

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

CARRERA DE MICROBIOLOGÍA

Evaluación *in planta* de la efectividad de cepas de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. como controladores biológicos de *Fusarium oxysporum* en uvilla (*Physalis peruviana* L.)

**DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
MICROBIÓLOGA**

JOHANNA LISSETH VERA MERA

Quito, 2021

CERTIFICACIÓN

Certifico que, la disertación de Microbiología de la candidata Johanna Lisseth Vera Mera, ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Jeniffer Marcela Yáñez Altuna', is centered on the page.

Mtr. Jeniffer Marcela Yáñez Altuna

Directora de la Disertación

Quito, 19 de febrero de 2021

DEDICATORIA

A Lorena y José Luis, por ser mi apoyo incondicional

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres, quienes siempre me han apoyado e impulsaron a seguir adelante en todo momento a pesar de las circunstancias. A mis hermanos, quienes siempre están presente.

A Xenia, mi abuela, quien durante todo este proceso estuvo ahí, mostrándome su cariño, su preocupación y apoyo.

A mi tía Esperanza, mi más profundo agradecimiento, por su generosidad y apoyo constante e incondicional.

Agradezco a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador por ser mi hogar a lo largo de estos años de mi desarrollo académico. A mis profesores, especialmente a Elena Granda, por brindarme sus conocimientos para mi formación profesional y por transmitirme el amor hacia la Microbiología y la ciencia en general.

Agradezco a mi directora de disertación Jeniffer Yáñez, por confiar en mí y darme la oportunidad de ser parte de su equipo de investigación.

A Martín Marcial, mi infinita gratitud, por ser una mano amiga y por guiarme en todo momento durante el proceso de este trabajo de disertación.

Por último, agradezco a mis compañeros de clase, principalmente a Michelle y Mateo, por su apoyo incondicional a lo largo de la carrera, y por los momentos compartidos.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	10
PALABRAS CLAVES.....	11
INTRODUCCIÓN.....	11
MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
Reactivación de cepas. –	13
Pruebas antagonistas <i>in vitro</i> . –	14
Antagonismo <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma</i> spp. contra <i>Fusarium oxysporum</i> . –.....	14
Antagonismo <i>in vitro</i> de <i>Bacillus</i> spp. contra <i>Fusarium oxysporum</i> . –.....	14
Preparación de los inóculos. –	15
Antagonismo <i>in planta</i> . –.....	15
Primera inoculación de <i>F. oxysporum</i> . –	16
Segunda inoculación de <i>F. oxysporum</i> . –	17
Análisis de datos. –	17
RESULTADOS	17
DISCUSIÓN.....	19
CONCLUSIONES.....	23
AGRADECIMIENTOS.....	23
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. –	23
FIGURAS	31
TABLAS. -	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cepas reactivadas.....	31
Figura 2. Antagonismo <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma tomentosum</i> YC1BS contra <i>Fusarium oxysporum</i>	32
Figura 3. Antagonismo <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma atroviride</i> SP2AS contra <i>Fusarium oxysporum</i>	33
Figura 4. Antagonismo <i>in vitro</i> de <i>Bacillus</i> spp. contra <i>Fusarium oxysporum</i>	34
Figura 5. Porcentaje de incidencia de la marchitez vascular en la primera inoculación durante cuatro semanas de observación.....	35
Figura 6. Porcentaje de incidencia de la marchitez vascular en la segunda inoculación durante cuatro semanas de observación.....	35
Figura 7. Gráfico de barras del índice de severidad de la enfermedad en la primera inoculación durante cuatro semanas de observación.....	36
Figura 8. Gráfico de barras del índice de severidad de la enfermedad en la segunda inoculación durante cuatro semanas de observación.....	37
Figura 9. Plántulas de uvilla ubicadas en bloques completos al azar bajo condiciones de invernadero.....	38
Figura 10. Plántulas de uvilla con tratamiento <i>B. subtilis</i> OJ1Aga durante la primera infección.....	38
Figura 11. Plántulas de uvilla con tratamientos que presentaron el índice de severidad más alto durante la primera infección.....	39
Figura 12. Testigos positivos en la primera infección.....	40
Figura 13. Cultivo de raíces de testigos positivos en la primera infección.....	40
Figura 14. Planta con el consorcio <i>T. atroviride</i> SP2AS + <i>B. cereus</i> Ap en la tercera semana de observación de la segunda inoculación.....	41
Figura 15. Plantas con tratamientos en la cuarta semana luego de la segunda inoculación.....	42

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Organización de los tratamientos.....	43
Tabla 2. Análisis de la varianza de la actividad promotora de crecimiento de consorcios microbianos aplicados para el control de <i>Fusarium oxysporum</i> en uvilla.....	44
Tabla 3. Promedios y desviación estándar de la evaluación biocontroladora de los tratamientos frente a <i>F. oxysporum</i> en condiciones de invernadero en la cuarta semana después de la inoculación.....	45

MANUSCRITO PARA LA PUBLICACIÓN

Revista

Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas

Título

Evaluación *in planta* de la efectividad de cepas de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. como controladores biológicos de *Fusarium oxysporum* en uvilla (*Physalis peruviana* L.)

Autores

Johanna Lisseth Vera Mera *

Correo electrónico

* johaavera29@gmail.com

Dirección

Laboratorio de Fitopatología y Control Biológico, Carrera de Microbiología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

El siguiente trabajo de investigación se presenta en el formato de la Revista *Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas* a partir de la siguiente página.

Evaluación *in planta* de la efectividad de cepas de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. como controladores biológicos de *Fusarium oxysporum* en uvilla (*Physalis peruviana* L.)

***In planta* evaluation of the effectiveness of *Trichoderma* spp. and *Bacillus* spp. strains as biological controllers of *Fusarium oxysporum* in goldenberry (*Physalis peruviana* L.)**

***Johanna Vera¹**

¹Laboratorio de Fitopatología y Control Biológico, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, PUCE, Quito, Ecuador.

*johaavera29@gmail.com

RESUMEN

La uvilla (*Physalis peruviana* L.) es un fruto andino que ha logrado gran impacto económico en los últimos años, tanto por su alto contenido nutricional como por sus características organolépticas. Sin embargo, su cultivo se ha visto afectado por patógenos como *Fusarium oxysporum*, agente causal de la marchitez vascular. El presente estudio evaluó la eficacia biocontroladora *in planta* de cepas de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp., contra *F. oxysporum* bajo condiciones de invernadero, como una alternativa al uso de agroquímicos. Para este propósito se seleccionaron cepas cuya compatibilidad en consorcio y efecto antagonista *in vitro* fue previamente descrita en otro estudio. Estas cepas fueron empleadas de forma individual y conjunta en plántulas de uvilla inoculadas con anterioridad con el fitopatógeno. Durante el periodo de observación, el proceso de infección se realizó dos veces a diferentes concentraciones y se determinó la capacidad de los microorganismos potencialmente biocontroladores para reducir la incidencia y severidad de la enfermedad. Entre los hallazgos del presente estudio se resalta el efecto de la inoculación de *B. subtilis* OJ1Aga que inhibió en un 100 % el desarrollo de marchitez vascular en las dos infecciones realizadas. Los resultados de esta investigación demuestran que los tratamientos conformados únicamente por cepas de *Bacillus* spp. presentaron mejor capacidad antagonista y acción biofertilizante al compararse con el

efecto de los consorcios fúngicos y bacterianos o la inoculación individual de *Trichoderma* spp.

PALABRAS CLAVES. – Biocontroladores, cepas, consorcio, *Trichoderma* spp., *Bacillus* spp., *Fusarium oxysporum*.

ABSTRACT

The goldenberry (*Physalis peruviana* L.) is an Andean fruit that has achieved great economic impact in recent years, both due to its high nutritional content and its organoleptic characteristics. However, its cultivation has been affected by pathogens such as *Fusarium oxysporum*, the causal agent of vascular wilt. The present study evaluated the biocontroller efficacy *in plant* of *Trichoderma* spp. and *Bacillus* spp., against *F. oxysporum* under greenhouse conditions, as an alternative to the use of agrochemicals. For this purpose, strains whose compatibility in consortium and antagonistic effect *in vitro* was previously described in another study were selected. These were individually and jointly used in goldenberry seedlings previously inoculated with the phytopathogen. During the observation period, the infection process was carried out twice at different concentrations and the capacity of potentially biocontrolling microorganisms to reduce the incidence and severity of the disease was determined. Among the findings of the present study, the effect of the inoculation of *B. subtilis* OJ1Aga is highlighted, which inhibited the development of vascular wilt in the two infections carried out by 100%. The results of this research show that the treatments consisting only of *Bacillus* spp. presented better antagonistic capacity and biofertilizing action when compared with the effect of fungal and bacterial consortia or individual inoculation of *Trichoderma* spp.

KEY WORDS. – Biocontrollers, strains, consortium, *Trichoderma* spp., *Bacillus* spp., *Fusarium oxysporum*.

INTRODUCCIÓN

Physalis peruviana L. conocida como uvilla en Ecuador, es una planta solanácea endémica de la región de los Andes (Osorio-Guarín et al. 2016). Produce un fruto pequeño de color amarillo-anaranjado de sabor intenso, agradable y con alto contenido nutricional

(vitaminas C y A, potasio, calcio y fósforo), características que han proporcionado una alta demanda en el extranjero (Yildiz et al. 2014).

De acuerdo a Enciso-Rodríguez et al. (2020), Colombia es el principal país exportador de uvilla a nivel mundial, seguido de Ecuador, Zimbabue, Malaysia, China, Kenia y Sudáfrica. En Ecuador, en el año 2019, se exportó un valor de 206 mil dólares de la fruta fresca, siendo sus principales destinos, Canadá, Francia, Países Bajos, Estados Unidos y España; y 657 mil dólares de uvilla deshidratada con destino a Australia, Alemania, Estados Unidos, Reino Unido y Canadá (Pro Ecuador 2020).

