



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
CARRERA AGRONOMÍA

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE *Bacillus subtilis* F. Cohn EN EL
CRECIMIENTO DE SIETE CEPAS DE HONGOS BENÉFICOS EN
CONDICIONES *IN VITRO***

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERO AGRÓNOMO

AUTOR:

ALEXIS SANTIAGO PALLMAY MOROCHO

Riobamba – Ecuador

2023



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
CARRERA AGRONOMÍA

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE *Bacillus subtilis* F. Cohn EN EL
CRECIMIENTO DE SIETE CEPAS DE HONGOS BENÉFICOS EN
CONDICIONES *IN VITRO***

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERO AGRÓNOMO

AUTOR: ALEXIS SANTIAGO PALLMAY MOROCHO

DIRECTORA: ING. NORMA ERAZO SANDOVAL Ph.D

Riobamba – Ecuador

2023

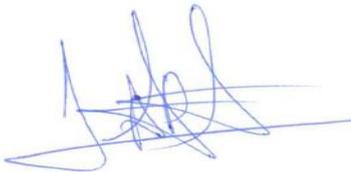
© 2023, Alexis Santiago Pallmay Morocho

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Yo, Alexis Santiago Pallmay Morocho, declaro que el presente Trabajo de Integración Curricular es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autor asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este Trabajo de Integración Curricular; el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 2 de junio de 2023

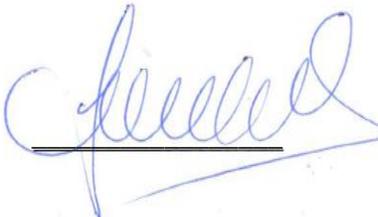
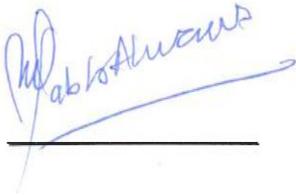


Alexis Santiago Pallmay Morocho

060595522-8

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
CARRERA AGRONOMÍA

El Tribunal del Trabajo de Integración Curricular certifica que: El Trabajo de Integración Curricular; tipo: Proyecto de Investigación, **EVALUACIÓN DEL EFECTO DE *Bacillus subtilis* F. Cohn EN EL CRECIMIENTO DE SIETE CEPAS DE HONGOS BENÉFICOS EN CONDICIONES *IN VITRO***, realizado por el señor: **ALEXIS SANTIAGO PALLMAY MOROCHO**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Integración Curricular, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
Ing. Victor Alberto Lindao Cordova Ph.D. PRESIDENTE DEL TRIBUNAL		2023-06-02
Ing. Norma Soledad Erazo Sandoval Ph.D. DIRECTORA DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR		2023-06-02
Ing. Pablo Israel Álvarez Romero Ph.D. ASESOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR		2023-06-02

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a mis padres, María Morocho y Ángel Pallmay, quienes han sido mi apoyo constante en mi recorrido académico, inculcándome confianza y dedicación. También quiero dedicarla a mis hermanos, Gladys, Myriam, José Luis, Alex, Angy, Edison, Gaby, Cristian y mi padrino Ernesto quienes han estado a mi lado brindándome su apoyo incondicional y sus palabras de aliento, ayudándome a crecer como persona. Por último, quiero expresar mi gratitud a mis amigos, quienes han sido leales y han brindado su apoyo en los momentos difíciles. Valoraré su amistad y siempre los llevaré en mi corazón.

Alexis

AGRADECIMIENTO

Doy gracias a Dios por haberme bendecido con esta vida y por haber sido mi guía constante en todas las etapas de mi existencia. También quiero expresar mi gratitud hacia mis padres y hermanos, quienes confiaron y creyeron en mí. Asimismo, agradezco a los docentes de la Carrera de Agronomía de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, quienes han compartido sus conocimientos y me han guiado con paciencia y rectitud. Quiero expresar mi agradecimiento de manera especial a la PhD. Norma Erazo, PhD. Pablo Álvarez e Ingeniera Gabriela Rosero, quienes han sido una fuente de inspiración y motivación durante todo el proceso de ejecución del presente trabajo.

Alexis

ÍNDICE DE CONTENIDO

INDICE DE TABLAS.....	xi
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	xiii
ÍNDICE DE ANEXOS	xiv
RESUMEN.....	xv
SUMMARY	xvi
INTRODUCCIÓN	1

CAPÍTULO I

1. PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN.....	2
1.1 Planteamiento del problema.....	2
1.2 Objetivos	2
1.2.1 <i>Objetivo general</i>	2
1.2.2. <i>Objetivos específicos</i>	2
1.3 Justificación	2
1.4 Hipótesis.....	3
1.4.1 <i>Nula</i>	3
1.4.2 <i>Alternativa</i>	3

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO	4
2.1 <i>Bacillus subtilis</i>	4
2.1.1 <i>Generalidades</i>	4
2.1.2 <i>Taxonomía</i>	4
2.1.3 <i>Características morfológicas</i>	4
2.1.4 <i>Metabolismo de Bacillus subtilis</i>	5
2.1.5 <i>Producción de metabolitos de Bacillus subtilis</i>	5

2.1.5.1	<i>Producción de antibióticos</i>	5
2.1.5.2	<i>Producción de compuestos volátiles</i>	6
2.1.5.3	<i>Producción de enzimas líticas</i>	6
2.1.6	<i>Aplicaciones en el campo</i>	6
2.2	Hongos benéficos	6
2.2.1	<i>Generalidades</i>	6
2.2.2	<i>Aplicaciones en la agricultura</i>	7
2.2.3	<i>Hongos nematófagos</i>	7
2.2.3.1	<i>Hongos atrapadores de nematodos</i>	8
2.2.3.2	<i>Arthrobotrys sp</i>	9
2.2.3.3	<i>Arthrobotrys oligospora</i>	10
2.2.3.4	<i>Arthrobotrys musiformis</i>	10
2.2.3.5	<i>Arthrobotrys conoides</i>	10
2.2.4	<i>Hongos entomopatógenos</i>	11
2.2.4.1	<i>Beauveria bassiana</i>	12
2.2.4.2	<i>Metarhizium anisopliae</i>	13
2.2.5	<i>Trichoderma spp.</i>	14
2.2.5.1	<i>Trichoderma harzianum</i>	15
2.3	Mecanismos antagónicos	16
2.3.1	<i>Competencia</i>	16
2.3.2	<i>Antibiosis</i>	16
2.3.3	<i>Hiperparasitismo</i>	16
2.4	Producción in vitro	16
2.4.1	<i>Medios de cultivo</i>	17

CAPÍTULO III

3	MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1	Características del lugar	18
3.1.1	<i>Localización</i>	18

3.1.2	<i>Ubicación geográfica</i>	18
3.2	Materiales y equipos	18
3.2.1	<i>Materiales oficina</i>	18
3.2.2	<i>Materiales de laboratorio</i>	18
3.2.3	<i>Equipos de laboratorio</i>	19
3.2.4	<i>Equipos de oficina</i>	19
3.2.5	<i>Reactivos</i>	19
3.3	Métodos	20
3.3.1	<i>Microorganismos empleados</i>	20
3.3.2	<i>Medio de cultivo</i>	20
3.3.2.1	<i>Preparación del medio de cultivo</i>	20
3.3.3	<i>Reactivación de las cepas de hongos</i>	21
3.3.4	<i>Método dual</i>	21
3.3.5	<i>Método de compuestos volátiles</i>	22
3.3.5.1	<i>Método de compuestos volátiles (0 horas)</i>	22
3.3.5.2	<i>Métodos de compuestos volátiles (96 horas)</i>	22
3.3.6	<i>Cálculo del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial</i>	23
3.3.7	<i>Cálculo de la tasa de crecimiento</i>	23
3.3.8	<i>Porcentaje de inhibición de la esporulación</i>	23
3.3.9	<i>Características morfológicas</i>	24
3.4	Especificaciones del experimento	25
3.4.1	<i>Esquema del diseño experimental</i>	25
3.4.2	<i>Tratamientos</i>	25
3.5	Tipo de diseño	25
3.5.1	<i>Características del diseño</i>	25
3.5.2	<i>Esquema del análisis de varianza</i>	26
3.5.3	<i>Análisis estadístico</i>	26
3.5.4	<i>Análisis funcional</i>	26

CAPÍTULO IV

4	Marco de ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.....	27
4.1	<i>Procesamiento, análisis e interpretación de resultados</i>	27
4.1.1	<i>Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial</i>	27
4.1.1.1	<i>Método dual</i>	27
4.1.1.2	<i>Método de compuestos volátiles (0 horas)</i>	30
4.1.1.3	<i>Método de compuestos volátiles (96 horas)</i>	32
4.1.2	<i>Tasa de crecimiento micelial</i>	35
4.1.2.1	<i>Método dual</i>	35
4.1.2.2	<i>Método de compuestos volátiles (0 horas)</i>	37
4.1.2.3	<i>Método de compuestos volátiles (96 horas)</i>	39
4.1.3	<i>Porcentaje de inhibición de la esporulación de los hongos benéficos</i>	41
4.1.4	<i>Características morfológicas de los hongos benéficos</i>	43
4.2	Discusión	50
4.3	Comprobación de la hipótesis	54

CAPÍTULO V

5	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	55
5.1	Conclusiones	55
5.2	Recomendaciones	55

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

INDICE DE TABLAS

Tabla 1-2:	Clasificación taxonómica de <i>Bacillus subtilis</i>	4
Tabla 2-2:	Clasificación taxonómica de <i>Arthrobotrys</i> sp.	9
Tabla 3-2:	Clasificación taxonómica de <i>Beauveria bassiana</i>	12
Tabla 4-2:	Clasificación taxonómica de <i>Metarhizium anisopliae</i>	13
Tabla 5-2:	Clasificación taxonómica de <i>Trichoderma harzianum</i>	15
Tabla 6-3:	Procedencia de los microorganismos para la investigación.	20
Tabla 7-3:	Escala para el porcentaje de inhibición de micelio.....	23
Tabla 8-3:	Escala para el porcentaje de inhibición de la esporulación.	24
Tabla 9-3:	Escala de crecimiento descrita por Gómez (2018).	24
Tabla 10-3:	Tratamientos.	25
Tabla 11-3:	Esquema de análisis de varianza (ANOVA).	26
Tabla 12-3:	Prueba T para la tasa de crecimiento micelial.	26
Tabla 13-4:	Análisis de varianza para el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial vertical del método dual.	27
Tabla 14-4:	Prueba Tukey al 5% para el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial vertical del método dual.	28
Tabla 15-4:	Análisis de varianza para el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial horizontal del método dual.	29
Tabla 16-4:	Prueba Tukey al 5% para el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial horizontal del método dual.	29
Tabla 17-4:	Análisis de varianza para el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial vertical del método compuestos volátiles (0 horas).....	30
Tabla 18-4:	Prueba Tukey al 5% para el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial vertical del método compuestos volátiles (0 horas).....	31
Tabla 19-4:	Análisis de varianza para el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial horizontal del método compuestos volátiles (0 horas).	31
Tabla 20-4:	Prueba Tukey al 5% para el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial horizontal del método compuestos volátiles (0 horas).	32
Tabla 21-4:	Análisis de varianza para el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial vertical del método compuestos volátiles (96 horas).....	33
Tabla 22-4:	Prueba Tukey al 5% para el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial vertical del método compuestos volátiles (96 horas).....	33

Tabla 23-4:	Análisis de varianza para el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del horizontal del método compuestos volátiles (96 horas).	34
Tabla 24-4:	Prueba Tukey al 5% para el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial horizontal del método compuestos volátiles (96 horas).	35
Tabla 25-4:	Prueba T para la tasa de crecimiento micelial vertical en el método dual.	36
Tabla 26-4:	Prueba T para la tasa de crecimiento micelial horizontal en el método dual.	37
Tabla 27-4:	Prueba T para la tasa de crecimiento micelial vertical en el método compuestos volátiles (0 horas).	38
Tabla 28-4:	Prueba T para la tasa de crecimiento micelial horizontal en el método compuestos volátiles (0 horas).	39
Tabla 29-4:	Prueba T para la tasa de crecimiento micelial vertical en el método compuestos volátiles (96 horas).	40
Tabla 30-4:	Prueba T para la tasa de crecimiento micelial horizontal en el método compuestos volátiles (96 horas).	41
Tabla 31-4:	Análisis de varianza para el porcentaje de inhibición de la esporulación.	42
Tabla 32-4:	Prueba Tukey al 5% para el porcentaje de inhibición de la esporulación	42
Tabla 33-4:	Características macroscópicas y microscópicas de <i>A. oligospora</i> (PG01), en condiciones <i>in vitro</i>	43
Tabla 34-4:	Características macroscópicas y microscópicas de <i>A. oligospora</i> (CH02), en condiciones <i>in vitro</i>	44
Tabla 35-4:	Características macroscópicas y microscópicas de <i>A. musiformis</i> en condiciones <i>in vitro</i>	45
Tabla 36-4:	Características macroscópicas y microscópicas de <i>A. conoides</i> en condiciones <i>in vitro</i>	46
Tabla 37-4:	Características macroscópicas y microscópicas de <i>B. bassiana</i> en condiciones <i>in vitro</i>	47
Tabla 38-4:	Características macroscópicas y microscópicas de <i>M. anisopliae</i> en condiciones <i>in vitro</i>	48
Tabla 39-4:	Características macroscópicas y microscópicas de <i>T. harzianum</i> , en condiciones <i>in vitro</i>	49

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1-3:	Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial vertical de siete hongos benéficos en presencia de <i>B. subtilis</i> mediante el método dual.....	27
Ilustración 2-4:	Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial horizontal de siete hongos benéficos en presencia de <i>B. subtilis</i> mediante el método dual.....	28
Ilustración 3-4:	Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial vertical de siete hongos benéficos en presencia de <i>B. subtilis</i> mediante el método compuestos volátiles (0 horas).	30
Ilustración 4-4:	Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial horizontal de siete hongos benéficos en presencia de <i>B. subtilis</i> mediante el método compuestos volátiles (0 horas).	31
Ilustración 5-4:	Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial vertical de siete hongos benéficos en presencia de <i>B. subtilis</i> mediante el método compuestos volátiles (96 horas).	32
Ilustración 6-4:	Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial horizontal de siete hongos benéficos en presencia de <i>B. subtilis</i> mediante el método compuestos volátiles (96 horas).	34
Ilustración 7-4:	Tasa de crecimiento micelial vertical de siete hongos benéficos en presencia de <i>B. subtilis</i> mediante el método dual.....	35
Ilustración 8-4:	Tasa de crecimiento micelial horizontal de siete hongos benéficos en presencia de <i>B. subtilis</i> mediante el método dual.....	36
Ilustración 9-4:	Tasa de crecimiento micelial vertical de siete hongos benéficos en presencia de <i>B. subtilis</i> mediante el método de compuestos volátiles (0 horas).	37
Ilustración 10-4:	Tasa de crecimiento micelial horizontal de siete hongos benéficos en presencia de <i>B. subtilis</i> mediante el método de compuestos volátiles (0 horas).	38
Ilustración 11-4:	Tasa de crecimiento micelial vertical de siete hongos benéficos en presencia de <i>B. subtilis</i> mediante el método de compuestos volátiles (96 horas).	39
Ilustración 12-4:	Tasa de crecimiento micelial horizontal de siete hongos benéficos en presencia de <i>B. subtilis</i> mediante el método de compuestos volátiles (96 horas).	40
Ilustración 13-4:	Porcentaje de inhibición de la esporulación de siete hongos benéficos en presencia de <i>B. subtilis</i>	41

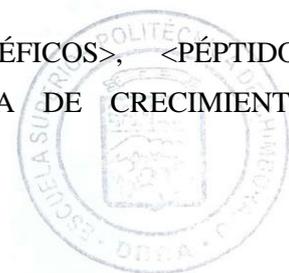
ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO.
- ANEXO B:** CEPAS DE LOS HONGOS UTILIZADOS EN LA INVESTIGACIÓN.
- ANEXO C:** REPIQUE DE HONGOS.
- ANEXO D:** HONGOS REPICADOS.
- ANEXO E:** ENFRENTAMIENTO ENTRE LA BACTERIA Y HONGOS BENÉFICOS.
- ANEXO F:** ALMACENAMIENTO DE LAS UNIDADES EXPERIMENTALES.
- ANEXO G:** PROCEDIMIENTO PARA LA INHIBICIÓN DE ESPORULACIÓN.
- ANEXO H:** CONTROLES 4 DÍAS DEL ENSAYO.
- ANEXO I:** CONTROLES CRECIMIENTO 100% DEL ENSAYO.
- ANEXO J:** MÉTODO DUAL TRATAMIENTOS FINALIZADO EL ENSAYO.
- ANEXO K:** MÉTODO COMPUESTOS VOLÁTILES (0 HORAS) TRATAMIENTOS FINALIZADO EL ENSAYO.
- ANEXO L:** MÉTODO COMPUESTOS VOLÁTILES (96 HORAS) TRATAMIENTOS FINALIZADO EL ENSAYO.
- ANEXO M:** INHIBICIÓN DE ESPORULACIÓN DE LOS HONGOS BENÉFICOS.
- ANEXO N:** DATOS DE LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO MICELIAL E INHIBICIÓN DE ESPORULACIÓN DE LOS HONGOS BENÉFICOS.
- ANEXO Ñ:** DATOS DE LA TASA DE CRECIMIENTO DE LOS HONGOS BENÉFICOS.

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de *Bacillus subtilis* F. Cohn, en el crecimiento de siete cepas de hongos benéficos en condiciones *in vitro*. Para lograr este objetivo, se llevó a cabo un estudio con enfoque cuantitativo y cualitativo, utilizando distintas metodologías, se utilizó *A. oligospora* (PG01), *A. oligospora* (CH02), *A. musiformis*, *A. conoides*, *B. bassiana*, *M. anisopliae* y *T. harzianum* para el estudio. Se midió el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial horizontal y vertical utilizando el método dual de Torres et al. (2018, pp. 239-245) y de compuestos volátiles de León et al. (2020, pp. 20-25), se recolectaron datos sobre la tasa de crecimiento micelial y la esporulación de los hongos. Además, se evaluaron las características morfológicas de los hongos para entender mejor el impacto de *Bacillus subtilis* en su desarrollo. Mediante el método dual se determinó que el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento micelial fue *A. musiformis* con 49,95% de inhibición vertical y 47,7% inhibición horizontal y *T. harzianum* presentó un porcentaje de inhibición micelial menor al 25%. En el método de compuestos volátiles *A. conoides* presentó un porcentaje de inhibición mayor al 50% y *M. anisopliae* presentó un porcentaje de inhibición micelial menor al 25%. En el método de compuestos volátiles (96 horas) *B. bassiana* presentó un porcentaje de inhibición mayor al 50% y *T. harzianum* presentó un porcentaje de inhibición micelial menor al 25%. Por lo tanto, se concluye que *Bacillus subtilis* provoca antagonismo en *A. oligospora* (PG01), *A. oligospora* (CH02), *A. musiformis*, *A. conoides*, *B. bassiana* y *M. anisopliae* mientras que la bacteria causó un efecto mínimo en *T. harzianum*. Se recomienda realizar pruebas en campo combinando *Bacillus subtilis* con *T. harzianum*.

Palabras clave: <*Bacillus subtilis*>, <HONGOS BENÉFICOS>, <PÉPTIDOS>, <LIPOPÉPTIDOS>, <INHIBICIÓN DE MICELIO>, <TASA DE CRECIMIENTO>, <MORFOLOGÍA>, <METABOLITOS SECUNDARIOS>.

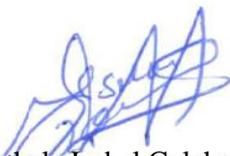


1151-DBRA-UPT-2023

SUMMARY

This research aimed to evaluate the effect of *Bacillus subtilis* F. Cohn on the growth of seven strains of beneficial fungi under *in vitro* conditions. A quantitative and qualitative study was carried out using different methodologies. *A. oligospora* (PG01), *A. oligospora* (CH02), *A. musiformis*, *A. conoides*, *B. bassiana*, *M. anisopliae* and *T. harzianum* were used for this study. The percentage inhibition of horizontal and vertical mycelial growth was measured using the dual method of Torres et al. (2018, pp. 239-245) and volatile compounds of León et al. (2020, pp. 20-25), data on mycelial growth rate and fungal sporulation were collected. In addition, the morphological characteristics of the fungi were evaluated to better understand the impact of *Bacillus subtilis* on their development. By dual method, the highest percentage of mycelial growth inhibition was determined for *A. musiformis* with 49.95% vertical inhibition and 47.7% horizontal inhibition and *T. harzianum* had a percentage of mycelial inhibition of less than 25%. In the method of volatile compounds, *A. conoides* showed a percentage of inhibition higher than 50% and *M. anisopliae* showed a percentage of mycelial inhibition lower than 25%. In the method of volatile compounds (96 hours), *B. bassiana* showed an inhibition percentage higher than 50% and *T. harzianum* showed a mycelial inhibition percentage lower than 25%. Therefore, it is concluded that *Bacillus subtilis* causes antagonism on *A. oligospora* (PG01), *A. oligospora* (CH02), *A. musiformis*, *A. conoides*, *B. bassiana* and *M. anisopliae* while the bacterium caused minimal effect on *T. harzianum*. It is recommended to carry out field trials combining *Bacillus subtilis* with *T. harzianum*.

Key words: <*Bacillus subtilis*>, <BENEFICIAL FUNGI>, <PEPTIDES>, <LIPOPEPTIDES>, <MYCELIAL INHIBITION>, <GROWTH RATE>, <MORPHOLOGY>, <SECONDARY METABOLITES>.



Esthela Isabel Colcha Guashpa

0603020678

INTRODUCCIÓN

La práctica de la agricultura convencional se vuelve progresivamente insostenible, impactando negativamente en aspectos ambientales, económicos y sociales en las áreas donde se lleva a cabo. El empleo excesivo de plaguicidas y fertilizantes químicos, junto con prácticas de cultivo inapropiadas y la expansión de la agricultura, han dañado ecosistemas y contribuido al aumento del efecto invernadero (Barquero et al., 2007: p. 12-14).

Usar microorganismos en el control biológico de patógenos que afectan los cultivos es una opción ecológica y eficaz que favorece una agricultura sostenible, ya que disminuye los problemas asociados a la utilización de plaguicidas y productos químicos (Ruiz et al., 2014: p.1326).

Se han realizado investigaciones centradas en encontrar microorganismos nativos que funcionen en las condiciones ambientales específicas de cada zona y que puedan emplearse para restaurar las interacciones del microbiota del suelo. De esta manera, podrían utilizarse como biofertilizantes y/o biocontroladores, atenuando el impacto de los agroquímicos y reduciendo los costos de producción (Orberá et al., 2014: p.7).

La agricultura moderna requiere disminuir el uso de agroquímicos e implementar sistemas sostenibles mediante el empleo de agentes de control biológico. Una alternativa es el uso de hongos para el manejo de nematodos e insectos, lo que representa una opción biológica relevante en la actualidad (Naranjo, 2008, p.123).

De acuerdo con Albuquerque (2008, p.211), ciertos microorganismos producen nutrientes que sirven de alimento para otros microorganismos. Las bacterias de la flora normal del organismo controlan el crecimiento de microorganismos dañinos. Se ha comprobado que las bacterias del género *Bacillus* tienen un alto potencial como antagonistas, principalmente debido a la gran cantidad de enzimas líticas, antibióticos y otras sustancias con actividad biocida que pueden generar efectos de control sobre diversas especies de organismos fitopatógenos (Sosa et al., 2005: pp.96-100).

CAPÍTULO I

1. PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN

1.1 Planteamiento del problema

No se dispone de suficiente información sobre el efecto de *Bacillus subtilis* F. Cohn, en el crecimiento de *Arthrobotrys oligospora* (PG01), *A. oligospora* (CH02), *A. musiformis* (CH01), *A. conoides* (PG02), *Beauveria bassiana* (A21), *Metarhizium anisopliae* (A13), *Trichoderma harzianum* (Th01) en el Ecuador. El estudio de la interacción entre microorganismos benéficos es importante porque puede mejorar la productividad agrícola e industrial, controlar enfermedades y plagas, promover la sostenibilidad ambiental.

1.2 Objetivos

1.2.1 *Objetivo general*

Evaluar el efecto de *Bacillus subtilis* F. Cohn, en el crecimiento de siete cepas de hongos benéficos en condiciones *in vitro*.

1.2.2 *Objetivos específicos*

- Evaluar el efecto antagónico de *Bacillus subtilis* F. Cohn, sobre las siete cepas de hongos benéficos.
- Determinar las características morfológicas de los hongos benéficos durante las pruebas de antagonismo.

1.3 Justificación

En nuestro país en la actualidad no existe la cantidad suficiente de información sobre la convivencia de microorganismos benéficos en un mismo entorno, por lo cual, se considera de gran importancia generar datos sobre el efecto de *Bacillus subtilis* F. Cohn en el crecimiento de hongos benéficos.

En los últimos años las investigaciones del efecto de *Bacillus subtilis* F. Cohn, se lo ha enfocado en el manejo en contra de los fitopatógenos, por lo cual, se ha debido realizar esta investigación que busca conocer el comportamiento de los hongos benéficos en presencia de la bacteria.

Al realizar esta investigación existe la posibilidad de identificar combinaciones efectivas de microorganismos que pueden mejorar la productividad agrícola y reducir la necesidad de utilizar pesticidas y fertilizantes químicos. Además, este tipo de investigación puede ser útil para promover la sostenibilidad ambiental en la producción agrícola e industrial.

1.4 Hipótesis

1.4.1 Nula

Bacillus subtilis F. Cohn, no demuestra ningún efecto antagónico en el crecimiento de las siete cepas de hongos benéficos.

1.4.2 Alternativa

Bacillus subtilis F. Cohn, demuestra algún efecto antagónico en el crecimiento de al menos en un hongo benéfico.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1 *Bacillus subtilis*

2.1.1 Generalidades

Las bacterias del género *Bacillus* se consideran muy eficaces para combatir enfermedades que afectan a hojas y raíces en los cultivos agrícolas. Estos microorganismos son considerados especialistas en colonización y su uso en el control de enfermedades fúngicas ha sido ampliamente estudiado (Fernández, 2001, p.97).

El género *Bacillus* se caracteriza por tener bordes levemente desiguales y aplanados que pueden ser de color blanco, ya sea opaco o brillante. Su textura puede variar entre seca, harinosa o mucosa (Larrea et al., 2015: p.145).

2.1.2 Taxonomía

Según muestra Ñacato y Valencia (2016, p.13), *Bacillus subtilis* se clasifica en:

Tabla 1-2: Clasificación taxonómica de *Bacillus subtilis*

Dominio	Bacteria
Filo	Firmicutes
Clase	Bacilli
Orden	Bacillales
Familia	<i>Bacillaceae</i>
Género	<i>Bacillus</i>
Especie	<i>Bacillus subtilis</i>

Fuente: (Biologie 2015; citado en Ñacato y Valencia, 2016, p.13).

Realizado por: Pallmay, Alexis, 2023.

2.1.3 Características morfológicas

La bacteria *Bacillus subtilis* es una bacteria con tinción Gram positiva, que crece a temperaturas moderadas, produce esporas de pared delgada con forma oval o cilíndrica, y tiene una capacidad fermentativa. Además, suele ser capaz de hidrolizar proteínas de la caseína y almidón. Históricamente, fue catalogada como una bacteria aerobia obligada (Biologie 2015; citado en Ñacato & Valencia, 2016, p.13).

Esta bacteria tiene la capacidad de producir endosporas extremadamente resistentes al calor y puede sobrevivir a temperaturas de 80°C a 100°C, además de resistir la sequía, heladas radiaciones y los químicos tóxicos. Debido a su resistencia, puede sobrevivir y ser aislada de una amplia variedad de sustratos (Márquez, 2001, p.3).

2.1.4 Metabolismo de *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis, pueden utilizar una gran variedad de fuentes de carbono adaptando sus vías metabólicas para los continuos cambios a su alrededor, haciéndolas capaces de competir de manera eficaz con otros microorganismos (Postma 1987; citado en Muñoz, 2009, p.19).

El metabolismo de *Bacillus subtilis*, se basa principalmente en la respiración y utiliza el oxígeno como aceptor final de electrones. En consecuencia, cuando se encuentra presente oxígeno, la bacteria crece abundantemente y produce 2,3-butanodiol, acetoína y CO₂ como sus principales productos (Layton et al., 2011: p.145).

2.1.5 Producción de metabolitos de *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis, produce una gran cantidad de lipopéptidos, metabolitos primarios o secundarios, con amplio espectro antibiótico. Dichos metabolitos son supresores efectivos de algunos patógenos de plantas (Ariza y Sánchez, 2012: pp.1-7).

2.1.5.1 Producción de antibióticos

Lantibióticos: Los lantibióticos son péptidos que contienen un aminoácido de tioéter llamado lantionina, junto con otros aminoácidos modificados *Bacillus subtilis* es capaz de producir varios lantibióticos, entre los que se incluyen la subtilina y la nisina (Guder et al., 2000; citado en Ramos, 2011, pp.14-17).

Iturinas: Los metabolitos lipopéptidos cíclicos de la clase iturina son altamente efectivos contra una amplia variedad de patógenos importantes, incluyendo levaduras. Estos compuestos actúan sobre la pared celular de los hongos y se caracterizan por ser anfifílicos y tener un heptapéptido cíclico compuesto por siete o diez aminoácidos (Guder et al., 2000; citado en Ramos, 2011, pp.14-17).

