamente, con el objetivo de retirar la mayor cantidad posible de suelo y suciedad superficial.
2. Realizar lavados sucesivos con agua corriente para retirar los residuos de jabón y partículas de suelo.
3. En condiciones asépticas, realice los siguientes lavados con un volumen aproximado de 200 mL de líquido en cada lavado y manipule el material con pinzas estériles: un minuto en agitación constante con alcohol al 70%; dos minutos en hipoclorito de sodio al 2% y tres lavados de un minuto en agua estéril.

4. Secar las muestras sobre servilleta estéril durante 5 a 10 minutos, en cámara de flujo laminar.
5. Previamente al aislamiento del material vegetal, prepare el medio de cultivo PDA complementado con 0,1% de tritón para restringir la velocidad de crecimiento de las colonias, e incube por dos días a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ para confirmar que los medios de cultivos no presenten ningún tipo de contaminación, descarte las cajas contaminadas en caso de que se presenten.
6. Corte varios pedazos de tejido usando una tijera estéril o bisturí y cuchillas no. 22 en segmentos de 1 cm.
7. Sembrar en forma de espiral (Foto 1). Incube las cajas a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 7 días (tiempo en el que el hongo producirá masas de conidios y micelio) Foto 2.

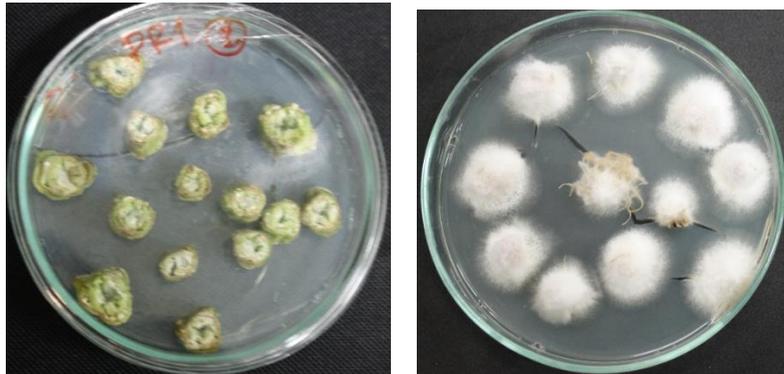


Foto 1. Siembra en espiral de segmentos de tallo. Foto 2. Crecimiento de micelio sobre tejido

8. Observar el cultivo diariamente, luego realice subcultivos en cajas nuevas con PDA hasta obtener aislamientos puros. Tome el micelio aéreo de cada caja y coloque en un nuevo medio con PDA.
9. A partir de un cultivo de *Fusarium* sp., puro tome una mínima muestra de micelio aéreo esporulado con un asa recta y disuelva dentro del tubo con tween. Agite en vórtex por 30 segundos. Usando una micropipeta, transfiera la suspensión a un nuevo tubo pasándola a través de una doble capa del velo suizo o muselina estéril, con el fin de filtrar y eliminar el micelio presente en la suspensión. Agite en vórtex a máxima velocidad durante un minuto para desagregar las células.

10. Llene tubos eppendorf con 2 mL de la solución de tween 80 al 0,1% y rotule con el código correspondiente del aislamiento.
11. Realizar tres diluciones poniendo 100 μ l de suspensión en un nuevo tubo con 900 μ l de tween. Agite de nuevo durante 30 segundos y tome una alícuota de 20 μ l de suspensión adicionada con 5 μ l de azul de lactofenol y verifique en microscopio la ausencia de micelio y la ausencia de cualquier tipo de contaminación. Con ayuda de un rastrillo siembre 100 μ l en superficie por triplicado en medio de cultivo PDA.
12. Incubar durante 48 horas a 25° C en condiciones de luz constante, y cuando las colonias comiencen a presentar crecimiento, tome con un asa recta una mínima porción de micelio aéreo de una sola colonia y transfiera a una nueva caja de PDA.

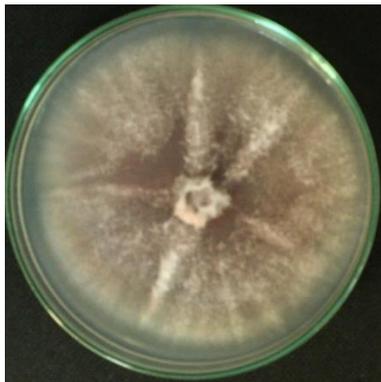


Foto 3. Cultivo puro de *Fusarium oxysporum*

13. Finalmente, incubar el cultivo puro en condiciones descritas anteriormente (Foto 3), críoconservar y almacenar.
14. Para la conservación de hongos a largo plazo, puede usar dos métodos. El primero en papel de filtro, donde los aislamientos se cultivan en PDA con fragmentos de papel de filtro durante 15 días hasta su esporulación. Luego se recoge y se seca en cabina de flujo laminar, para ser almacenados dentro de una bolsa de papel pergamino a -20 °C.
15. Para el segundo método se usa glicerol, obteniendo una suspensión concentrada de esporas de hongos de un cultivo de PDA de dos semanas de edad y almacene en 30% (v/v) de agua y glicerol a -80 °C.

ANEXO 2. Análisis de suelo usado para ajustes de ensayos con *Fol* en tomate.