La producción de uvilla, sin embargo, se ve afectada principalmente por enfermedades causadas por bacterias como *Xanthomonas* sp., y *Ralstonia solanacearum*, y hongos como *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp., *Cercospora* sp., *Phoma* sp., *Sclerotinia sclerotiorum* y *Fusarium oxysporum* (Smith 2012; Enciso-Rodríguez et al. 2020).

Destaca, por su severidad, *Fusarium oxysporum*, responsable del marchitamiento vascular (Yáñez et al. 2019). Este hongo se encuentra en el suelo como saprófito o patógeno especializado (Acurio 2010) y posee la habilidad de diseminarse con gran facilidad (Estupiñán y Ossa 2007; Altamirano 2010), llegando a ocasionar pérdidas totales del cultivo (Rodríguez et al. 2010). Como consecuencia, se observa la reducción en volumen de la exportación de la fruta y la disminución de la rentabilidad del cultivo (Rodríguez et al. 2010).

El control de este patógeno con fungicidas químicos ha resultado ineficaz, debido a la resistencia que presenta a agroquímicos comúnmente utilizados para su control, y por la capacidad de producir estructuras de resistencia llamadas clamidosporas (Osorio-Guarín et al. 2016). Además, el uso indiscriminado de agroquímicos genera un impacto negativo en el suelo, como la alteración de sus propiedades químicas y físicas, y la transformación de los ecosistemas microbianos, causando principalmente la infertilidad del suelo (Viracucha 2015; Orozco et al. 2016).

En ese contexto, a pesar de que la uvilla se ha convertido en un cultivo con impacto económico en los últimos tiempos, las investigaciones sobre el control de patógenos en este cultivo son escasas y, en Ecuador, casi inexistentes (Rodríguez et al. 2010). Por tanto, resulta imperativo investigar los fitopatógenos y desarrollar alternativas biológicas eficaces para su tratamiento (Díaz et al. 2019).

Dentro de los agentes de control biológico (BCAs por sus siglas en inglés) más estudiados, se encuentra *Bacillus*, género bacteriano que posee habilidad de producir endosporas, confiriéndole resistencia para adaptarse a diferentes hábitats (Villarreal-Delgado et al. 2018). Los mecanismos de *Bacillus* incluyen la producción de sustancias enzimáticas y antibióticas como las surfactinas, fengicinas e iturinas, la capacidad de promoción de crecimiento vegetal (PGPR por sus siglas en inglés), y la producción de endosporas previamente mencionada (Tejera-Hernández et al. 2011; Villarreal-Delgado et al. 2018).

Otro microorganismo ampliamente estudiado como BCAs, es *Trichoderma*, hongo cosmopolita y antagonista que posee diversos mecanismos de actividad como la antibiosis, competencia por nutrientes y espacio, micoparasitismo, capacidad de inducir resistencia sistémica y defensa de las plantas (Amaral et al. 2019; Hernández-Melchor et al. 2019).

Silva (2018), estudió *in vitro* mediante pruebas antagonistas a *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. contra el fitopatógeno *F. oxysporum*, y con ensayos de compatibilidad entre estos dos microorganismos. Como resultado obtuvo que el antagonismo de cepas de *Trichoderma* spp. con *Bacillus* spp. contra *F. oxysporum* fue eficaz en todas las combinaciones realizadas, y se produjo un mayor grado de inhibición micelial en conjunto que en pruebas individuales.

Por tanto, el propósito de esta investigación es llevar a nivel de invernadero el estudio realizado por Silva (2018), para observar si los microorganismos probados *in vitro* pueden ser aplicados *in planta* como un método eficaz de control del fitopatógeno *F. oxysporum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivación de cepas. –

Las cepas de *Trichoderma* spp. y de *Bacillus* spp. utilizadas, presentaron la mejor capacidad antagonista frente a *Fusarium oxysporum* en estudios realizados por Silva (2018). Estas cepas fueron conservadas en la colección de cultivos microbianos del laboratorio de Fitopatología y Control Biológico de la PUCE.

Se seleccionaron *Trichoderma tomentosum* (YC1BS), *Trichoderma atroviride* (SP2AS), *Bacillus cereus* (DA21), *Bacillus cereus* (Ap) y *Bacillus subtilis* (OJ1Aga). Las cepas de

Trichoderma y *Fusarium oxysporum* (Yáñez 2019), fueron reactivadas en agar papa dextrosa (PDA por sus siglas en inglés) e incubadas durante siete días a 25 °C (Aquiahuatl y Pérez 2013) (Figura 1). Las cepas de *Bacillus* fueron reactivadas en agar nutritivo a 25 °C por 48 h (Urrea et al. 2011) (Figura 1).

Pruebas antagonistas *in vitro*. –

Para verificar la viabilidad de las cepas seleccionadas y usadas por Silva (2018) y Yáñez et al. (2019), se realizaron pruebas antagonistas *in vitro* de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. contra *Fusarium oxysporum*.

Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. contra *Fusarium oxysporum*. –

De una colonia esporulada de siete días de *F. oxysporum* se tomó un disco de 5 mm y se la colocó en una caja Petri con agar PDA a 1 cm de distancia del borde. Se incubó por 48 horas a temperatura ambiente (25 °C) y se colocó un disco de 5 mm de *Trichoderma* spp. de siete días de crecimiento en el extremo contrario al fitopatógeno, igualmente a 1 cm de distancia del borde de la caja. Estas pruebas fueron realizadas por triplicado. El crecimiento de ambos hongos fue medido durante 10 días cada 24 horas. Como control se sembraron por separado cada cepa en medio PDA (Tovar 2008; Fernández y Suárez 2009).

El antagonismo fue medido de acuerdo al porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) mediante la fórmula descrita en Ezziyyani et al. (2004):

$$PICR = \frac{R1 - R2}{R1} * 100$$

En donde R1= radio del patógeno en cultivo control y R2= radio del patógeno en el enfrentamiento (Fernández y Suárez 2009).

Antagonismo *in vitro* de *Bacillus* spp. contra *Fusarium oxysporum*. –

Se preparó 100 µl de *Bacillus* spp. en tubo con caldo infusión cerebro corazón (BHI por sus siglas en inglés), a una concentración de 1x10⁸ cel/ml mediante el uso del espectrofotómetro marca Hanon, a una longitud de onda de 600 nm, y se sembró en superficie en platos Petri con medio PDA. Una vez ubicada la bacteria, se colocó un disco de 5 mm de una colonia esporulada de *F. oxysporum* de siete días de crecimiento en el

centro del plato Petri. Se incubó a temperatura ambiente (25 °C) y se midió el halo de crecimiento del fitopatógeno cada 24 horas durante 11 días (Tejera et al. 2012). Se cultivó *F. oxysporum* en el centro de una caja Petri con medio PDA como control.

El porcentaje de inhibición micelial (PIM) se calculó en base a la fórmula usada en Tejera et al. (2012):

$$PIM = \frac{D.C.C - D.C.P}{D.C.C} * 100$$

En donde D.C.C = diámetro de la colonia fitopatógena control y D.C.P.= diámetro de la colonia fitopatógena en el enfrentamiento.

Pruebas antagonistas *in planta*

Preparación de los inóculos. –

El inóculo de *Trichoderma* spp. se obtuvo a partir de cultivos esporulados sembrados en platos Petri con agar PDA e incubados durante siete días. Se realizó una fermentación en fase líquida de *Trichoderma* spp. en medio de cultivo que contenía melaza al 3 % y extracto de levadura al 1 % (Sriram et al. 2011). El cultivo fue sometido a agitación magnética a 80 rpm durante ocho días y a 25 °C, verificando cada 24 h su reproducción progresiva hasta llegar a una concentración de 1×10^6 conidias/ml (Sriram et al. 2011). Para la suspensión de conidias se utilizó agua destilada estéril y se ajustó la concentración mediante el recuento en cámara de Neubauer (Cubillos et al. 2011; Moosa et al. 2016). El inóculo de *Bacillus* spp. fue realizado mediante fermentación líquida en caldo BHI hasta conseguir una concentración de 1×10^8 cel/ml, a través de la medición de densidad óptica mediante el uso del espectrofotómetro a una longitud de onda de 600nm. El cultivo se incubó en agitación magnética (Thermo Fisher Scientific) a 90 rpm, durante 48 h y a 25 °C, verificando cada 24 h su reproducción gradual (Li et al. 2013). Las conidias de *F. oxysporum* (FOX) obtenidas de un cultivo esporulado de ocho días en medio PDA, fueron suspendidas en agua destilada estéril, ajustada a una concentración de 1×10^6 conidias/ml mediante el recuento en cámara de Neubauer, de acuerdo al protocolo descrito por Leslie y Summerell (2006).

Antagonismo *in planta* de biocontroladores frente a *F. oxysporum*. –

Para este ensayo se usaron 65 plántulas de uvilla ecotipo colombiano de 15 cm de altura en promedio y con cinco hojas verdaderas, sin signos o síntomas de enfermedad. Las

plantas fueron adquiridas en la empresa Terrafertil/Nature's Heart (Tabacundo-Ecuador). Durante el ensayo, las plantas se mantuvieron bajo condiciones de invernadero (80-90 % de humedad y temperatura de 13-20 °C). El riego se realizó cada dos días y se fertilizaron cada semana con Nitrofoska (fertilizante foliar) a una proporción 15:15 a 20 % v/v de acuerdo a la metodología usada por Urrea et al. (2011). Se realizaron dos inoculaciones de *F. oxysporum* a diferentes concentraciones y a diferentes tiempos de exposición.