Surfactinas: Las surfactinas son conocidas por ser un biosurfactante altamente efectivo que reduce la tensión superficial, lo que las convierte en excelentes detergentes, emulsionantes y capaces de formar biofilms (Guder et al., 2000; citado en Ramos, 2011, pp.14-17).

2.1.5.2 Producción de compuestos volátiles

Los compuestos volátiles orgánicos (VOCs) son moléculas de bajo peso molecular, entre las que se incluyen aldehídos, alcoholes, cetonas, hidrocarburos, índoles, terpenos y jasmonatos. *Bacillus* spp. es capaz de producir varios VOCs, como benzotiazol, benzaldehído, fenilacetaldehído y 2,3-butanodiol, entre otros. Estos compuestos han demostrado tener propiedades antimicrobianas (Pedraza, et al., 2020, p. 118).

2.1.5.3 Producción de enzimas líticas

Las enzimas líticas producidas incluyen las quitinasas, β -1,3-glucanasas, peroxidasas, proteasas y lipasas. Las quitinasas y β -1,3-glucanasas son capaces de degradar la pared celular de los hongos, lo que puede llevar a la lisis celular en estos organismos. Además, la acción de estas enzimas puede liberar oligómeros de quitina y glucano, los cuales estimulan las defensas de la planta. (Pedraza, et al., 2020, p. 118).

2.1.6 Aplicaciones en el campo

Las endosporas son una estructura especializada de *Bacillus subtilis*, lo que les permite controlar enfermedades en cultivos de hortalizas al producir antibióticos antifúngicos como la bacitracina-A (Cuervo 2010; citado en Caicedo y Chacón, 2017, p.15).

Bacillus subtilis es reconocido como *Rhizobacterium* debido a que crea hormonas vegetales como el ácido indoleico, ácido abscísico, giberelinas y citoquininas, las cuales promueven el desarrollo de las raíces y la multiplicación de los pelos radiculares (Junges et al., 2013: p.521).

Junges et al., (2013, p. 521), mencionaron que la bacteria *Bacillus subtilis* forma una membrana alrededor de las semillas, lo que posibilita la adaptación fisiológica en diversos suelos, brindando apoyo a las plantas en su germinación y vitalidad.

2.2 Hongos benéficos

2.2.1 Generalidades

Los hongos son microorganismos que pueden tener una estructura unicelular, como la levadura, o una estructura multicelular, como las especies filamentosas. Su cuerpo está compuesto por células alargadas que están recubiertas por paredes celulares que contienen quitina y proteínas.

Estas células se agrupan en estructuras vegetativas llamadas hifas. Debido a su alta variabilidad genética y su capacidad para infectar una amplia gama de huéspedes, los hongos son un grupo de microorganismos muy diverso y complejo (Ferrera et al., 2012: p.250).

La pared celular de los hongos está compuesta principalmente por polisacáridos (80%), proteínas (3-20%), lípidos, pigmentos y sales inorgánicas en cantidades menores. La quitina es el polisacárido característico de la pared celular en hongos, y forma microfibrillas que le brindan rigidez y protección a la célula fúngica. Esta característica es esencial para la supervivencia y crecimiento de los hongos (Díaz et al., 2006: p.856-860).

2.2.2 Aplicaciones en la agricultura

Según Bravo (2018, p.29), el uso de hongos beneficiosos en la agricultura puede producir múltiples beneficios para la agricultura. Algunos de estos beneficios incluyen:

- Mejora de la capacidad de las plantas para soportar condiciones adversas como la falta de agua, variaciones de pH y salinidad del suelo.
- Reducción de la incidencia de enfermedades en las plantas y mayor resistencia a los patógenos del suelo como ácaros, nematodos y hongos.
- Mejora la estructura del suelo al crear agregados que aumentan la retención de agua, la aireación y la descomposición de la materia orgánica.

2.2.3 Hongos nematófagos

Los hongos nematófagos pueden capturar, parasitar o inmovilizar nematodos en todas las etapas de su ciclo de vida, lo que los convierte en importantes competidores de los nematodos patógenos de plantas o parásitos animales. Debido a esta posibilidad, existe un gran interés en utilizar estos hongos para diversos fines (Nordbring Hertz et al., 2006: pp.1-11).

Basándose en su mecanismo de infección Yang et al., (2007, pp.8379-8384), han subdividido comúnmente los hongos nematófagos en cuatro grupos principales:

- Hongos atrapadores de nematodos (con alrededor de 380 especies) que utilizan trampas especializadas para capturar nematodos de vida libre.

- Hongos endoparásitos (con unas 120 especies) que infectan a los nematodos mediante esporas adhesivas.
- Hongos productores de toxinas (con aproximadamente 270 especies) que secretan toxinas para inmovilizar a los nematodos después de penetrar su cutícula con sus hifas.
- Hongos parásitos de huevos y quistes, infectan estos estados con sus puntas hifales.

La mayoría de los hongos nematófagos actúan como parásitos obligados de nematodos. Estos hongos tienen la habilidad de parasitar e infectar a los nematodos mediante la producción de estructuras especializadas que capturan a los nematodos. Estas estructuras incluyen esporas adhesivas especializadas o apresorios en hifas especializadas que son capaces de penetrar la cutícula o caparazón de los huevos o quistes de los nematodos (Adam et al., 2014: pp.1-8).

Los parásitos obligados de los nematodos comienzan la infección a través de sus esporas, que pueden ser ingeridas y germinar en el sistema digestivo del nematodo, creciendo dentro de su pared celular, o adherirse a la cutícula del nematodo y penetrarlo directamente. La capacidad de los hongos nematófagos para capturar nematodos los convierte en candidatos atractivos como agentes de control de nematodos que son parásitos de plantas y animales. En este sentido, se han desarrollado varios nematicidas biológicos que han sido utilizados con éxito para el control de nematodos (Barron, 1997, p.5).

2.2.3.1 *Hongos atrapadores de nematodos*

Estos hongos tienen un crecimiento vegetativo en el suelo como saprófitos y la producción de trampas o redes puede iniciarse espontáneamente o en respuesta a estímulos ambientales, incluyendo péptidos y otros compuestos secretados por los nematodos (Yang et al., 2011: pp.1-12).

Las trampas pueden ser divididas en tres estructuras básicas: botones adhesivos, anillos constrictores y redes adhesivas. Estas estructuras pueden a su vez subdividirse en hifas ensanchadas adhesivas, botones adhesivos tanto pedicelados como no pedicelados, anillos tanto constrictores como no constrictores, redes bidimensionales y redes tridimensionales (Roberts, 1995, pp.199-221).

2.2.3.2 *Arthrobotrys* sp

Arthrobotrys sp. es un hongo depredador que pertenece a la familia *Orbiliaceae* y cuenta con un total de 71 especies en su género. Estos hongos son capaces de capturar y alimentarse de nematodos. El hongo depredador *Arthrobotrys* sp. desarrolla micelios en forma de argolla que pueden capturar a los nematodos, y segrega una sustancia adhesiva en la superficie de sus hifas que ayuda en la captura. A medida que el hongo crece, se forman redes de hifas y anillos que funcionan como verdaderas trampas para los nematodos que se mueven cerca (Varon, 2000, pp.46-53).

Según Yang et al., (2011: pp.1-12), la taxonomía es la siguiente:

Tabla 2-2: Clasificación taxonómica de *Arthrobotrys* sp.

Reino	Fungi
Filo	Ascomycota
Clase	Orbiliomycetes
Orden	Orbiliales
Familia	Orbiliaceae
Género	<i>Arthrobotrys</i>

Fuente: (Yang et al., 2011, pp.1-12).

Realizado por: Pallmay, Alexis, 2023.

Estos hongos son saprófitos que forman un sistema micelial, capaces de atrapar y consumir larvas de nematodos, que se encuentran en el suelo y en la materia fecal, mediante la producción de un material que se adhiere al parásito y la acción de anillos constrictores. El mecanismo de acción de los hongos combina el uso de órganos de captura, que ejercen una fuerza mecánica, y la liberación de enzimas hidrolíticas, como proteasas proteicas, que digieren la cutícula del nematodo. Una hora después de que el hongo ingresa al parásito, se crea un bulbo infectivo que invade completamente el interior del nematodo en cuestión de horas (Fernández, 2019, pp.1-13).

La digestión de estos hongos puede durar hasta una semana, durante la cual la hifa trófica se alisa y el hongo se desarrolla nuevamente hasta que la presencia del nematodo activa su capacidad depredadora. Esto ha sido reportado en estudios realizados por (Fernández, 2019, pp.1-13).

Arthrobotrys sp. posee conidióforos alargados erectos muy distintos de las hifas vegetativas, los cuales son de color hialino. Los conidios son de forma piriforme, desiguales y también hialinos. Emergen de pequeños dentecillos que forman una especie de racimo, con un total de 20 a 30

grupos de conidios. Son bicelulares y la célula distal es el doble de grande que la proximal (Adolfredo, 2002 y Esquivel, 2010; citado en Castillo y Medina, 2014, p.13).

2.2.3.3 *Arthrobotrys oligospora*

Arthrobotrys oligospora es uno de los hongos atrapanemátodos más investigados. Se han encontrado cepas de este hongo en diversos ambientes de suelo, como suelos contaminados con metales pesados y restos de madera en descomposición, donde vive principalmente como saprófito. Sin embargo, cuando los nematodos están presentes, *A. oligospora* entra en una fase parasitaria al formar una red tridimensional compleja para atraparlos. Este proceso desencadena una serie de eventos que involucran la fijación, invasión e inmovilización de los nematodos. La capacidad de *A. oligospora* para eliminar nematodos lo convierte en un candidato atractivo para el control de nematodos parásitos en plantas y animales (Yang et al., 2011: pp.1-12).

2.2.3.4 *Arthrobotrys musiformis*

Arthrobotrys musiformis es un componente esencial de los hongos atrapanemátodos y sus hifas pueden especializarse para formar una compleja red tridimensional que es capaz de atrapar nematodos de forma vermiforme, *A. musiformis* utiliza sus puntas de hifas para atacar los huevos y quistes de los nematodos (Zhang, 2011, pp.763-773).

Según Zhang, (2011, pp.763-773), *A. musiformis* tiene la capacidad de sintetizar varios péptidos pequeños que actúan como nematocidas, los cuales se han encontrado durante su etapa depredadora. Además, presenta estructuras aéreas fúngicas que consisten en la formación de conidióforos altos y erectos con racimos de conidios apicales. Los conidios tienen una forma ligeramente curvada y alargada obovoidal, y están separados por un tabique.

2.2.3.5 *Arthrobotrys conoides*

Arthrobotrys conoides es un hongo que pertenece a los atrapadores de nematodos y se especializa en formar una red tridimensional para atrapar a los nematodos (Naranjo, 2008, pp.123-132). Este hongo presenta un micelio compuesto por hifas ramificadas, septadas y hialinas. Los conidióforos son hialinos, no ramificados y erectos, y pueden proliferar repetidamente, produciendo una cabeza capitada apretada que puede llegar a medir hasta 400 μm de longitud y contener 7-12 o más conidios. Los conidios son de forma cónica, nacen individualmente sobre dentículos y son ligeramente comprimidos en el tabique (Ghosh et al., 2017: pp.105-126).

2.2.4 *Hongos entomopatógenos*

Los hongos entomopatógenos son agentes cruciales en el control biológico de plagas de insectos que causan frecuentes pérdidas en la agricultura y reducen significativamente los rendimientos. Existen más de 700 especies de hongos entomopatógenos, solo un pequeño número, aproximadamente 10, han sido empleados con éxito en el control biológico de insectos (Albuquerque, 2008, pp.209-242).

Son conocidos por su capacidad para infectar todas las etapas de la vida de los insectos, y se pueden encontrar en una variedad de hábitats, como acuáticos, terrestres y subterráneos. Estos hongos penetran en los insectos a través de la piel, lo que los convierte en los únicos patógenos capaces de infectar a insectos que tienen un aparato bucal picador, chupador, entre otros (Albuquerque, 2008, pp.209-242).

Los hongos entomopatógenos comienzan su proceso de infección en los insectos hospederos cuando las esporas viables entran en contacto con la superficie del integumento y se adhieren a ella, buscando un lugar adecuado para establecer una asociación patógeno-hospedero. Una vez que se establece esta asociación, los hongos forman túbulos germinales que facilitan la invasión del hongo en el insecto. Además, varias especies de hongos entomopatógenos son capaces de producir ácidos orgánicos que se han implicado en el proceso de infección. Por ejemplo, se ha reportado que *Beauveria* spp produce ácido oxálico (Díaz et al., 2006: p.856-860).

Según Castillo (2006, pp.4-42), los hongos entomopatógenos experimentan una serie de etapas en su proceso de desarrollo sobre el hospedero, las cuales incluyen:

- El proceso de infección de los insectos por hongos comienza con la adhesión de la espora o conidio a la cutícula. Posteriormente, el hongo desarrolla un tubo germinativo y un apresorio para adherirse a la cutícula y penetrar en el cuerpo del insecto. Esto ocurre alrededor de 12 horas después de la inoculación, con la formación de apresorios entre 12 y 18 horas después.
- La penetración del hongo en el cuerpo del insecto se lleva a cabo mediante un mecanismo físico y uno químico. El mecanismo físico consiste en la presión ejercida por la estructura de penetración, lo que rompe las áreas esclerosadas y membranosas de la cutícula. El mecanismo químico, por su parte, se basa en la acción de enzimas como proteasas, lipasas y quitinasas, las cuales descomponen el tejido en la zona de penetración, lo que facilita el ingreso del hongo.

- Después de la penetración, la hifa del hongo se expande y ramifica en el interior del tejido del insecto, colonizando completamente la cavidad del cuerpo. Este proceso puede tardar de 3 a 4 días después de la inoculación y durante la colonización se forman pequeñas colonias y estructuras del hongo, lo que representa la fase final de la enfermedad del insecto, que ocurre aproximadamente 4 a 5 días después de la inoculación.

Otra forma mediante la cual el hongo puede causar la muerte del insecto es mediante la producción de toxinas. Los hongos entomopatógenos tienen la capacidad de sintetizar toxinas que son utilizadas en el ciclo de la relación patógeno-hospedante. Entre estas toxinas se han encontrado destruxinas, demetildextruxina y protodextruxina, las cuales son sustancias de baja toxicidad, pero de mucha actividad tóxica sobre insectos, ácaros y nematodos. Las destruxinas afectan varios organelos tales como mitocondria, retículo endoplásmico y membrana nuclear, paralizando las células y causando disfunción del intestino (Sandino, 2003; citado en Castillo, 2006, p.18).

2.2.4.1 *Beauveria bassiana*

Beauveria bassiana es reconocido como uno de los agentes más eficaces de control biológico en la industria agrícola. Este hongo tiene la capacidad de causar efectos duraderos en las poblaciones de insectos plaga de importancia económica, y es capaz de infectar a más de 200 especies de insectos, incluyendo hormigas, gusanos, áfidos, ácaros y escarabajos (Chiriboga et al., 2015: pp.1-25).

Según Chiriboga et al., (2015, pp.1-25), mencionan que la taxonomía es la siguiente:

Tabla 3-2: Clasificación taxonómica de *Beauveria bassiana*

Reino	Fungi
Filo	Ascomycota
Clase	Sordariomycetes
Orden	Hypocreales
Familia	Cordycipitaceae
Género	<i>Beauveria</i>
Especie	<i>Beauveria bassiana</i>

Fuente: (Chiriboga et al., 2015: pp.1-25).

Realizado por: Pallmay, Alexis, 2023.

Según Hernández y Berlanga (1998, pp.1-4), el proceso del desarrollo de *B. bassiana* sobre insectos puede ser desglosados en las siguientes:

- Adhesión del conidio a la cutícula del insecto.
- Germinación de la unidad infectiva sobre la cutícula.
- Penetración en la cutícula del insecto por el tubo germinativo.
- Producción de metabolitos tóxicos.
- Muerte del huésped.

2.2.4.2 *Metarhizium anisopliae*

Metarhizium anisopliae es capaz de producir enzimas extracelulares que tienen la capacidad de degradar los polímeros que conforman la cutícula (proteínas, lípidos y quitina), lo que le permite obtener los nutrientes necesarios para su crecimiento (Padilla et al., 2000: pp.28-40).

M. anisopliae contiene una alta cantidad de aminopeptidasas e hidrofobina, las cuales facilitan la acción de las enzimas extracelulares sobre la cutícula del insecto. En cuanto a la taxonomía, Padilla et al., (2000, pp.28-40), la describen de la siguiente manera:

Tabla 4-2: Clasificación taxonómica de *Metarhizium anisopliae*

Reino	Fungi
Filo	Ascomycota
Clase	Sordariomycetes
Orden	Hypocreales
Familia	Clavicipitaceae
Género	<i>Metarhizium</i>
Especie	<i>Metarhizium anisopliae</i>

Fuente: (Padilla et al., 2000: pp.28-40).

Realizado por: Pallmay, Alexis, 2023.

Según Hernández et al., (2019, pp.155-166), mencionaron que *M. anisopliae* ha sido utilizado como agente de control biológico en diversas plagas de insectos, incluyendo termitas (Isoptera), langostas (*Locusta migratoria* L.), salivazos (*Aeneolamia* spp. F., *Prosapia* spp. F., *Nilaparvata lugens* Stal), escarabajos (*Adoryphorus couloni* B., *Antitrogus parvulus* *Oryctes rhinocerus* L.) y gusanos barrenadores (*Diatraea saccharalis* F.).

2.2.5 *Trichoderma* spp.

El género *Trichoderma* fue descrito por primera vez en 1794 por Persoon y en la actualidad se reconocen dentro de dicho grupo taxonómico a 254 especies. *Trichoderma* produce una gran diversidad de metabolitos secundarios con distintos tipos de actividad biológica. Entre estos, han sido particularmente estudiados los peptaiboles o peptaibióticos, algunas características estructurales de dichos péptidos es el alto contenido de ácido 2- amino-isobutírico y la presencia de ácido hidroxil- amino en el extremo C terminal (Morales, 2016, pp.3-126).

Las especies más notables son *T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii* y *T. hamatum*. Estos hongos tienen múltiples aplicaciones biotecnológicas en el ámbito agrícola, especialmente en la inhibición del crecimiento, la esporulación y la germinación de esporas de hongos patógenos. Estos hongos filamentosos se pueden encontrar en todo el mundo, tanto en suelos como en madera y hortalizas en descomposición (Mesa et al., 2020: pp.1-13).

Los hongos del género *Trichoderma* se caracterizan por tener conidióforos ramificados que se parecen a un pequeño árbol, con penachos compactos en forma de anillo y un sistema de ramas irregulares en forma piramidal. Estas ramas terminan en fiálides que contienen esporas asexuales o conidios, los cuales pueden emerger directamente del micelio. Además, los hongos de este género pueden producir clamidosporas intercalares, terminales y propágulos de tres tipos: hifas, clamidosporas y conidios, lo que les proporciona un mecanismo de resistencia (Mesa et al., 2020: pp.1-13).

Se han descrito diferentes mecanismos de acción de *Trichoderma*, los principales son:

Competencia: El género *Trichoderma* es altamente adaptable y puede utilizar una amplia variedad de nutrientes orgánicos e inorgánicos presentes en el suelo, lo que le permite competir de manera efectiva en diferentes entornos. *Trichoderma* producen sideróforos y péptidos que les permiten competir por el hierro en el suelo, lo que les otorga la capacidad de frenar el crecimiento de ciertos patógenos como *Fusarium* spp (Morales, 2016, pp.3-126).

Antibiosis: La antibiosis se refiere a la capacidad de un microorganismo para producir antibióticos o metabolitos tóxicos que pueden inhibir directamente el crecimiento de otro microorganismo sensible a ellos. En el caso de *Trichoderma* muchas de sus cepas producen metabolitos secundarios tanto volátiles como no volátiles, tales como la trichodermina y otros metabolitos peptídicos, los cuales pueden actuar como "antibióticos" inhibiendo el desarrollo de otros microorganismos. *T. harzianum*, en particular, es capaz de producir una gran cantidad de

antibióticos como la trichodermina, suzukacilina, alameticina, dermadina, trichotecenos y trichorzianina, entre otros (Infante et al., 2009: pp.1-8).

Hiperparasitismo: El hiperparasitismo es un fenómeno donde *Trichoderma* actúa como parásito de otros hongos, en el cual ataca a hongos patógenos y los utiliza como fuente de nutrientes para su propio crecimiento y desarrollo. Durante este proceso, *Trichoderma* produce enzimas y metabolitos secundarios que degradan la pared celular y otros componentes del hongo huésped, lo que le permite invadir y colonizar el tejido fúngico. A medida que el hongo huésped es degradado, *Trichoderma* obtiene nutrientes y energía para su propio crecimiento y producción de esporas (Rodríguez et al., 2008: pp.5-10).

Inducción de resistencia: Este proceso implica cambios celulares en la planta, como el aumento de depósitos de calosa en la pared celular y el aumento de la actividad de peroxidasas y quitinasas. Se ha demostrado que algunas especies de *Trichoderma* pueden estimular el crecimiento de la planta y activar mecanismos de defensa contra patógenos, lo que hace que este proceso sea de gran interés en el campo (Padrón et al., 2017: pp.9-13).

2.2.5.1 *Trichoderma harzianum*

Trichoderma harzianum es un hongo que se encuentra comúnmente en diversos materiales orgánicos y suelos, y es conocido por su capacidad para producir tanto toxinas como antibióticos. Las colonias de *T. harzianum* crecen y maduran rápidamente este género prefiere un pH ácido de 4.5-5 y se desarrolla bien en ambientes con alto contenido de humedad (Romero et al., 2009: pp.143-151).

Según Vásquez (2010, p.19), la taxonomía es la siguiente:

Tabla 5-2: Clasificación taxonómica de *Trichoderma harzianum*.

Reino	Fungi
Filo	Ascomycota
Clase	Sordariomycetes
Orden	Hypocreales
Familia	Hypocreaceae
Género	<i>Trichoderma</i>
Especie	<i>Trichoderma harzianum</i>

Fuente: (NCBI, 2010; citado en Vásquez, 2010, p.19).

Realizado por: Pallmay, Alexis, 2023.

2.3 Mecanismos antagónicos

2.3.1 Competencia

La competencia se produce cuando dos o más organismos luchan por los mismos recursos, lo que puede ser un problema cuando estos recursos son limitados, lo que resulta en una competencia por la supervivencia. Este tipo de situación se puede observar en diferentes ámbitos, incluyendo la competencia por recursos como el agua, la luz solar, los nutrientes, así como también por el espacio disponible en un ambiente dado. La competencia por los nutrientes puede ser particularmente intensa, ya que estos son esenciales para el crecimiento y la supervivencia de los organismos (Villamil, 1998, pp.1-5).

2.3.2 Antibiosis

La antibiosis se refiere a la capacidad de ciertas sustancias secretadas por microorganismos, como los antibióticos, las bacteriocinas, los péptidos antimicrobianos, las enzimas líticas y los metabolitos secundarios, capaces de inhibir o matar otros tipos de organismos. Estas sustancias pueden ser utilizadas para evitar la propagación de patógenos y afectar el desarrollo de otros organismos, lo que puede ser beneficioso para la supervivencia y el crecimiento de los organismos que las producen (Villamil, 1998, pp.1-5).

2.3.3 Hiperparasitismo

Esto ocurre cuando un parásito existente es atacado por otro parásito. Esto evita que el parásito original sobreviva e infecte al organismo deseado. Implica la desaparición de organismos no deseados (Villamil, 1998, pp.1-5).

2.4 Producción in vitro

En microbiología, la producción in vitro es un método de propagación de microorganismos como bacterias, hongos, etc., se los obtiene mediante un conjunto de técnicas que permiten el crecimiento y mantenimiento de las células o tejidos en un medio nutritivo y condiciones ambientales controladas (Arbeola et al., 2002: pp.71-80).

2.4.1 Medios de cultivo

En general, un "medio" es cualquier material que contenga una combinación adecuada de nutrientes que permita el crecimiento o aumento del número de células de una población microbiana. En los laboratorios de microbiología se utilizan diferentes medios para obtener cepas y aislar o identificar microorganismos para diferentes propósitos (Magaly, 2012, p.13).

CAPÍTULO III

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Características del lugar

3.1.1 Localización

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Ciencias Biológicas, localizado en la Facultad de Recursos Naturales de la ESPOCH, ubicado en la Parroquia Lizarzaburu, Cantón Riobamba, Provincia de Chimborazo. Las condiciones del ambiente dentro del laboratorio son en promedio una temperatura de 23°C y humedad relativa de 67%.

3.1.2 Ubicación geográfica

Latitud: 1°39'05.10"S

Longitud: 78°40'59,86''O

Altitud: 2820 msnm (Tiupul, 2011, p. 1).

3.2 Materiales y equipos

3.2.1 Materiales oficina

- Cuaderno de apuntes
- Esferos

3.2.2 Materiales de laboratorio

- Cajas Petri
- Parafilm
- Mascarilla
- Guantes desechables
- Envases esterilizados
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Regla
- Sacabocado N° 04

- Aguja
- Asa y asa triangular
- Tubos de ensayo

3.2.3 Equipos de laboratorio

- Incubadora Memmert 854 Schwabach W-Germany
- Balanza digital OHAUS PA4202
- Microscopio Motic BA310E
- Mechero (Lámpara de alcohol)
- Autoclave Hyrayama HL 3030 e
- Cámara de flujo clase II Tipo A2 Biobase BBS 110LLA2-x

3.2.4 Equipos de oficina

- Teléfono celular
- Computadora
- Memoria USB
- Calculadora
- Impresora

3.2.5 Reactivos

- a. Agua destilada
- b. Agar nutritivo Difco™
- c. PDA (Agar papa dextrosa) Titan Biotech LTD
- d. Etanol 70%
- e. Azul de algodón

3.3 Métodos

3.3.1 *Microorganismos empleados*

El aislado de *Bacillus subtilis* F. Cohn y las siete cepas de hongos benéficos PG01, CH02, CH01, PG02, A21, A13 y Th01 provinieron de la colección de cultivos fúngicos del Laboratorio de Ciencias Biológicas de la Facultad de Recursos Naturales de la ESPOCH (Tabla 6-3).

Tabla 6-3: Procedencia de los microorganismos para la investigación.

Investigador	Lugar y año	Microorganismo	Proyecto
Ing. Norma Erazo	ESPOCH, (2012).	<i>Bacillus subtilis</i> F. Cohn	Banco de microorganismos de microbiología.
Ing. Norma Erazo	Pallatanga, (2018).	<i>A. oligospora</i> (PG01).	Estudio de la diversidad de hongos nematófagos asociados a la rizosfera de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.), en tres localidades de la provincia de Chimborazo.
Ing. Norma Erazo	Chambo, (2018).	<i>A. oligospora</i> (CH02).	
Ing. Norma Erazo		<i>A. musiformis</i> (CH01).	
Ing. Norma Erazo	Pallatanga, (2018).	<i>A. conoides</i> (PG02).	
Ing. Norma Erazo	San Francisco, (2015).	<i>B. bassiana</i> (A21).	Diagnóstico de hongos entomopatógenos para el control del gusano blanco de la papa en provincia de Chimborazo.
Ing. Norma Erazo		<i>M. anisopliae</i> (A13).	
Ing. Norma Erazo	ESPOCH, (2018).	<i>T. harzianum</i> (Th01).	Banco de microorganismos de microbiología.

Realizado por: Pallmay, Alexis, 2023.

3.3.2 *Medio de cultivo*

El medio de cultivo utilizado para el desarrollo y enfrentamiento *in vitro* de la bacteria y hongos es de tipo sólido. En el método dual se utilizó papa dextrosa agar (PDA) Titan Biotech LTD para el crecimiento de la bacteria y hongos. En el método de compuestos volátiles se usó PDA para el crecimiento de los hongos y agar nutritivo (AN) Difco™ para el desarrollo de la bacteria.

3.3.2.1 *Preparación del medio de cultivo*

Preparación del PDA:

- a. Se pesó 40 g de PDA se los adicionó en 1L de agua destilada, la solución se esterilizó en la autoclave durante 15 min a 1 atmósfera de presión a una temperatura de 121°C.

- b.** El medio estéril se la vertió en las cajas Petri, dejando reposar entre 30-40 min hasta que estén solidificados.

Preparación del AN:

- a.** Se pesó 30 g de AN se los adicionó en 1L de agua destilada, la solución se la esterilizó en la autoclave durante 15 min a 1 atm de presión a una temperatura de 121°C.
- b.** El medio estéril se la vertió en cajas Petri, dejando reposar entre 30-40 min hasta que estén solidificados.

3.3.3 *Reactivación de las cepas de hongos*

Del banco microbiano del Laboratorio de Ciencias Biológicas se repicaron las siete cepas de hongos benéficos de la siguiente manera:

- a.** En la cámara de flujo respectivamente esterilizando se colocaron los materiales de laboratorio.
- b.** Con el sacabocado N°4 se cortaron discos de 8 mm de los hongos.
- c.** Con la aguja se colocaron los discos del hongo en las cajas Petri, sellando la caja Petri con Parafilm.
- d.** Las cajas Petri selladas se las dejó en la incubadora a una temperatura de 28°C hasta que se desarrollen completamente.