INFORME N° 3557-317 (28855-28857) Andrea del Pilar Villarreal 2017-11-28

Corpoica		ACREDITADO ONAC ORGANISMO NACIONAL DE NORMAS Y CALIDAD		REPORTE DE RESULTADOS LABORATORIO DE SERVICIOS UNA MUESTRA VINCULACIÓN DE CONOCIMIENTO Y TECNOLOGÍA	
ISO/IEC 17025-2005 13-LAB-031		LABORATORIO DE QUÍMICA DE SUELOS, AGUAS Y PLANTAS		#DE SOLICITUD 3557	CODIGO DE LABORATORIO 517-26855
1. Información del cliente					
Nombre y Apellido:	ANDREA DEL PILAR VILLARREAL				
Cálculo o NIT	20500205				
Dirección:	KM 14 VIA MOSQUERA				
Ciudad:	CUNDINAMARCA				
Municipio:	MOSQUERA				
Tel. fijo/Celular:	3142635918-4227300 EXC. 1404				
Tipo de análisis:	Fertilidad completa,				
2. Información de la muestra					
Identificación:	M1	Altura:	2560		
Matriz:	SUELO	Cultivo:	TOMATE CHORRO		
Vinedo:	TIBATIXA	Estado:	ESTABLECIDO		
Fisca:	SUELO LOTES PATOGINO	Topografía del terreno:	PLANO		
Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria CORPOICA con acreditación ONAC vigente a la fecha, con código de acreditación 10-LAB-031, bajo la norma ISO/IEC 17025:2005. El laboratorio tiene acreditación ONAC bajo la norma NTC ISO/IEC 17025 en los ensayos de: pH (VC_R_004 versión 2 de 08-09-2016), Nitrógeno disponible Bray 2 (NTC 5349:2008), conductividad eléctrica en suela (NTC 5349:2008), cationes cambiables en suelo calcio, magnesio, potasio y sodio disponibles (NTC 5349:2008), micro nutrientes en suelo por óxido modificado (NTC 5326:2007)*					
Fecha de recepción:	2017-11-07		Javier Ricardo Jiménez (RM2)		
Fecha(s) de análisis:	2017-11-14 / 2017-11-17		Lider Unidad de Laboratorio de Suelos		
Fecha de reporte:	2017-11-28				
DETERMINACION ANALITICA	UNIDAD	MÉTODO	VALOR*	INTERPRETACIÓN*	
pH	Unidades de pH	VC_R_004 versión 2	5,67	MODERADAMENTE ACIDO	
Conductividad eléctrica	dS/m	NTC 5349:2008	19,81	MUY FUERTEMENTE SALINO	
Nitrato orgánico (N-O)	g/100 g	Walkley & Black	10,78	ALTO	
Nitrógeno disponible (N) Bray 2	mg/kg	NTC 5350:2005	229,87	ALTO	
Azúfre disponible (S)	mg/kg	Fotómetro monocromático de calcio	338,60	ALTO	
Alúmina intercambiable (Al-H)	cmol _c /kg	KCl	0,00	ALTO	
Aluminio intercambiable (Al)	cmol _c /kg	KCl	0,00	ALTO	
Calcio intercambiable (Ca)	cmol _c /kg	NTC 5349:2008	10,76	ALTO	
Magnesio intercambiable (Mg)	cmol _c /kg	NTC 5349:2008	4,28	ALTO	
Fosfato intercambiable (P)	cmol _c /kg	NTC 5349:2008	16,84	ALTO	
Sodio intercambiable (Na)	cmol _c /kg	NTC 5349:2008	2,51	MEDIO	
Capacidad de intercambio catiónico (CIC)	cmol _c /kg	Suma de cationes	34,40	ALTO	
Hierro disponible (Fe) Olan	mg/kg	NTC 5326:2007	212,62	ALTO	
Manganeso disponible (Mn) Olan	mg/kg	NTC 5326:2007	54,73	ALTO	
Zinc disponible (Zn) Olan	mg/kg	NTC 5326:2007	14,65	ALTO	
Cobre disponible (Cu) Olan	mg/kg	NTC 5326:2007	2,51	MEDIO	
Boro disponible (B)	mg/kg	Fotómetro monocromático de calcio	1,70	ALTO	
SATURACION DE BASES	Saturación de Calcio	31%	Medio		
	Saturación de Magnesio	12%	Bajo		
	Saturación de Potasio	49%	Alto		
	Saturación de Sodio	7%	Normal		
	Saturación de Aluminio	0%			
RELACIONES IÓNICAS	Relación Ca/Mg	2,5			
	Relación Ca+Mg/K	0,9			
	Relación Mg/K	0,3			
	Relación Ca/B	1002			
OBSERVACIONES: * Interpretación basada en ICA 1902 Fertilización en diversos cultivos. Guía Aproximación Manual de asistencia N 25, N27 No Determinado.					
Los resultados son válidos únicamente para la muestra en referencia. Este documento ha sido producido electrónicamente y es válido sin la firma. Este documento no puede ser reproducido total ni parcialmente, sin la autorización formal de CORPOICA. Para peticiones, quejas, solicitudes de información comuníquese al correo electrónico: atencionalcliente@corpoica.org.co o a la línea telefónica 018000121515					
CORPORACION COLOMBIANA DE INVESTIGACION AGROPECUARIA, NIT: 800194600-3 CENTRO DE INVESTIGACION TIBATIXA KILOMETRO 14 VIA MOSQUERA (CUNDINAMARCA) TELEFONOS: 4227300, extensión 1414 E-MAIL: ypaero@corpoica.org.co					
				VC-4-327	
				Versión: 2	
				Fecha de aprobación: 04-09-2017	

ANEXO 3. Análisis comparativo de tres métodos de inoculación para *Fol59*

3.1 Variable dependiente: ABCPE_Sev

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	6	7015937,667	1169322,944	41,50	<.0001
Error	18	507202,333	28177,907		
Total no corregido	24	7523140,000			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	ABCPE_Sev Media
0,670033	33,61177	167,8628	499,4167

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F- Valor	Pr > F
Bloques	3	78859,1667	26286,3889	0,93	0,4452
Tratamiento	2	951070,3333	475535,1667	16,88	<.0001

Tukey Líneas de comparación para medias de mínimos cuadrados de Tratamiento

LS-medias con la misma letra no son significativamente diferente.

	ABCPE_Sev LSMEAN	Tratamiento	Número LSMEAN
A	674,75	IR	2
A	602,50	IR+SS	3
B	221,00	SS	1

3.2 Procedimiento GLM-Variable dependiente: ABCPE_INCIDENCIA

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F- Valor	Pr > F
Modelo	6	20692625,00	3448770,83	58,02	<.0001
Error	18	1069875,00	59437,50		
Total no corregido	24	21762500,00			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	ABCPE_Inc Media
0,598244	27,32907	243,7981	892,0833

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F- Valor	Pr > F
Bloques	3	112312,500	37437,500	0,63	0,6051
Tratamiento	2	1480808,333	740404,167	12,46	0,0004

Tukey Líneas de comparación para medias de mínimos cuadrados de Tratamiento

LS-medias con la misma letra no son significativamente diferente.

	ABCPE_Inc LSMEAN	Tratamiento	Número LSMEAN
A	1146,3	IR	2
A	975,0	IR+SS	3
B	555,0	SS	1

ANEXO 4. Análisis para el aislamiento UDCFOL10

4.1 Severidad UDCFOL10: De acuerdo con el análisis de varianza, las réplicas (1-2) presentaron diferencias significativas.

Réplicas	ABCPE_Sev LSMEAN	H0:MediaLS1=MediaLS2 Pr > t
1	811,666667	0,0035
2	415,666667	

Tukey Líneas de comparación para medias de mínimos cuadrados de Ensayos LS-medias con la misma letra no son significativamente diferente.

	ABCPE Severidad LSMEAN	Réplicas	Número LSMEAN
A	811,667	1	1
B	415,667	2	2

4.2 Incidencia UDCFOL10

Réplicas	ABCPE_Inc LSMEAN	H0:MediaLS1=MediaLS2 Pr > t
1	1093,33333	0,0012
2	726,66667	

Tukey Líneas de comparación para medias de mínimos cuadrados de Ensayos LS-medias con la misma letra no son significativamente diferente.

	ABCPE Incidencia LSMEAN	Réplicas	Número LSMEAN
A	1093,33	1	1
B	726,67	2	2

1. Réplica Biológica 1

4.3 Análisis estadístico por ensayo

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	6	9183362,667	1530560,444	159,22	<.0001
Error	6	57677,333	9612,889		
Total no corregido	12	9241040,000			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	ABCPE_Sev Media
0,956809	12,07951	98,04534	811,6667

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Bloque	3	128462,667	42820,889	4,45	0,0570
Tratamiento	2	1149266,667	574633,333	59,78	0,0001

Tukey Líneas de comparación para medias de mínimos cuadrados de Tratamiento

LS-medias con la misma letra no son significativamente diferente.