Primera inoculación de *F. oxysporum*. –

Previo a la inoculación del fitopatógeno, se realizó la desinfección de las raíces de las plántulas de uvilla, donde se removió el exceso de suelo con agua destilada estéril, seguido de un lavado con hipoclorito de sodio al 1 %, y un enjuague con agua destilada estéril (Corrales et al. 2012). La inoculación del fitopatógeno consistió en la inmersión de las raíces en la suspensión de conidias de FOX previamente preparada. Pasadas las 8 horas de inmersión, se ubicó a cada planta en macetas con sustrato estéril etiquetadas y previamente inoculadas con 15 ml de cada tratamiento biocontrolador (Corrales et al. 2012; Yendyo et al. 2017; Soria 2020). Los tratamientos en consorcio fueron inoculados en una proporción 1:1 (15 ml de cada tratamiento) (Bautista et al. 2010; Yendyo et al. 2017).

La marchitez vascular fue evaluada mediante el registro de datos de incidencia y severidad durante 30 días (Urrea et al. 2011). La incidencia fue determinada de acuerdo al número total de plantas con síntomas de la enfermedad expresada en porcentaje (French y Hebert 1980; Soria 2020). La severidad fue definida mediante el uso de la siguiente fórmula descrita en Chiang et al. (2017):

$$ISE(\%) = \frac{\sum(\text{frecuencia} * \text{grado de categoría})}{(\text{total de unidades evaluadas}) * (\text{índice máximo de categoría})} \times 100$$

Se clasificó a la severidad de acuerdo a la “escala de severidad para la marchitez vascular” por *F. oxysporum* descrita por el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) y usada por Corrales et al. (2012). A continuación, se describe la clasificación para el grado de severidad:

Grado 0: Planta sana, sin manifestación de síntomas.

Grado 1: Máximo 10 % de hojas marchitas o cloróticas.

Grado 2: 25 % hojas marchitas o cloróticas.

Grado 3: 50-70 % hojas marchitas o cloróticas.

Grado 4: 100 % de la enfermedad. Planta muerta o severamente afectada. El follaje puede presentar necrosis o pérdida total de las hojas.

Segunda inoculación de *F. oxysporum*. –

Transcurridos los 30 días desde la primera infección, se desinfectaron nuevamente las raíces de las plantas siguiendo el protocolo ya descrito de Corrales et al. (2012). Una vez desinfectadas las raíces, se procedió a sumergirlas durante 24 h en una suspensión de FOX en agua destilada estéril a una concentración de 1×10^7 conidias/ml (Leslie y Summerell 2006). Después de las 24 h de inmersión, se ubicó cada planta en la maceta de la que fue extraída. Seguido, se colocó una punta de pipeta estéril con 200 μ l de la suspensión FOX en el tallo de la planta, para que ingrese por capilaridad hacia el sistema vascular (Wonni et al. 2015). Durante 30 días se observó la incidencia y severidad de la marchitez vascular siguiendo el protocolo descrito en la primera infección.

El experimento fue dispuesto en un diseño de bloques completos al azar (DBCA) (Figura 9), que consistió en cinco plantas por tratamiento, distribuidos en cinco bloques, incluyendo el control negativo (FOX) y el control cero (solo planta). Se establecieron en total 13 tratamientos (Tabla 1).

Análisis de datos. –

Al finalizar el periodo de observación se determinó la altura, número de hojas y peso en fresco de todas las plantas. Los resultados se expresaron como el promedio \pm desviación estándar de cinco réplicas correspondientes a cada uno de los tratamientos individuales. Con el propósito de comparar el efecto de los diferentes tratamientos utilizados, en función de las variables arriba mencionadas, se aplicó un análisis de la varianza (ANOVA). La prueba post hoc de Tukey fue utilizada para determinar diferencias estadísticas significativas entre los promedios correspondientes a los diferentes tratamientos utilizados. Un nivel de confianza de 95 % fue establecido para las dos pruebas estadísticas. Estas pruebas fueron analizadas mediante el programa SPSS Statistics Base 22.0 (IBM 2018).

RESULTADOS

El antagonismo *in vitro* de *Trichoderma tomentosum* YC1BS frente a *Fusarium oxysporum* presentó un porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) de 58,9 %

(Figura 2), mientras que el antagonismo de *Trichoderma atroviride* SP2AS contra *F. oxysporum* fue de 42,1 % (Figura 3). Por su parte, los antagonismos de *Bacillus* spp. contra *Fusarium oxysporum* presentaron un porcentaje de inhibición micelial (PIM) de 56,9 % para *Bacillus cereus* DA21, 55,3 % para *Bacillus cereus* Ap, y del 84,6 % para *Bacillus subtilis* OJ1Aga (Figura 4).

Los resultados obtenidos del antagonismo *in planta* muestran que, la incidencia de la marchitez vascular durante la primera inoculación de las plántulas de uvilla fue del 51,67 % en la semana uno de observación, y demostró una reducción total de la enfermedad en la cuarta semana (Figura 5). No obstante, luego de la segunda infección, se observó una incidencia del 54,39 % a lo largo de la primera semana de observación, y disminuyó al 40,35 % en la última semana (Figura 6).

En la primera infección, el índice de severidad de la enfermedad (ISE) osciló entre el 0 y el 35 % en las dos primeras semanas tras la inoculación con el fitopatógeno (Figura 7). Sin embargo, para la última semana se observó una reducción del 100 % de la marchitez vascular en todos los tratamientos. En este sentido, el tratamiento que mostró mayor efectividad fue aquel que consistió en la inoculación de *Bacillus subtilis* OJ1Aga, que presentó un ISE de 0 % durante las cuatro semanas de observación (Figuras 7 y 10), seguido del efecto resultante de los tratamientos con *Bacillus cereus* Ap, *Trichoderma tomentosum* YC1BS y *Trichoderma atroviride* SP2AS + *Bacillus cereus* Ap, con un ISE de apenas 10 % durante las primeras dos semanas de evaluación. Los tratamientos que presentaron mayor severidad de marchitez vascular fueron *Trichoderma tomentosum* YC1BS + *Bacillus cereus* Ap y *Trichoderma tomentosum* YC1BS + *Bacillus subtilis* OJ1Aga, con un ISE del 30-35 % durante las dos primeras semanas de observación (Figuras 7 y 11).

Los controles positivos no presentaron síntomas de marchitez vascular durante todo el periodo de observación (Figura 12). El cultivo en laboratorio de las raíces de estos controles confirmó la presencia de *F. oxysporum*, así como la presencia de *Trichoderma* spp. por contaminación (Figura 13).

Durante la segunda inoculación del patógeno, se evidenció un índice de severidad igual al de la primera inoculación (0-35 %) en las primeras dos semanas de observación. Los tratamientos que presentaron un ISE de 0 % durante las cuatro semanas de análisis fueron *Bacillus subtilis* OJ1Aga, *Bacillus cereus* Ap y *Bacillus cereus* DA21 (Figuras 8). No obstante, tratamientos como *T. atroviride* SP2AS, *T. tomentosum* YC1BS y *T. tomentosum* YC1BS + *B. cereus* DA21 presentaron los porcentajes de severidad más altos

en las primeras semanas y disminuyeron la severidad de la enfermedad en $\leq 10\%$. Por otro lado, el tratamiento *T. atroviride* SP2AS + *B. cereus* Ap no logró disminuir la severidad de la marchitez vascular en ninguna semana de observación (Figuras 8 y 14).

Los análisis estadísticos al comparar el efecto de los diferentes tratamientos utilizados, en función de las variables altura de planta, número de hojas y peso en fresco indicaron que, los tratamientos conformados por *B. subtilis* OJ1Aga, *B. cereus* DA21, *B. cereus* Ap, *T. atroviride* SP2AS + *B. subtilis* OJ1Aga y *T. tomentosum* YC1BS + *B. cereus* DA21, presentan diferencias significativas ($p < 0,05$) en todos los parámetros analizados en comparación al control positivo y al control cero (Tabla 2). Por otra parte, el tratamiento *T. atroviride* SP2AS fue el único tratamiento en no presentar diferencias significativas en relación al control positivo y al control cero en ningún parámetro evaluado (Tabla 2) (Figura 15). Los promedios resultantes de la variable altura de la planta indican que las tratadas con *B. cereus* DA21 y *B. cereus* Ap presentaron los valores más altos, con una media de 98,25 cm y 97,0 cm respectivamente, mientras que el control cero obtuvo una media de 47,50 cm y el control positivo 41,0 cm (Tabla 2). Por otro lado, el promedio referente a la variable número de hojas nos muestra que las plantas inoculadas con *T. atroviride* SP2AS + *B. subtilis* OJ1Aga obtuvieron el mejor resultado, con un valor de 24,75, seguido de los tratamientos *B. cereus* Ap, con 23,5, y *B. cereus* DA21 con 23,0. Los controles indicaron una media de 7,25 para el control positivo y 9,50 para el control cero (Tabla 2). Por último, el promedio para la variable peso en fresco nos señala que las plantas con los tratamientos que poseen el valor más alto en cuanto al peso, fueron las tratadas con *B. cereus* DA21 y *T. tomentosum* + *B. cereus* DA21 con una media de 40,625 g para *B. cereus* DA21 y 35,025 g para *T. tomentosum* + *B. cereus* DA21. Por otro lado, el control positivo arrojó un promedio de 4,77 g y 6,97 g en el control cero (Tabla 2).

DISCUSIÓN

Las características macro y microscópicas de las cepas reactivadas, junto con los resultados obtenidos de las pruebas antagonistas *in vitro* de las cepas de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. contra *Fusarium oxysporum*, son consistentes con las características y los resultados obtenidos del estudio realizado por Silva (2018). Lo que demuestra la viabilidad de las cepas usadas en esta investigación.