3.3.4 *Método dual*

Usando la metodología descrita por Torres Cortés et al. (2018, pp. 239-245), se emplearon cajas Petri con los hongos en crecimiento para realizar la prueba de enfrentamiento. Los materiales de laboratorio fueron colocados en la cámara de flujo y expuestos a luz UV durante 15 minutos.

- a. Con el sacabocado N°4 se realizan discos de 8 mm cada uno.
- b. Con la aguja se coloca los discos de los hongos en el centro de las cajas Petri.
- c. Con el asa se toma una muestra de la bacteria con el mismo se realizó un estriado en los extremos de la caja Petri.
- d. Las cajas Petri se las dejó en la incubadora a 28°C.

3.3.5 Método de compuestos volátiles

Se utilizó la metodología de León et al. (2020, pp. 20-25), esta metodología permitió trabajar con diferentes tiempos de crecimiento del hongo, lo que permitió obtener datos precisos y completos.

3.3.5.1 Método de compuestos volátiles (0 horas)

La confrontación de los hongos y bacteria se la realizó de manera simultánea, se cultivaron en cajas Petri separadas, luego se juntaron evitando el contacto directo entre ambos microorganismos:

- a. Se realizó cortes con el sacabocado a los hongos en crecimiento formando discos de 8 mm, colocándolos en las cajas Petri.
- b. Se realizó un estriado simple en las Cajas Petri con la bacteria.
- c. La caja Petri que contiene a la bacteria se colocó encima e invertida sobre la que contenía el hongo benéfico, las cajas fueron sellados con Parafilm. Dejándolas en la incubadora a una temperatura de 28°C.

3.3.5.2 Métodos de compuestos volátiles (96 horas)

La confrontación de los hongos y bacteria se la realizó pasando 4 días.

- a. Se repicó los hongos benéficos en cajas Petri y se las dejó en la incubadora a una temperatura de 28 °C por 4 días.
- b. Pasando los 4 días se realizó un estriado simple en las Cajas Petri con la bacteria.

- c. La caja Petri que contiene a la bacteria se colocó encima e invertida sobre la que contenía el hongo benéfico, las cajas fueron sellados con Parafilm. Dejándolas en la incubadora a una temperatura de 28°C.

3.3.6 Cálculo del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial

Para determinar el efecto de *Bacillus subtilis* F. Cohn en el crecimiento de los hongos se utilizó la metodología de León et al. (2020, pp. 20-25), en la cual se calculó el porcentaje del crecimiento micelial. En la cual consiste en la medición del diámetro horizontal y vertical en presencia de la bacteria, mientras que el control se utilizaron cajas Petri donde se encontraban solamente los hongos benéficos. La toma de datos se la realizó cada 24 horas.

Con las mediciones obtenidas se procedió al cálculo del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \left(1 - \frac{\text{diámetro tratamiento}}{\text{diámetro control}}\right) * 100$$

Mediante la siguiente escala se determinó si la inhibición es:

Tabla 7-3: Escala para el porcentaje de inhibición de micelio.

Baja:	0% – 25%
Media:	25% – 50%
Alta:	> 50%

Realizado por: Pallmay, Alexis, 2023.

3.3.7 Cálculo de la tasa de crecimiento

En el estudio realizado, se utilizó la metodología de Corrales et al. (2012, p. 69), para determinar la tasa de crecimiento micelial de los hongos benéficos, en la que consiste en la utilización de la siguiente fórmula:

$$Tc = \frac{\text{crecimiento final} - \text{crecimiento inicial}}{\text{tiempo final} - \text{tiempo inicial}}$$

3.3.8 Porcentaje de inhibición de la esporulación

El conteo de esporas se realizó a partir de las cajas Petri testigos con los hongos benéficos desarrollados completamente, en la cual se utilizó la metodología de Armenia (2005, p. 37):

- a. Se agregó 5 ml de agua destilada estéril en las cajas Petri y se raspó la superficie con un asa de Drigalski.
- b. Para el control se tomó 25 µl de la solución y se colocó en una placa porta objetos. Para los tratamientos se tomó 12,5 µl de la solución del hongo y 12,5 µl de la solución de la bacteria.
- c. Los portaobjetos se colocaron en cámara húmeda dejándolas en incubación por 24 h a una temperatura de 28 °C.
- d. A las placas porta objetos se les agregó una gota de azul de algodón colocando el cubreobjeto.
- e. Se realizó el conteo de esporas (40X).

Mediante la siguiente escala se determinó si la inhibición es:

Tabla 8-3: Escala para el porcentaje de inhibición de la esporulación.

Baja:	0% – 25%
Media:	25% – 50%
Alta:	> 50%

Realizado por: Pallmay, Alexis, 2023.

3.3.9 Características morfológicas

Las características morfológicas tanto macroscópica y microscópicamente se las determinó al final del ensayo:

- a. Las características macroscópicas se determinó el color de las colonias basándose en la escala de colores Pantone (2020). Las características del micelio se las determinó basándose en diferentes autores dependiendo el hongo benéfico. Para determinar la velocidad de crecimiento se utilizó la escala descrita por Gómez (2018), en la cual consiste en (Tabla 9-3):

Tabla 9-3: Escala de crecimiento descrita por Gómez (2018).

Rápido	Entre una y dos semanas
Moderado	Entre dos y tres semanas
Lento	Entre tres y cuatro semanas.

Fuente: (Gómez, 2018).

Realizado por: Pallmay, Alexis, 2023.

- b. Las características microscópicas se las determinó mediante la revisión literaria de diferentes autores dependiendo del hongo benéfico.

3.4 Especificaciones del experimento

3.4.1 Esquema del diseño experimental

Número de tratamientos	8
Número de repeticiones	3
Número de unidades experimentales	24

3.4.2 Tratamientos

Tabla 10-3: Tratamientos.

Tratamiento	Descripción
T1	<i>Bacillus subtilis</i> F Cohn + PG01
T2	<i>Bacillus subtilis</i> F Cohn + CH02
T3	<i>Bacillus subtilis</i> F Cohn + CH01
T4	<i>Bacillus subtilis</i> F Cohn + PG02
T5	<i>Bacillus subtilis</i> F Cohn + A21
T6	<i>Bacillus subtilis</i> F Cohn + A13
T7	<i>Bacillus subtilis</i> F Cohn + Th01
T8	Control

Realizado por: Pallmay, Alexis, 2023.

3.5 Tipo de diseño

3.5.1 Características del diseño

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) para la variable porcentaje de inhibición del crecimiento micelial y porcentaje de inhibición de la esporulación. En cuanto a la tasa de crecimiento micelial se llevó a cabo una prueba T.

3.5.2 Esquema del análisis de varianza

Tabla 11-3: Esquema de análisis de varianza (ANOVA).

Fuente de Variación	Fórmula	gl
Tratamientos	(t-1)	7
Error	t (n -1)	16
Total	(tn)-1	23

Realizado por: Pallmay, Alexis, 2023.

Tabla 12-3: Prueba T para la tasa de crecimiento micelial.

Tasa de crecimiento				
Tratamiento	Media	D. Estándar	p – valor	Significancia
Hongo/Bacteria	cm/día	-	-	-
Control	cm/día	-	-	-

Realizado por: Pallmay, Alexis, 2023.

3.5.3 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante un Análisis de Varianza (ANOVA). Esta técnica permite comparar diversos grupos en una variable cuantitativa, para determinar si las medias poblacionales son iguales (0) o diferentes (1).

3.5.4 Análisis funcional

Después de realizar un análisis de varianza (ANOVA) para comparar los tratamientos, se llevó a cabo una prueba de Tukey al 5% para determinar si existían diferencias significativas entre los tratamientos y el coeficiente de variación fue expresado en porcentaje.

CAPITULO IV

4 MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1 Procesamiento, análisis e interpretación de resultados

4.1.1 Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial

4.1.1.1 Método dual

Dual vertical

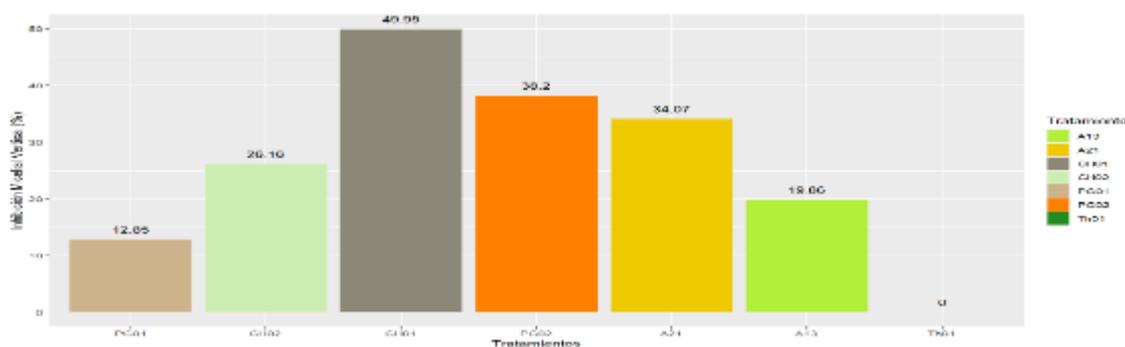


Ilustración 1-3: Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial vertical de siete hongos benéficos en presencia de *B. subtilis* mediante el método dual.

Realizado por: Pallmay, Alexis, 2023.

El análisis de varianza (Tabla 13-4) para la variable porcentaje de inhibición del crecimiento micelial vertical en el método dual presentaron diferencias estadísticas entre tratamientos ($p < 0,05$), el coeficiente de variación indica que la variabilidad de los datos es relativamente baja, con un 5,26%.

Tabla 13-4: Análisis de varianza para el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial vertical del método dual.

Variables	SC	gl	CM	F	p - valor	Significancia
Tratamientos	6780	7	968,6	683	0,0000000000000002	**
Error	23	16	1,4			
Total	6803	23				
CV	5,26%					

Diferencias significas * ($p < 0,05$); diferencias altamente significativas ** ($p < 0,01$), ns: no significativo ($p > 0,05$).

Realizado por: Pallmay, Alexis, 2023.

Mediante la prueba de Tukey al 5% para el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial vertical en el método dual se determinaron que existen 7 grupos de tratamientos: “a” con el mayor porcentaje de inhibición micelial vertical se ubicó en el tratamiento CH01 correspondiente al *A. musiformis* con una media de 49,95%; seguido del rango “b” el tratamiento PG02 correspondiente al *A. conoides* con una media de 38,20%; seguido del rango “c” el tratamiento A21 correspondiente a *Beauveria bassiana* con una media de 34,07% (Tabla 14-4).

Tabla 14-4: Prueba Tukey al 5% para el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial vertical del método dual.

Tratamientos	Medias	Rango
CH01 (<i>B. subtilis</i> + <i>A. musiformis</i>).	49,95	a
PG02 (<i>B. subtilis</i> + <i>A. conoides</i>).	38,20	b
A21 (<i>B. subtilis</i> + <i>B. bassiana</i>).	34,07	c
CH02 (<i>B. subtilis</i> + <i>A. oligospora</i>).	26,16	d
A13 (<i>B. subtilis</i> + <i>M. anisopliae</i>).	19,86	e
PG01 (<i>B. subtilis</i> + <i>A. oligospora</i>).	12,85	f
Th01 (<i>B. subtilis</i> + <i>T. harzianum</i>).	00,00	g

Los tratamientos con letras diferentes indican diferencias entre tratamientos según la Prueba Tukey al 5%.

Realizado por: Pallmay, Alexis, 2023.

Dual horizontal

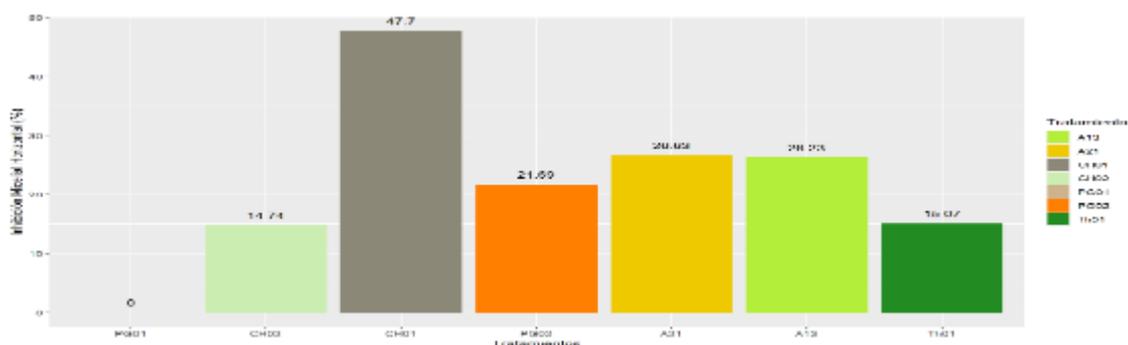


Ilustración 2-4: Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial horizontal de siete hongos benéficos en presencia *B. subtilis* mediante el método dual.

Realizado por: Pallmay, Alexis, 2023.

El análisis de varianza (Tabla 15-4) para la variable porcentaje de inhibición del crecimiento micelial horizontal en el método dual presentaron diferencias estadísticas entre tratamientos ($p < 0,05$), el coeficiente de variación indica que la variabilidad de los datos es relativamente baja con un 4,85%.

Tabla 15-4: Análisis de varianza para el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial horizontal del método dual.

Variables	SC	gl	CM	F	p - valor	Significancia
Tratamientos	5092	7	727,5	855,3	0,0000000000000002	**
Error	14	16	0,9			
Total	5106	23				
CV	4,85%					

Diferencias significativas * (p<0,05); diferencias altamente significativas ** (p<0,01), ns: no significativo (p>0,05)

Realizado por: Pallmay, Alexis, 2023.

Mediante la prueba de Tukey al 5% para el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial horizontal en el método dual se determinaron que existen 5 grupos de tratamientos: en el rango “a” con el mayor porcentaje de inhibición micelial horizontal se ubicó en el tratamiento CH01 correspondiente al *A. musiformis* con una media de 47,70%; seguido del rango “b” los tratamientos A21 y A13 correspondientes a *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* con medias de 26,63% y 26,23%; seguido del rango “c” el tratamiento PG02 correspondiente a *A. conoides* con una media de 21,69% (Tabla 16-4).

Tabla 16-4: Prueba Tukey al 5% para el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial horizontal del método dual.

Tratamientos	Medias	Rangos
CH01 (<i>B. subtilis</i> + <i>A. musiformis</i>).	47,7	a
A21 (<i>B. subtilis</i> + <i>B. bassiana</i>).	26,63	b
A13 (<i>B. subtilis</i> + <i>M. anisopliae</i>).	26,23	b
PG02 (<i>B. subtilis</i> + <i>A. conoides</i>).	21,69	c
Th01 (<i>B. subtilis</i> + <i>T. harzianum</i>).	15,07	d
CH02 (<i>B. subtilis</i> + <i>A. oligospora</i>).	14,74	d
PG01 (<i>B. subtilis</i> + <i>A. oligospora</i>).	0	e

Los tratamientos con letras diferentes indican diferencias entre tratamientos según la Prueba Tukey al 5%.

Realizado por: Pallmay, Alexis, 2023.

4.1.1.2 Método de compuestos volátiles (0 horas)

Volátiles verticales

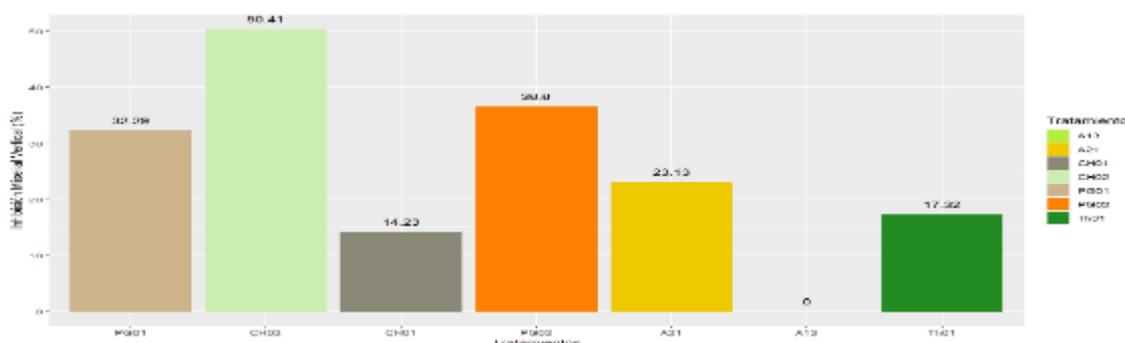


Ilustración 3-4: Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial vertical de siete hongos benéficos en presencia de *B. subtilis* mediante el método compuestos volátiles (0 horas).

Realizado por: Pallmay, Alexis, 2023.

El análisis de varianza (Tabla 17-4) para la variable porcentaje de inhibición del crecimiento micelial vertical en el método de compuestos volátiles a las 0 horas presentaron diferencias estadísticas entre tratamientos ($p < 0,05$), el coeficiente de variación indica que la variabilidad de los datos es relativamente baja, con un 4,68%.

Tabla 17-4: Análisis de varianza para el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial vertical del método compuestos volátiles (0 horas).

Variables	SC	gl	CM	F	p - valor	Significancia
Tratamientos	6532	7	933,1	902,3	0,0000000000000002	**
Error	17	16	1,0			
Total	6549	23				
CV	4,68%					

Diferencias significas * ($p < 0,05$); diferencias altamente significativas ** ($p < 0,01$), ns: no significativo ($p > 0,05$)

Realizado por: Pallmay, Alexis, 2023.

Mediante la prueba de Tukey al 5% para el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial vertical en el método de compuestos volátiles a las 0 horas se determinaron que existen 7 grupos de tratamientos: en el rango “a” con el mayor porcentaje de inhibición micelial vertical se ubicó en el tratamiento CH02 correspondiente al *A. oligospora* con una media de 50,41%; seguido del rango “b” el tratamiento PG02 correspondiente al *A. conioidea* con una media de 36,60%; seguido del rango “c” el tratamiento PG01 correspondiente a *A. oligospora* con una media de 32,29% (Tabla 18-4).

Tabla 18-4: Prueba Tukey al 5% para el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial vertical del método compuestos volátiles (0 horas).

Tratamientos	MediasRangos
CH02 (<i>B. subtilis</i> + <i>A. oligospora</i>).	50,41 a
PG02 (<i>B. subtilis</i> + <i>A. conoides</i>).	36,60 b
PG01 (<i>B. subtilis</i> + <i>A. oligospora</i>).	32,29 c
A21 (<i>B. subtilis</i> + <i>B. bassiana</i>).	23,13 d
Th01 (<i>B. subtilis</i> + <i>T. harzianum</i>).	17,32 e
CH01 (<i>B. subtilis</i> + <i>A. musiformis</i>).	14,23 f
A13 (<i>B. subtilis</i> + <i>M. anisopliae</i>).	0,00 g

Los tratamientos con letras diferentes indican diferencias entre tratamientos según la Prueba Tukey al 5%.

Realizado por: Pallmay, Alexis, 2023.

Volátiles horizontal

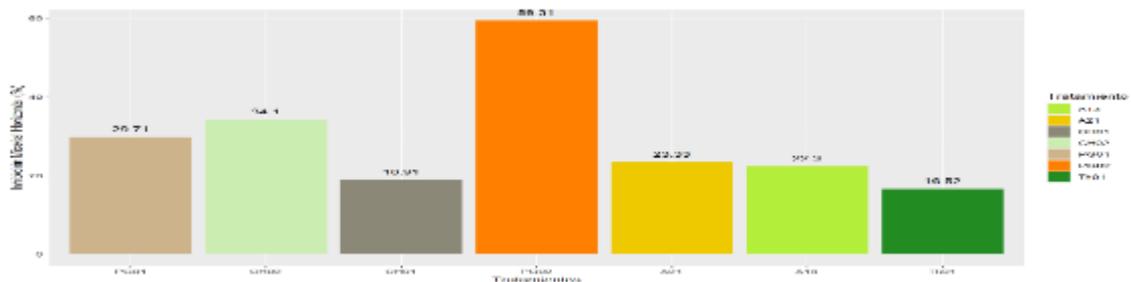


Ilustración 4-4: Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial horizontal de siete hongos benéficos en presencia de *B. subtilis* mediante el método compuestos volátiles (0 horas).

Realizado por: Pallmay, Alexis, 2023.

El análisis de varianza (Tabla 19-4) para la variable porcentaje de inhibición del crecimiento micelial horizontal en el método de compuestos volátiles a las 0 horas presentaron diferencias estadísticas entre tratamientos ($p < 0,05$), el coeficiente de variación indica que la variabilidad de los datos es relativamente baja, con un 6,54%.

Tabla 19-4: Análisis de varianza para el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial horizontal del método compuestos volátiles (0 horas).

Variables	SC	gl	CM	F	p - valor	Significancia
Tratamientos	6073	7	867,5	310,6	0,000000000000000709	**
Error	45	16	2,8			
Total	6118	23				
CV	6,54%					

Diferencias significas * ($p < 0,05$); diferencias altamente significativas ** ($p < 0,01$), ns: no significativo ($p > 0,05$).

Realizado por: Pallmay, Alexis, 2023.

Mediante la prueba de Tukey al 5% para el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial horizontal en el método de compuestos volátiles a las 0 horas se determinaron que existen 4 grupos de tratamientos: en el rango “a” con el mayor porcentaje de inhibición micelial horizontal se ubicó en el tratamiento PG02 correspondiente al *A. conoide* con una media de 59,31%; seguido del rango “b” los tratamientos CH02 y PG01 que corresponden al *A. oligospora* con una media de 33,10% y 29,71%; seguido del rango “c” los tratamientos A21 y A13 correspondientes a *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* con una media de 23,33% y 22,30% (Tabla 20-4).

Tabla 20-4: Prueba Tukey al 5% para el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial horizontal del método compuestos volátiles (0 horas).

Tratamientos	Medias Rangos
PG02 (<i>B. subtilis</i> + <i>A. conoides</i>).	59,31 a
CH02 (<i>B. subtilis</i> + <i>A. oligospora</i>).	34,10 b
PG01 (<i>B. subtilis</i> + <i>A. oligospora</i>).	29,71 b
A21 (<i>B. subtilis</i> + <i>B. bassiana</i>).	23,33 c
A13 (<i>B. subtilis</i> + <i>M. anisopliae</i>).	22,30 c
CH01 (<i>B. subtilis</i> + <i>A. musiformis</i>).	18,91 c d
Th01 (<i>B. subtilis</i> + <i>T. harzianum</i>).	16,52 d

Los tratamientos con letras diferentes indican diferencias entre tratamientos según la Prueba Tukey al 5%.

Realizado por: Pallmay, Alexis, 2023.

4.1.1.3 Método de compuestos volátiles (96 horas)

Volátiles vertical

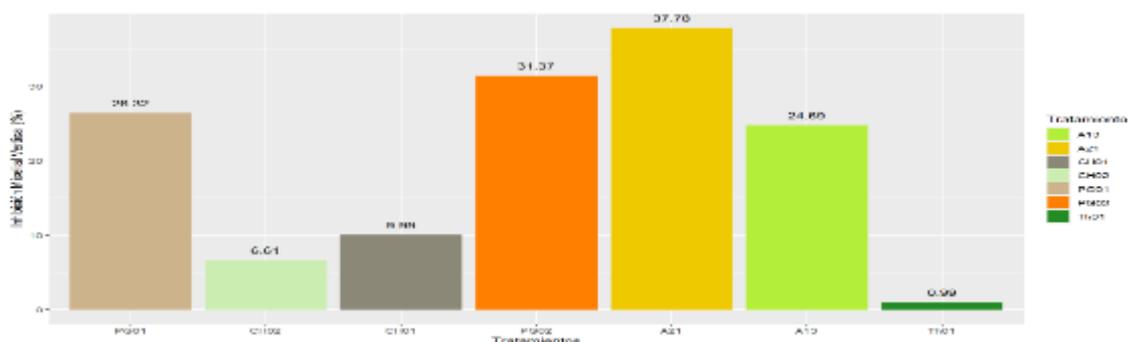


Ilustración 5-4: Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial vertical de siete hongos benéficos en presencia de *B. subtilis* mediante el método compuestos volátiles (96 horas).

Realizado por: Pallmay, Alexis, 2023.

El análisis de varianza (Tabla 21-4) para la variable porcentaje de inhibición del crecimiento micelial vertical en el método de compuestos volátiles a las 96 horas presentaron diferencias

estadísticas entre tratamientos ($p < 0,05$), el coeficiente de variación indica que la variabilidad de los datos es relativamente baja, con un 4,68%.

Tabla 21-4: Análisis de varianza para el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial vertical del método compuestos volátiles (96 horas).

Variables	SC	gl	CM	F	p - valor	Significancia
Tratamientos	4459	7	637,1	979,2	0,0000000000000002	**
Error	10	16	0,7			
Total	4469	23				
CV	4,68%					

Diferencias significas * ($p < 0,05$); diferencias altamente significativas ** ($p < 0,01$), ns: no significativo ($p > 0,05$)

Realizado por: Pallmay, Alexis, 2023.

Mediante la prueba de Tukey al 5% para el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial vertical en el método de compuestos volátiles a las 96 horas se determinaron que existen 6 grupos de tratamientos: en el rango “a” con el mayor porcentaje de inhibición micelial vertical se ubicó en el tratamiento A21 correspondiente al *Beauveria bassiana* con una media de 37%,78; seguido del rango “b” el tratamiento PG02 correspondiente al *A. conoides* con una media de 31,37%; seguido del rango “c” los tratamientos PG01 y A13 correspondientes a los tratamientos de *A. oligospora* y *Metarhizium anisopliae* con una media de 23,33% y 22,30% (Tabla 22-4).

Tabla 22-4: Prueba Tukey al 5% para el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial vertical del método compuestos volátiles (96 horas).

Tratamientos	Medias	Rangos
A21 (<i>B. subtilis</i> + <i>B. bassiana</i>).	37,78	a
PG02 (<i>B. subtilis</i> + <i>A. conoides</i>).	31,37	b
PG01 (<i>B. subtilis</i> + <i>A. oligospora</i>).	26,32	c
A13 (<i>B. subtilis</i> + <i>M. anisopliae</i>).	24,69	c
CH01 (<i>B. subtilis</i> + <i>A. musiformis</i>).	9,99	d
CH02 (<i>B. subtilis</i> + <i>A. oligospora</i>).	6,61	e
Th01 (<i>B. subtilis</i> + <i>T. harzianum</i>).	0,99	f

Los tratamientos con letras diferentes indican diferencias entre tratamientos según la Prueba Tukey al 5%.

Realizado por: Pallmay, Alexis, 2023

Volátiles horizontal

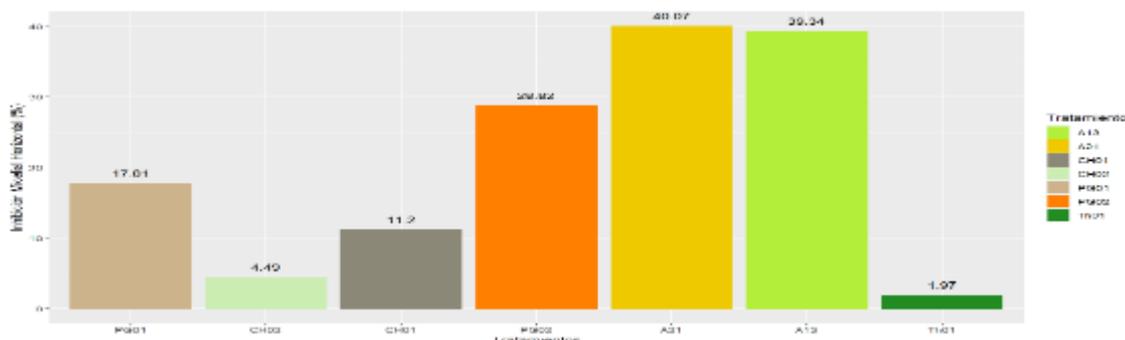


Ilustración 6-4: Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial horizontal de siete hongos benéficos en presencia de *B. subtilis* mediante el método compuestos volátiles (96 horas).

Realizado por: Pallmay, Alexis, 2023.

El análisis de varianza (Tabla 23-4) para la variable porcentaje de inhibición del crecimiento micelial horizontal en el método de compuestos volátiles a las 96 horas presentaron diferencias estadísticas entre tratamientos ($p < 0,05$), el coeficiente de variación indica que la variabilidad de los datos es relativamente baja, con un 8,13%.

Tabla 23-4: Análisis de varianza para el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del horizontal del método compuestos volátiles (96 horas).

Variables	SC	gl	CM	F	p - valor	Significancia
Tratamientos	5608	7	801,2	375,8	0,0000000000000002	**
Error	34	16	2,1			
Total	5642	23				
CV	8,13%					

Diferencias significas * ($p < 0,05$); diferencias altamente significativas ** ($p < 0,01$), ns: no significativo ($p > 0,05$)

Realizado por: Pallmay, Alexis, 2023.

Mediante la prueba de Tukey al 5% para el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial horizontal en el método de compuestos volátiles a las 96 horas se determinaron que existen 5 grupos de tratamiento: en el rango “a” con el mayor porcentaje de inhibición micelial horizontal se ubicó en los tratamientos A21 y A13 correspondiente al *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* con una media de 40,07% y 39,34%; seguido del rango “b” el tratamiento PG02 correspondiente al *A. conoides* con una media de 28,82%; seguido del rango “c” el tratamiento PG01 correspondiente al tratamiento de *A. oligospora* con una media de 17,81% (Tabla 24-4).