ABCPE_Sev LSMEAN	Tratamiento	Número LSMEAN
A 1090	UDCFOL10 25	2
A 965	UDCFOL10 15	1
B 380	UDCFOL10 30	3

2. Réplica Biológica 2

Variable dependiente: ABCPE_Sev - Réplica 2 (ensayos=2)

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	6	2188546,667	364757,778	34,69	0,0002
Error	6	63085,333	10514,222		
Total no corregido	12	2251632,000			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	ABCPE_Sev Media
0,646158	24,66854	102,5389	415,6667

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Bloque	3	12110,6667	4036,8889	0,38	0,7687
Tratamiento	2	103090,6667	51545,3333	4,90	0,0547

Tukey Líneas de comparación para medias de mínimos cuadrados de

Tratamiento

LS-medias con la misma letra no son significativamente diferente.

ABCPE_Sev _SMEAN	Tratamiento	Número _SMEAN
A 490	UDCFOL10 15	1
A 472	UDCFOL10 25	2
A 285	UDCFOL10 30	3

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	6	6458133,333	1076355,556	34,16	0,0002
Error	6	189066,667	31511,111		
Total no corregido	12	6647200,000			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	ABCPE_Inc Media
0,391416	24,42849	177,5137	726,6667

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Bloque	3	25333,33333	8444,44444	0,27	0,8464
Tratamiento	2	96266,66667	48133,33333	1,53	0,2909

Tukey Líneas de comparación para medias de mínimos cuadrados de Tratamiento

LS-medias con la misma letra no son significativamente diferente.

	ABCPE_Inc LSMEAN	Tratamiento	Número LSMEAN
A	850	UDCFOL10 25	2
A	690	UDCFOL10 30	3
A	640	UDCFOL10 15	1

1.5.1

ANEXO 5. Análisis para el aislamiento *Fo/59*

1. Severidad *Fo/59*

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	10	6014477,381	601447,738	52,16	<.0001
Error	13	149894,619	11530,355		
Total no corregido	23	6164372,000			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	ABCPE_Sev Media
0,506676	21,27242	107,3795	504,7826

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Réplica	1	2,6698	2,6698	0,00	0,9881
Bloque	3	10076,6359	3358,8786	0,29	0,8309
Réplicas*Bloque	3	4874,7535	1624,9178	0,14	0,9337
Tratamiento	2	139313,3810	69656,6905	6,04	0,0140

Tests de hipótesis usando el MS Tipo III para Ensayos*Bloque como un término de error

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Réplicas	1	2,66984127	2,66984127	0,00	0,9702

Tukey-
Kramer Líneas de comparación para medias de mínimos cuadrados de
Ensayos

LS-medias con la misma letra no son significativamente diferente.

	ABCPE_Sev LSMEAN	Réplica	Número LSMEAN
A	506,19	2	2
A	505,50	1	1

Tukey-
Kramer Líneas de comparación para medias de mínimos cuadrados de Tratamiento

LS-medias con la misma letra no son significativamente diferente.

	ABCPE_Sev LSMEAN	Tratamiento	Número LSMEAN
A	597,000	FoI59 25 ddi	2
A	510,036	FoI59 15 ddi	1
B	410,500	FoI59 30 ddi	3

2. Incidencia *FoI59*

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	10	13910119,05	1391011,90	282,63	<.0001
Error	13	63980,95	4921,61		
Total no corregido	23	13974100,00			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	ABCPE_Inc Media
0,700914	9,069964	70,15420	773,4783

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Réplicas	1	12825,71429	12825,71429	2,61	0,1305
Bloque	3	76656,30252	25552,10084	5,19	0,0141
Réplicas*Bloque	3	12101,40056	4033,80019	0,82	0,5059
Tratamiento	2	58752,38095	29376,19048	5,97	0,0145

Tests de hipótesis usando el MS Tipo III para Ensayos*Bloque como un término de error

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Réplicas	1	12825,71429	12825,71429	3,18	0,1726

Tukey-
Kramer Líneas de comparación para medias de mínimos cuadrados de Tratamiento
LS-medias con la misma letra no son significativamente diferente.

	ABCPE_Inc	LSMEAN	Tratamiento	Número LSMEAN
A	835,000		Fol59 25 ddi	2
A	755,000		Fol59 30 ddi	3
A	710,714		Fol59 15 ddi	1

ANEXO 6. Análisis estadísticos de los experimentos *in planta* de 30 días con *Fol59*

7.1 Variable Incidencia

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	9	11031600,00	1225733,33	202,29	<.0001
Error	27	163600,00	6059,26		
Total no corregido	36	11195200,00			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	ABCPEI Media
0,836043	14,62570	77,84124	532,2222

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	9	11031600,00	1225733,33	202,29	<.0001

Tukey Líneas de comparación para medias de mínimos cuadrados de Tratamiento

LS-medias con la misma letra no son significativamente diferente.

	ABCPEI LSMEAN	Tratamiento	Número LSMEAN
A	860	A_SCK	1
B	660	S2	9
C B	640	S1	8
C B D	520	CaPhi 1	2
C B D	490	KPhi1-C1	4
C D	460	KpPhi2-C1	6
D	420	KPhi2-C2	7
D	390	CaPhi 2	3

D	350	KPhi1-C2		5	
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	9	12517600,00	1390844,44	143,55	<.0001
Error	27	261600,00	9688,89		
Total no corregido	36	12779200,00			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	ABCPEI Media
0,457811	16,84200	98,43215	584,4444

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	9	12517600,00	1390844,44	143,55	<.0001

Tukey Líneas de comparación para medias de mínimos cuadrados de Tratamiento

LS-medias con la misma letra no son significativamente diferente.

	ABCPEI LSMEAN	Tratamiento	Número LSMEAN
A	700	A_SCK	1
B	660	S1	8
B	630	CaPhi 1	2
B	620	S2	9
B	610	CaPhi 2	3
B	560	KPhi2-C1	6
B	560	KPhi2-C2	7
B	460	KPhi1-C1	4
B	460	KPhi1-C2	5

Ensayo=3

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	9	11369200,00	1263244,44	180,27	<.0001
Error	27	189200,00	7007,41		
Total no corregido	36	11558400,00			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	ABCPEI Media
0,530288	15,03777	83,71026	556,6667

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	9	11369200,00	1263244,44	180,27	<.0001
Tukey Líneas de comparación para medias de mínimos cuadrados de Tratamiento					
LS-medias con la misma letra no son significativamente diferente.					
	ABCPEI LSMEAN	Tratamiento	Número LSMEAN		
A	730	A_SCK	1		
B	615	CaPhi 1	2		
B	560	CaPhi 2	3		
B	550	KPhi2-C2	7		
B	540	KPhi1-C1	4		
B	535	S1	8		
B	535	S2	9		
B	520	KPhi2-C1	6		
B	425	KPhi1-C2	5		

Ensayo 1.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	9	2344880,000	260542,222	61,11	<.0001
Error	27	115120,000	4263,704		
Total no corregido	36	2460000,000			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	ABCPES Media
0,607388	26,61564	65,29704	245,3333

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	9	2344880,000	260542,222	61,11	<.0001
Tukey Líneas de comparación para medias de mínimos cuadrados de Tratamiento					
LS-medias con la misma letra no son significativamente diferente.					
	ABCPES LSMEAN	Tratamiento	Número LSMEAN		
A	396	A_SCK	1		
B	292	Caphi 1	2		
B	284	S2	9		
B	265	S1	8		

B	226	Kphi1-C1	4
B	217	Kphi2-C2	7
B	214	Kphi2-C1	6
B	157	Caphi 2	3
B	157	Kphi1-C2	5

Ensayo 2.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	9	4486544,000	498504,889	102,40	<.0001
Error	27	131440,000	4868,148		
Total no corregido	36	4617984,000			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	ABCPES Media
0,681551	20,41447	69,77212	341,7778

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	9	4486544,000	498504,889	102,40	<.0001

Tukey Líneas de comparación para medias de mínimos cuadrados de Tratamiento

LS-medias con la misma letra no son significativamente diferente.