Las especies de *Fusarium* que causan la marchitez en las plantas, infectan a sus hospederos ingresando por la raíz de forma directa o a través de heridas, el micelio se

extiende hasta los vasos xilemáticos y, como consecuencia, el micelio y los microconidios formados son diseminados a través de la planta (Agrios 2005). De esta forma se origina el marchitamiento, necrosis y clorosis de las hojas (Villa-Martínez 2014). Dado que, la rizosfera concede la primera línea de defensa de las plantas contra patógenos, los microorganismos rizosféricos han sido considerados candidatos ideales como controladores biológicos (Zhu et al. 2020). Microorganismos del género *Bacillus* y *Trichoderma*, han sido ampliamente estudiados como BCAs por sus mecanismos de acción y su potencial *in vitro* de reducir el crecimiento micelial de algunos hongos fitopatógenos (Marfetán et al. 2020).

En este estudio, el tratamiento conformado por *B. subtilis* OJ1Aga, fue el mejor tratamiento en las dos fases de inoculación. Tanto en la primera como en la segunda infección, *B. subtilis* OJ1Aga no permitió el desarrollo de la enfermedad en ninguna semana de observación. Asimismo, fue uno de los tratamientos que indicó diferencias significativas en todos los parámetros analizados. Esto es congruente con los resultados obtenidos a nivel *in vitro*, con un PIM del 84,6 % en el enfrentamiento con el patógeno. Además, el estudio realizado por Silva (2018), señala que *B. subtilis* OJ1Aga obtuvo el mejor porcentaje de inhibición micelial (84,85 %) entre los 40 aislados de *Bacillus* spp. probados, e incluso obtuvo mejor inhibición del patógeno entre las pruebas conjuntas conformadas por cepas de *Trichoderma* spp. y cepas de *Bacillus cereus*, en donde el mayor porcentaje de inhibición fue de 80,95 %. Estos resultados coinciden con los resultados obtenidos por Khan et al. (2018), donde *B. subtilis* demostró ser la cepa más efectiva contra *F. oxysporum* a nivel *in vitro* e *in vivo* en comparación con otras cepas de *Bacillus* spp.

Los resultados de los tratamientos con consorcios obtenidos en condiciones de invernadero difieren de los resultados obtenidos a nivel *in vitro* por Silva (2018). Los consorcios conformados por *T. tomentosum* YC1BS + *B. cereus* DA21 y *T. atroviride* SP2AS + *B. subtilis* OJ1Aga demostraron no ser compatibles en las pruebas *in vitro*, sin embargo, se observó que *in vivo* estos microorganismos pueden actuar de forma conjunta, indicando ser los únicos consorcios en mostrar diferencias significativas con el control positivo en todos los parámetros observados. Además, *T. atroviride* SP2AS + *B. subtilis* OJ1Aga logró contrarrestar la marchitez vascular en las dos inoculaciones realizadas. Estos resultados se asemejan a los obtenidos por Besset-Manzoni et al. (2019), donde las pruebas antagonistas *in vitro* de la cepa *Bacillus* sp. JM79 contra *Fusarium graminearum* fueron limitadas, no obstante, en los ensayos *in planta*, indicó los mejores resultados en

cuanto a crecimiento de las plantas y protección contra el fitopatógeno. Por lo tanto, se demuestra que no siempre las cepas que obtienen un mayor porcentaje antagonista a nivel *in vitro*, son cepas que muestren los mejores resultados *in vivo*. Esto podría explicarse por las interacciones bióticas del suelo y la planta, así como por las condiciones ambientales que les rodea (Jambhulkar et al. 2018; Soria 2020). Besseth-Manzoni et al. (2019) sugiere que para evaluar la capacidad biocontroladora de un microorganismo, es preferible realizar directamente ensayos *in planta* y no *in vitro* como generalmente se ejecuta.

El estudio realizado por Silva (2018) indica que, la sinergia *in vitro* de *Trichoderma* spp. con *Bacillus* spp. logra un mejor porcentaje de inhibición micelial que de forma individual. Sin embargo, nuestro estudio demuestra que las cepas de *Bacillus* spp. poseen mejor capacidad antagonista de forma individual que de forma conjunta. Estos resultados difieren de los resultados obtenidos por Jambhulkar et al. (2018), donde la aplicación de *Pseudomonas fluorescens* con *T. harzianum* incrementó la eficacia y la consistencia de los dos BCA. No obstante, el estudio realizado por Xu et al. (2010) concluye que, generalmente los mecanismos de acción de un solo BCA es más efectivo que en combinación. Una posible razón por la que los consorcios no fueron tan efectivos como de forma individual, podría ser debido a que *Trichoderma* spp. produce metabolitos tóxicos volátiles y no volátiles, que impide la colonización por otros microorganismos antagonistas, además de la competencia por nutrientes y espacio (Jambhulkar et al. 2018), o a su vez, *Bacillus* spp. produce antibióticos como el ácido d-glucónico y el 2-hexil-5-propil resorcinol, así como también sideróforos, lo que puede causar la inhibición micelial no solo del fitopatógeno, sino también de *Trichoderma* (Rajeela et al. 2018).

Un estudio realizado por Eckshtain-Levi et al. (2020) aisló bacterias rizosféricas de la planta *A. thaliana* con el fin de evaluar si alguno de los aislados, de forma individual o en consorcio, incrementaba la persistencia de *B. subtilis* en la rizosfera. Como resultado obtuvieron que las rizobacterias probadas de forma individual incrementaban la concentración de *B. subtilis* hasta en un logaritmo, mientras que las rizobacterias probadas en consorcio, no tuvieron resultados satisfactorios en cuanto al aumento y persistencia de *B. subtilis*. Estos resultados sugieren que las interacciones entre microorganismos pueden desempeñar un papel importante en la persistencia y comportamiento de ellos, y, además, que la especificidad de la cepa es vital para las interacciones entre microorganismos.

La contaminación por *Trichoderma* spp. en los controles positivos de la primera inoculación del fitopatógeno, podría ser la razón de la ausencia de síntomas de marchitez

vascular durante las cuatro semanas de observación. Sin embargo, al obtener un porcentaje bajo (0 -35 %) de severidad durante las dos primeras semanas tras la infección, y al contrarrestar la enfermedad en su totalidad en todos los tratamientos aplicados, se llegó a inferir que el patógeno no actuó con la severidad que se esperaba. El primer reporte de *F. oxysporum* en plantas de uvilla en el Ecuador, publicado por Yáñez et al. (2019), demostró en los postulados de Koch que el aislado YC-3 (utilizado en la presente investigación), fue el más agresivo de los *Fusarium*, limitando el crecimiento de las plántulas y presentando síntomas severos de la enfermedad. Asimismo, el estudio realizado por Soria (2020) mostró una severidad por marchitez vascular en plántulas de uvilla del 44,4 a 66,7 % en las dos primeras semanas de observación. En ese contexto, se procedió a realizar una segunda infección, a una concentración más alta y con un mayor tiempo de exposición. Fue interesante observar que los resultados fueron similares a los obtenidos en la primera inoculación durante las dos primeras semanas.

A pesar que las plantas estuvieron bajo condiciones de invernadero, el clima no fue favorecedor. La temperatura en el día oscilaba entre los 15 y 20 °C, y en las noches descendía drásticamente a 9 y 11 °C. De acuerdo a Veneros-Terrones (2017), las condiciones óptimas para el desarrollo de este hongo fitopatógeno son temperaturas de 25 y 30 °C. Esto pudo ser un limitante en el desarrollo de la enfermedad, y explicaría el bajo grado porcentual de severidad obtenido en las dos infecciones.

Los resultados del ensayo en condiciones de invernadero no solo demostraron la efectividad de algunos tratamientos para combatir la marchitez vascular, sino que evidenció la capacidad de las cepas de *Bacillus* spp. como PGPR. Los tratamientos conformados por *B. subtilis* OJ1Aga, *B. cereus* Ap y *B. cereus* DA21, mostraron diferencias altamente significativas en altura, peso en fresco y número de hojas con respecto a los controles cero. Sivasakthi et al. (2014) menciona que *Bacillus* spp. promueve la producción de giberelinas, auxinas y citoquinas (fitohormonas de crecimiento), además posee la capacidad de solubilizar fósforo, producir sideróforos y ácido acético, que aumenta la absorción de N, P, K, Ca y Mg en las plantas.

De acuerdo a Besset-Manzoni (2019), las bacterias con capacidad PGPR pueden inducir a la resistencia sistémica de la planta, lo que se traduce en una respuesta inmediata de defensa frente a un fitopatógeno. Esto explicaría la eficacia de los tratamientos conformados por cepas de *Bacillus* spp. frente a la marchitez vascular.

CONCLUSIONES

Los tratamientos conformados por *B. subtilis* OJ1Aga, *B. cereus* Ap y *B. cereus* DA21 presentan mayor grado de inhibición del fitopatógeno *in planta* de forma individual que en consorcio. Se recomienda realizar directamente ensayos *in vivo* para evaluar la capacidad biocontroladora de un microorganismo, ya que las interacciones que se desarrollan con otros microorganismos y con la planta, así como las condiciones ambientales, pueden relacionarse directamente con el incremento y el efecto controlador del microorganismo a examinar.