Tabla 24-4: Prueba Tukey al 5% para el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial horizontal del método compuestos volátiles (96 horas).

Tratamientos	Medias	Rangos
A21 (<i>B. subtilis</i> + <i>B. bassiana</i>).	40,07	a
A13 (<i>B. subtilis</i> + <i>M. anisopliae</i>).	39,34	a
PG02 (<i>B. subtilis</i> + <i>A. conoides</i>).	28,82	b
PG01 (<i>B. subtilis</i> + <i>A. oligospora</i>).	17,81	c
CH01 (<i>B. subtilis</i> + <i>A. musiformis</i>).	11,20	d
CH02 (<i>B. subtilis</i> + <i>A. oligospora</i>).	4,49	e
Th01 (<i>B. subtilis</i> + <i>T. harzianum</i>).	1,97	e

Los tratamientos con letras diferentes indican diferencias entre tratamientos según la Prueba Tukey al 5%.

Realizado por: Pallmay, Alexis, 2023.

4.1.2 Tasa de crecimiento micelial

4.1.2.1 Método dual

Dual vertical

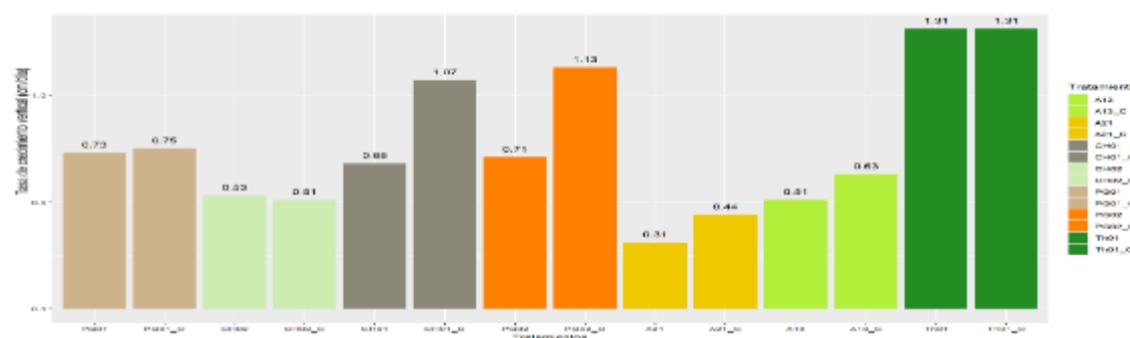


Ilustración 7-4: Tasa de crecimiento micelial vertical de siete hongos benéficos en presencia de *B. subtilis* mediante el método dual.

Realizado por: Pallmay, Alexis, 2023.

Mediante la prueba T (Tabla 25-4) para la variable tasa de crecimiento micelial vertical utilizado en el método dual, se encontraron diferencias estadísticas significativas en 5 grupos de tratamientos ($p < 0,05$), con una desviación estándar de 4.

Tabla 25-4: Prueba T para la tasa de crecimiento micelial vertical en el método dual.

Tasa de crecimiento				
Tratamientos	Media (cm/día)	D. Estándar	p - valor	Significancia
PG01 (<i>B. subtilis</i> + <i>A. oligospora</i>).	0,73	4	0,00749043	**
PG01_C (<i>A. oligospora</i>).	0,75			
CH02 (<i>B. subtilis</i> + <i>A. oligospora</i>).	0,53	4	0,373901	ns
CH02_C (<i>A. oligospora</i>).	0,51			
CH01 (<i>B. subtilis</i> + <i>A. musiformis</i>).	0,68	4	0,000002114927	**
CH01_C (<i>A. musiformis</i>).	1,07			
PG02 (<i>B. subtilis</i> + <i>A. conoides</i>).	0,71	4	0,0026688	**
PG02_C (<i>A. conoides</i>).	1,13			
A21 (<i>B. subtilis</i> + <i>B. bassiana</i>).	0,31	4	0,00351552	**
A21_C (<i>B. bassiana</i>).	0,44			
A13 (<i>B. subtilis</i> + <i>M. anisopliae</i>).	0,51	4	0,0234981	*
A13_C (<i>M. anisopliae</i>).	0,63			
Th01 (<i>B. subtilis</i> + <i>T. harzianum</i>).	1,31	4	1	ns
Th01_C (<i>T. harzianum</i>).	1,31			

Diferencias significas * (p<0,05); diferencias altamente significativas ** (p<0,01), ns: no significativo (p>0,05)

Realizado por: Pallmay, Alexis, 2023.

Dual horizontal

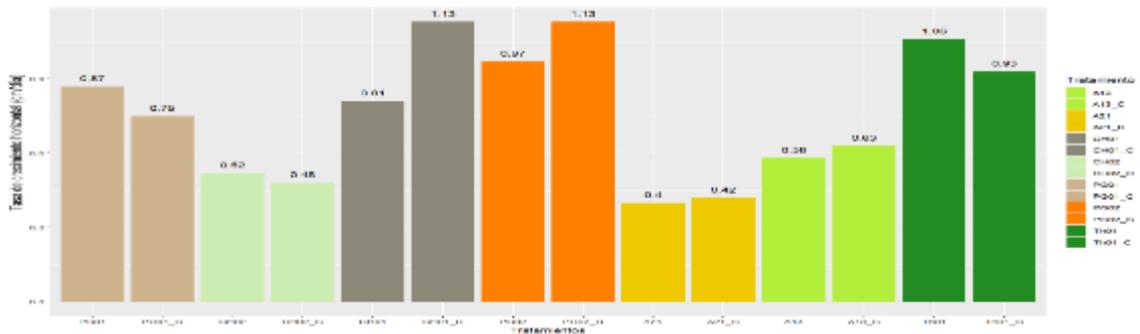


Ilustración 8-4: Tasa de crecimiento micelial horizontal de siete hongos benéficos en presencia de *B. subtilis* mediante el método dual.

Realizado por: Pallmay, Alexis, 2023.

Mediante la prueba T (Tabla 26-4) para la variable tasa de crecimiento micelial horizontal utilizado en el método dual, se encontraron diferencias estadísticas significativas en 2 grupos de tratamientos (p<0,05), con una desviación estándar de 4.

Tabla 26-4: Prueba T para la tasa de crecimiento micelial horizontal en el método dual.

Tratamientos	Tasa de crecimiento		p - valor	Significancia
	Media (cm/día)	D. Estándar		
PG01 (<i>B. subtilis</i> + <i>A. oligospora</i>).	0,87	4	0,1161165	ns
PG01_C (<i>A. oligospora</i>).	0,75			
CH02 (<i>B. subtilis</i> + <i>A. oligospora</i>).	0,52	4	0,04881155	*
CH02_C (<i>A. oligospora</i>).	0,48			
CH01 (<i>B. subtilis</i> + <i>A. musiformis</i>).	0,81	4	0,02437615	*
CH01_C (<i>A. musiformis</i>).	1,13			
PG02 (<i>B. subtilis</i> + <i>A. conoides</i>).	0,97	4	0,1469588	ns
PG02_C (<i>A. conoides</i>).	1,13			
A21 (<i>B. subtilis</i> + <i>B. bassiana</i>).	0,4	4	0,2377961	ns
A21_C (<i>B. bassiana</i>).	0,42			
A13 (<i>B. subtilis</i> + <i>M. anisopliae</i>).	0,58	4	0,3181723	ns
A13_C (<i>M. anisopliae</i>).	0,63			
Th01 (<i>B. subtilis</i> + <i>T. harzianum</i>).	1,06	4	0,102738	ns
Th01_C (<i>T. harzianum</i>).	0,93			

Diferencias significas * ($p < 0,05$); diferencias altamente significativas ** ($p < 0,01$), ns: no significativo ($p > 0,05$)

Realizado por: Pallmay, Alexis, 2023.

4.1.2.2 Método de compuestos volátiles (0 horas)

Volátiles vertical

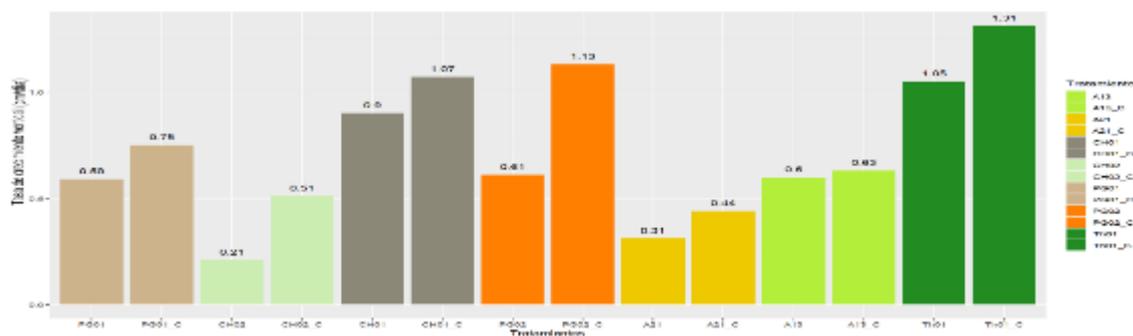


Ilustración 9-4: Tasa de crecimiento micelial vertical de siete hongos benéficos en presencia de *B. subtilis* mediante el método de compuestos volátiles (0 horas).

Realizado por: Pallmay, Alexis, 2023.

Mediante la prueba T (Tabla 27-4) para la variable tasa de crecimiento micelial vertical utilizado en el método compuestos volátiles (0 horas), se encontraron diferencias estadísticas significativas en 5 grupos de tratamientos ($p < 0,05$), con una desviación estándar de 4.

Tabla 27-4: Prueba T para la tasa de crecimiento micelial vertical en el método compuestos volátiles (0 horas).

Tratamientos	Tasa de crecimiento			
	Media (cm/día)	D. Estándar	p - valor	Significancia
PG01 (<i>B. subtilis</i> + <i>A. oligospora</i>).	0,59	4	0,00005899788	**
PG01_C (<i>A. oligospora</i>).	0,75			
CH02 (<i>B. subtilis</i> + <i>A. oligospora</i>).	0,21	4	0,00241034	**
CH02_C (<i>A. oligospora</i>).	0,51			
CH01 (<i>B. subtilis</i> + <i>A. musiformis</i>).	0,9	4	0,00003166002	**
CH01_C (<i>A. musiformis</i>).	1,07			
PG02 (<i>B. subtilis</i> + <i>A. conoides</i>).	0,61	4	0,00120049	**
PG02_C (<i>A. conoides</i>).	1,13			
A21 (<i>B. subtilis</i> + <i>B. bassiana</i>).	0,31	4	0,00124391	**
A21_C (<i>B. bassiana</i>).	0,44			
A13 (<i>B. subtilis</i> + <i>M. anisopliae</i>).	0,6	4	0,5637088	ns
A13_C (<i>M. anisopliae</i>).	0,63			
Th01 (<i>B. subtilis</i> + <i>T. harzianum</i>).	1,05	4	0,164789	ns
Th01_C (<i>T. harzianum</i>).	1,31			

Diferencias significas * ($p < 0,05$); diferencias altamente significativas ** ($p < 0,01$), ns: no significativo ($p > 0,05$)

Realizado por: Pallmay, Alexis, 2023.

Volátiles horizontal

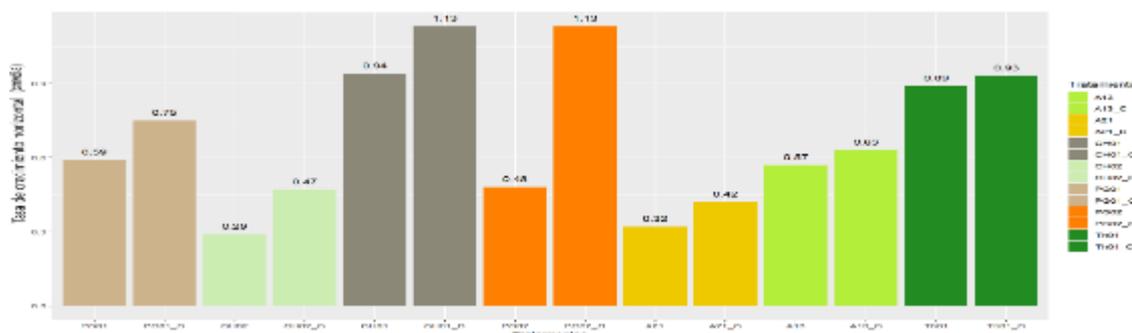


Ilustración 10-4: Tasa de crecimiento micelial horizontal de siete hongos benéficos en presencia de *B. subtilis* mediante el método de compuestos volátiles (0 horas).

Realizado por: Pallmay, Alexis, 2023.

Mediante la prueba T (Tabla 28-4) para la variable tasa de crecimiento micelial horizontal utilizado en el método compuestos volátiles (0 horas), se encontraron diferencias estadísticas significativas en 5 grupos de tratamientos ($p < 0,05$), con una desviación estándar de 4.

Tabla 28-4: Prueba T para la tasa de crecimiento micelial horizontal en el método compuestos volátiles (0 horas).

Tasa de crecimiento				
Tratamientos	Media (cm/día)	D. Estándar	p - valor	Significancia
PG01 (<i>B. subtilis</i> + <i>A. oligospora</i>).	0,59	4	0,00021748	**
PG01_C (<i>A. oligospora</i>).	0,75			
CH02 (<i>B. subtilis</i> + <i>A. oligospora</i>).	0,29	4	0,00004534426	**
CH02_C (<i>A. oligospora</i>).	0,47			
CH01 (<i>B. subtilis</i> + <i>A. musiformis</i>).	0,94	4	0,06456439	ns
CH01_C (<i>A. musiformis</i>).	1,13			
PG02 (<i>B. subtilis</i> + <i>A. conoides</i>).	0,48	4	0,00088033	**
PG02_C (<i>A. conoides</i>).	1,13			
A21 (<i>B. subtilis</i> + <i>B. bassiana</i>).	0,32	4	0,00009888192	**
A21_C (<i>B. bassiana</i>).	0,42			
A13 (<i>B. subtilis</i> + <i>M. anisopliae</i>).	0,57	4	0,144177	ns
A13_C (<i>M. anisopliae</i>).	0,63			
Th01 (<i>B. subtilis</i> + <i>T. harzianum</i>).	0,89	4	0,02321516	*
Th01_C (<i>T. harzianum</i>).	0,93			

Diferencias significas * (p<0,05); diferencias altamente significativas ** (p<0,01), ns: no significativo (p>0,05)

Realizado por: Pallmay, Alexis, 2023.

4.1.2.3 Método de compuestos volátiles (96 horas)

Volátiles vertical (96 horas)

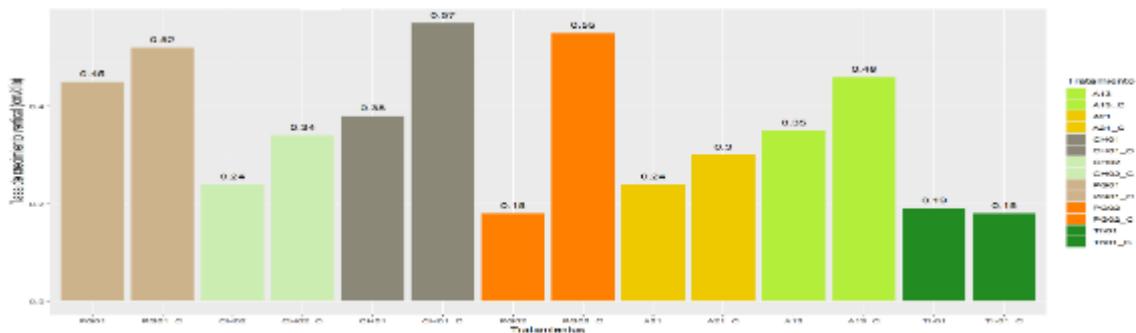


Ilustración 11-4: Tasa de crecimiento micelial vertical de siete hongos benéficos en presencia de *B. subtilis* mediante el método de compuestos volátiles (96 horas).

Realizado por: Pallmay, Alexis, 2023.

Mediante la prueba T (Tabla 29-4) para la variable tasa de crecimiento micelial vertical utilizado en el método compuestos volátiles (96 horas), se encontraron diferencias estadísticas significativas en 6 grupos de tratamientos (p<0,05), con una desviación estándar de 4.

Tabla 29-4: Prueba T para la tasa de crecimiento micelial vertical en el método compuestos volátiles (96 horas).

Tasa de crecimiento				
Tratamientos	Media (cm/día)	D. Estándar	p - valor	Significancia
PG01 (<i>B. subtilis</i> + <i>A. oligospora</i>).	0,45	4	0,00532813	**
PG01_C (<i>A. oligospora</i>).	0,52			
CH02 (<i>B. subtilis</i> + <i>A. oligospora</i>).	0,24	4	0,00535882	**
CH02_C (<i>A. oligospora</i>).	0,34			
CH01 (<i>B. subtilis</i> + <i>A. musiformis</i>).	0,38	4	0,00147312	**
CH01_C (<i>A. musiformis</i>).	0,57			
PG02 (<i>B. subtilis</i> + <i>A. conoides</i>).	0,18	4	0,00077338	**
PG02_C (<i>A. conoides</i>).	0,55			
A21 (<i>B. subtilis</i> + <i>B. bassiana</i>).	0,24	4	0,00312559	**
A21_C (<i>B. bassiana</i>).	0,3			
A13 (<i>B. subtilis</i> + <i>M. anisopliae</i>).	0,35	4	0,00537044	**
A13_C (<i>M. anisopliae</i>).	0,46			
Th01 (<i>B. subtilis</i> + <i>T. harzianum</i>).	0,19	4	0,7827543	ns
Th01_C (<i>T. harzianum</i>).	0,18			

Diferencias significativas * ($p < 0,05$); diferencias altamente significativas ** ($p < 0,01$), ns: no significativo ($p > 0,05$)

Realizado por: Pallmay, Alexis, 2023.

Volátiles horizontal (96 horas)

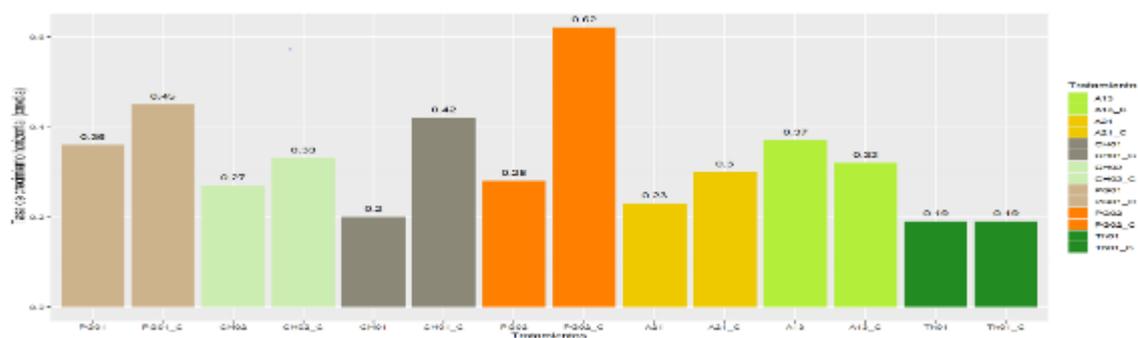


Ilustración 12-4: Tasa de crecimiento micelial horizontal de siete hongos benéficos en presencia de *B. subtilis* mediante el método de compuestos volátiles (96 horas).

Realizado por: Pallmay, Alexis, 2023.

Mediante la prueba T (Tabla 30-4) para la variable tasa micelial de crecimiento horizontal utilizado en el método compuestos volátiles (96 horas), se encontraron diferencias estadísticas significativas en 6 grupos de tratamientos ($p < 0,05$), con una desviación estándar de 4.

Tabla 30-4: Prueba T para la tasa de crecimiento micelial horizontal en el método compuestos volátiles (96 horas).

Tasa de crecimiento					
Tratamientos	Media (cm/día)	D. Estándar	p - valor	Significancia	
PG01 (<i>B. subtilis</i> + <i>A. oligospora</i>).	0,36	4	0,00265052	**	
PG01_C (<i>A. oligospora</i>).	0,45				
CH02 (<i>B. subtilis</i> + <i>A. oligospora</i>).	0,27	4	0,01740232	*	
CH02_C (<i>A. oligospora</i>).	0,33				
CH01 (<i>B. subtilis</i> + <i>A. musiformis</i>).	0,2	4	0,0095403	**	
CH01_C (<i>A. musiformis</i>).	0,42				
PG02 (<i>B. subtilis</i> + <i>A. conoides</i>).	0,28	4	0,00023631	**	
PG02_C (<i>A. conoides</i>).	0,62				
A21 (<i>B. subtilis</i> + <i>B. bassiana</i>).	0,23	4	0,00120509	**	
A21_C (<i>B. bassiana</i>).	0,3				
A13 (<i>B. subtilis</i> + <i>M. anisopliae</i>).	0,37	4	0,04881155	*	
A13_C (<i>M. anisopliae</i>).	0,32				
Th01 (<i>B. subtilis</i> + <i>T. harzianum</i>).	0,19	4	1	ns	
Th01_C (<i>T. harzianum</i>).	0,19				

Diferencias significativas * (p<0,05); diferencias altamente significativas ** (p<0,01), ns: no significativo (p>0,05)

Realizado por: Pallmay, Alexis, 2023.

4.1.3 Porcentaje de inhibición de la esporulación de los hongos benéficos

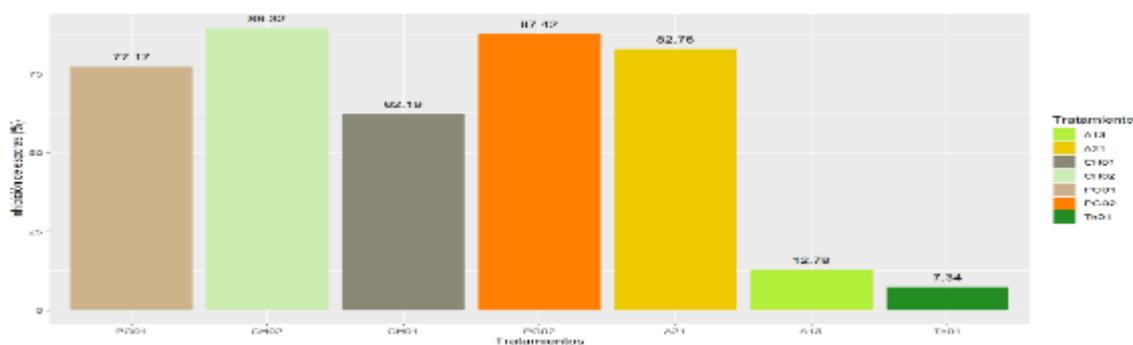


Ilustración 13-4: Porcentaje de inhibición de la esporulación de siete hongos benéficos en presencia de *B. subtilis*.

Realizado por: Pallmay, Alexis, 2023.

El análisis de varianza (Tabla 31-4) para la variable porcentaje de inhibición de la esporulación presentaron diferencias estadísticas entre tratamientos ($p < 0,05$), el coeficiente de variación indica que la variabilidad de los datos es relativamente baja, con un 2,79%.

Tabla 31-4: Análisis de varianza para el porcentaje de inhibición de la esporulación.

Variables	SC	gl	CM	F	p - valor	Significancia
Tratamientos	31699	7	4528	2112	0,0000000000000002	**
Error	34	16	2			
Total	31733	23				
CV	2,79%					

Diferencias significativas * (p<0,05); diferencias altamente significativas ** (p<0,01), ns: no significativo (p>0,05)

Realizado por: Pallmay, Alexis, 2023.

Mediante la prueba de Tukey al 5% para el porcentaje de inhibición de la esporulación la se determinaron que existen 6 grupos de tratamientos: en el rango “a” con el mayor porcentaje de inhibición de esporas se ubicó en los tratamientos CH02 y PG02 correspondiente al *A. oligospora* y *A. conoide* con una media de 89,32% y 87,42%; seguido del rango “b” el tratamiento A21 que corresponde al *Beauveria. bassiana* con una media de 82,76%; seguido del rango “c” el tratamiento PG01 correspondiente al *A. oligospora* con una media de 77,17% (Tabla 32-4).

Tabla 32-4: Prueba Tukey al 5% para el porcentaje de inhibición de la esporulación

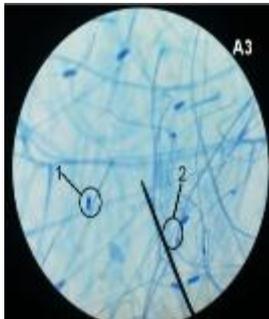
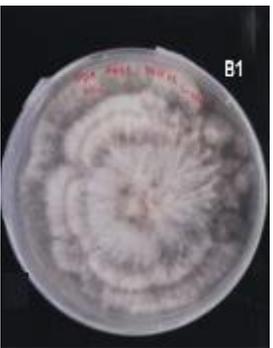
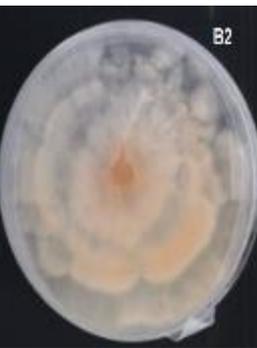
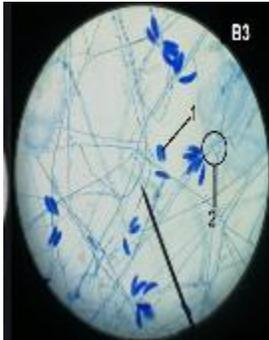
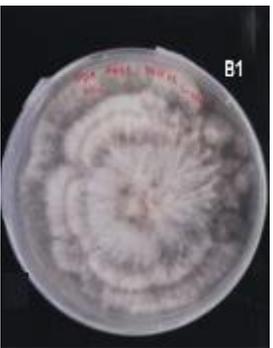
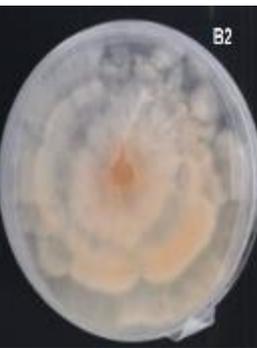
Tratamientos	Medias	Rangos
CH02 (<i>B. subtilis</i> + <i>A. oligospora</i>).	89,32	a
PG02 (<i>B. subtilis</i> + <i>A. conoides</i>).	87,42	a
A21 (<i>B. subtilis</i> + <i>B. bassiana</i>).	82,76	b
PG01 (<i>B. subtilis</i> + <i>A. oligospora</i>).	77,17	c
CH01 (<i>B. subtilis</i> + <i>A. musiformis</i>).	62,19	d
A13 (<i>B. subtilis</i> + <i>M. anisopliae</i>).	12,78	e
Th01 (<i>B. subtilis</i> + <i>T. harzianum</i>).	7,34	f
Control (Solo hongo benéfico).	0,00	g

Los tratamientos con letras diferentes indican diferencias entre tratamientos según la Prueba Tukey al 5%.

Realizado por: Pallmay, Alexis, 2023.

4.1.4 Características morfológicas de los hongos benéficos

Tabla 33-4: Características macroscópicas y microscópicas de *A. oligospora* (PG01), en condiciones *in vitro*.

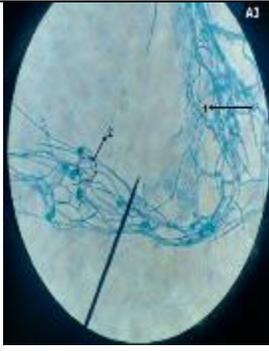
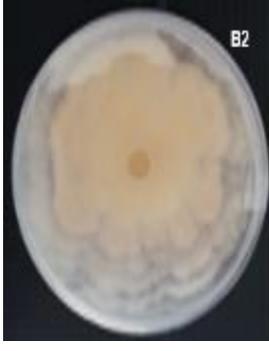
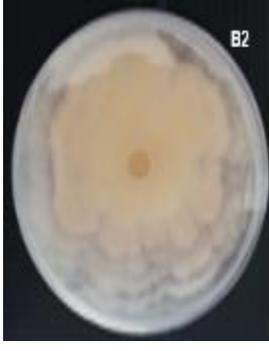
<i>Arthrotrrys oligospora</i> PG01 (PDA)								
R	Crecimiento	Características macroscópicas				Forma	Micelio	Características macroscópicas
		Anverso	Reverso					
R1	Rápido	Gris blanco (PMS 427 RGB #ddd1d1)		Blanco (PMS 441 RGB #d1d1c6)		Radial	Algodonoso, poca vellosidad y afelpado	Abundantes conidióforos alargados, erectos y conidios fusiformes agrupadas en racimo (Márquez et al., 2015: pp.47-55). 
R2	Rápido	Gris blanco (PMS 427 RGB #ddd1d1)		Blanco (PMS 441 RGB #d1d1c6)		Radial	Algodonoso, poca vellosidad y afelpado	
R3	Rápido	Gris blanco (PMS 427 RGB #ddd1d1)		Blanco (PMS 441 RGB #d1d1c6)		Radial	Algodonoso, poca vellosidad y afelpado	
C1	Rápido	Gris blanco (PMS 427 RGB #ddd1d1)		Blanco cremoso (PMS 434 RGB #e0d1c6)		Radial	Algodonoso, velloso y afelpado	Abundantes conidióforos alargados, erectos y conidios fusiformes agrupadas en racimo (Márquez et al., 2015: pp.47-55). 
C2	Rápido	Gris blanco (PMS 427 RGB #ddd1d1)		Blanco cremoso (PMS 434 RGB #e0d1c6)		Radial	Algodonoso, velloso y afelpado	
C3	Rápido	Gris blanco (PMS 427 RGB #ddd1d1)		Blanco cremoso (PMS 434 RGB #e0d1c6)		Radial	Algodonoso, velloso y afelpado	

A1 y B1: Anverso; A2 y B2: Reverso; A3 y B3: 1 conidios fusiformes y 2 conidióforos alargados; PMS: Codificación mediante la Escala de colores PANTONE.