	ABCPES LSMEAN	Tratamiento	Número LSMEAN
A	483	A_SCK	1
B	A 391	CaPhi 1	2
B	A 386	CaPhi 2	3
B	A 375	S2	9
B	A 372	S1	8
B	A 367	KPhi2-C2	7
B	C 296	KPhi2-C1	6
B	C 240	KPhi1-C1	4
C	166	KPhi1-C2	5

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	9	5500184,000	611131,556	86,70	<.0001
Error	27	190312,000	7048,593		
Total no corregido	36	5690496,000			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	ABCPES Media
0,538923	21,92696	83,95590	382,8889

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de de la media	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	9	5500184,000	611131,556	86,70	<.0001

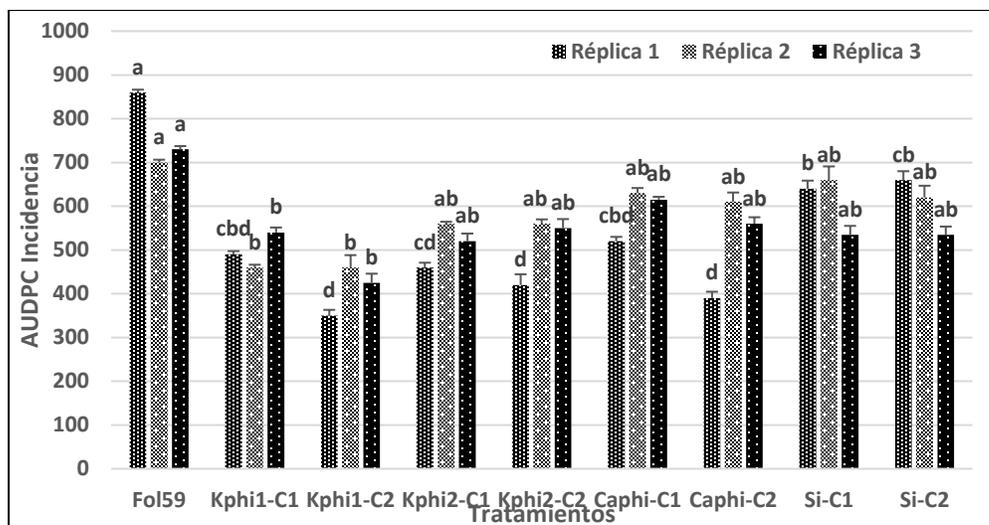
Tukey Líneas de comparación para medias de mínimos cuadrados de Tratamiento

LS-medias con la misma letra no son significativamente diferente.

	ABCPES LSMEAN	Tratamiento	Número LSMEAN
A	500	A_SCK	1
A			
A	440	CaPhi 1	2
A			
A	422	KPhi2-C1	6
A			
A	414	CaPhi 2	3
A			
B A	398	KPhi2-C2	7
B A			
B A	371	S1	8
B A			
B A	361	KPhi1-C1	4
B A			
B A	340	S2	9
B			
B	200	KPhi1-C2	5

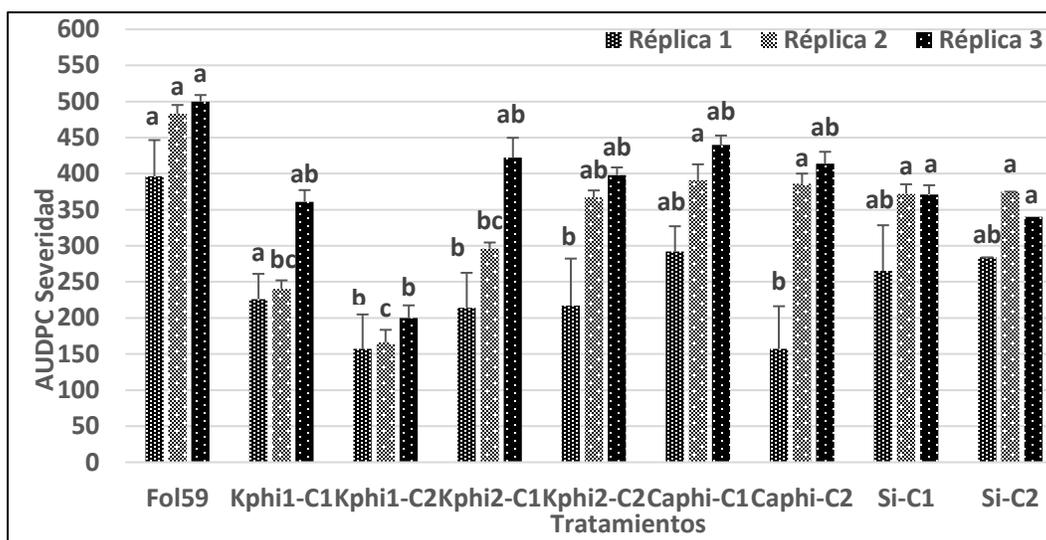
ANEXO 7. Gráficas de Incidencia y severidad del ABCPE de las sustancias bioactivas

7. 2 Incidencia



Área bajo la curva del progreso de la enfermedad de la incidencia de las sustancias bioactivas frente a *Fol59*. Se presenta la media \pm SE de cada réplica biológica evaluadas durante 14 ddi. Columnas con diferentes letras son significativamente diferentes de acuerdo con la comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$). Las gráficas representan las réplicas biológicas de forma independiente, en donde se evalúa el efecto de dos concentraciones de KPhi, CaPhi y (Si).

7. 1 Severidad



Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) expresada como severidad, causada por el aislamiento *Fol59* en plantas de tomate de 30 días de edad tratadas con sustancias bioactivas y 44 días después de inoculación. Se presenta la media \pm SE de cada réplica biológica evaluadas durante 14 ddi. Columnas con diferentes letras son significativamente diferentes de acuerdo con la comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$). Las gráficas representan las réplicas biológicas de forma independiente, en donde se evalúa el efecto de dos concentraciones de KPhi, CaPhi y (Si).

ANEXO 8. Análisis estadísticos de los experimentos *in planta* con KPhi.

Severidad KPhi

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	249084,0000	49816,8000	6,61	0,0057
Error	10	75328,0000	7532,8000		
Total corregido	15	324412,0000			

Tukey Líneas de comparación para medias de mínimos cuadrados de Tratamiento

LS-medias con la misma letra no son significativamente diferente.