El presente estudio evidenció la capacidad biocontroladora efectiva de cepas de *Bacillus* spp. y su acción como promotores de crecimiento, mejorando considerablemente las variables estudiadas en cuanto a altura de la planta, número de hojas y peso en fresco con respecto a los controles cero. Por lo tanto, es importante seguir con investigaciones futuras a nivel de campo, así como la producción a gran escala de estos microorganismos para ofrecer a los agricultores un método eficaz y biológico de control como alternativa a los agroquímicos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el proyecto “Diagnóstico de las enfermedades y de plagas en cultivos comerciales de uvilla (*Physalis peruviana* L.) en el Ecuador” perteneciente al laboratorio de Fitopatología y Control Biológico de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, dirigido por la Mtr. Jeniffer Yánez. De igual forma un agradecimiento especial a la empresa Terrafertil por proporcionar las plántulas de uvilla para el desarrollo de este proyecto de investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. –

- Agrios G. 2005. Plant Pathology (5ta Ed.): Florida (Estados Unidos): Elsevier Academic Press.
- Acurio R. 2010. Técnicas de prevención y control de *Fusarium oxysporum f.sp. dianthi* en clavel *Dianthus caryophyllus* y su incidencia en la productividad (Tesis de Maestría). Universidad de Cuenca, Cuenca, Ecuador.

- Altamirano M. 2010. Estudio de la cadena productiva de uvilla (*Physalis peruviana* L.) en la Sierra Norte del Ecuador (Tesis de Pregrado). Universidad San Francisco de Quito, Quito, Ecuador.
- Amaral J, Pinto G, Flores-Pacheco JA, Díez-Casero JJ, Cerqueira A, Monteiro P, Gómez-Cadenas A, Alves A, Martín-García J. 2019. Effect of *Trichoderma viride* pre-inoculation in pine species with different levels of susceptibility to *Fusarium circinatum*: physiological and hormonal responses. *Plant Pathology*. 68(9):1645–1653. doi:10.1111/ppa.13080. [acceso 2021 Feb 18]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ppa.13080>.
- Aquihuatl M, Pérez M. 2013. Manual de Prácticas de Laboratorio de Microbiología General. Izapalpa, México: Universidad Autónoma Metropolitana. [acceso 2021 Feb 18]. https://uamenlinea.uam.mx/materiales/licenciatura/diversos/AQUIAHUATL_RAMOS_MARIA_DE_LOS_ANGELES_Manual_de_practicas_de.pdf
- Bautista D, Corrales Ramírez MSC LC, Cuervo Andrade PhD JL, González, Lady, Guevara M, Sánchez Leal MSC LC. 2010. Evaluación del efecto biocontrolador de *Bacillus* spp., frente a *Fusarium* spp., bajo condiciones de invernadero en *Rosmarinus officinalis* L. *Nova*. 8(13):63. doi:10.22490/24629448.440. [acceso 2021 Feb 18]. <https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/nova/article/view/440>.
- Besset-Manzoni Y, Joly P, Brutel A, Gerin F, Soudière O, Langin T, Prigent-Combaret C. 2019. Does in vitro selection of biocontrol agents guarantee success in planta? A study case of wheat protection against *Fusarium* seedling blight by soil bacteria. Karlovsky P, editor. *PLoS One*. 14(12):e0225655. doi:10.1371/journal.pone.0225655. [accessed 2021 Feb 19]. <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0225655>.
- Chiang KS, Liu HI, Tsai JW, Tsai JR, Bock CH. 2017. A discussion on disease severity index values. Part II: using the disease severity index for null hypothesis testing. *Ann Appl Biol*. 171(3):490–505. doi:10.1111/aab.12396. [acceso 2021 Feb 18]. <http://doi.wiley.com/10.1111/aab.12396>.
- Corrales Ramírez MSC LC, Sánchez Leal MSC LC, Cuervo Andrade PhD JL, Joya JA, Márquez K. 2012. Efecto Biocontrolador de “*Bacillus*” spp., Frente a “*Fusarium*”

- sp., Bajo Condiciones de Invernadero en Plantas de Tomillo (“*Thymus Vulgaris* L.”). *Nova*. 10(17):64. doi:10.22490/24629448.518. [acceso 2021 Feb 18]. <https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/nova/article/view/518>.
- Cubillos J, Páez A, Mejía L. 2011. Evaluación de la Capacidad Biocontroladora de *Trichoderma harzianum* Rifai contra *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. Asociado al Complejo “Secadera” en Maracuyá, Bajo Condiciones de Invernadero. *Rev Fac Nac Agron - Medellín*. 64(1):5821–5830. [accessed 2021 Feb 18]. http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0304-28472011000100008&script=sci_abstract&tlng=es.
- Díaz J, Chaves-Acuña W, Yáñez J. 2019. Diversidad de comunidades fúngicas aisladas de tejidos sintomáticos de la uvilla (*Physalis peruviana*) en los Andes Ecuatorianos. *Rev Ecuat Med Cienc Biol*. 40(2):77–86. doi:10.26807/remcb.v40i2.55.
- Eckshtain-Levi N, Harris SL, Roscios RQ, Shank EA. 2020. Bacterial community members increase bacillus subtilis maintenance on the roots of arabidopsis thaliana. *Phytobiomes J*. 4(4):303–313. doi:10.1094/PBIOMES-02-20-0019-R. [acceso 2021 Feb 19]. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PBIOMES-02-20-0019-R>.
- Enciso-Rodríguez FE, Osorio-Guarín JA, Garzón-Martínez GA, Delgadillo-Duran P, Barrero LS. 2020. Optimization of the genotyping-by-sequencing SNP calling for diversity analysis in cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) and related taxa. *PLoS One*. 15(8 August). doi:10.1371/journal.pone.0238383. [acceso 2021 Feb 18]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32845934/>.
- Estupiñán H. y Ossa J. 2007. Efecto del agente causal de la marchitez vascular de la uchuva (*Physalis peruviana* L.) El hongo *Fusarium oxysporum* Schlecht, sobre algunas solanáceas y otras especies cultivadas afectadas por formas especiales del microorganismo (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Fernández R, Suárez C. 2009. Antagonism *in vitro* of *Trichoderma harzianum* Rifai against *Fusarium oxysporum* Schlecht *f. sp. passiflorae* in passion fruit (*Passiflora edulis* Sims var. *Flavicarpa*) from Colombian bananera zone municipality. *Rev*

- Fac Nac Agron Medellín. 62(1):4743–4748. [accessed 2021 Feb 18]. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-28472009000100001.
- French E. y Hebert T. 1980. Métodos de investigación fitopatológica. 2nd ed. San José, Costa Rica: Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas.
- Fischer G, Almanza-Merchán PJ, Miranda D. 2014. Importancia y cultivo de la uchuva (*Physalis peruviana* L.). Rev Bras Frutic. 36(1):40. doi:10.1590/0100-2945-441/13. [accessed 2021 Feb 18]. <http://dx.doi.org/10.1590/0100-2945-441/13>.
- Góngora A. y Rojas S. (2006). Incidencia de las enfermedades en Uchuva *Physalis peruviana* por estado fenológico y de acuerdo con la ubicación en los diferentes estratos de la planta, en el departamento de Cundinamarca (Tesis de Pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Hernández-Melchor DJ, Ferrera-Cerrato R, Alarcón A. 2019. *Trichoderma*: Agricultural and biotechnological importance, and fermentation systems for producing biomass and enzymes of industrial interest. Chil J Agric Anim Sci. 35(1):98–112. doi:10.4067/S0719-38902019005000205. [accessed 2021 Feb 18]. http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0719-38902019005000205&lng=en&nrm=iso&tlng=en.
- Instituto de Promoción de Exportaciones e Inversiones [ProEcuador]. 2020. Oferta de uvilla ecuatoriana en mercados potenciales 2020. [acceso 2021 Feb 18]. <https://www.proecuador.gob.ec/oferta-de-uvilla-ecuatoriana-en-mercados-potenciales-2020/>
- Jambhulkar PP, Sharma P, Manokaran R, Lakshman DK, Rokadia P, Jambhulkar N. 2018. Assessing synergism of combined applications of *Trichoderma harzianum* and *Pseudomonas fluorescens* to control blast and bacterial leaf blight of rice. Eur J Plant Pathol. 152(3):747–757. doi:10.1007/s10658-018-1519-3.
- Khan N, Martínez-Hidalgo P, Ice TA, Maymon M, Humm EA, Nejat N, Sanders ER, Kaplan D, Hirsch AM. 2018. Antifungal Activity of *Bacillus* Species Against *Fusarium* and Analysis of the Potential Mechanisms Used in Biocontrol. Front Microbiol. 9(OCT):2363. doi:10.3389/fmicb.2018.02363. [acceso 2021 Feb 18]. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.02363/full>.

- Leslie J. y Summerell B. 2006. *Fusarium* Laboratory Manual. Kansas, EEUU: Blackwell Publishing.
- Li H, Zhao J, Feng H, Huang L, Kang Z. 2013. Biological control of wheat stripe rust by an endophytic *Bacillus subtilis* strain E1R-j in greenhouse and field trials. *Crop Prot.* 43:201–206. doi:10.1016/j.cropro.2012.09.008. [acceso 2021 Feb 18]. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0261219412002566>.
- Marfetán JA, Greslebin AG, Taccari LE, Vélez ML. 2020. Rhizospheric microorganisms as potential biocontrol agents against *Phytophthora austrocedri*. *Eur J Plant Pathol.* 158(3):721–732. doi:10.1007/s10658-020-02113-7. [acceso 2021 Feb 18]. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10658-020-02113-7>.
- Moosa A, Sahi ST, Haq IU, Farzand A, Khan SA, Javaid K. 2017. Antagonistic Potential of *Trichoderma* Isolates and Manures Against *Fusarium* Wilt of Tomato. *Int J Veg Sci.* 23(3):207–218. doi:10.1080/19315260.2016.1232329. [acceso 2021 Feb 18]. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19315260.2016.1232329>.
- Orozco A, Valverde M, Martínez R, Chávez C, Benavides R. 2016. Propiedades físicas, químicas y biológicas de un suelo con biofertilización cultivado con manzano. *Terr Lat.* 34(4): 441-456.
- Osorio-Guarín JA, Enciso-Rodríguez FE, González C, Fernández-Pozo N, Mueller LA, Barrero LS. 2016. Association analysis for disease resistance to *Fusarium oxysporum* in cape gooseberry (*Physalis peruviana* L). *BMC Genomics.* 17(1). doi:10.1186/s12864-016-2568-7. [acceso 2021 Feb 18]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26988219/>.
- Pareja JLZ, Cardona AS, Bonilla M, Diez C. 2002. Manejo del cultivo de la uchuva en Colombia. undefined.
- Puente LA, Pinto-Muñoz CA, Castro ES, Cortés M. 2011. *Physalis peruviana* Linnaeus, the multiple properties of a highly functional fruit: A review. *Food Res Int.* 44(7):1733–1740. doi:10.1016/j.foodres.2010.09.034. [acceso 2021 Feb 18]. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996910003571>.
- Pineda-Insuasti J, Benavides-Sotelo E, Duarte-Trujillo A, Burgos-Rada C, Soto-Arroyave C, Pineda-Soto C, Fierro-Ramos F, Mora-Muñoz E, Álvarez-Ramos S.