Crecimiento: Rápido entre 1 y 2 semanas; Moderado entre 2 y 3 semanas; Lento entre 3 y 4 semanas

Realizado por: Pallmay, Alexis, 2023.

Tabla 34-4: Características macroscópicas y microscópicas de *A. oligospora* (CH02), en condiciones *in vitro*.

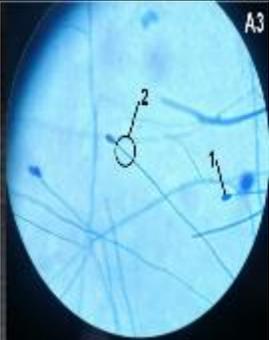
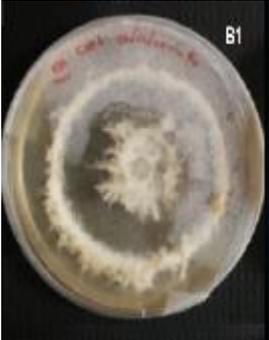
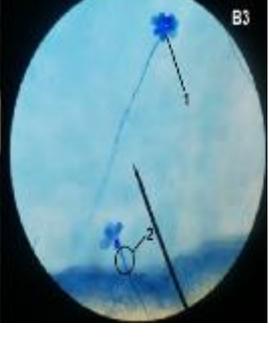
<i>Arthrobotrys oligospora</i> CH02 (PDA)									
R	Crecimiento	Características macroscópicas				Características microscópicas			
		Anverso		Reverso		Forma	Micelio		
R1	Lento	Gris Blanco (PMS 427 RGB #ddd1c6)		Blanco cremoso (PMS 434 RGB #e0d1c6)		Radial	Poco Algodonoso y velloso	Pocos conidióforos simples alargados, erectos y conidios hialinos, lisas, globosas (Catillo y Medina., 2014: pp.13-65).	
R2	Lento	Gris Blanco (PMS 427 RGB #ddd1c6)		Blanco cremoso (PMS 434 RGB #e0d1c6)		Radial	Poco Algodonoso y velloso		
R3	Lento	Gris Blanco (PMS 427 RGB #ddd1c6)		Blanco cremoso (PMS 434 RGB #e0d1c6)		Radial	Poco Algodonoso y velloso		
C1	Lento	Gris Blanco (PMS 427 RGB #ddd1c6)		Blanco cremoso (PMS 434 RGB #e0d1c6)		Radial	Algodonoso, velloso y afelpado	Abundantes conidióforos simples alargados, erectos y conidios hialinos, lisas, globosas (Catillo y Medina., 2014: pp.13-65).	
C2	Lento	Gris Blanco (PMS 427 RGB #ddd1c6)		Blanco cremoso (PMS 434 RGB #e0d1c6)		Radial	Algodonoso, velloso y afelpado		
C3	Lento	Gris Blanco (PMS 427 RGB #ddd1c6)		Blanco cremoso (PMS 434 RGB #e0d1c6)		Radial	Algodonoso, velloso y afelpado		

A1 y B1: Anverso; **A2 y B2:** Reverso; **A3 y B3:** 1 conidios hialinos, lisas y globosas y 2 conidióforos simple alargados; **PMS:** Codificación mediante la Escala de colores PANTONE.

Crecimiento: **Rápido** entre 1 y 2 semanas; **Moderado** entre 2 y 3 semanas; **Lento** entre 3 y 4 semanas

Realizado por: Pallmay, Alexis, 2023.

Tabla 35-4: Características macroscópicas y microscópicas de *A. musiformis* en condiciones *in vitro*.

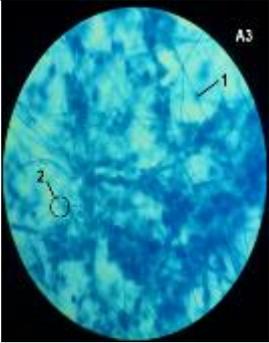
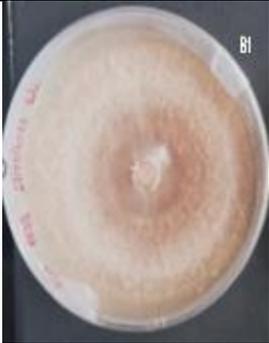
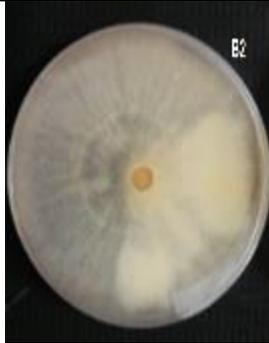
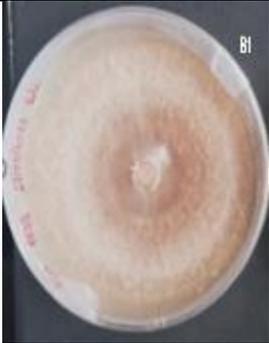
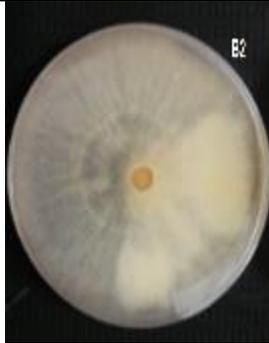
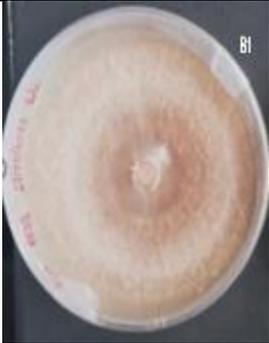
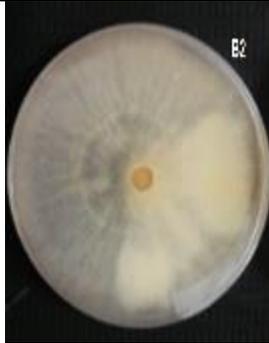
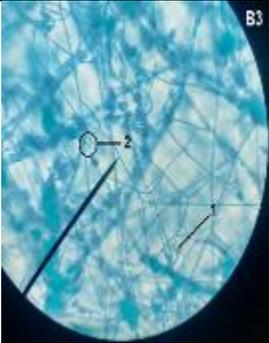
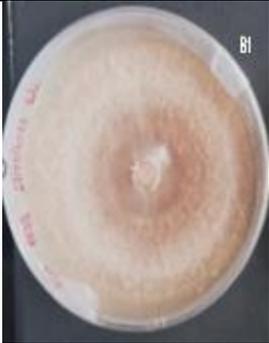
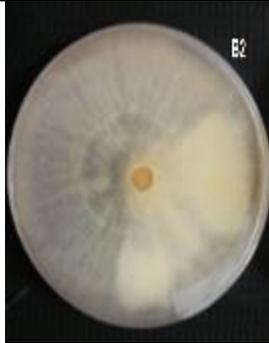
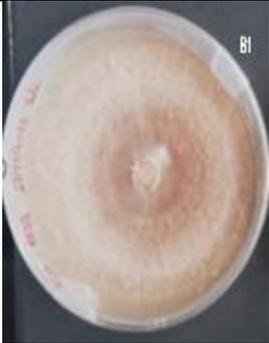
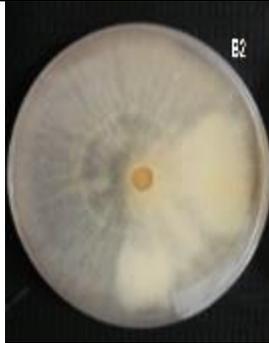
<i>Arthrotrrys musiformis</i> CH01 (PDA)										
R	Crecimiento	Características macroscópicas					Características microscópicas			
		Anverso		Reverso		Forma	Micelio			
R1	Rápido	Gris Blanco (PMS 568 RGB #d6d6c6)		Blanco (PMS 427 RGB #ddd1d1)		Radial	Poca vellocida d y afelpado	Pocos conidióforos simples y conidios ovalados (Pérez et al., 2022: pp.1- 15).		
R2	Rápido	Gris Blanco (PMS 568 RGB #d6d6c6)		Blanco (PMS 427 RGB #ddd1d1)		Radial	Poca vellocida d y afelpado			
R3	Rápido	Gris Blanco (PMS 568 RGB #d6d6c6)		Blanco (PMS 427 RGB #ddd1d1)		Radial	Poca vellocida d y afelpado			
C1	Rápido	Gris Blanco (PMS 568 RGB #d6d6c6)		Blanco (PMS 427 RGB #ddd1d1)		Radial	Algodon oso, velloso y afelpado	Abundantes conidióforos alargados, erectos y conidios ovalados agrupados en racimo (Pérez et al., 2022: pp.1- 15).		
C2	Rápido	Gris Blanco (PMS 568 RGB #d6d6c6)		Blanco (PMS 427 RGB #ddd1d1)		Radial	Algodon oso, velloso y afelpado			
C3	Rápido	Gris Blanco (PMS 568 RGB #d6d6c6)		Blanco (PMS 427 RGB #ddd1d1)		Radial	Algodon oso, velloso y afelpado			

A1 y B1: Anverso; **A2 y B2:** Reverso; **A3 y B3:** 1 conidios ovalados y 2 conidióforos alargados; **PMS:** Codificación mediante la Escala de colores PANTONE.

Crecimiento: **Rápido** entre 1 y 2 semanas; **Moderado** entre 2 y 3 semanas; **Lento** entre 3 y 4 semanas

Realizado por: Pallmay, Alexis, 2023.

Tabla 36-4: Características macroscópicas y microscópicas de *A. conoides* en condiciones *in vitro*.

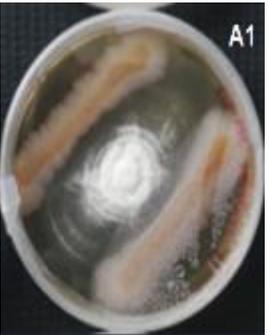
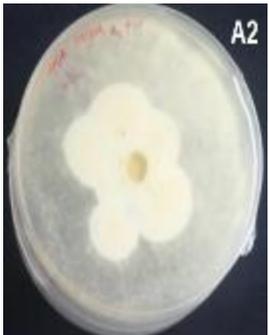
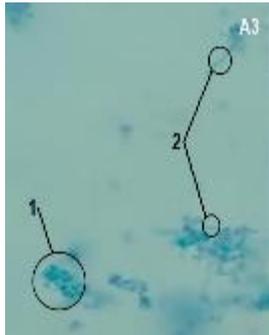
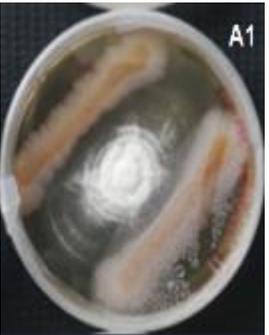
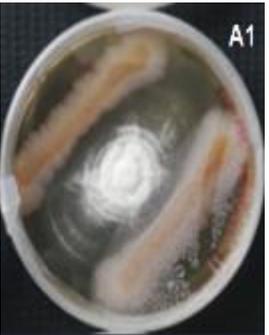
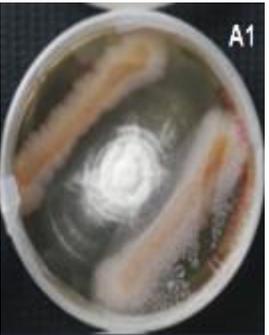
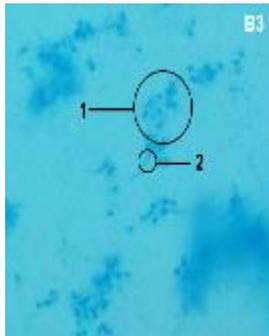
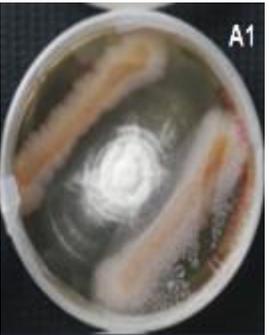
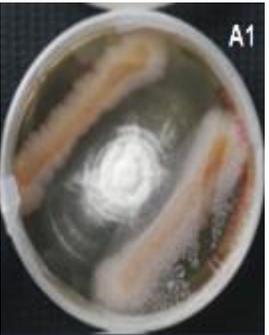
<i>Arthrobotrys conoides</i> PG02 (PDA)									
R	Crecimiento	Características macroscópicas				Características microscópicas			
		Anverso		Reverso				Forma	Micelio
R1	Rápido	Crema (PMS 155 RGB #f4dbaa)		Blanco (PMS 441 RGB #d1d1c6)		Radial	Poco Algodonoso y veloso	Pocos conidióforos simples y conidios ovalados, hialinos (Ghosta et al., 2017: pp.105-106).	
R2	Rápido	Crema (PMS 155 RGB #f4dbaa)		Blanco (PMS 441 RGB #d1d1c6)		Radial	Poco Algodonoso y veloso		
R3	Rápido	Crema (PMS 155 RGB #f4dbaa)		Blanco (PMS 441 RGB #d1d1c6)		Radial	Poco Algodonoso y veloso		
C1	Rápido	Marrón (PMS 157 RGB #eda04f)		Blanco (PMS 441 RGB #d1d1c6)		Radial	Algodonoso, veloso y afelpado	Abundantes conidióforos simples y conidios ovalados, hialinos (Ghosta et al., 2017: pp.105-106).	
C2	Rápido	Marrón (PMS 157 RGB #eda04f)		Blanco (PMS 441 RGB #d1d1c6)		Radial	Algodonoso, veloso y afelpado		
C3	Rápido	Marrón (PMS 157 RGB #eda04f)		Blanco (PMS 441 RGB #d1d1c6)		Radial	Algodonoso, veloso y afelpado		

A1 y B1: Anverso; A2 y B2: Reverso; A3 y B3: 1 conidios ovalados y 2 conidióforos simples; PMS: Codificación mediante la Escala de colores PANTONE.

Crecimiento: **Rápido** entre 1 y 2 semanas; **Moderado** entre 2 y 3 semanas; **Lento** entre 3 y 4 semanas

Realizado por: Pallmay, Alexis, 2023.

Tabla 37-4: Características macroscópicas y microscópicas de *B. bassiana* en condiciones *in vitro*.

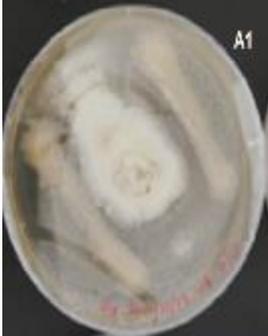
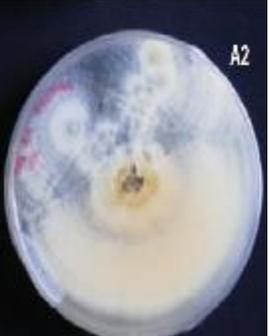
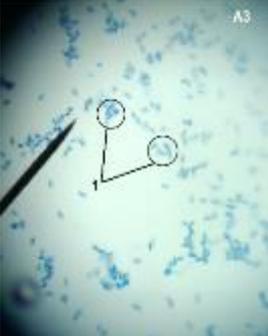
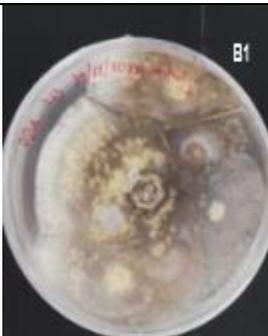
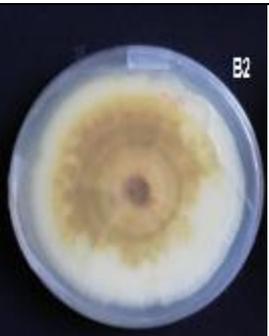
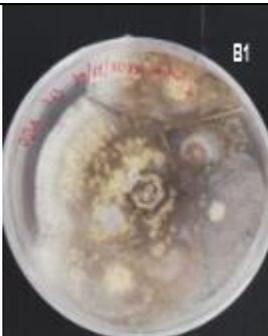
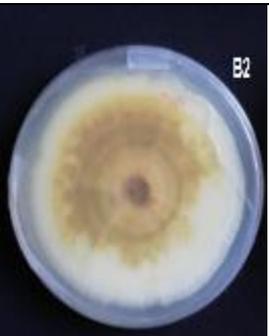
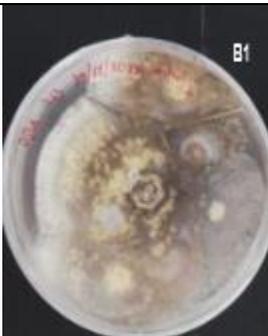
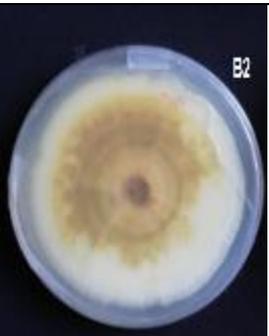
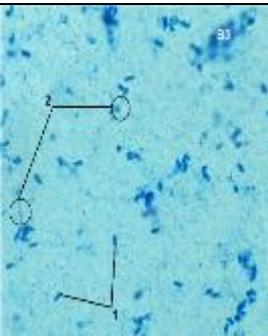
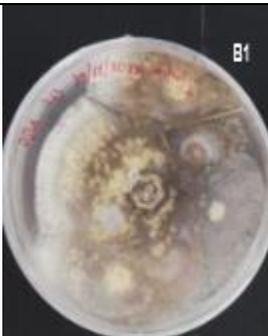
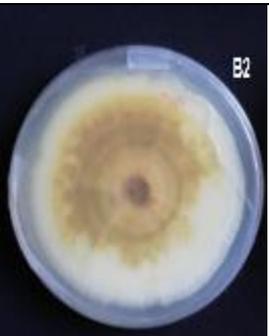
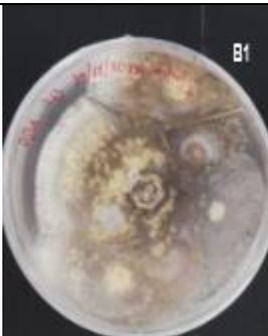
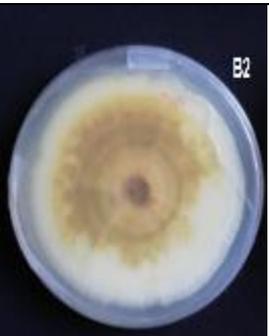
<i>Beauveria bassiana</i> A21 (PDA)									
R	Crecimiento	Características macroscópicas					Características microscópicas		
		Anverso		Reverso		Forma	Micelio		
R1	Moderado	Blanco (PMS 427 RGB #ddd1)		Amarillo crema (PMS 1205 RGB #f7e8aa)		No Radial	Poco compacto y polvoso	Pocos conidióforos simples y abundantes conidios de forma esférica levemente ovaladas (Chiriboga et al., 2015: pp.1-25).	
R2	Moderado	Blanco (PMS 427 RGB #ddd1)		Amarillo crema (PMS 1205 RGB #f7e8aa)		No Radial	Poco compacto y polvoso		
R3	Moderado	Blanco (PMS 427 RGB #ddd1)		Amarillo crema (PMS 1205 RGB #f7e8aa)		No Radial	Poco compacto y polvoso		
C1	Moderado	Blanco (PMS 427 RGB #ddd1)		Amarillo crema (PMS 1205 RGB #f7e8aa)		Radial	Compacto, y muy polvoso	Abundantes conidióforos simples y conidios de forma esférica levemente ovaladas (Chiriboga et al., 2015: pp.1-25).	
C2	Moderado	Blanco (PMS 427 RGB #ddd1)		Amarillo crema (PMS 1205 RGB #f7e8aa)		Radial	Compacto, y muy polvoso		
C3	Moderado	Blanco (PMS 427 RGB #ddd1)		Amarillo crema (PMS 1205 RGB #f7e8aa)		Radial	Compacto, y muy polvoso		

A1 y B1: Anverso; A2 y B2: Reverso; A3 y B3: 1 conidios de forma esférica levemente ovalada y 2 conidióforos simples; PMS: Codificación mediante la Escala de colores PANTONE.

Crecimiento: Rápido entre 1 y 2 semanas; Moderado entre 2 y 3 semanas; Lento entre 3 y 4 semanas

Realizado por: Pallmay Alexis, 2023.

Tabla 38-4: Características macroscópicas y microscópicas de *M. anisopliae* en condiciones *in vitro*.

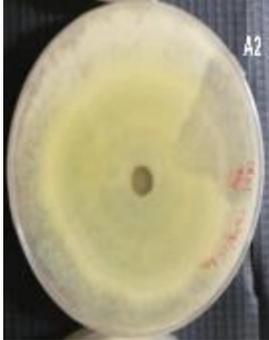
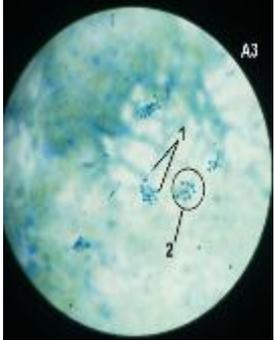
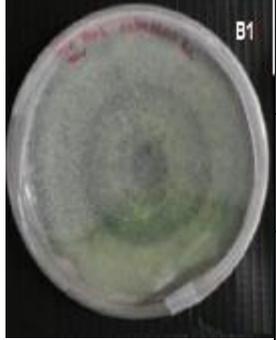
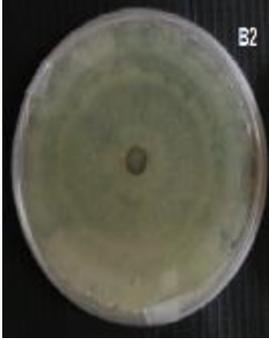
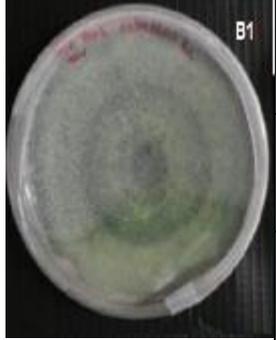
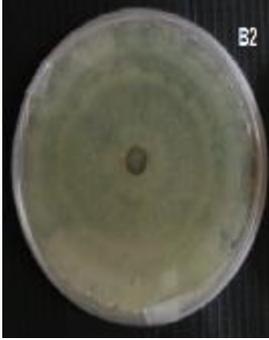
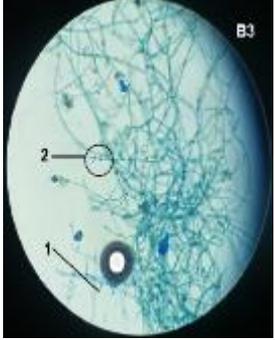
<i>Metarhizium anisopliae</i> A13 (PDA)										
R	Crecimiento	Características microscópicas					Características microscópicas			
		Anverso		Reverso		Forma	Micelio			
R1	Moderado	Blanco (PMS 427 RGB #ddd1)		Amarillo crema (PMS 1205 RGB #f7e8aa)		No Radial	Algodonoso y polvoso	Abundantes conidios ovoides (Valle et al., 2021: pp.1-19).		
R2	Moderado	Blanco (PMS 427 RGB #ddd1)		Amarillo crema (PMS 1205 RGB #f7e8aa)		No Radial	Algodonoso y polvoso			
R3	Moderado	Blanco (PMS 427 RGB #ddd1)		Amarillo crema (PMS 1205 RGB #f7e8aa)		No Radial	Algodonoso y polvoso			
C1	Moderado	Verde oscuro (PMS 133 RGB #705b0a)		Amarillo crema (PMS 1205 RGB #f7e8aa)		Radial	Algodonoso y polvoso	Poco conidióforos simples y abundantes conidios ovoides (Valle et al., 2021: pp.1-19).		
C2	Moderado	Verde oscuro (PMS 133 RGB #705b0a)		Amarillo crema (PMS 1205 RGB #f7e8aa)		Radial	Algodonoso y polvoso			
C3	Moderado	Verde oscuro (PMS 133 RGB #705b0a)		Amarillo crema (PMS 1205 RGB #f7e8aa)		Radial	Algodonoso y polvoso			

A1 y B1: Anverso; **A2 y B2:** Reverso; **A3 y B3:** 1 conidios ovoides y 2 conidióforos simples; **PMS:** Codificación mediante la Escala de colores PANTONE.

Crecimiento: **Rápido** entre 1 y 2 semanas; **Moderado** entre 2 y 3 semanas; **Lento** entre 3 y 4 semanas

Realizado por: Pallmay, Alexis, 2023.

Tabla 39-4: Características macroscópicas y microscópicas de *T. harzianum*, en condiciones *in vitro*.

<i>Trichoderma harzianum</i> Th01 (PDA)									
R	Crecimiento	Características macroscópicas						Características microscópicas	
		Anverso		Reverso		Forma	Micelio		
R1	Rápido	Verde oscuro (PMS 364 RGB #3a7728)		Verde amarillo (PMS 380 RGB #d6e542)		Radial	Algodonoso y polvoso	Abundantes conidióforos ramificados piramidales, fiálides delgadas en forma de botella y abundantes conidios cortos ovoides de paredes lisas (Romero et al., 2009: pp.143-151).	
R2	Rápido	Verde oscuro (PMS 364 RGB #3a7728)		Verde amarillo (PMS 380 RGB #d6e542)		Radial	Algodonoso y polvoso		
R3	Rápido	Verde oscuro (PMS 364 RGB #3a7728)		Blanco crema (PMS 393 RGB #f2ef87)		Radial	Algodonoso y polvoso		
C1	Rápido	Verde oscuro (PMS 364 RGB #3a7728)		Verde oscuro (PMS 364 RGB #3a7728)		Radial	Algodonoso y polvoso	Abundantes conidióforos ramificados piramidales, fiálides delgadas en forma de botella y abundantes conidios cortos ovoides de paredes lisas (Romero et al., 2009: pp.143-151).	
C2	Rápido	Verde oscuro (PMS 364 RGB #3a7728)		Verde oscuro (PMS 364 RGB #3a7728)		Radial	Algodonoso y polvoso		
C3	Rápido	Verde oscuro (PMS 364 RGB #3a7728)		Verde oscuro (PMS 364 RGB #3a7728)		Radial	Algodonoso y polvoso		

A1 y B1: Anverso; **A2 y B2:** Reverso; **A3 y B3:** 1 conidios cortos ovoides y 2 conidióforos ramificados; **PMS:** Codificación mediante la Escala de colores PANTONE.

Crecimiento: **Rápido** entre 1 y 2 semanas; **Moderado** entre 2 y 3 semanas; **Lento** entre 3 y 4 semanas

Realizado por: Pallmay Alexis, 2023.

4.2 Discusión

De acuerdo con investigaciones realizadas por Ocampo (2020, pp.1-50), se ha observado que *Bacillus subtilis* presenta una variabilidad en los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial en presencia de diferentes hongos.

En el método dual, la variable que indica el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial muestra que el tratamiento CH01, que involucra a *A. musiformis*, presenta el mayor porcentaje de inhibición, con un 49,95% de inhibición vertical y un 47,7% de inhibición horizontal con una tasa de crecimiento de 6,45 mm/día, según lo reportado por Castillo y Medina (2014, pp.3-64), la tasa de crecimiento del género *Arthrobotrys sp.* es de 5mm/día.

Según Acevedo et al., (2015, pp.1-6), en su estudio descubrieron que los productos extracelulares de un filtrado del hongo *A. musiformis* tienen actividad paralizante. Según el autor, este compuesto pertenece a la familia de proteasas del grupo de las serinas.

Mientras que el tratamiento Th01 correspondiente a *T. harzianum* presentó 0% de inhibición vertical y 15,07% de inhibición horizontal presentando una tasa de crecimiento de 11,8 mm/día. El estudio realizado por Guigón et al., (2010, pp.87-96), determinaron que la tasa de crecimiento promedio de las cepas de *Trichoderma spp* a 25 °C varía de 12 a 17 mm/día.

Según Padilla et al., (2000, pp.28-40), los resultados obtenidos en el laboratorio pueden verse afectados por diversos factores, siendo la temperatura el más común de ellos.

En el método de compuestos volátiles (0 horas) el tratamiento con mayor porcentaje de inhibición en el crecimiento micelial es el PG02 correspondiente al *A. conoides* con 36,6% de inhibición vertical y 59,31% de inhibición horizontal con una tasa de crecimiento de 5,45 mm/día. El tratamiento con menor inhibición es el tratamiento A13 correspondiente a *M. anisopliae* con 0% de inhibición vertical y 22,3% de inhibición horizontal presentando una tasa de crecimiento de 5,85 mm/día, la tasa de crecimiento reportado por Padilla et al., (2000, pp.28-40), para *M. anisopliae* es un promedio de 10 a 20 mm/día.

Según Marín et al., (2015, pp.11-134), mencionan en su estudio que *Metarhizium anisopliae* produce proteasas, lipasas, quitinasas y metabolitos secundarios que pueden ayudar en su defensa en presencia de microorganismos desconocidos.