	ABCPE S LSMEAN	Tratamiento	Número LSMEAN
A	454	A_SCK Fol59	1
B	217	KPhi	2

11.2 Incidencia KPhi

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	336800,0000	67360,0000	1,28	0,3457
Error	10	527200,0000	52720,0000		
Total corregido	15	864000,0000			

Tukey Líneas de comparación para medias de mínimos cuadrados de Tratamiento

LS-medias con la misma letra no son significativamente diferente.

	ABCPE I LSMEAN	Tratamiento	Número LSMEAN
A	800	A_SCK Fol59	1
B	560	KPhi	2

5. Bibliografía

- Abbasi, P. A., & Lazarovits, G. (2006). Seed Treatment with Phosphonate (AG3) Suppresses Pythium Damping-off of Cucumber Seedlings. *Plant Disease*, 90(40), 459–464. <http://doi.org/Doi.10.1094/Pd-90-0459>
- Agrios, G. N. (2005). *Fitopatología*. (Limusa (2005)., Ed.), Limusa. México, D.F. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- AGRONET. (2017). <http://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/default.aspx>.
- Amini, J. (2009). Physiological race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in Kurdistan province of Iran and reaction of some tomato cultivars to race 1 of pathogen. *Plant Pathology Journal*.
- Araújo, L., Valdebenito-Sanhueza, R. M., & Stadnik, M. J. (2010). Avaliação de formulações de fosfito de potássio sobre *Colletotrichum gloeosporioides* in vitro e no controle pós-infecional da mancha foliar de *Glomerella* em macieira. *Tropical Plant Pathology*, 35(1), 54–59. <http://doi.org/10.1590/S1982-56762010000100010>
- Ashley, K., Cordell, D., & Mavinic, D. (2011). A brief history of phosphorus: From the philosopher's stone to nutrient recovery and reuse. *Chemosphere*, 84(6), 737–746. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.03.001>
- Bekker, T. F., Kaiser, C., & Labuschagne, N. (2009). The antifungal activity of potassium silicate and the role of pH against selected plant pathogenic fungi in vitro. *South African Journal of Plant and Soil*, 26(1), 55–57. <http://doi.org/10.1080/02571862.2009.10639934>
- Boix-Ruiz, A., Gálvez-Patón, L., de Cara-García, M., Palmero-Llamas, D., Camacho-Ferre, F., & Tello-Marquina, J. C. (2015). Comparison of analytical techniques used to identify tomato-pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Phytoparasitica*. <http://doi.org/10.1007/s12600-014-0444-z>
- Burra, D., Berkowitz, O., Hedley, P. E., Morris, J., Resjö, S., Levander, F., ... Alexandersson, E. (2014). Phosphite-induced changes of the transcriptome and secretome in *Solanum tuberosum* leading to resistance against *Phytophthora infestans*. *BMC Plant Biology*, 14(1), 254. <http://doi.org/10.1186/s12870-014-0254-y>
- Burra, D. D. (2016). *Defence related molecular signalling in Potato* (Universita).
- Cai, K., Gao, D., Chen, J., & Luo, S. (2009). Probing the mechanisms of silicon-mediated pathogen resistance. *Plant Signaling & Behavior*, 4(1), 1–3. <http://doi.org/10.4161/psb.4.1.7280>
- Caixeta, A. D. O., Vieira, B. S., & Canedo, É. J. (2012). Efeito do fosfito de potássio sobre fungos fitopatogênicos do feijoeiro, (3), 35–43.
- Çak, B., & Yolageldi, L. (2014). Response to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato roots involves regulation of SA- and ET-responsive gene expressions, 379–391. <http://doi.org/10.1007/s10658-014-0394-9>

- Cardona, A. O. (2018). Antioquia y Norte de Santander son los departamentos líderes en la producción de tomate. *Miércoles, 23 de Mayo de 2018*.
- Carmona, M. A., Sautua, F. J., Grijalba, P. E., Cassina, M., & Pérez-Hernández, O. (2017). Effect of potassium and manganese phosphites in the control of *Pythium damping-off* in soybean: a feasible alternative to fungicide seed treatments. *Pest Management Science, 74*(2), 366–374. <http://doi.org/10.1002/ps.4714>
- Carmona, M., & Sautua, F. (2017). In vitro antifungal / fungistatic activity of manganese phosphite against soybean soil-borne pathogens. *International Journal of Experimental Botany, 9457*(December), 265–269.
- Carrillo-fasio, J. A., Estrada, G., Enrique, J., Ortega, C., Márquez, I., Adriana, Z., ... Sañudo-barajas, J. (2003). Razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Snyder y Hansen, en Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en el Valle de Culiacán, Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología, 21*, 123–127.
- Castaño Monsalve, J., Ramírez Gil, J. G., Patiño Hoyos, L. F., & Morales Osorio, J. G. (2015). Alternativa para el manejo de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary en *Solanum betaceum* Cav. mediante inductores de resistencia. *Revista de Protección Vegetal, 30*(3), 204–212. Retrieved from http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522015000300006&lang=pt
- Castro, L. rosalez. (2017). *Efecto del Silicio en la Micromorfología de Plantas de Tomate (Solanum lycopersicum L) Inoculadas con Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO.
- Cerqueira, A., Alves, A., Berenguer, H., Correia, B., Gómez-Cadenas, A., Diez, J. J., ... Pinto, G. (2017). Phosphite shifts physiological and hormonal profile of Monterey pine and delays *Fusarium circinatum* progression. *Plant Physiology and Biochemistry, 114*, 88–99. <http://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.02.020>
- Chiang, K. S., Liu, H. I., Tsai, J. W., Tsai, J. R., & Bock, C. H. (2017). A discussion on disease severity index values. Part II: using the disease severity index for null hypothesis testing. *Annals of Applied Biology, 171*(3), 490–505. <http://doi.org/10.1111/aab.12396>
- DANE. (2014). Departamento Administrativo Nacional de Estadística - DANE - Gobierno Nacional.
- Dean, R. A., Lichens-Park, A., & Kole, C. (2014). Genomics of plant-associated fungi and oomycetes: Dicot pathogens. *Genomics of Plant-Associated Fungi and Oomycetes: Dicot Pathogens*, 1–239. <http://doi.org/10.1007/978-3-662-44056-8>
- Dean, R., Van Kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., ... Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology, 13*(4), 414–430. <http://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
- Debona, D., Rodrigues, F. A., & Datnoff, L. E. (2017). Silicon's Role in Abiotic and Biotic Plant Stresses. *Annual Review of Phytopathology, 55*(1), 85–107. <http://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035312>
- Deliopoulos, T., Kettlewell, P. S., & Hare, M. C. (2010). Fungal disease suppression by