2017. Producción de biopreparados de *Trichoderma* spp: una revisión. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 51(1), 47-52.
- Rajeela K, Gupta TH, Gopal A, Hegde M, Thomas V V. 2018. Evaluation of Combinatorial Capacity of Coconut and Cocoa Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) with Biocontrol Agent *Trichoderma harzianum*. *Curr Inves Agri Curr Res*. 3(4). doi:10.32474/CIACR.2018.03.000168. [acceso 2021 Feb 18]. <https://www.researchgate.net/publication/326506731>.
- Rodríguez J, Monsalve J, Rosero S. 2010. Evaluación de Microorganismos Aislados de Gallinaza por su Potencial para el Biocontrol de *Fusarium* (*F. oxysporum*) en Plántulas de Uchuva (*Physalis peruviana*). *Rev Fac Nac Agron*. 63(2):5499–5509.
- Silva D. 2018. Acción in vitro de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. como controladores biológicos conjuntos contra *Fusarium oxysporum* en uvilla (*Physalis peruviana*), ecotipo colombiano, en la sierra norte y centro del Ecuador (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Sivasakthi S, Usharani G, Saranraj P. 2014. Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR) - *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*: A review. *African J Agric Res*. 9(16):1265–1277. doi:10.5897/AJAR2013.7914. [acceso 2021 Feb 18]. <http://www.academicjournals.org/AJAR>.
- Smith A. 2012. Reconocimiento de las enfermedades y plagas en el cultivo de la uchuva. En A. Díaz (Eds.), Avances en el manejo y control de *Fusarium oxysporum* en el cultivo de uchuva (*Physalis peruviana*) (pp. 9-12). Bogotá, Colombia: Produmedios.
- Soria L. 2020. Evaluación *in vitro* e *in planta* de la acción conjunta biocontroladora de cepas de *Pseudomonas* spp. y *Trichoderma* spp. frente a *Fusarium oxysporum* YC-3 en plántulas de uvilla (*Physalis peruviana* L.) (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Sriram S, Roopa KP, Savitha MJ. 2011. Extended shelf-life of liquid fermentation derived talc formulations of *Trichoderma harzianum* with the addition of glycerol in the production medium. *Crop Prot*. 30(10):1334–1339. doi:10.1016/j.cropro.2011.06.003.

- Tejera-Hernández B, Rojas-Badía M, Heydrich-Pérez M. 2011. Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC*. 42(3): 131-138. [acceso 2021 Feb 18]. <https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/REVSAGAS/article/view/2610>
- Tovar J. 2008. Evaluación de la capacidad antagonista “*in vivo*” de aislamientos de *Trichoderma* spp. frente al hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani*. (Tesis de Grado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Urrea R, Cabezas L, Sierra R, Cárdenas M, Restrepo S, Jiménez P. 2011. Selection of antagonistic bacteria isolated from the *Physalis peruviana* rhizosphere against *Fusarium oxysporum*. *J Appl Microbiol*. 111(3):707–716. doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05092.x. [acceso 2021 Feb 18]. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2011.05092.x>.
- Veneros-Terrones R, Cerna-Rebaza L, Chico-Ruíz J. 2017. Efecto de la temperatura en el crecimiento de *Fusarium oxysporum* y *Alternaria solani*. *Sagasteguiana*. 5(1): 1-6.
- Villa-Martínez A, Pérez-Leal R, Armando Morales-Morales H, Basurto-Sotelo M, Manuel Soto-Parra J, Martínez-Escudero E. Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales Current situation of *Fusarium* spp in the control and evaluation of the antifungal activity on vegetables extracts. doi:10.15446/acag.v64n2.43358. [acceso 2021 Feb 18]. <http://dx.doi.org/10.15446/acag.v64n2.43358>.
- Villarreal-Delgado MF, Villa-Rodríguez ED, Cira-Chávez LA, Estrada-Alvarado MI, Parra-Cota FI, De los Santos-Villalobos S. 2018. El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Rev Mex Fitopatol Mex J Phytopathol*. 36(1). doi:10.18781/r.mex.fit.1706-5. [acceso 2021 Feb 18]. <https://www.smf.org.mx/rmf/ojs/index.php/RMF/article/view/100>.
- Viracucha A. 2015. Efectos ocasionados al suelo por la utilización de agroquímicos en el cultivo de naranjilla en la parroquia Bombón, cantón el Chaco, 2015 (Tesis de pregrado). Universidad Técnica de Cotopaxi, Latacuga, Ecuador.

- Wonni I, Ouedraogo L, Dao S, Tekete C, Koita O, Taghouti G. 2015. First report of Cassava Bacterial Blight caused by *Xanthomonas axonopodispv. manihotis* in Burkina Faso. *Plant Disease*. 99:551. doi: 10.1094/PDIS-03-14-0302-PDN
- Xu X, Robinson J, Jeger M, Jeffries P. 2010. Using combinations of biocontrol agents to control *Botrytis cinerea* on strawberry leaves under fluctuating temperatures. *Biocontrol Sci Technol*. 20(4):359–373. doi:10.1080/09583150903528114.
- Yáñez JM, Arellano MJ, Silva AD, Garzón CD. 2019. First Report of Fusarium Wilt by *Fusarium oxysporum* in *Physalis peruviana* in Ecuador. *Plant Dis*. 103(10):2678. doi:10.1094/pdis-10-18-1807-pdn
- Yendyo S, G.C. R, Pandey BR. 2017. Evaluation of *Trichoderma* spp., *Pseudomonas fluorescence* and *Bacillus subtilis* for biological control of *Ralstonia* wilt of tomato. *F1000Research*. 6:2028. doi:10.12688/f1000research.12448.1. [acceso 2021 Feb 18]. <https://doi.org/10.12688/f1000research.12448.1>.
- Yıldız G, İzli N, Ünal H, Uylaşer V. 2015. Physical and chemical characteristics of goldenberry fruit (*Physalis peruviana* L.). *J Food Sci Technol*. 52(4):2320–2327. doi:10.1007/s13197-014-1280-3.
- Zhu J, Tan T, Shen A, Yang X, Yu Y, Gao C, Li Z, Cheng Y, Chen J, Guo L, et al. 2020. Biocontrol potential of *Bacillus subtilis* IBFCBF-4 against *Fusarium* wilt of watermelon. *J Plant Pathol*. 102(2):433–441. doi:10.1007/s42161-019-00457-6. [acceso 2021 Feb 18]. <https://link.springer.com/article/10.1007/s42161-019-00457-6>.