En el método de compuestos volátiles (96 horas) el tratamiento con mayor inhibición es el tratamiento A21 correspondiente a *B. bassiana* con 37,78% de inhibición vertical y 40,07% de inhibición horizontal presentando una tasa de crecimiento de 2,35 mm/día, García et al., (2011, pp.28-40), reportaron resultados de 60 mm/día en la tasa de crecimiento para *B. bassiana*. El tratamiento con menor porcentaje de inhibición es el tratamiento Th01 correspondiente a *T. harzianum* con 0,99% de inhibición vertical y 1,97% de inhibición horizontal presentando una tasa de crecimiento de 1,9 mm/día.

Según la investigación llevada a cabo por Hernández et al., (2019, pp.98-112), se ha comprobado que *Trichoderma spp* es capaz de sintetizar metabolitos secundarios que participan en la producción de compuestos volátiles con propiedades antimicrobianas. Entre estos compuestos, se destacan los diterpenos tetracíclicos, como la harziandiona, los sesquiterpenos como los tricotecenos, tricodermina y harzianum A, y el triterpeno viridina.

Se puede mencionar que una de las características más importantes de *Bacillus subtilis* es su capacidad de producir una gran variedad de antibióticos entre éstos, los lipopéptidos clasificándose en 3 diferentes familias iturinas, fengicinas y surfactinas (Villarreal et al., 2018: pp.95-110).

Según una investigación llevada a cabo por Ragazzo et al., (2011, pp.5-11), la Iturina y la fengicina son compuestos que presentan fuertes propiedades de biocontrol, ya que son capaces de inhibir la acción de una amplia variedad de patógenos que afectan a las plantas. Por otro lado, la surfactina por sí sola no es capaz de inhibir el crecimiento de hongos, pero se ha demostrado que tiene un efecto sinérgico con la actividad antifúngica de la iturina A.

Según las investigaciones de Nozaki 2004; citado en Ocampo et al., (2021, pp.16-22), cuando bacterias y hongos coexisten en el mismo ambiente, las bacterias pueden desencadenar respuestas de defensa en los hongos. El estudio de los hongos nematófagos y entomopatógenos ha dado lugar a numerosos descubrimientos, sobre todo en relación con los compuestos secundarios que producen.

De acuerdo con Ruiz et al., (2016, pp.133-148), *Bacillus subtilis* posee una actividad antimicrobiana que puede combatir esporas de distintos tipos de microorganismos, como bacterias y hongos. Asimismo, se ha demostrado que tiene una habilidad excepcional para inhibir el crecimiento y la esporulación de diversos hongos fitopatógenos, tanto en entornos *in vitro* como *in vivo*.

En la variable que indica el porcentaje de inhibición de esporas, se encontró que los tratamientos que mostraron mayor inhibición fueron CH02, que correspondía a *A. oligospora*, con un porcentaje del 89,32%, y PG02, que correspondía *A. conoides*, con un porcentaje del 87,42%. Por otro lado, se observó que los tratamientos con menor porcentaje de inhibición fueron el tratamiento *M. anisopliae*, con un 12,78%, y Th01, correspondiente a *T. harzianum*, con un 7,34%.

El estudio de Ruiz et al., (2016, pp.133-148), describe que *B. subtilis* ejerce efectos antagónicos sobre los hongos por medio de varios mecanismos. En primer lugar, las bacterias se adhieren a las esporas en germinación a través de la polaridad y las parasitan directamente. Además, producen antibióticos extracelulares como bacilomicina, iturina, micosubtilina entre otros, así como enzimas líticas como quitinasa, proteasa, b-1,3 glucanasa y celulasa. *B. subtilis* también compete por los nutrientes en el hospedante, lo que provoca estrés y desnutrición en el hongo en germinación.

Las características morfológicas de *A. oligospora* (PG01), presentaron un color gris blanco con apariencia Algodonosa, vellosa y afelpada, en las características microscópicas se observó pocos conidióforos alargados, erectos y conidios fusiforme agrupadas en racimo. Márquez et al., (2015, pp.47-55), mencionaron que las estructuras morfológicas que observaron fueron conidióforos erectos y simples, generando varios racimos de conidios ovoidales agrupados en promedio 10 conidios.

Las características morfológicas de *A. oligospora* (CH02), presentaron un color blanco gris con textura algodonosa, vellosa y afelpada con pocos conidióforos simples alargados, erectos y conidios hialinos, lisos con forma globosa. Catillo y Medina (2014, pp.13-65), menciona que *A. oligospora* forman colonias que con el tiempo se vuelven color marrón, no pigmentan el medio de cultivo. Microscópicamente presenta hifas hialinas, con septos, conidióforo largo, erecto, hialino. Presenta conidios, hialinos, bicelulares que nacen de las fiálides.

Las características del *A. musiformis* presentó un color blanco gris con una apariencia algodonosa, vellosa y afelpada encontrando en sus características microscópicas abundantes conidióforos alargados, erectos y conidios de forma ovada agrupadas en racimo, estas características coinciden con Pérez et al., (2022, pp.1-15), mencionaron que los conidióforos son erecto coronado con racimos de conidios, los conidios tienen forma alargada-ovoidal y ligeramente curvados; los conidios están formados por dos células separadas por un tabique.

Las características morfológicas de *A. conoides* presentaron un color marrón y en algunos casos de color crema con apariencia algodonosa, vellosa y afelpada. Mientras que las características microscópicas se encontró abundantes conidióforos simples y conidios hialinos en forma ovoidal. Según Ghosta et al., (2017, pp.105-106), las colonias son de color blanco a rosa pálido de rápido crecimiento presentando conidióforos hialinos, no ramificados, erectos, que proliferan repetidamente, con 7–12 o más conidios en una cabeza capitada apretada.

Las características macroscópicas de *B. bassiana* presentaron colonias de color blanco desde su inicio hasta su crecimiento finalizado tomando un aspecto compacto y muy polvosa, mientras que la parte posterior de la caja Petri se tornó de un color amarillento, concordando con las características de Castillo et al., (2012, pp.275-281), mencionaron que las características morfológicas presentaron un aspecto algodonoso al principio, que luego se tornaron pulverulentas con superficie semielevada y crecimiento moderado. Las colonias presentaron color blanco que durante el crecimiento micelial fue tomando un color amarillento, por la parte posterior de la caja de Petri.

Las microscópicas se encontró pocos conidióforos simples y abundantes conidios o esporas esféricas levemente ovaladas, estas características coinciden con los de Chiriboga et al., (2015, pp.1-25), mencionaron que *B. bassiana* posee un micelio septado, conidióforos de 1 a 2 micras de diámetro, de donde nacen conidios o esporas hialinas redondas y ovaladas de 2 a 3 micras de diámetro, que se insertan en el raquis.

Las características morfológicas de *M. anisopliae* mostraron inicialmente un color blanco, mientras que el décimo día se tornaron de color verde oscuro tomando una apariencia algodonosa y polvosa, mientras que las características microscopias se encontró pocos conidióforos simples y abundantes conidios alargados de forma ovoidal, estas características morfológicas coinciden con lo descrito por Valle et al., (2021, pp.1-19), quienes describieron que los aislados de *M. anisopliae* mostraron colonias inicialmente blancas, que al esporular se tornan de color verde, con conidióforos simples o agregados y fiálides en forma de botella. Los conidios son alargados, ovoides a cilíndricos dispuestos en cadenas compactas paralelas, que en masa presentaron color verde olivo.

Las características macroscópicas de *T. harzianum* presentó un micelio blanco y algodonoso al cuarto día incubación, mientras que el séptimo y octavo se presentó una apariencia aterciopelada levemente blando tomando un color verde oscuro.

Ameratunga et al., (2010, pp.704-709), reportaron características macroscópicas similares donde obtuvieron un micelio blanco, algodonoso y posteriormente una esporulación verde oliva de apariencia aterciopelada y el hongo presentó un crecimiento micelial blanco durante los 3 primeros días de incubación, al quinto y sexto día se evidenció una esporulación total sobre la placa.

Las características microscópicas presentaron abundantes conidióforos ramificados piramidales, fiálides delgadas en forma de botella y abundantes conidios cortos ovoides de paredes lisas.

Romero et al., (2009, pp.143-151), mencionaron que los conidióforos son de color verde y que presentan diversas ramificaciones perpendiculares, en algunos casos se observa la formación de ramas laterales en grupos de dos a tres, las fiálides son largas y delgadas con verticilos terminales de hasta 4 conidios con forma citriforme y subglobosos.

4.3 Comprobación de la hipótesis

La investigación demostró que la hipótesis alterna se cumple y que *Bacillus subtilis* F. Cohn tiene propiedades antagonistas contra al menos un hongo benéfico.

CAPÍTULO V

5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Bacillus subtilis F. Cohn, causa una disminución en el crecimiento en los hongos *A. oligospora* (CH02), *A. musiformis* (CH01), *A. conoides* (PG02) y *B. bassiana* (A21), con una inhibición del crecimiento micelial superior al 50% afectando en la tasa de crecimiento. Por otro lado, los hongos *A. oligospora* (PG01), *M. anisopliae* (A13) y *T. harzianum* (Th01) presentaron efectos positivos, logrando adaptarse a la presencia de la bacteria y experimentando una inhibición del crecimiento micelial menor al 25% la tasa de crecimiento no se vio tan afectada en estos hongos.

El porcentaje de inhibición de la esporulación los hongos *A. oligospora* (PG01), *A. oligospora* (CH02), *A. musiformis* (CH01), *A. conoides* (PG02) y *B. bassiana* (A21) presentaron porcentaje superiores al 50%. En cambio, los hongos *M. anisopliae* (A13) y *T. harzianum* (Th01) presentaron porcentajes menores al 25%.

En las características morfológicas *Bacillus subtilis* F. Cohn provoca cambios notorios, el principal cambio es en la densidad del micelio, mientras que las características microscópicas como la forma, color etc., no tienen ningún efecto.

5.2 Recomendaciones

Realizar una investigación en campo para lograr determinar si *Bacillus subtilis* F. Cohn con *T. harzianum* (Th01), provoca alguna efectividad que permita mejorar los rendimientos de los cultivos y optimizar el uso de los recursos, ya que el género *Bacillus* y género *Trichoderma* son conocidos por su capacidad de promover el crecimiento de las plantas y mejorar la resistencia de estas frente a enfermedades.

BIBLIOGRAFÍA

ALBUQUERQUE, E. “Hongos Entomopatógenos: importante herramienta para el control de «moscas blancas» (Homóptera: *aleyrodidae*). *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*” [en línea], 2008, (Brasil) 5(6), pp. 211. [Consulta: 05 marzo 2023]. Disponible en: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/25735/1/Maranhao.pdf>.

ARIZA, Y. & SÁNCHEZ, L. “Determinación de metabolitos secundarios a partir de *Bacillus subtilis* con efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp.”. *Nova* [en línea], 2012, (Colombia) 10(18), pp. 150. Consulta: [11 febrero 2023]. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702012000200002

ADAM, M., et al. “Bacterial antagonists of fungal pathogens also control root-knot nematodes by induced systemic resistance of tomato plants”. *PLoS ONE* [en línea], 2014, (United State of America) 9(2), pp. 1-8. [Consultado: 10 febrero 2023]. ISSN 19326203. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0090402&type=printable>

ARBEOLA, A., et al. “Germinación «in vitro» de embriones inmaduros a distintas temperaturas de estratificación”. *ITEA* [en línea], 2002, (Argentina) 98(1), pp. 71-80. Consulta: [18 febrero 2023]. ISSN 1130-6017. Disponible en: https://www.aida-itea.org/aida-itea/files/itea/revistas/2002/98V-1/98V-1_06.pdf

ACEVEDO RAMÍREZ, P.M.d.C., et al. “Actividad proteolítica de productos extracelulares de *Artrobotrys musiformis* y su efecto *in vitro* contra *Haemonchus contortus* larvas infecciosas.”. *Veterinary Record Open* [en línea], 2015, (Colombia) 2(1), pp. 1-6. Consulta: [16 marzo 2023]. ISSN 2399-2050. Disponible en: <https://bvajournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1136/vetreco-2014-000103>

AMERATUNGA, S., et al. “Chronic neck pain following car crashes: A population-based study from Auckland, New Zealand”. *Internal Medicine Journal* [en línea], 2010, (New Zealand) 40(10), pp. 704-709. [Consulta: 11 marzo 2023]. ISSN 14440903. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1445-5994.2009.02101.x>

ARMENIA, Gurrola. Actividad antifúngica de extractos con metabolitos secundarios de semilla de *Moringa Oleifera* Lam. para el control *in vitro* de *Rhizopus stolonifer* (Ehrens.: Fr.) Vuill [En línea] (Trabajo de titulación). (Maestría) Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo,

A.C., Sonora, México. 2005. pp. 37. [Consulta: 2022-11-19]. Disponible en: https://ciad.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1006/825/1/Velazquez-Gurrola%20A_MC_2005.pdf

BARQUERO, L., et al. “Informe de vigilancia tecnológica. Bioinsumos. Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología”. *COLCIENCIAS*, vol. 1, (2007), (Colombia) pp.13.

BRAVO, Natalie. “Hongos benéficos para la agricultura orgánica y convencional”. *Revista Frutícola COPEFRUT S.A.*, vol. 40, n° 1 (2018), (Chile) p. 29.

BARRON, G. L. (1977). The nematode-destroying fungi. Canadian Biological Publications Ltd.

CHIRIBOGA, H., et al. “*Beauveria Bassiana* hongo entomopatógeno para el control biológico de hormigas cortadoras”. *IICA* [en línea], 2015, (Paraguay) 1(1), pp. 1-25. [Consulta: 15 marzo 2023]. ISBN 9789292485924. Disponible en: <https://repositorio.iica.int/bitstream/handle/11324/2646/BVE17038724e.pdf;jsessionid=15810051E3ECA9685E6C4B0ADD1280F1?sequence=1>.

CASTILLO, C., et al. “Caracterización morfológica de *Beauveria bassiana*, aislada de diferentes insectos en Trujillo Venezuela”. *Academia Trujillo Venezuela* [en línea], 2012, (Venezuela) 11(13), pp. 275-281. Consulta: [15 marzo 2023]. ISSN 1690-3226. Disponible en: <http://www.saber.ula.ve/bitstream/handle/123456789/37631/articulo7.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

CORRALES, Lucia., et al. “Efecto biocontrolador de *Bacillus* spp., frente a *Fusarium* sp. bajo condiciones de invernadero en plantas de Tomillo (*Thymus vulgaris* L.). *NOVA*, vol. 10, n° 17 (2012), (Cuba) pp. 69.

CASTILLO Salvador, Zeno. Uso de *Metarhizium anisopliae* para el control biológico del salivazo (*Aeneolamia* spp. y *Prosapia* spp.) en pastizales de *Brachiaria decumbens* en El Petén, Guatemala [En línea] (Trabajo de titulación). (Magister), Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza México. Turrialba, Costa Rica. 2006. pp. 4-42. [Consulta: 2023-03-12]. Disponible en: <https://repositorio.catie.ac.cr/handle/11554/4543>

CASTILLO Ávila, Marcia Leonor, & MEDINA MEDINA, José Vinicio. Control biológico del nematodo agallador del tomate de mesa *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White, 1919) Chitwood, 1949 mediante aislamientos de hongos nematófagos nativos [En línea] (Trabajo de titulación). (Ingeniero) Universidad Nacional De Loja, Loja, Ecuador. 2014. pp. 13-65. [Consulta: 2023-02-15]. Disponible en: <https://dspace.unl.edu.ec/jspui/handle/123456789/12075>

CAICEDO, S., & CHACÓN, J. 2017. Pruebas bajo invernadero de cepas de *Bacillus subtilis* como agente de biocontrol de *Alternaria* spp. en *Brassica oleracea* var. *Itálica* y técnicas de conservación de cepas [En línea] (Trabajo de titulación). (Ingeniero) Universidad Politécnica Salesiana, Quito, Ecuador. pp. 1-10. [Consultado: 2023-02-07]. Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/13545>

DÍAZ, M., et al. “Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos”. *Interciencia* [en línea], 2006, (Venezuela) 31(12), pp. 856-860. [Consultado: 10 febrero 2023]. ISSN 0378-1844. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33901204>

FERNÁNDEZ, O. “Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario”. *Manejo Integrado de Plagas* [en línea], 2001, (Costa Rica) 1(62), pp. 96-100. [Consultado: 29 enero 2023]. ISSN 1016-0469. Disponible en: <https://repositorio.catie.ac.cr/handle/11554/6578>

FERRERA CERRATO, Ronald., et al. *Manual de biología de suelos Tropicales* [en línea]. Cartago-Costa Rica: Editorial TEC, 2012. [Consultado: 07 febrero 2023]. Disponible en: https://openlibrary.org/books/OL25410344M/Manual_de_biolog%C3%ADa_de_suelos_tropicales#editions-list

FERNÁNDEZ JIMÉNEZ, M.A. “Implementación de hongos nematófagos para el control de parásitos gastrointestinales”. *Pensamiento y Acción* [en línea], 2019, (Colombia) 1(27), pp. 1-13. [Consultado: 15 febrero 2023]. ISSN 0120-1190. Disponible en: https://revistas.uptc.edu.co/index.php/pensamiento_accion/article/view/10201/8413

GARCÍA, M.A., et al. “Aislamiento y caracterización morfológica de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*”. *Horizonte Sanitario* [en línea], 2011, (México) 10(2), pp. 28-40. Consulta: [16 marzo 2023]. ISSN 1665-3262. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=457845138002>

GUIGÓN LÓPEZ, C., et al. “Identificación Molecular de Cepas Nativas de *Trichoderma* spp. su Tasa de Crecimiento *in vitro* y Antagonismo contra Hongos Fitopatógenos”. *Revista mexicana de fitopatología* [en línea], 2010, (México) 28(2), pp. 87-96. Consulta: [16 marzo 2023]. ISSN 2007-8080. Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092010000200002

GÓMEZ, Eyder Daniel. Caracterización morfológica, molecular, bioquímica de hongos y bacterias asociados a piñuela *Bromelia karatas* L. en los municipios de Patia y Mercaderes Cauca [En línea] (Trabajo de titulación). (Maestría) Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Colombia. 2018. pp. 90

HERNÁNDEZ, V. & BERLANGA, A. “Uso de *Beauveria bassiana* como insecticida microbial”. *SAGAR* [en línea], 1998, (Colombia) 1(1), pp. 1-4. Consulta: [11 febrero 2023]. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/172882/Ficha_CB_03_Beauveria_bassiana.pdf

HERNÁNDEZ ROSAS, F., et al. “Análisis de las investigaciones sobre *Metarhizium anisopliae* en los últimos 40 años”. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* [en línea], 2019, (México) 1(22), pp. 155-166. Consulta: [11 febrero 2023]. ISSN 2007-0934. Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342019000900155

HERNÁNDEZ MELCHOR, D.J., et al. “*Trichoderma*: Importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial”. *Chilean Journal of Agricultural and Animal Sciences* [en línea], 2019, (México) 35(1), pp. 98-112. Consulta: [12 febrero 2023]. ISSN 0719-3890. Disponible en: https://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0719-38902019005000205&script=sci_arttext

INFANTE, D., et al. “Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos”. *Revista de Protección Vegetal* [en línea], 2009, (Cuba) 24(1), pp. 1-8. Consulta: [18 marzo 2023]. ISSN 1010-2752. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522009000100002

JUNGES, E., et al. “Effect of priming and seed-coating when associated with *Bacillus subtilis* in maize seeds”. *Revista Ciencia Agronómica* [En línea], 2013, (Colombia) 44(3), pp. 521.

[Consultado: 07 febrero 2023]. ISSN 1806-6690. Disponible en: <https://www.scielo.br/j/rca/a/jFrKx7SHsGGWjNzWxgK7cyQ/?lang=en&format=pdf>

LEÓN, D.C., et al. “Actividad fungicida de compuestos orgánicos volátiles de la bacteria *Paenibacillus* contra *Colletotrichum gloeosporioides*”. *Revista Colombiana de Química* [En línea], 2020, (Colombia) 49(1), pp. 20-25. [Consulta: 18 noviembre 2022]. ISSN 0120-2804. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-28042020000100020&lng=en&nrm=iso

LARREA, I., et al. “Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus* spp. con actividad contra *Tetranychus urticae* Koch en cultivos comerciales de rosas”. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* [en línea], 2015, (Colombia) 25(2), pp. 145. [Consultado: 29 enero 2023]. ISSN 0123-3475. Disponible en: http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v17n2/es_0123-3475-biote-17-02-138.pdf

LAYTON, C., et al. “Mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos”. *Nova*, vol. 9, n° 15 (2011), (Colombia) pp. 179.

MÁRQUEZ LARA, D., et al. “Capacidad predadora *in vitro* de hongos nematófagos nativos de Cundinamarca sobre nematodos gastrointestinales de bovinos”. *Revista de Medicina Veterinaria* [en línea], 2015, (Colombia) 31(1), pp. 47-55. Consulta: [20 marzo 2023]. ISSN 0122-9354. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-93542016000100005

MARÍN, V.H., et al. “Hongos entomopatógenos y sus metabolitos, una alternativa sustentable para el control de plagas en viveros forestales y agricultura protegida: caso *Bradysia imPATiens* (Johannsen)”. *Sociedades Rurales, Producción y Medio Ambiente* [en línea], 2015, (México) 15(30), pp. 111-134. Consulta: [16 marzo 2023]. ISSN 2007-7556. Disponible en: <https://sociedadesruralesojs.xoc.uam.mx/index.php/srpma/article/view/292/290>

MAGALY, S.G. de G., “Cultivo De Los Microorganismos”. *Cultivo De Microorganismos* [en línea], 2012, (Colombia) 1(1), p.13. Consulta: [18 febrero 2023]. Disponible en: http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/08_Tema_5_Cultivo.pdf.

MORALES, S., 2016. Evaluación del potencial antagonico de cepas silvestres de *Trichoderma* spp. hacia microorganismos fitopatógenos [En línea] (Trabajo de titulación). (Maestro) Universidad Michoacana De San Nicolás De Hidalgo, Morelia, México. 2016. pp. 3-126. [Consulta: 2023-02-15]. Disponible en: http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/handle/DGB_UMICH/1950

MESA VANEGAS, A.M., et al. “Metabolitos secundarios en *Trichoderma* spp. y sus aplicaciones biotecnológicas agrícolas”. *Actualidades Biológicas* [en línea], 2020, (Colombia) 41(111), pp. 1-13. Consulta: [20 marzo 2023]. ISSN 0304-3584. Disponible en: <https://revistas.udea.edu.co/index.php/actbio/article/view/341271>

MUÑOZ MÁRQUEZ, María Enriqueta. Efecto de la interrupción del gen cromosomal *pfkA* sobre el crecimiento, esporulación y producción de ácidos orgánicos en *Bacillus subtilis*. [En línea] (Trabajo de titulación). (Doctor) Centro de investigación científica y de Educación Superior de Ensenada, Ensenada, México. 2009. p. 19 [Consulta: 2023-02-22]. Disponible en: <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/2738/1/182851.pdf>

MÁRQUEZ TORRES, F. Aislamiento y taxonomía de bacterias del género *Bacillus* recolectadas en suelos de un bosque de *Pinus radiata* y una pradera permanente en distintas épocas de muestreo [En línea] (Trabajo de titulación). (Ingeniero) Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias, Valdivia, Chile. pp. 3. [Consultado: 2023-02-05]. Disponible en: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2007/fcm357a/doc/fcm357a.pdf>

NARANJO, R.P. “Manejo biológico de nematodos fitoparásitos con hongos y bacterias”. *Tecnología en Marcha* [en línea], 2008, (Panamá) 21(1), pp. 123. [Consultado: 26 enero 2023]. ISSN 2215-3241. Disponible en: https://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec_marcha/article/view/1345/1247

NORDBRING HERTZ, B., et al. (2006). “Nematophagous fungi”. *Encyclopedia of Life Sciences* [en línea], 2006, (United State of America) 1(1), pp. 1-11. [Consultado: 09 febrero 2023]. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/228034002>

ÑACATO, C., & VALENCIA, M. Aislamiento, identificación y pruebas *in vitro* de cepas autóctonas de *Bacillus subtilis* como agente de biocontrol de *Alternaria* spp en *Brassica oleracea* var. *Itálica* [en línea] (Trabajo de titulación). (Ingeniero) Universidad Politécnica Salesiana,

Biotecnología de los Recursos Naturales, Quito, Ecuador. 2016, pp. 1-100. [Consultado: 2023-02-03]. Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/12144>

ORBERÁ, T., et al. Aplicaciones potenciales de la cepa SR/B-16 de *Bacillus subtilis* para el control de hongos fitopatógenos en cultivos económicamente relevantes. *Aplicación de biotecnología* [en línea], 2014, (Cuba) 31(1), pp.7. [Consultado: 25 enero 2023]. ISSN 1027-2852. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1027-28522014000100002

OCAMPO GUTIÉRREZ, Ana Yuridia. Estudio de biocontrol de endófitos y rizobacterias sobre hongos endófitos cultivables de semillas de *Pinus chiapensis* [En línea] (Trabajo de titulación). (Maestría) Benemérita Universidad Autónoma De Puebla, Puebla, México. 2020. pp. 1-50. [Consulta: 2023-02-22]. Disponible en: <https://repositorioinstitucional.buap.mx/handle/20.500.12371/10344>

OCAMPO GUTIÉRREZ, Ana Yuridia. Caracterización taxonómica y actividad depredadora de hongos nematófagos, evaluación y clasificación química de los compuestos con actividad nematicida contra *Haemonchus contortus* [En línea] (Trabajo de titulación). (Doctor) Universidad Autónoma Del Estado De Morelos, Morelos, México. 2021. pp. 16-22. [Consulta: 2023-02-22]. Disponible en: <http://riaa.uaem.mx/handle/20.500.12055/1487>

PÉREZ ANZÚREZ, G., et al. “*Arthrobotrys musiformis* (Orbiliales) Kills *Haemonchus contortus* Infective Larvae (*Trichostrongylidae*) through Its Predatory Activity and Its Fungal Culture Filtrates”. *Pathogens* [en línea], 2022, (México) 11(10), pp. 1-15. Consulta: [15 marzo 2023]. ISSN 20760817. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2076-0817/11/10/1068>

PADILLA MELO, G.N., et al. “Caracterización patogénica y morfológica de aislamientos de *Metarhizium anisopliae* obtenidos de diferentes ordenes insectiles”. *Cenife* [en línea], 2000, (Colombia) 51(1), pp. 28-40. Consulta: [16 marzo 2023]. ISSN 0120-0275. Disponible en: <https://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/966/1/arc051%2801%2928-40.pdf>

PEDRAZA, Luz., et al. “Mecanismos de acción de *Bacillus* spp. (*Bacillaceae*) contra microorganismos fitopatógenos durante su interacción con plantas”. *Acta Biológica Colombiana* [en línea]. 2020, (Colombia) 25(1), pp.112-125. [Consulta: 25 febrero 2023]. ISSN 0120-548X. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-548X2020000100112&lng=en&nrm=iso

PADRÓN MARTINEZ, H., et al. “Control biológico de fitopatógenos mediante aislados de *Trichoderma* spp”. *AgroProductividad* [en línea], 2017, (México) 10(3), pp. 9-13. Consulta: [18 febrero 2023]. ISSN 2448-7546. Disponible en: <https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/961>

PANTONE. *Pantone color guide* [blog]. 2020. [Consulta: 05 marzo 2023]. Disponible en: <https://www.pantone.com/color-guide>

RUIZ, E., et al. “Actividad antagonica de filtrados de *Bacillus subtilis* contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.)”. *Rev. Mex. Ciencia Agro* [En línea], 2014, (México) 5(7), pp. 1326. [Consulta: 10 enero 2023]. ISSN 2007-0934. Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342014000700015

ROBERTS, P.A. “Conceptual and practical aspects of variability in root-knot nematodes related to host plant resistance”. *Annual Review of Phytopathology*, vol. 33 (1995), (United State of America) pp. 199–221.

RODRÍGUEZ, M.G., et al. “Efecto antagonico “*in vitro*” de diferentes cepas de *Trichoderma* spp. sobre agentes patógenos de semilla y suelo en el cultivo del frijol”. *Centro agrícola* [en línea], 2009, (Colombia) 35(1), pp. 5-10. Consulta: [18 marzo 2023]. ISSN 0253-5785. Disponible en: <http://cagricola.uclv.edu.cu/index.php/es/?id=475:efecto-antagonico-in-vitro-de-diferentes-cepas-de-trichoderma-spp-sobre-agentes-patogenos-de-semilla-y-suelo-en-el-cultivo-del-frijol>

RAMOS HERNÁNDEZ, María Magdalena. *Bacillus subtilis*: Producción de fracciones péptidicas antimicrobianas y promoción de crecimiento vegetal de tomate [En línea] (Trabajo de titulación). (Maestro) Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, México. 2011. pp.14-17 [Consulta: 2023-02-22]. Disponible en: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/handle/123456789/4024>

ROMERO ARENAS, O., et al. “Características de *Trichoderma harzianum*, como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles”. *Revista colombiana de Biotecnología* [en línea], 2009, (Colombia) 11(2), pp. 143-151. Consulta: [18 febrero 2023]. ISSN 0123-3475. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v11n2/v11n2a15.pdf>

RAGAZZO SÁNCHEZ, J.A., et al. “Selección de cepas de *Bacillus* spp. productoras de antibióticos aisladas de frutos tropicales”. *Revista Chapingo Serie Horticultura* [en línea], 2011, (México) 17(1), pp. 5-11. Consulta: [4 abril 2023]. ISSN 2007-4034. Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-152X2011000400002

RUIZ SÁNCHEZ, E., et al. “Actividad antifúngica e identificación molecular de cepas nativas de *Bacillus subtilis*”. *Agrociencia* [en línea], 2016, (México) 50(2), pp. 133-148. Consulta: [22 febrero 2023]. ISSN 2521-9766. Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952016000200133

ROMERO ARENAS, O., et al. “The characteristics of *Trichoderma harzianum* as a limiting agent in edible mushrooms”. *Revista colombiana de Biotecnología* [en línea], 2009, (Colombia) 11(2), pp. 143-151. [Consulta: 10 marzo 2023]. ISSN 0123-3475. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-34752009000200015

SOSA, A., et al. “Aislamiento y selección de bacterias pertenecientes al género *Bacillus* con potencialidades para el control biológico en semilleros de tabaco”. *Centro Agrícola* [en línea], 2005, (Cuba) 32 (3), pp. 25-29. [Consultado: 28 enero 2023]. ISSN 0253-5785. Disponible en: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=CU2009100889>

TORRES CORTÉS, G., et al. “Antagonism of *Bacillus* spp. against *Fusarium oxysporum* f. sp. radicis-lycopersici and their effects on tomato plants growth”. *Chilean Journal of Agricultural Research*, vol. 78, n° 2 (2018), (Chile) pp. 239-245.