- inorganic salts: A review. *Crop Protection*, 29(10), 1059–1075. <http://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.05.011>
- Di Pietro, A., Madrid, M. P., Caracuel, Z., Delgado-Jarana, J., & Roncero, M. I. G. (2003). Fusarium oxysporum: Exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Molecular Plant Pathology*, 4(5), 315–325. <http://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00180.x>
- Espitia E. (2014). *Tecnologías de producción limpia ajustadas a los modelos agronómicos bajo condiciones protegidas de tomate, guisante y pimentón. Informe técnico final de producto. CORPOICA.*
- Felipini, R. B., Boneti, J. I., Katsurayama, Y., Neto, A. C. R., Veleirinho, B., Maraschin, M., & Di Piero, R. M. (2016). Apple scab control and activation of plant defence responses using potassium phosphite and chitosan. *European Journal of Plant Pathology*, 145(4), 929–939. <http://doi.org/10.1007/s10658-016-0881-2>
- Fenn, M. E. (1984). Studies on the In Vitro and In Vivo Antifungal Activity of Fosetyl-Al and Phosphorous Acid. *Phytopathology*, 74, 606. <http://doi.org/10.1094/Phyto-74-606>
- Förster, H., Adaskaveg, J. E., Kim, D. H., & Stanghellini, M. E. (1998). Effect of phosphite on tomato and pepper plants and on susceptibility of pepper to phytophthora root and crown rot in hydroponic culture. *Plant Disease*, 82(10), 1165–1170. <http://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.10.1165>
- Garzón, C. D., & Flores, F. J. (2013). Fungicides - Showcases of Integrated Plant Disease Management from Around the World, 311–328. <http://doi.org/10.5772/3251>
- Gillardi, giovanna; Demarchi, Maria; Gullinio, Lodovica y Garibaldi, A. (n.d.). Effetto dei fosfiti nei confronti di differenti patogeni fogliari e radicali di colture orticole.
- Gomes, G., Sobrinho, R., Rodrigues, G. B., Santos, A., Cintra, W., Junior, D. J., & Novaes, S. De. (2016). Efeito de fosfito de potássio no crescimento e na densidade micelial do Fusarium solani do maracujazeiro, 180–182.
- Gómez, F. C., & Trejo, L. I. (2015). Biostimulant activity of phosphite in horticulture. *Scientia Horticulturae*, 196, 82–90. <http://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.035>
- Gómez-Merino, F. C., & Trejo-Téllez, L. I. (2015). Biostimulant activity of phosphite in horticulture. *Scientia Horticulturae*, 196, 82–90. <http://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.035>
- Gordon, T. R. (2017). Fusarium oxysporum and the Fusarium Wilt Syndrome.pdf. *The Annual Review of Phytopathology Is Online at Phyto.annualreviews.org*, Annu. Rev. Phytopathol. 2017. 55:23–39 First. <http://doi.org/https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-095919>
- Han, Y., Li, P., Gong, S., Yang, L., Wen, L., & Hou, M. (2016). Defense Responses in Rice Induced by Silicon Amendment against Infestation by the Leaf Folder Cnaphalocrocis medinalis. *PloS One*, 11(4), e0153918. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0153918>
- Heine, G., Tikum, G., & Horst, W. J. (2007). The effect of silicon on the infection by and spread of Pythium aphanidermatum in single roots of tomato and bitter gourd. *Journal of Experimental Botany*, 58(3), 569–577. <http://doi.org/10.1093/jxb/erl232>

- Hofgaard, I. S., Ergon, Å., Henriksen, B., & Tronsmo, A. M. (2010). The effect of potential resistance inducers on development of *Microdochium majus* and *Fusarium culmorum* in winter wheat. *European Journal of Plant Pathology*, *128*(2), 269–281. <http://doi.org/10.1007/s10658-010-9662-5>
- Horinouchi, H., Watanabe, H., Taguchi, Y., Muslim, A., & Hyakumachi, M. (2011). Biological control of Fusarium wilt of tomato with *Fusarium equiseti* GF191 in both rock wool and soil systems. *BioControl*. <http://doi.org/10.1007/s10526-011-9369-3>
- Houterman PM, Speijer D, Dekker HL, DE Koster CG, Cornelissen BJ, R. M. (2007). The mixed xylem sap proteome of *Fusarium oxysporum*-infected tomato plants. *Molecular Plant Pathology*, *2*, 215–221.
- Houterman, P. M., Cornelissen, B. J. C., & Rep, M. (2008). Suppression of plant resistance gene-based immunity by a fungal effector. *PLoS Pathogens*, *4*(5), e1000061. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000061>
- Huang, C.-H., Roberts, P. D., & Datnoff, L. E. (2011). Silicon Suppresses Fusarium Crown and Root Rot of Tomato. *Phytopathology*, *159*(7-8), 546–554.
- ICA. (2018). Registros fertilizantes - agosto 2018. In *Instituto Colombiano Agropecuario* (pp. 1–3831).
- Intagri. (2011). Uso de Fosfitos en la Agricultura. *Ipni*, pp. 1–2.
- Jaramillo, J. E., Noreña, Patricia, V., Luis, R., Gil, F., María, V., ... Arroyave, G. (2012). *Tecnología para el cultivo de toamte bajo condiciones protegidas*. Bogotá D.C. Retrieved from www.corpoica.org.co
- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*. <http://doi.org/10.1038/nature05286>
- Jost, R., Pharmawati, M., Lapis-gaza, H. R., & Rossig, C. (2015). Differentiating phosphate-dependent and phosphate-independent systemic phosphate-starvation response networks in *Arabidopsis thaliana* through the application of phosphite. <http://doi.org/10.1093/jxb/erv025>
- Kiirika, L. M., Stahl, F., & Wydra, K. (2013). Phenotypic and molecular characterization of resistance induction by single and combined application of chitosan and silicon in tomato against *Ralstonia solanacearum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *81*, 1–12. <http://doi.org/10.1016/j.pmpp.2012.11.002>
- Kim, S. G., Hur, O. S., Ro, N. Y., Ko, H. C., Rhee, J. H., Sung, J. S., ... Baek, H. J. (2016). Evaluation of resistance to *Ralstonia solanacearum* in tomato genetic resources at seedling stage. *Plant Pathology Journal*, *32*(1), 58–64. <http://doi.org/10.5423/PPJ.NT.06.2015.0121>
- Kromann, P., Pérez, W. G., Taípe, A., Schulte-Geldermann, E., Sharma, P. B., Andrade-Piedra, J. L., & Forbes, G. A. (2012). Use of phosphonate to manage foliar potato late blight in developing countries. *Plant Disease*, *96*(7), 1008–1015. <http://doi.org/10.1094/PDIS-12-11-1029-RE>
- Kusunoki, M., & Beltrán-Acosta, C; Zuluaga-Mogollon, M.v; Cote-Prado, A. M. (2012). *Guía de Experimentos de fitopatología*. Corpoica y JICA.