FIGURAS

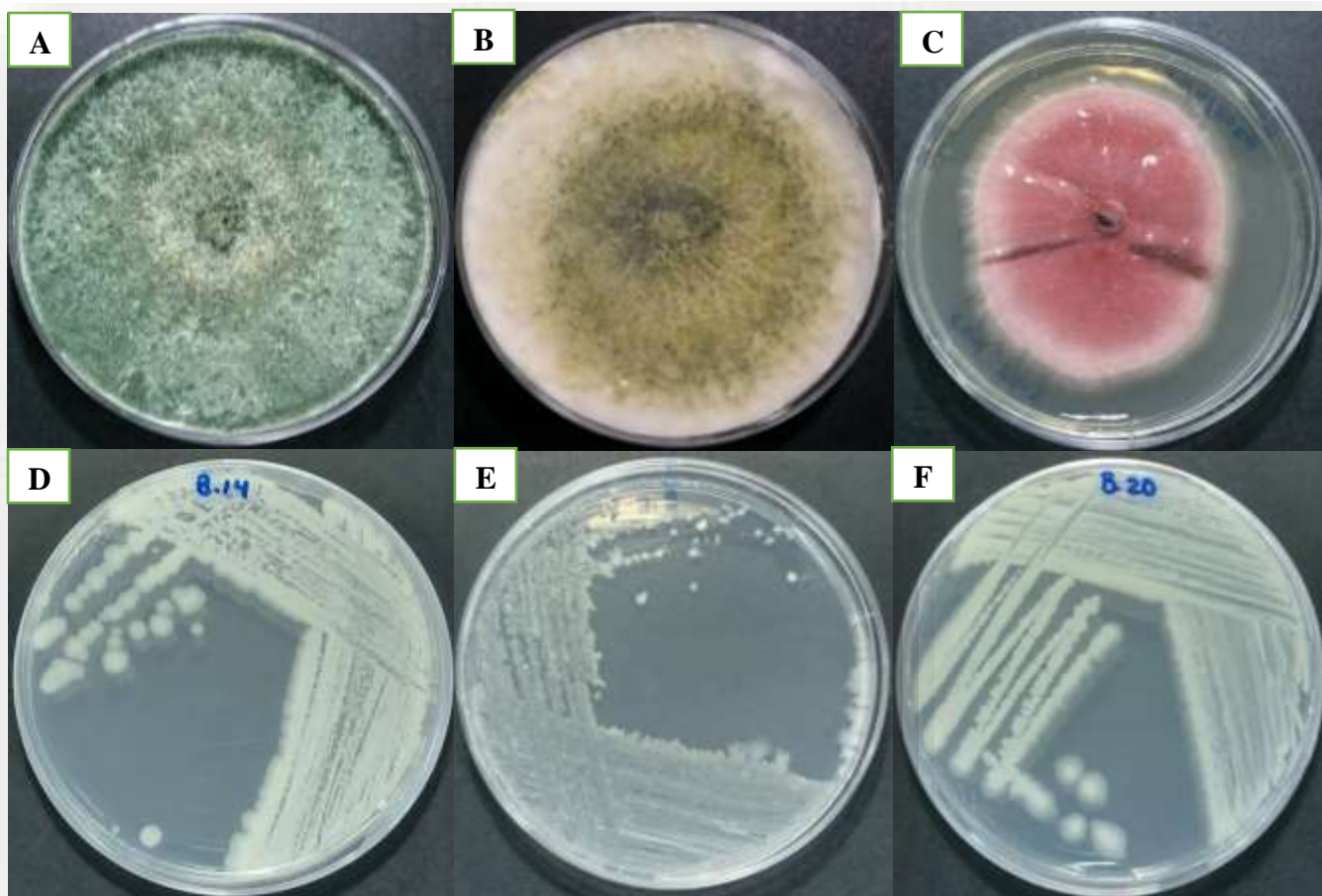


Figura 1. Cepas reactivadas. A) *Trichoderma atroviride* SP2A2. B) *Trichoderma tomentosum* YC1BS. C) *Fusarium oxysporum*. D) *Bacillus cereus* Ap. E) *Bacillus subtilis* OJ1a. F) *Bacillus cereus* DA21

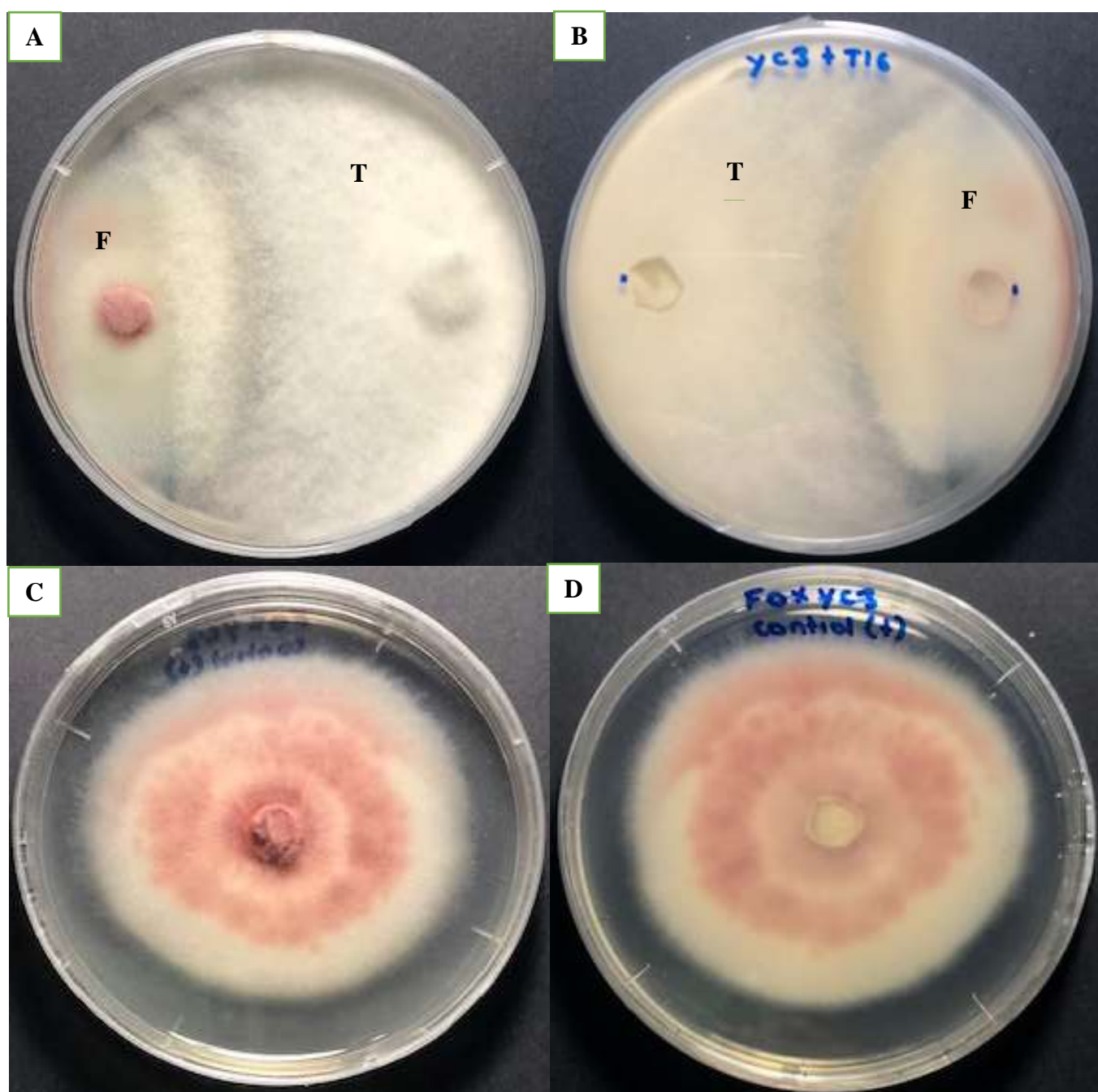


Figura 2. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma tometonsum* YC1BS (T) contra *Fusarium oxysporum* (F). A) Anverso del enfrentamiento B) Reverso del enfrentamiento C) Anverso control fitopatogéno D) Reverso control fitopatogéno

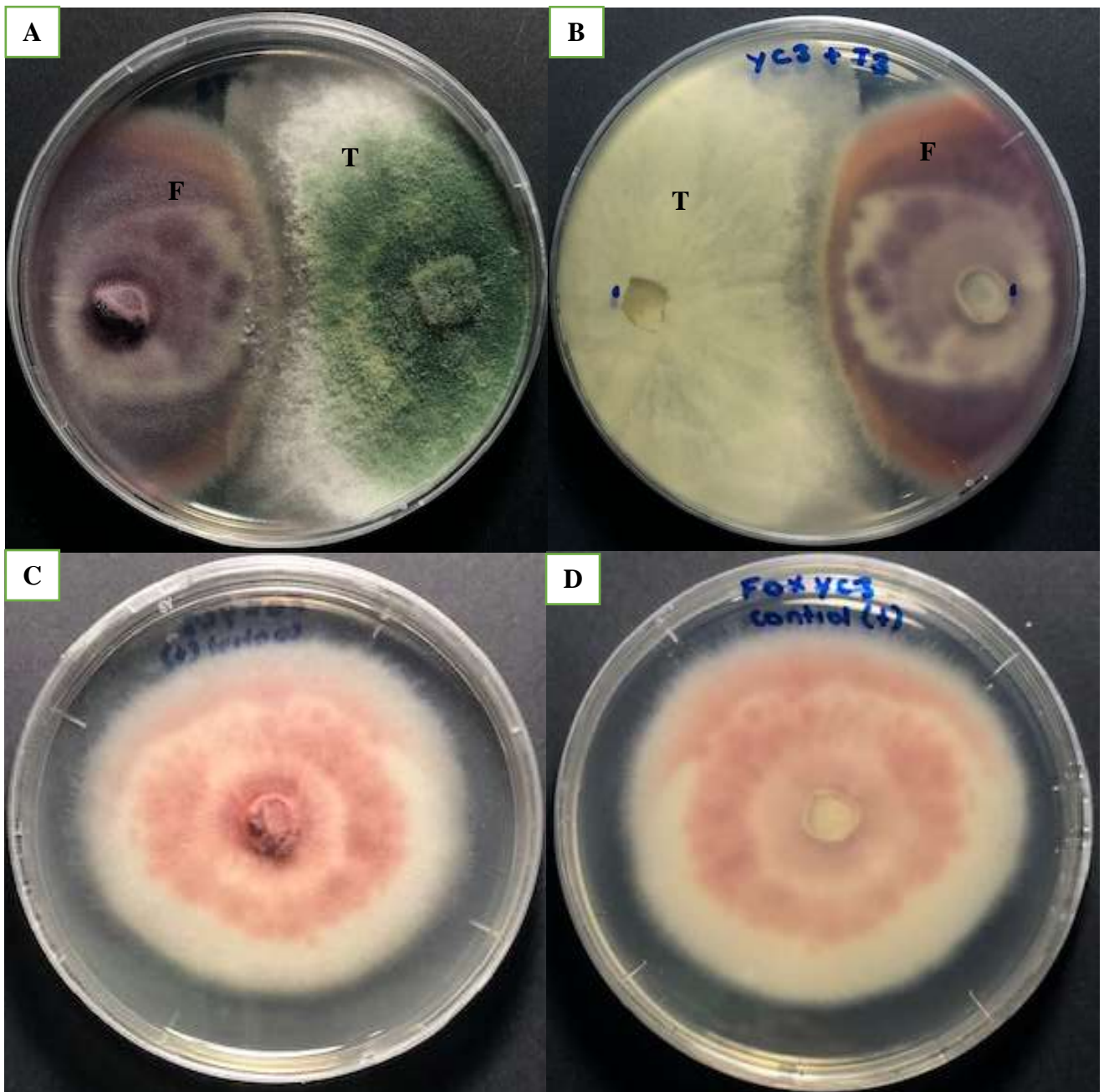


Figura 3. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma atroviride* SP2A2 (T) contra *Fusarium oxysporum* (F). A) Anverso del enfrentamiento B) Reverso del enfrentamiento C) Anverso control fitopatógeno D) Reverso control fitopatógeno