TIUPUL, Paulo César. Anuario climatológico año 2011. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.

VALLE RAMÍREZ, S.B., et al. “Aislamiento y caracterización de *Metarhizium* spp. de cultivos de caña de azúcar y su patogenicidad contra Mahanarva andigena (Hemiptera: *Cercopidae*)”. *Ciencia Tecnológica Agropecuaria* [en línea], 2021, (Ecuador) 23(1), pp. 1-19. [Consulta: 11 marzo 2023]. ISSN 25005308. Disponible en: <https://revistacta.agrosavia.co/index.php/revista/article/view/2361/935>

VILLARREAL DELGADO, M.F., et al. “El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola”. *Revista Mexicana de Fitopatología* [en línea],

2018, (México) 36(1), pp. 95-130. Consulta: [12 febrero 2023]. ISSN 2007-8080. Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092018000100095

VILLAMIL, C., “Mecanismos de antagonismo y tipos de agentes biocontroladores”. [en línea], 1998, (Colombia) 1(1), pp. 1-5. Consulta: [11 febrero 2023]. Disponible en: file:///C:/Users/59399/Downloads/pdf-antagonismo-microbiano_compress.pdf.

VÁSQUEZ CÁRDENAS, Julián Andrés. Caracterización microbiológica y producción de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* en cultivo artesanal [En línea] (Trabajo de titulación). (Microbiólogo Agrícola y Veterinario) Pontificia Universidad Javerina, Cali, Colombia. 2010. p. 19. [Consulta: 2023-02-15]. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/8662>

VARON, A. “Algunas consideraciones sobre el control biológico de nematodos”. *Corpoica-MIP*, (2000), (Colombia) pp. 46-53.

YANG, Y., et al. “Evolution of nematode-trapping cells of predatory fungi of the *Orbiliaceae* based on evidence from rRNA-encoding DNA and multiprotein sequences”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [en línea], 2007, (United States of America) 104(20), pp. 8379-8384. [Consultado: 10 febrero 2023]. ISSN 00278424. Disponible en: <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.0702770104>

YANG, J. K. “Genomic and proteomic analyses of the fungus *Arthrobotrys oligospora* provide insights into nematode-trap formation”. *PLoS Pathogens* [en línea], 2011, (United State of America) 7(1), pp. 1-12. [Consultado: 10 febrero 2023]. ISSN 1002179. Disponible en: <https://journals.plos.org/plospathogens/article/file?id=10.1371/journal.ppat.1002179&type=printable>

ZHANG, Y. “Divergence and dispersal of the nematodetrapping fungus *Arthrobotrys oligospora* from China”. *Environmental Microbiology Reports*, vol. 3, (2011), (China) pp.763–773.

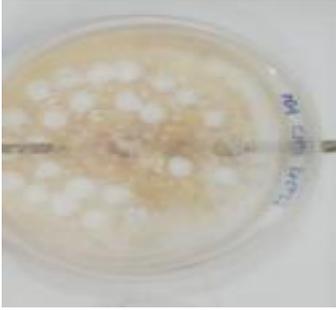


ANEXOS

ANEXO A: PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO

	
Medio para el crecimiento de hongos (PDA)	Medio para el crecimiento de bacterias (AN)
	
Pesando el medio para la preparación	Medios autoclavados
	
Medios de cultivos preparados	Medio vertido en las cajas Petri

ANEXO B: CEPAS DE LOS HONGOS UTILIZADOS EN LA INVESTIGACIÓN

	
<i>A. oligospora</i> (PG01)	<i>A. oligospora</i> (CH02)
	
<i>A. musiformis</i> (CH01).	<i>A. conoide</i> (PG02)
	
<i>Beauveria bassiana</i> (A21)	<i>Metarhizium anisopliae</i> (A13)
	
<i>Trichoderma harzianum</i> (Th01)	

ANEXO C: REPIQUE DE HONGOS



Materiales para utilizar



Esterilización de los materiales



Repique de las siete cepas de hongos

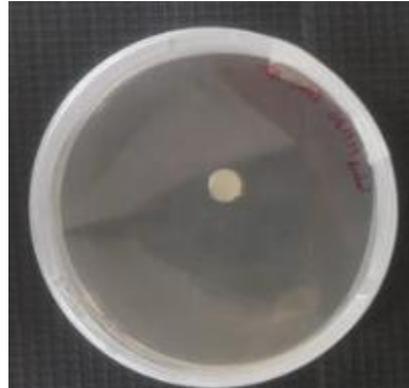


Rotulación de las cajas

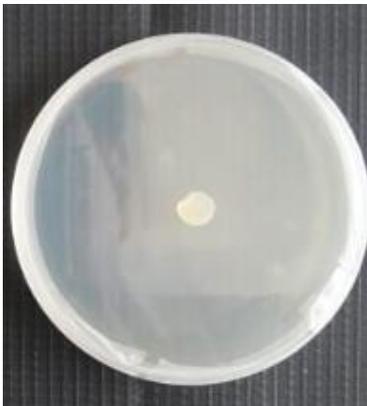
ANEXO D: HONGOS REPICADOS



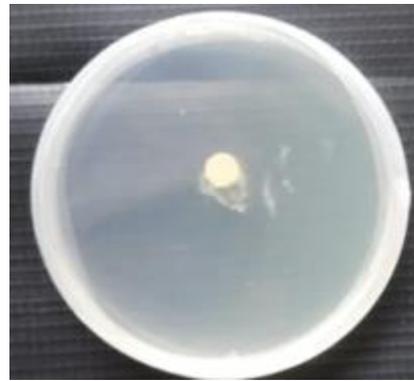
A. oligospora (PG01)



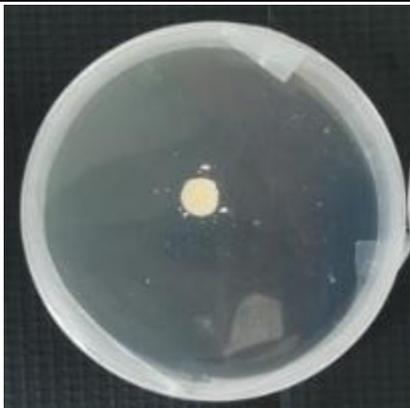
A. oligospora (CH02)



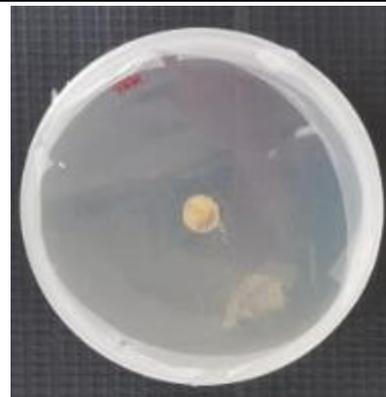
A. musiformis (CH01)



A. conoide (PG02)



Beauveria bassiana (A21)



Metarhizium anisopliae (A13)



Trichoderma harzianum (Th01)

ANEXO E: ENFRENTAMIENTO ENTRE LA BACTERIA Y HONGOS BENÉFICOS

	
<p>Desinfección del área de trabajo</p>	<p>Inoculación de los hongos</p>
	
<p>Inoculación de la bacteria</p>	<p>Rotulación de las cajas</p>

ANEXO F: ALMACENAMIENTO DE LAS UNIDADES EXPERIMENTALES

	
<p>Incubación de las cajas Petri</p>	<p>Incubadora a 28 C</p>

ANEXO G: PROCEDIMIENTO PARA LA INHIBICIÓN DE ESPORULACIÓN

	
<p>Agua estilizada (cámara húmeda)</p>	<p>Raspado de los hongos</p>
	
<p>Absorción del líquido con hongo</p>	<p>Absorción del líquido con <i>Bacillus subtilis</i></p>
	
<p>Medio vertido en los portaobjetos</p>	<p>Cámaras humedad en incubación</p>

ANEXO H: CONTROLES 4 DÍAS DEL ENSAYO



A. oligospora (PG01)



A. oligospora (CH02)



A. musiformis (CH01)



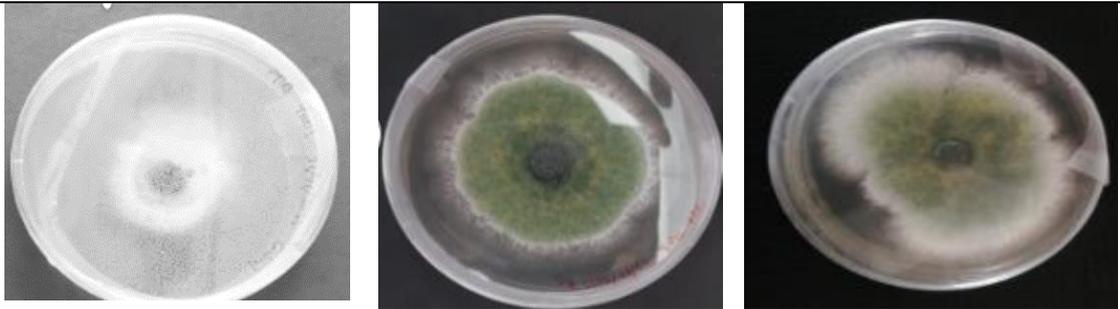
A. conoide (PG02)



Beauveria bassiana (A21)

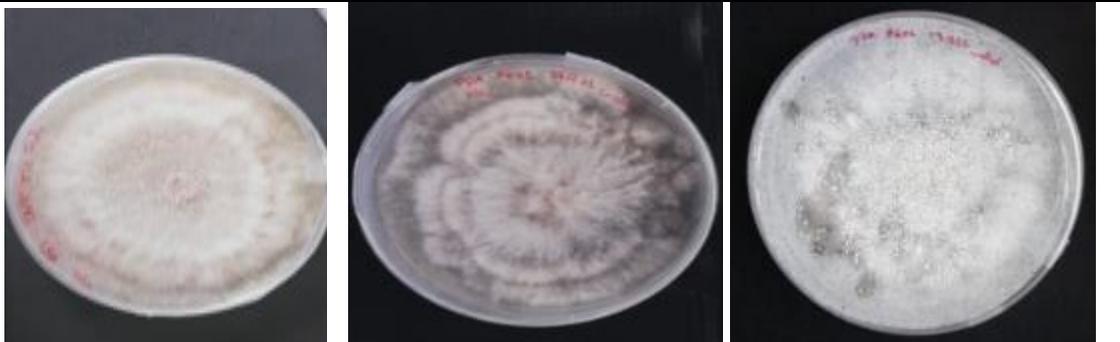


Metarhizium anisopliae (A13)

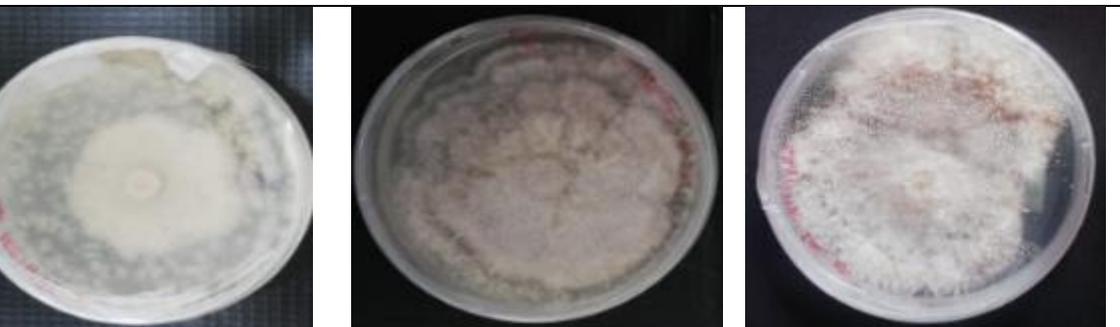


Trichoderma harzianum (Th01)

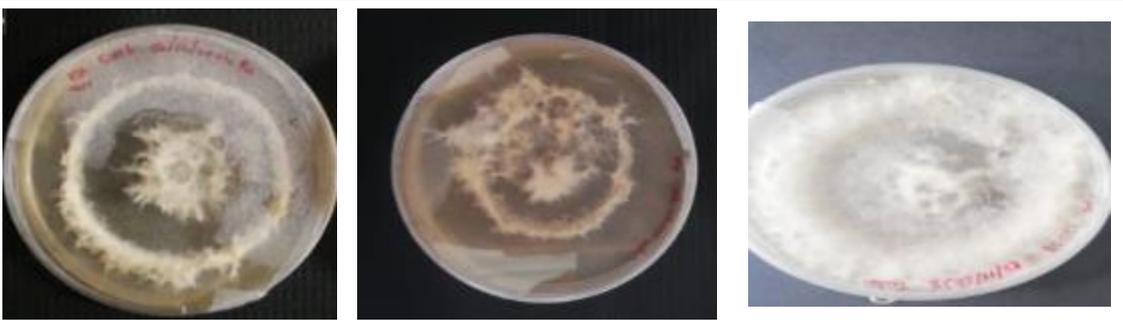
ANEXO I: CONTROLES CRECIMIENTO 100% DEL ENSAYO



A. oligospora (PG01)



A. oligospora (CH02)



A. musiformis (CH01)



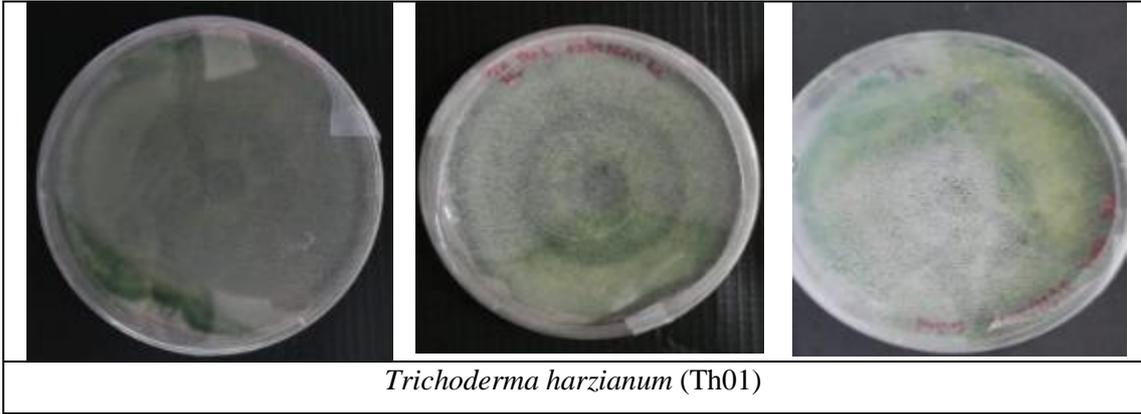
A. conoide (PG02)



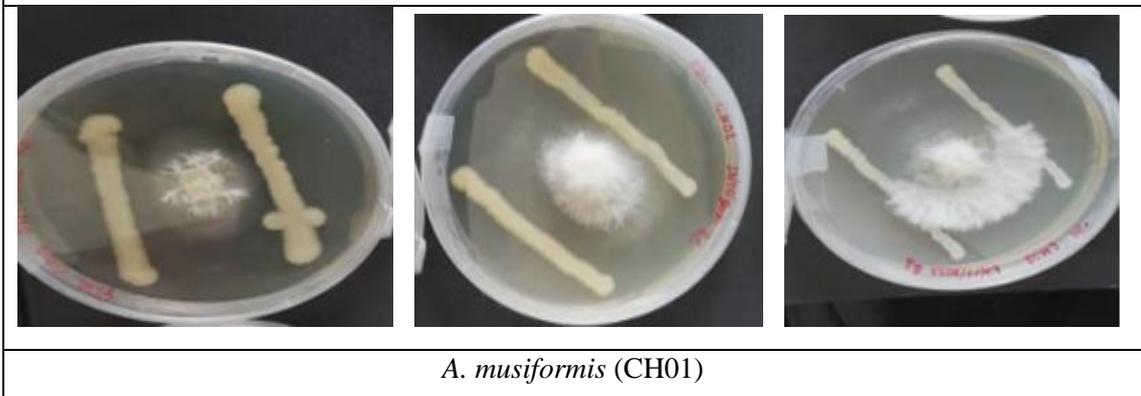
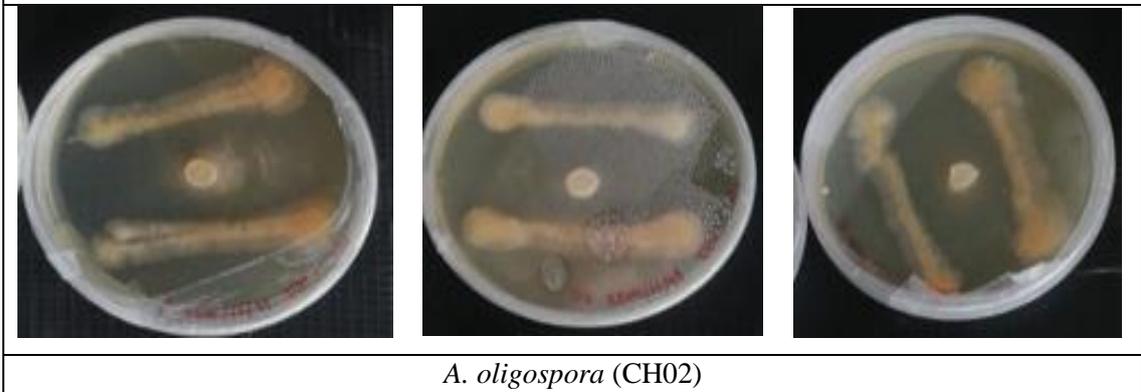
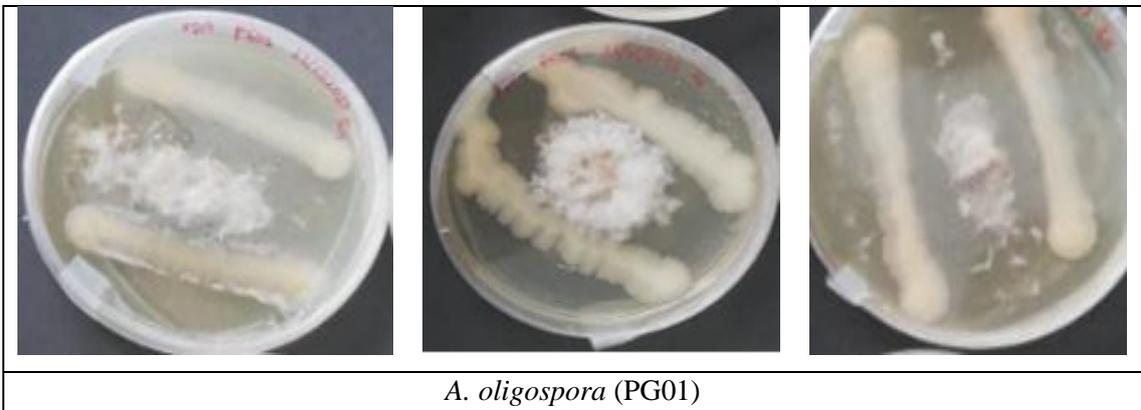
Beauveria bassiana (A21)



Metarhizium anisopliae (A13)

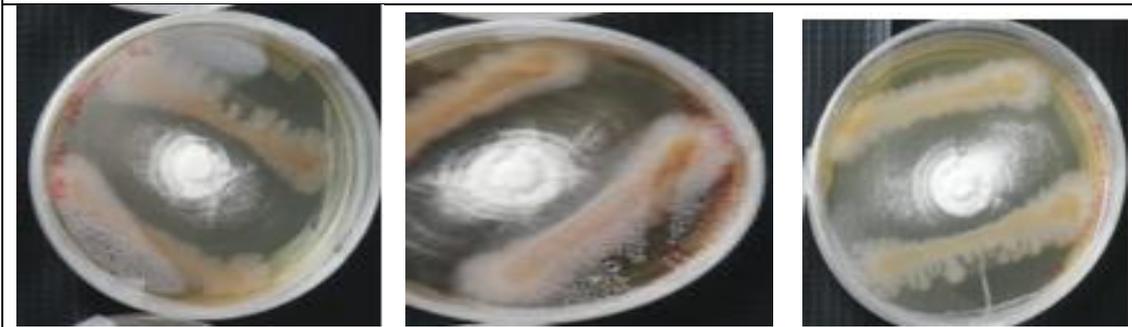


ANEXO J. MÉTODO DUAL TRATAMIENTOS FINALIZADO EL ENSAYO





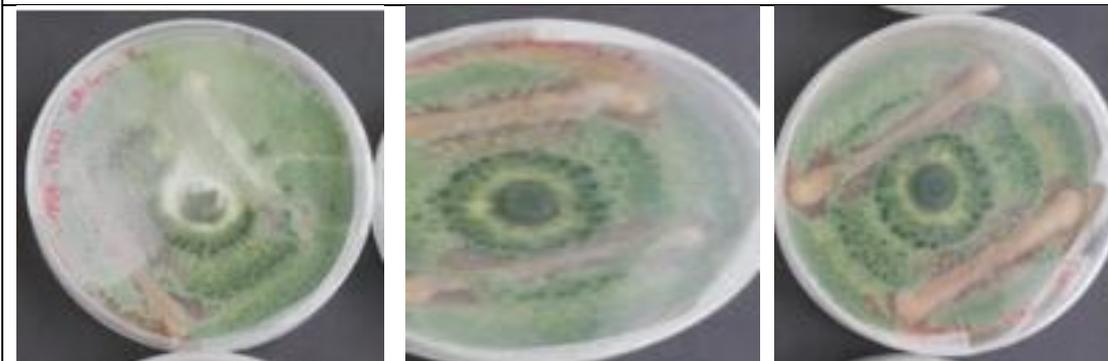
A. conoide (PG02)



Beauveria bassiana (A21)

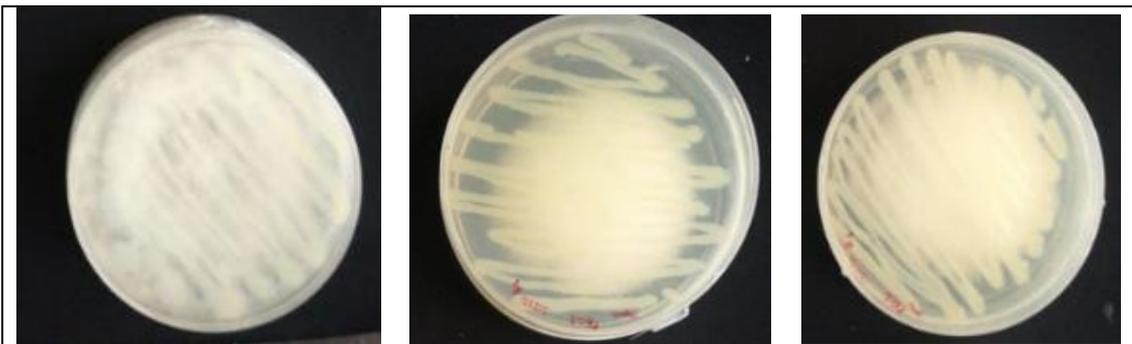


Metarhizium anisopliae (A13)



Trichoderma harzianum (Th01)

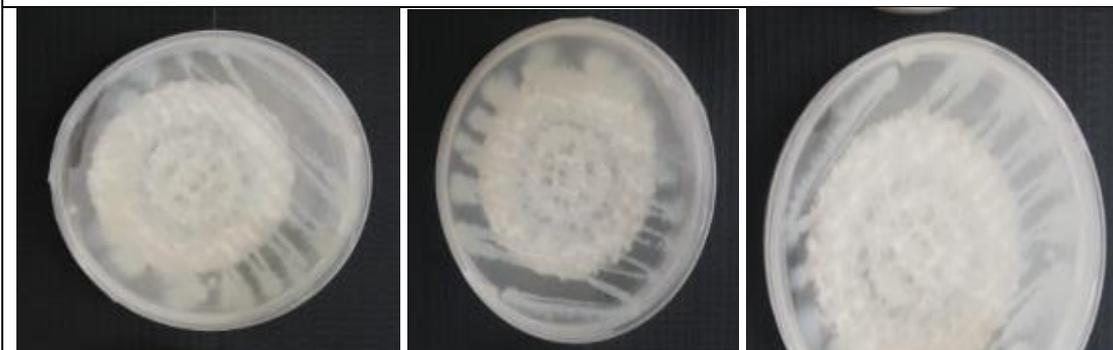
ANEXO K: MÉTODO COMPUESTOS VOLÁTILES (0 HORAS) TRATAMIENTOS FINALIZADO EL ENSAYO



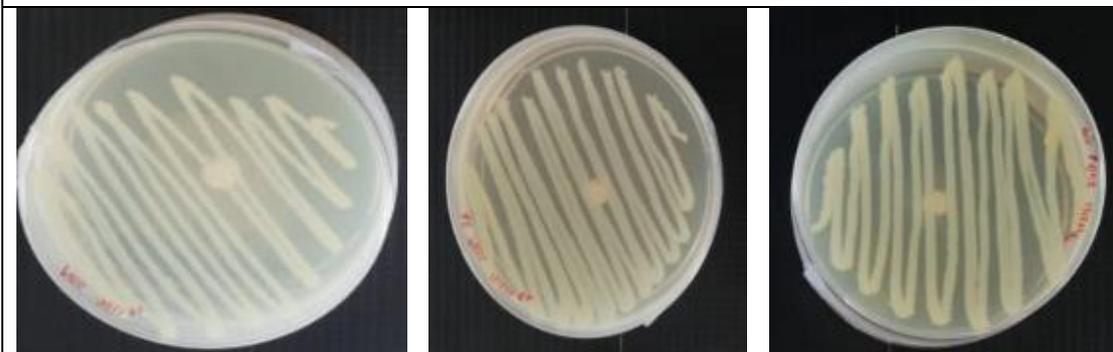
A. oligospora (PG01)



A. oligospora (CH02)



A. musiformis (CH01)



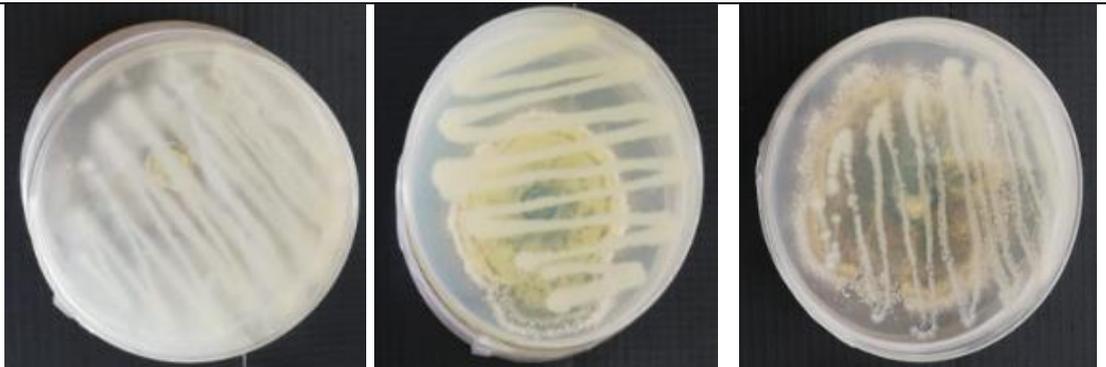
A. conoide (PG02)



Beauveria bassiana (A21)



Metarhizium anisopliae (A13)



Trichoderma harzianum (Th01)

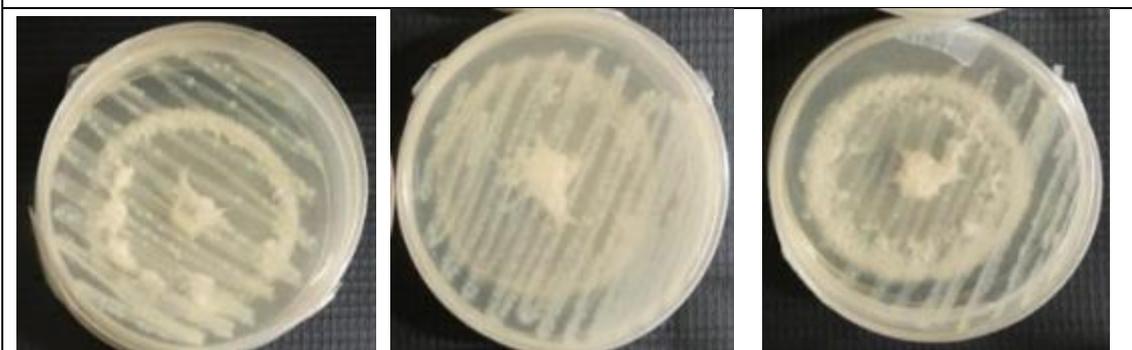
ANEXO L: MÉTODO COMPUESTOS VOLÁTILES (96 HORAS) TRATAMIENTOS FINALIZADO EL ENSAYO