- Lagopodi, A. L., Ram, A. F. J., Lamers, G. E. M., Punt, P. J., Hondel, C. A. M. J. J. Van Den, Lugtenberg, B. J. J., & Bloemberg, G. V. (2002). Novel Aspects of Tomato Root Colonization and Infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* Revealed by Confocal Laser Scanning Microscopic Analysis Using the Green Fluorescent Protein as a Marker. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *15*(2), 172–179.
- Lee, J., Tan, W., & Ting, A. (2014). Revealing the antimicrobial and enzymatic potentials of culturable fungal endophytes from tropical pitcher plants (*Nepenthes* spp.). *Mycosphere*, *5*(2), 364–377. <http://doi.org/10.5943/mycosphere/5/2/10>
- Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2007). *The Fusarium Laboratory Manual. The Fusarium Laboratory Manual*. <http://doi.org/10.1002/9780470278376>
- Liang, Y., Sun, W., Zhu, Y. G., & Christie, P. (2007). Mechanisms of silicon-mediated alleviation of abiotic stresses in higher plants: A review. *Environmental Pollution*. <http://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.06.008>
- Lievens, B., van Baarlen, P., Verreth, C., van Kerckhove, S., Rep, M., & Thomma, B. P. H. J. (2009). Evolutionary relationships between *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* isolates inferred from mating type, elongation factor-1 α and exopolygalacturonase sequences. *Mycological Research*. <http://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.07.019>
- Lobato, M. C., Olivieri, F. P., Altamiranda, E. A. G., Wolski, E. A., Daleo, G. R., Caldiz, D. O., & Andreu, A. B. (2008). Phosphite compounds reduce disease severity in potato seed tubers and foliage. *European Journal of Plant Pathology*. <http://doi.org/10.1007/s10658-008-9299-9>
- Lobato, M. C., Olivieri, F. P., Andreu, A. B., & Daleo, G. R. (2010). Antimicrobial activity of phosphites against different potato pathogens antimikrobielle aktivität von phosphiten gegenüber verschiedenen kartoffelpathogenen. *Journal of Plant Diseases and Protection*, *117*(3), 102–109. <http://doi.org/10.1007/BF03356343>
- Loera-Quezada, M. (2014). *Phosphite cannot be used as a phosphorus source but is non-toxic for microalgae Maribel*. <http://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.11.015>
- López-Arredondo, D. L., & Herrera-Estrella, L. (2012). Engineering phosphorus metabolism in plants to produce a dual fertilization and weed control system. *Nature Biotechnology*, *30*(9), 889–893. <http://doi.org/10.1038/nbt.2346>
- Lovatt, C.J, Mikkelsen, R. L. (2006). Phosphites and Phosphates : When Distributors and Growe. *Products and Trends*, 6.
- M. Rep, M. Meijer, P. M. Houterman, H. C. van der Does, and B. J. C. C. (2005). *Fusarium oxysporum* evades I-3-mediated resistance without altering the matching avirulence gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *18*(1), 15–23. <http://doi.org/10.1094/MPMI-18-0015>.
- Machinandiarena, M. F., Lobato, M. C., Feldman, M. L., Daleo, G. R., & Andreu, A. B. (2012). Potassium phosphite primes defense responses in potato against *Phytophthora infestans*. *Journal of Plant Physiology*, *169*(14), 1417–1424. <http://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.05.005>
- Manikandan, R., Harish, S., Karthikeyan, G., & Raguchander, T. (2018). Comparative

- proteomic analysis of different isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* to exploit the differentially expressed proteins responsible for virulence on tomato plants. *Frontiers in Microbiology*, 9(MAR), 1–13. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00420>
- Martinez-medina, A., Flors, V., Heil, M., Mauch-mani, B., & Pieterse, C. M. J. (2016). Recognizing Plant Defense Priming. *Trends in Plant Science*, 21(10), 818–822. <http://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.07.009>
- McDonald, A. E., Grant, B. R., & Plaxton, W. C. (2001). Phosphite (phosphorous acid): Its relevance in the environment and agriculture and influence on plant phosphate starvation response. *Journal of Plant Nutrition*, 24(10), 1505–1519. <http://doi.org/10.1081/PLN-100106017>
- McGovern, R. J. (2015). Management of tomato diseases caused by *Fusarium oxysporum*. *Crop Protection*, 73, 78–92. <http://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.02.021>
- Monsalve, J. V., Rosero, S. E. V., Cardenas, N. J. R., & Duarte, F. O. T. (2012). Efecto del Fosfito de Potasio en Combinación con el Fungicida Metalaxyl + Mancozeb en el Control de Mildeo Velloso (*Peronospora destructor* Berk) en Cebolla de Bulbo (*Allium cepa* L.). *Rev.Fac.Agr.Medellin*, 65(14), 6317–6325.
- Nirmaladevi, D., Venkataramana, M., Srivastava, R. K., Uppalapati, S. R., Gupta, V. K., Yli-Mattila, T., ... Chandra, N. S. (2016). Molecular phylogeny, pathogenicity and toxigenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Scientific Reports*, 6(November 2015), 1–14. <http://doi.org/10.1038/srep21367>
- Ouimette, D. G., & Coffey, M. D. (1990). Symplastic entry and phloem translocation of phosphonate. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 38(1), 18–25. [http://doi.org/10.1016/0048-3575\(90\)90143-P](http://doi.org/10.1016/0048-3575(90)90143-P)
- Pedroza, A., & Samaniego, J. (2009). Analisis del area bajo la curva del progreso de las enfermedades (ABCPE) en patosistemas agrícolas. *Tópicos Selectos de Estadística Alpicados a La Fitosanidad*, (September), 6–16. <http://doi.org/10.13140/2.1.4475.7767>
- Producción De Tomate, E. LA, & Jaramillo Viviana P Rodríguez Miryam Guzmán A Miguel Zapata C Teresita Rengifo M, J. N. (2007). *BUENAS PRÁCTICAS AGRÍCOLAS (BPA) BAJO CONDICIONES PROTEGIDAS*.
- Puerari, H. H., Dias-arieira, C. R., Diullen, O., & Brito, C. (2015). Resistance inducers in the control of root lesion nematodes in resistant and susceptible cultivars of maize. *Phytobiomes*, 43, 383–389. <http://doi.org/10.1007/s12600-014-0447-9>
- Raigosa, G., Mesa, A., Cristina, M., Villegas, J., Estela, L., Montoya, M., ... Mora, L. (2009). Genetic variability of isolates of *Phytophthora infestans* (Mont .) de Bary in solanaceorus crops. *Revista Facultad Nacional de Agronomía - Medellín*, vol. 62, n, pp. 4761–4771.
- Ramyabharathi, S. A., Meena, B., & Raguchander, T. (2012). Induction of chitinase and β - 1 , 3-glucanase PR proteins in tomato through liquid formulated *Bacillus subtilis* EPCO 16 against *Fusarium* wilt, 1(1), 50–60.
- Ratjen, A. M., & Gerendás, J. (2009). A critical assessment of the suitability of phosphite as a source of phosphorus, 821–828. <http://doi.org/10.1002/jpln.200800287>

- Raza, W., Ling, N., Zhang, R., Huang, Q., Xu, Y., & Shen, Q. (2017). Success evaluation of the biological control of Fusarium wilts of cucumber, banana, and tomato since 2000 and future research strategies. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(2), 202–212. <http://doi.org/10.3109/07388551.2015.1130683>
- Rep, M. (2005). Small proteins of plant-pathogenic fungi secreted during host colonization. *FEMS Microbiology Letters*, 253(1), 19–27. <http://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.09.014>
- Rodrigues, F. A., & Datnoff, L. E. (2015). *Silicon and plant diseases*. (Springer, Ed.), *Silicon and Plant Diseases*. New York. <http://doi.org/10.1007/978-3-319-22930-0>
- Romero, A., Munévar, F., & Cayón, G. (2011). Silicon and plant diseases. A review. *Agronomía Colombiana*, 29(3), 473–480.
- Rongai, D., Pulcini, P., Pesce, B., & Milano, F. (2017). Antifungal activity of pomegranate peel extract against fusarium wilt of tomato. *European Journal of Plant Pathology*, 147(1), 229–238. <http://doi.org/10.1007/s10658-016-0994-7>
- Rosgen, J., Pettitt, B. M. ., & Bolen, D. W. . (2007). 1 Phenotypic characterization of genetically distinct *Phytophthora cinnamomi* isolates from avocado. *Protein Science* (Vol. 16). <http://doi.org/10.1161/01.STR.32.1.139>
- Rosyidah, A., Murwani, I., & Siswadi, B. (2017). Effect of the use of Potassium Fertilizer on the Resistance and Growth of Tomato to Bacterial Wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology (IJEAB)*, 1(4).
- Sanchez-Vallet, A., Lopez, G., Ramos, B., Delgado-Cerezo, M., Riviere, M.-P., Liorente, F., ... Molina, A. (2012). Disruption of abscisic acid signalling constitutively activates Arabidopsis resistance to the necrotrophic fungus *Plectosphaerella cucumerina*. *Plant Physiology*, 160(December), 2109–2124. <http://doi.org/10.1104/pp.112.200154>
- Scott, P. M., Barber, P. A., & Hardy, G. E. S. J. (2015). Novel phosphite and nutrient application to control *Phytophthora cinnamomi* disease. *Australasian Plant Pathology*, 44(4), 431–436. <http://doi.org/10.1007/s13313-015-0365-4>
- Sidharthan, V. K., Aggarwal, R., Surenthiran, N., & Shanmugam, V. (2018). Selection and Characterization of the Virulent *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Isolate Inciting Vascular Wilt of Tomato. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 7(2), 1749–1756. <http://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.702.212>
- Solanki, V. H.; Patel, R. M.; Patel, K. G. (2015). Biochemical alteration in tomato varieties resistant and susceptible to *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*.
- Tambascio, C., Covacevich, F., Lobato, M. C., De Lasa, C., Caldiz, D., Dosio, G., & Andreu, A. (2014). The Application of K Phosphites to Seed Tubers Enhanced Emergence, Early Growth and Mycorrhizal Colonization in Potato (*Solanum tuberosum*). *American Journal of Plant Sciences*, 5(January), 132–137. <http://doi.org/10.4236/ajps.2014.51017>
- Tans-Kersten, H. H. H. and C. A. (2001). *Ralstonia solanacearum* Needs Motility for Invasive Virulence on Tomato. *Journal of Bacteriology*, 183(12), 3597–3605. <http://doi.org/10.1128/JB.183.12.3597>

- Telenchana-Guangasi Eduardo, L. (2011). *Evaluación de fosfitos potásicos (Fitoalexin y Atlante) en la prevención de enfermedades.*
- Thao, H. T. B., & Yamakawa, T. (2009). Phosphite (phosphorous acid): Fungicide, fertilizer or bio-stimulator? *Soil Science and Plant Nutrition*, 55(2), 228–234. <http://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2009.00365.x>
- Trejo-téllez, L. I., & Gómez-merino, F. C. (2018). Phosphite as an Inductor of Adaptive Responses to Stress and Stimulator of Better Plant Performance, 203–238.
- van der Does, H. C., Constantin, M. E., Houterman, P. M., Takken, F. L. W., Cornelissen, B. J. C., Haring, M. A., ... Rep, M. (2018). Fusarium oxysporum colonizes the stem of resistant tomato plants, the extent varying with the R-gene present. *European Journal of Plant Pathology*. <http://doi.org/10.1007/s10658-018-1596-3>
- Vargas-Hernandez, M., Macias-Bobadilla, I., Guevara-Gonzalez, R. G., Romero-Gomez, S. de J., Rico-Garcia, E., Ocampo-Velazquez, R. V., ... Torres-Pacheco, I. (2017). Plant Hormesis Management with Biostimulants of Biotic Origin in Agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 8(October), 1–11. <http://doi.org/10.3389/fpls.2017.01762>
- Veronica, D., Renata, A. A. dos S., Arthur, S. B. L., Marcelo, B. da S., Adriano, A. F., & Antelmo, R. F. (2016). Evaluation of in vitro inhibition of mycelial growth of Fusarium solani f. sp. piperis by different products in Brazil. *African Journal of Microbiology Research*. <http://doi.org/10.5897/AJMR2016.8292>
- Villa-Martínez, A., Morales-morales, Hugo Armando., Pérez-Leal, R., & Soto-parra, Juan Manuel., Basurto-Sotelo, M. y E. M.-E. (2015). Situación actual en el control de Fusarium spp . y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agronomica*, 64(2), 194–205. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.15446/acag.v64n2.43358>
- Villa-Martínez, A., Pérez-Leal, R., Morales-Morales, H. A., Ba-Surto-Sotelo, M., Soto-Parra, J. M., & Martínez-Escudero, E. (2014). Situación actual en el control de Fusarium spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agronomica*. <http://doi.org/10.15446/acag.v64n2.43358>
- Volcy, C. (2008). Génesis y evolución de los postulados de Koch y su relación con la fitopatología. Una revisión. *Agronomía Colombiana*, 26(1), 9.
- Wang, L., Cai, K., Chen, Y., & Wang, G. (2013). Silicon-mediated tomato resistance against Ralstonia solanacearum is associated with modification of soil microbial community structure and activity. *Biological Trace Element Research*, 152(2), 275–283. <http://doi.org/10.1007/s12011-013-9611-1>
- Wang, M., Zheng, Q., Shen, Q., & Guo, S. (2013). The Critical Role of Potassium in Plant Stress Response. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 7370–7390. <http://doi.org/10.3390/ijms14047370>
- Whan, J. A., Dann, E. K., & Aitken, E. A. B. (2016). Effects of silicon treatment and inoculation with Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum on cellular defences in root tissues of two cotton cultivars. *Annals of Botany*, 118(2), 219–226. <http://doi.org/10.1093/aob/mcw095>
- Yáñez-Juárez Moisés Gilberto, Carlos Alfonso López-Orona, F. A.-T., Partida-, L., &

- Ruvalcaba, T. de J. V.-A. y R. M.-L. (2018). Los fosfitos como alternativa para el manejo de problemas fitopatológicos Phosphites as alternative for the management of phytopathological problems Los fosfitos como alternativa para el manejo de problemas fitopatológicos, (January), 80–95. <http://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1710-7>
- Zhou, X., Shen, Y., Fu, X., & Wu, F. (2018). Application of Sodium Silicate Enhances Cucumber Resistance to Fusarium Wilt and Alters Soil Microbial Communities. *Frontiers in Plant Science*, 9(May), 1–12. <http://doi.org/10.3389/fpls.2018.00624>