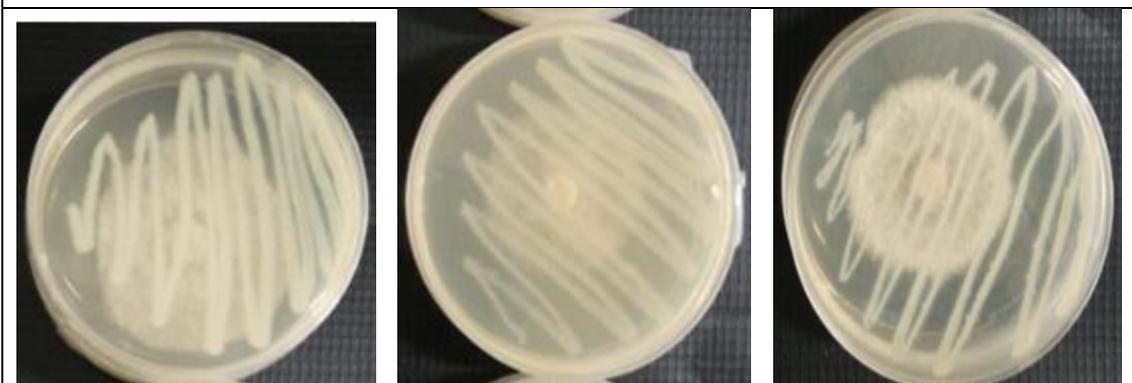
A. oligospora (PG01)



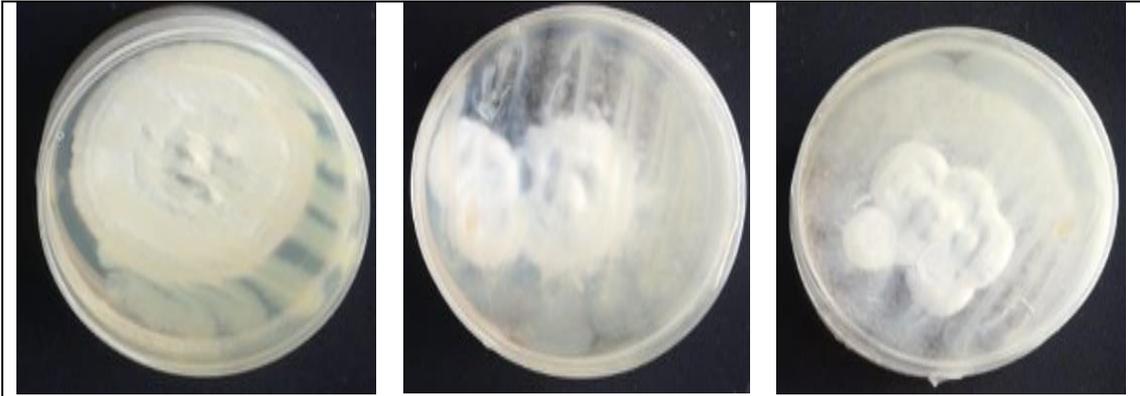
A. oligospora (CH02)



A. musiformis (CH01)



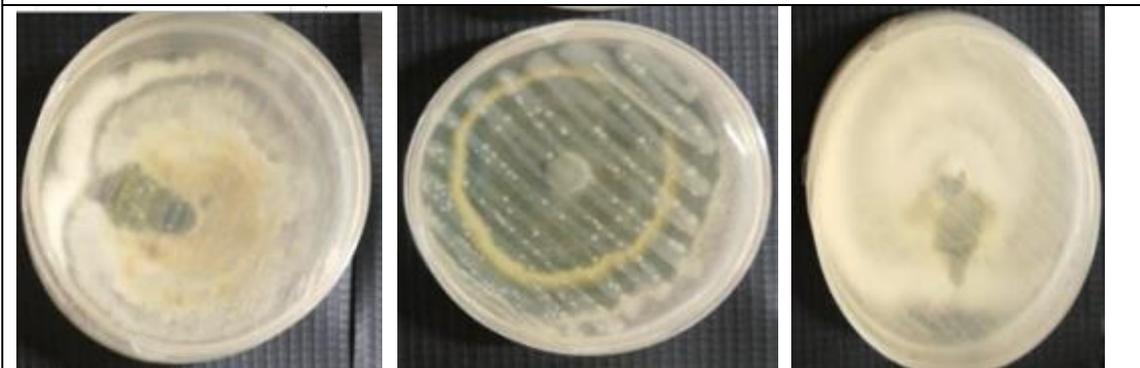
A. conoide (PG02)



Beauveria bassiana (A21)

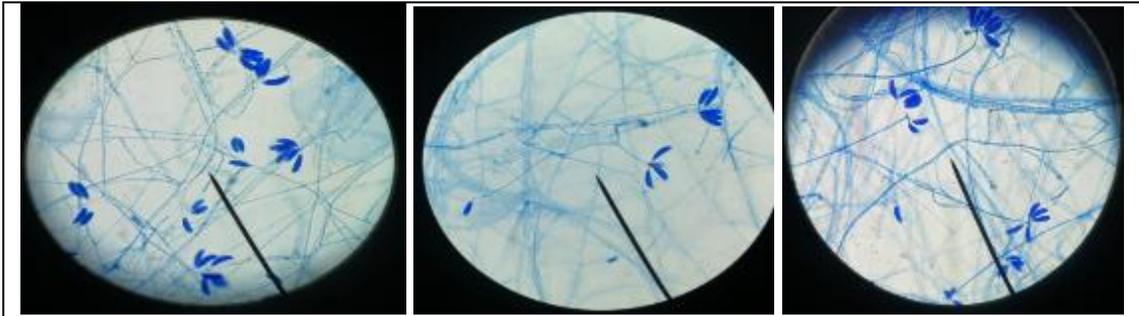


Metarhizium anisopliae (A13)

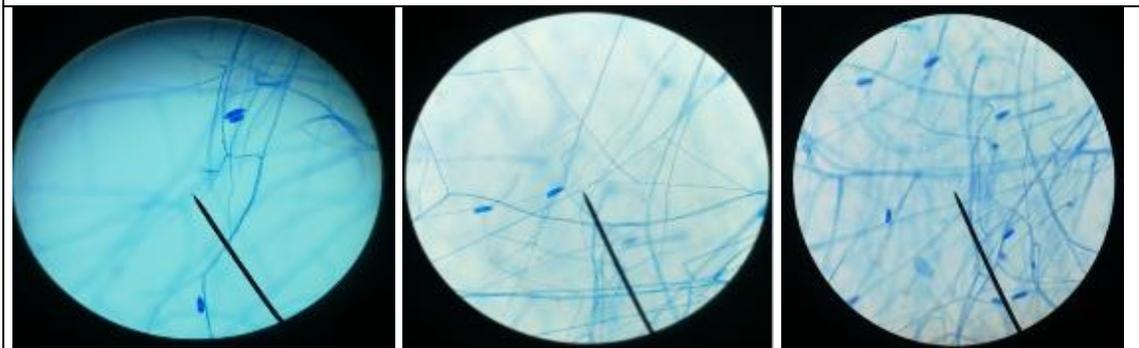


Trichoderma harzianum (Th01)

ANEXO M: INHIBICIÓN DE ESPORULACIÓN DE LOS HONGOS BENÉFICOS

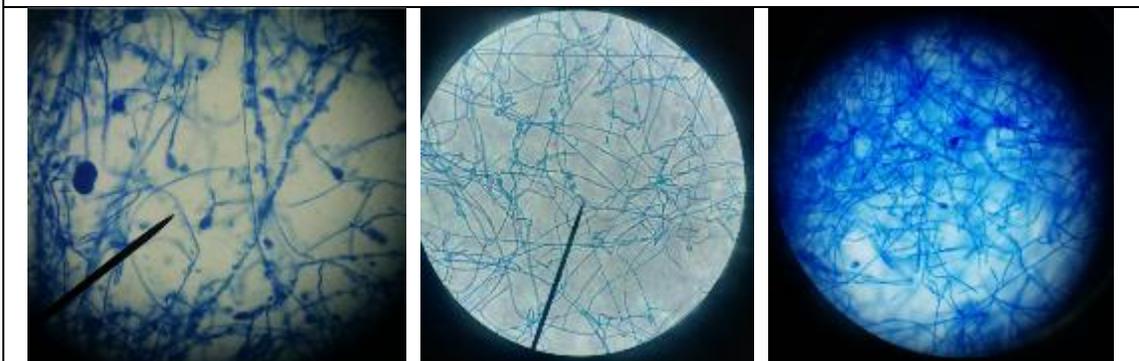


Controles



Repeticiones

A. oligospora (PG01)

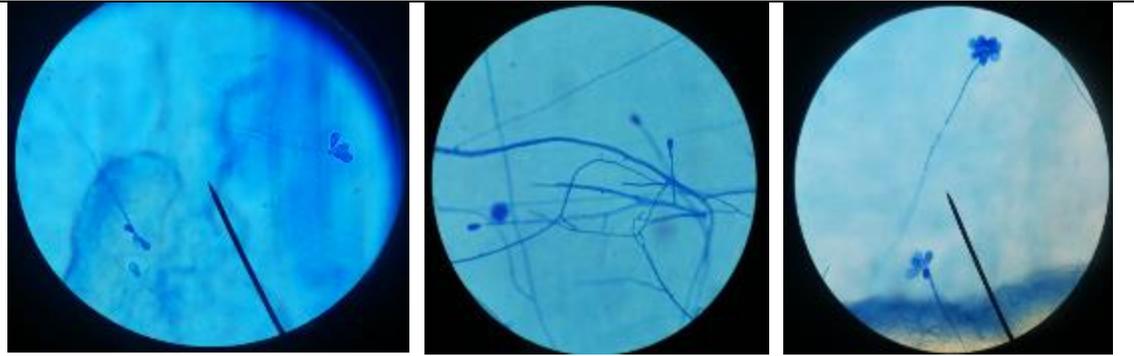


Controles

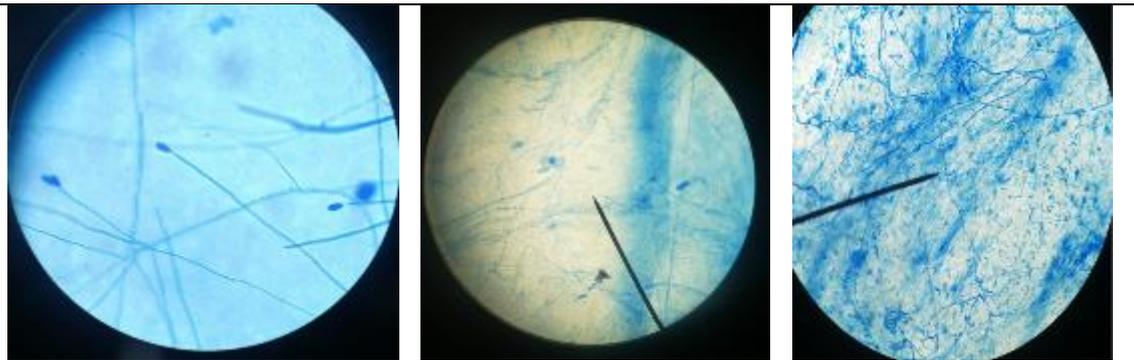


Repeticiones

A. oligospora (CH02)

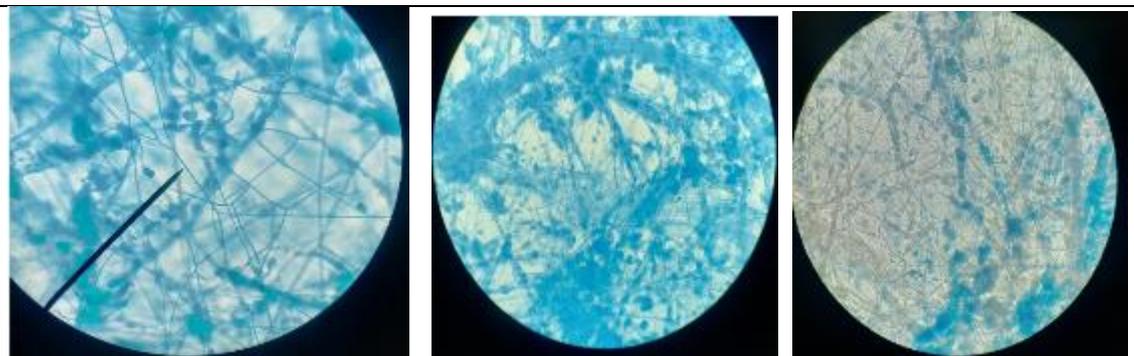


Controles

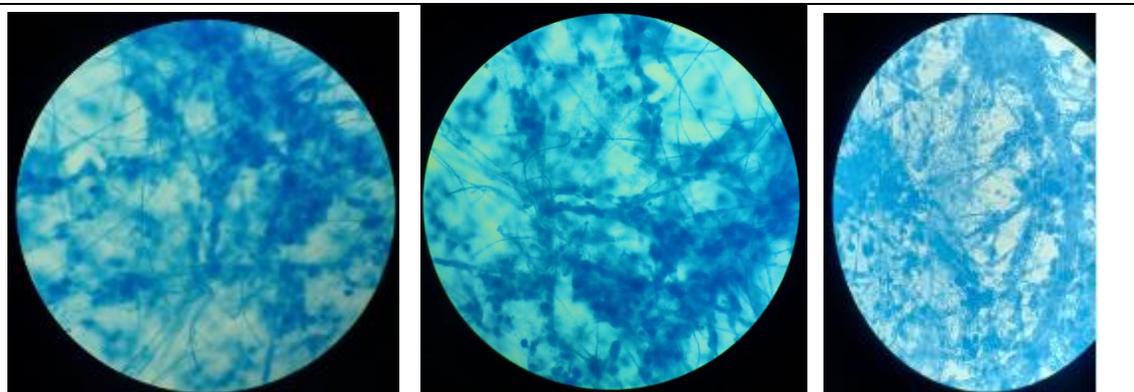


Repeticiones

A. musiformis (CH01)

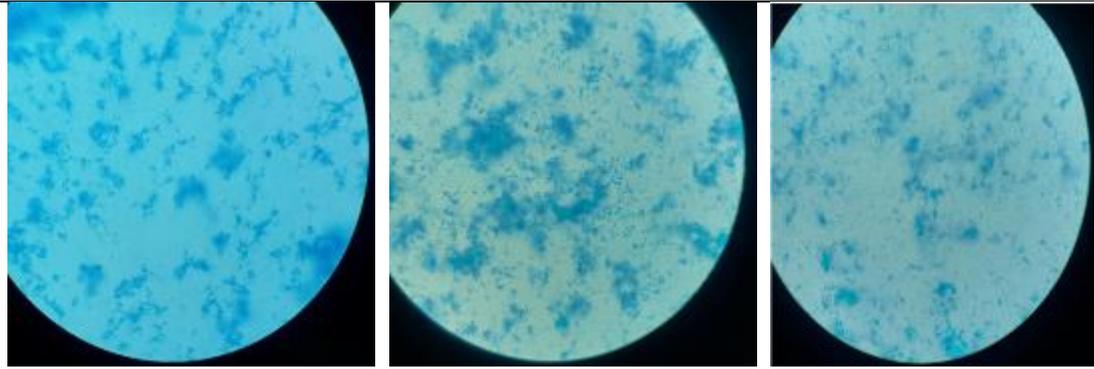


Control

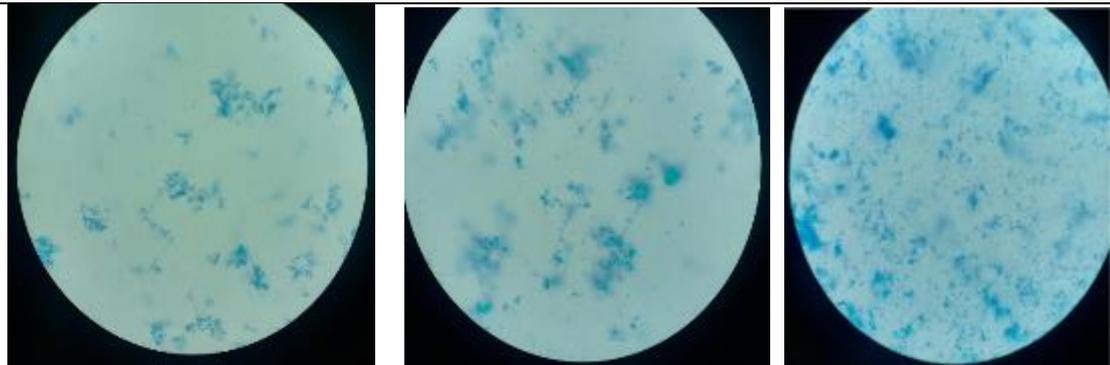


Repeticiones

A. conoide (PG02)

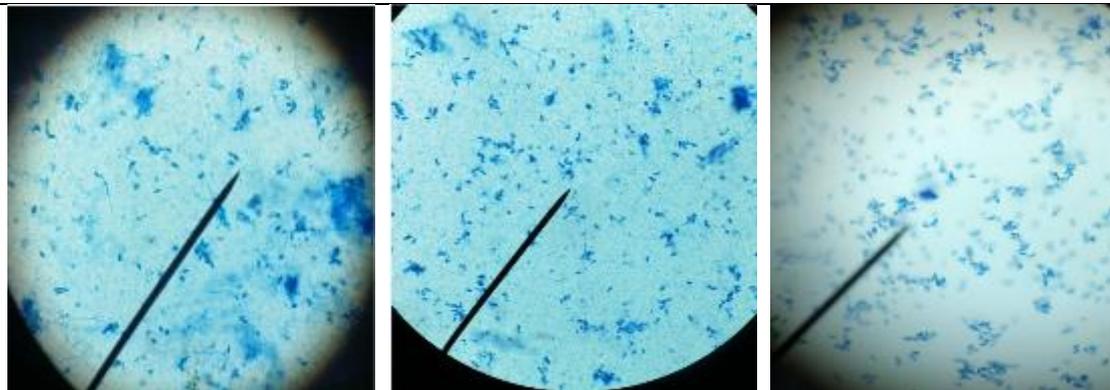


Control

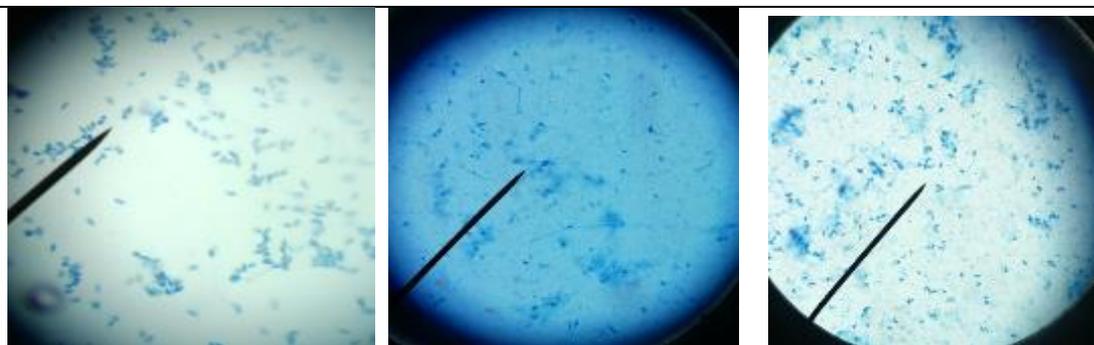


Repeticiones

Beauveria bassiana (A21)

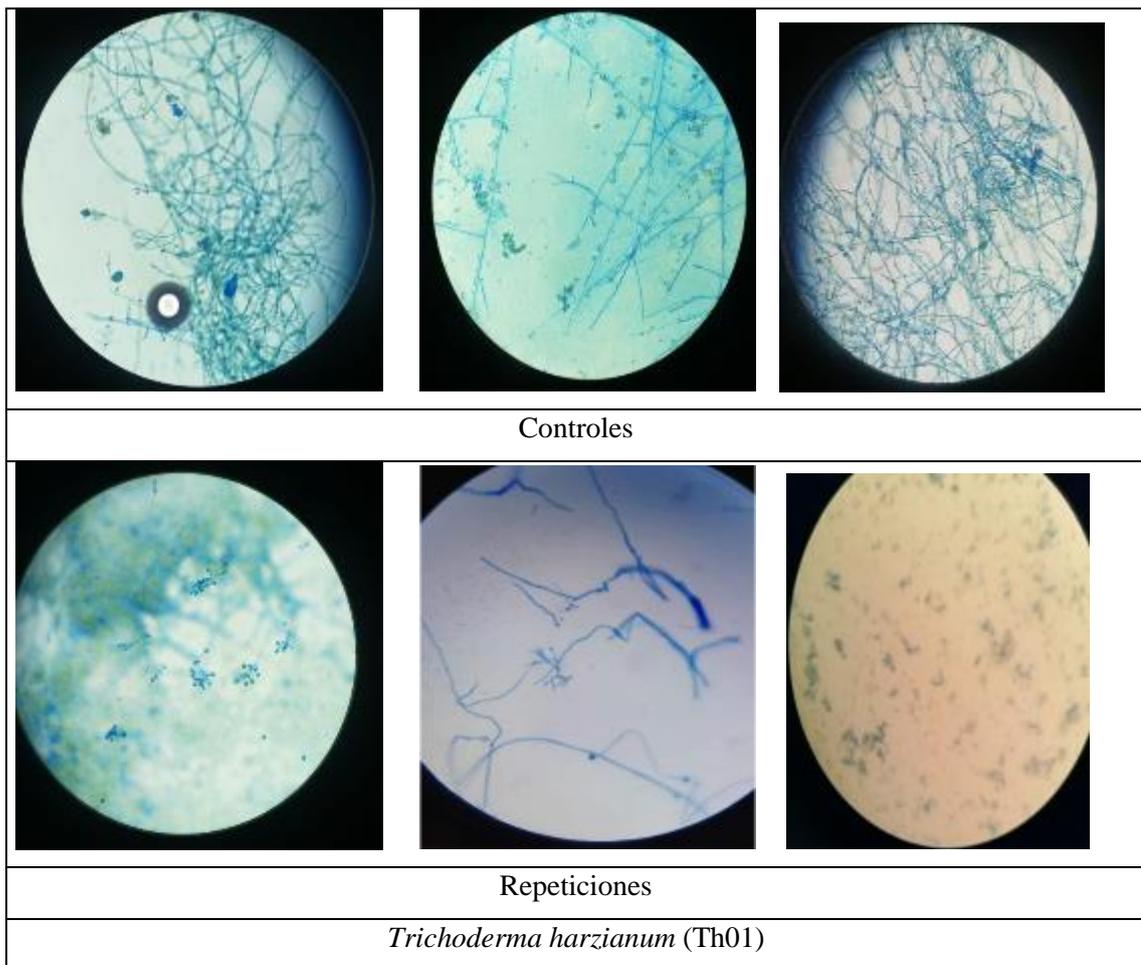


Controles



Repeticiones

Metarhizium anisopliae (A13)



ANEXO N: DATOS DE LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO MICELIAL E INHIBICIÓN DE ESPORULACIÓN DE LOS HONGOS BENÉFICOS

Tratamiento	Repetición	Esporas	cero_h	cero_v	dual_h	dual_v	días_h	días_v
PG01	1	76,92	30,81	32,84	0,00	12,81	18,53	26,81
PG01	2	77,83	31,19	33,03	0,00	13,04	16,54	25,57
PG01	3	76,76	27,15	31,01	0,00	12,70	18,38	26,60
CH02	1	88,1	35,38	51,26	15,94	26,13	4,04	7,05
CH02	2	90,32	32,22	49,52	14,18	26,44	6,73	6,32
CH02	3	89,54	34,72	50,45	14,10	25,93	2,73	6,47
CH01	1	61,54	18,40	14,17	48,59	50,06	12,37	8,44
CH01	2	63,67	18,75	13,75	48,07	49,58	11,76	11,02
CH01	3	61,35	19,60	14,79	46,45	50,22	9,46	10,53
PG02	1	87,1	60,51	37,73	23,20	38,62	28,80	30,72
PG02	2	90,32	61,68	37,62	20,27	37,49	29,16	31,86
PG02	3	84,85	55,76	34,46	21,62	38,51	28,50	31,55
A21	1	13,12	24,82	24,57	28,05	36,09	41,10	38,63
A21	2	12,11	23,37	23,38	26,58	34,53	40,80	37,29
A21	3	13,12	21,80	21,45	25,27	31,61	38,33	37,43
A13	1	80,77	23,72	0,00	26,68	21,78	40,95	25,82
A13	2	83,23	22,09	0,00	25,95	17,22	38,01	23,45

A13	3	84,29	21,12	0,00	26,07	20,61	39,05	24,82
Th01	1	5,49	15,97	17,62	15,44	0,00	0,34	0,58
Th01	2	7,87	16,45	17,11	14,52	0,00	4,43	1,76
Th01	3	8,67	17,16	17,25	15,26	0,00	1,14	0,65
Control	1	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Control	2	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Control	3	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

ANEXO Ñ: DATOS DE LA TASA DE CRECIMIENTO DE LOS HONGOS BENÉFICOS

Tratamiento	Repetición	dual_h	dual_v	cero_h	cero_v	dias_h	dias_v
PG01	1	0,94	0,73	0,58	0,59	0,35	0,45
PG01	2	0,94	0,73	0,59	0,58	0,35	0,46
PG01	3	0,75	0,74	0,62	0,61	0,37	0,45
PG01_C	1	0,75	0,75	0,75	0,75	0,45	0,54
PG01_C	2	0,75	0,75	0,75	0,75	0,43	0,50
PG01_C	3	0,75	0,75	0,75	0,75	0,46	0,53
CH02	1	0,50	0,54	0,28	0,21	0,29	0,26
CH02	2	0,54	0,54	0,31	0,22	0,25	0,24
CH02	3	0,54	0,54	0,28	0,19	0,27	0,23
CH02_C	1	0,50	0,54	0,47	0,54	0,35	0,36
CH02_C	2	0,47	0,54	0,47	0,54	0,32	0,34
CH02_C	3	0,47	0,47	0,47	0,47	0,34	0,31
CH01	1	0,68	0,70	1,03	0,91	0,21	0,41
CH01	2	0,87	0,67	0,89	0,89	0,15	0,38
CH01	3	0,89	0,67	0,90	0,90	0,23	0,36
CH01_C	1	1,25	1,07	1,25	1,07	0,49	0,60
CH01_C	2	1,07	1,07	1,07	1,07	0,35	0,56
CH01_C	3	1,07	1,07	1,07	1,07	0,41	0,54
PG02	1	0,91	0,69	0,47	0,59	0,29	0,21
PG02	2	1,10	0,75	0,42	0,65	0,24	0,10
PG02	3	0,91	0,69	0,56	0,61	0,29	0,23
PG02_C	1	1,07	1,07	1,07	1,07	0,59	0,55
PG02_C	2	1,25	1,25	1,25	1,25	0,66	0,56
PG02_C	3	1,07	1,07	1,07	1,07	0,60	0,55
A21	1	0,38	0,32	0,31	0,32	0,22	0,23
A21	2	0,41	0,29	0,32	0,30	0,22	0,24
A21	3	0,42	0,34	0,33	0,32	0,24	0,26
A21_C	1	0,42	0,47	0,42	0,47	0,28	0,30
A21_C	2	0,42	0,42	0,42	0,42	0,31	0,30
A21_C	3	0,42	0,44	0,42	0,44	0,31	0,31
A13	1	0,63	0,49	0,59	0,63	0,38	0,37
A13	2	0,53	0,53	0,55	0,56	0,36	0,36
A13	3	0,59	0,53	0,58	0,63	0,36	0,33
A13_C	1	0,68	0,68	0,68	0,68	0,34	0,49

A13_C	2	0,58	0,58	0,58	0,58	0,29	0,44
A13_C	3	0,63	0,63	0,63	0,63	0,33	0,45
Th01	1	1,00	1,46	0,91	1,14	0,20	0,17
Th01	2	1,18	1,44	0,89	1,10	0,19	0,20
Th01	3	1,00	1,04	0,89	0,93	0,18	0,20
Th01_C	1	0,93	1,46	0,93	1,46	0,19	0,15
Th01_C	2	0,93	1,44	0,93	1,44	0,20	0,22
Th01_C	3	0,94	1,04	0,94	1,04	0,18	0,18



epoch

**Dirección de Bibliotecas y
Recursos del Aprendizaje**

**UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y
DOCUMENTAL**

REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 26 / 06 / 2023

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)
Nombres – Apellidos: Alexis Santiago Pallmay Morocho
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: RECURSOS NATURALES
Carrera: AGRONOMÍA
Título a optar: INGENIERO AGRÓNOMO
f. responsable: Ing. Cristhian Fernando Castillo Ruiz



1151-DBRA-UTP-2023