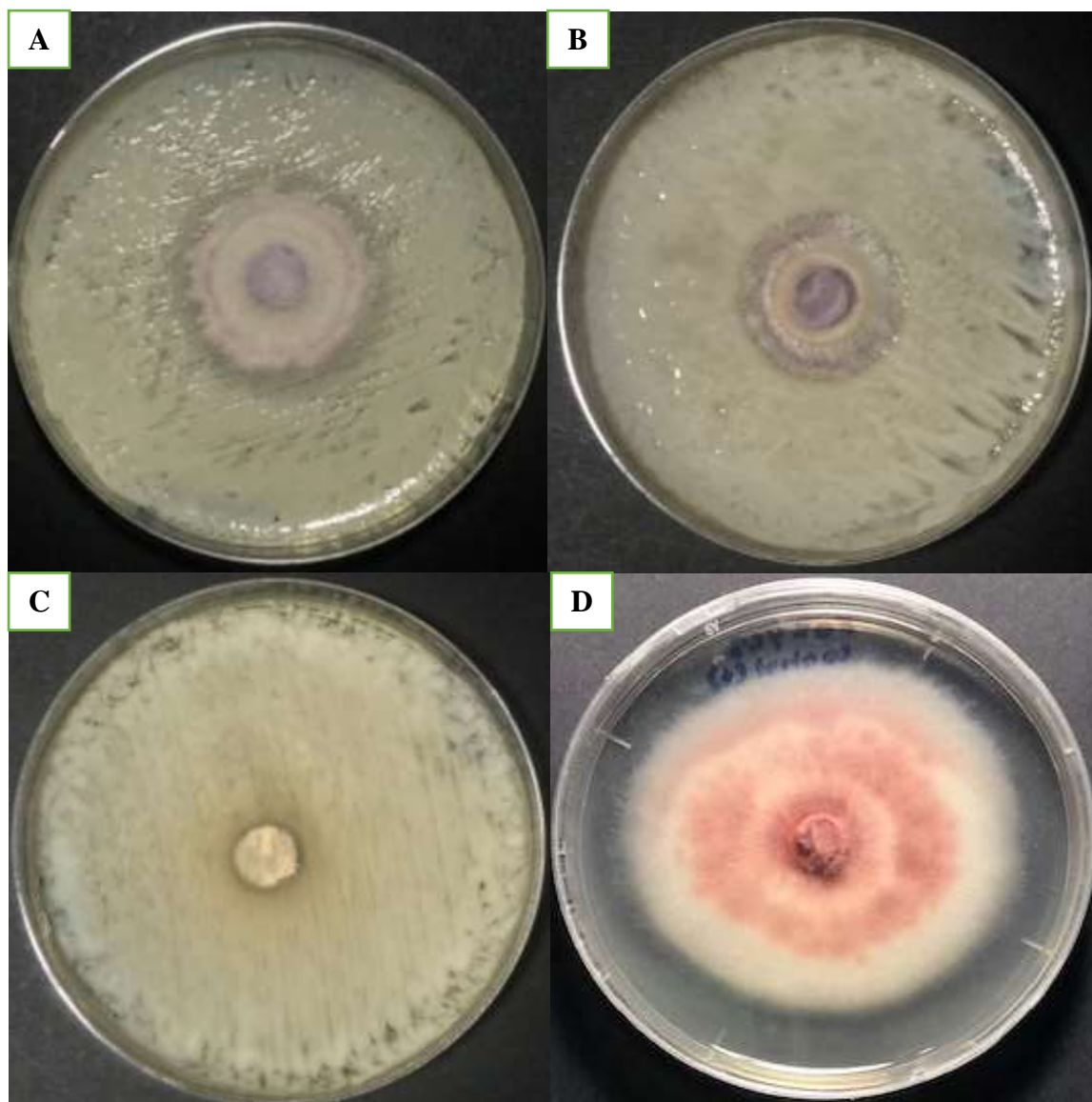


Figura 4. Antagonismo *in vitro* de *Bacillus* spp. contra *Fusarium oxysporum*. A) *B. cereus* DA21 B) *B. cereus* Ap C) *B. subtilis* OJ1Aga D) Control fitopatogeno

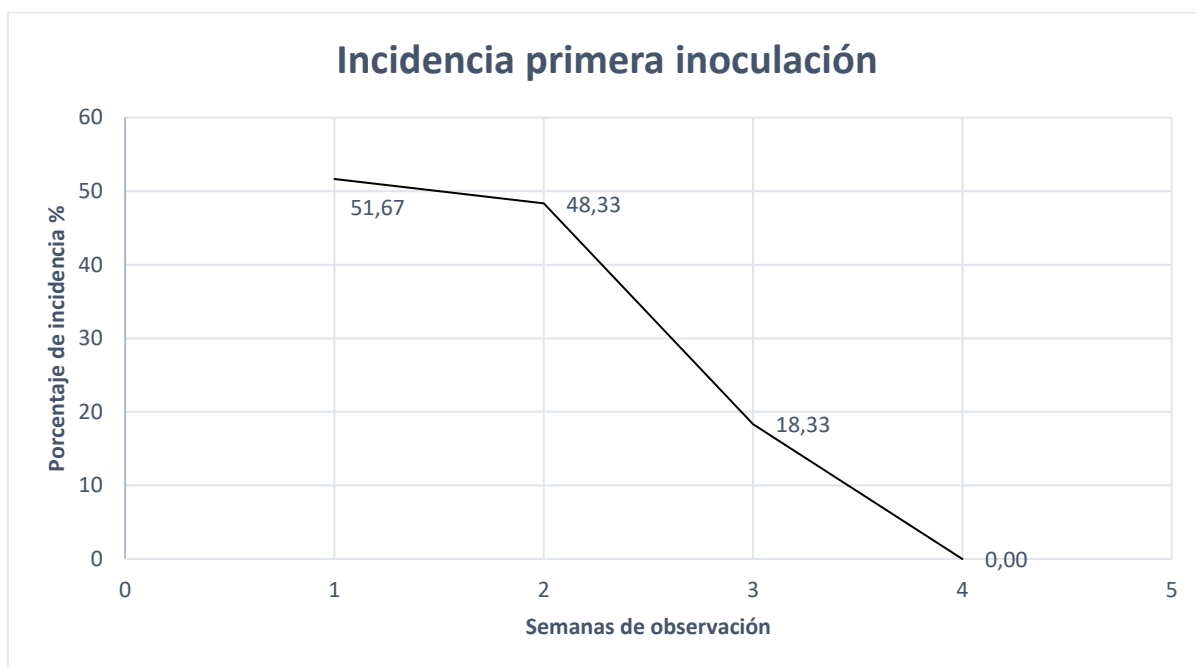


Figura 5. Porcentaje de incidencia de la marchitez vascular en la primera inoculación durante cuatro semanas de observación.

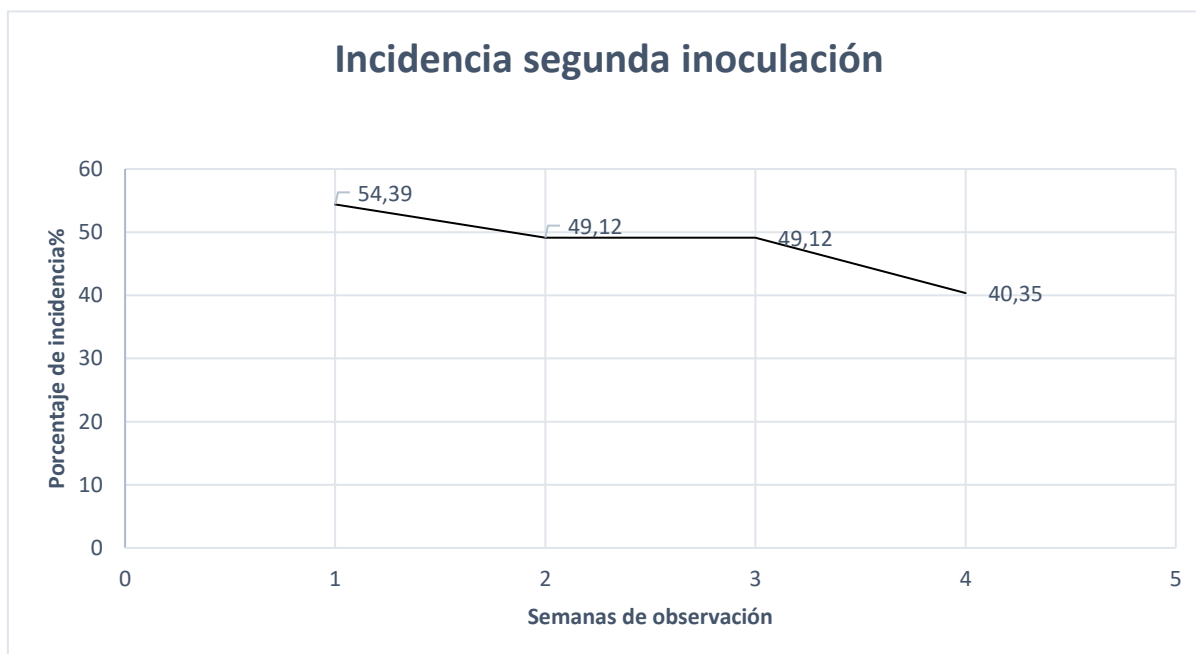


Figura 6. Porcentaje de incidencia de la marchitez vascular en la segunda inoculación durante cuatro semanas de observación.

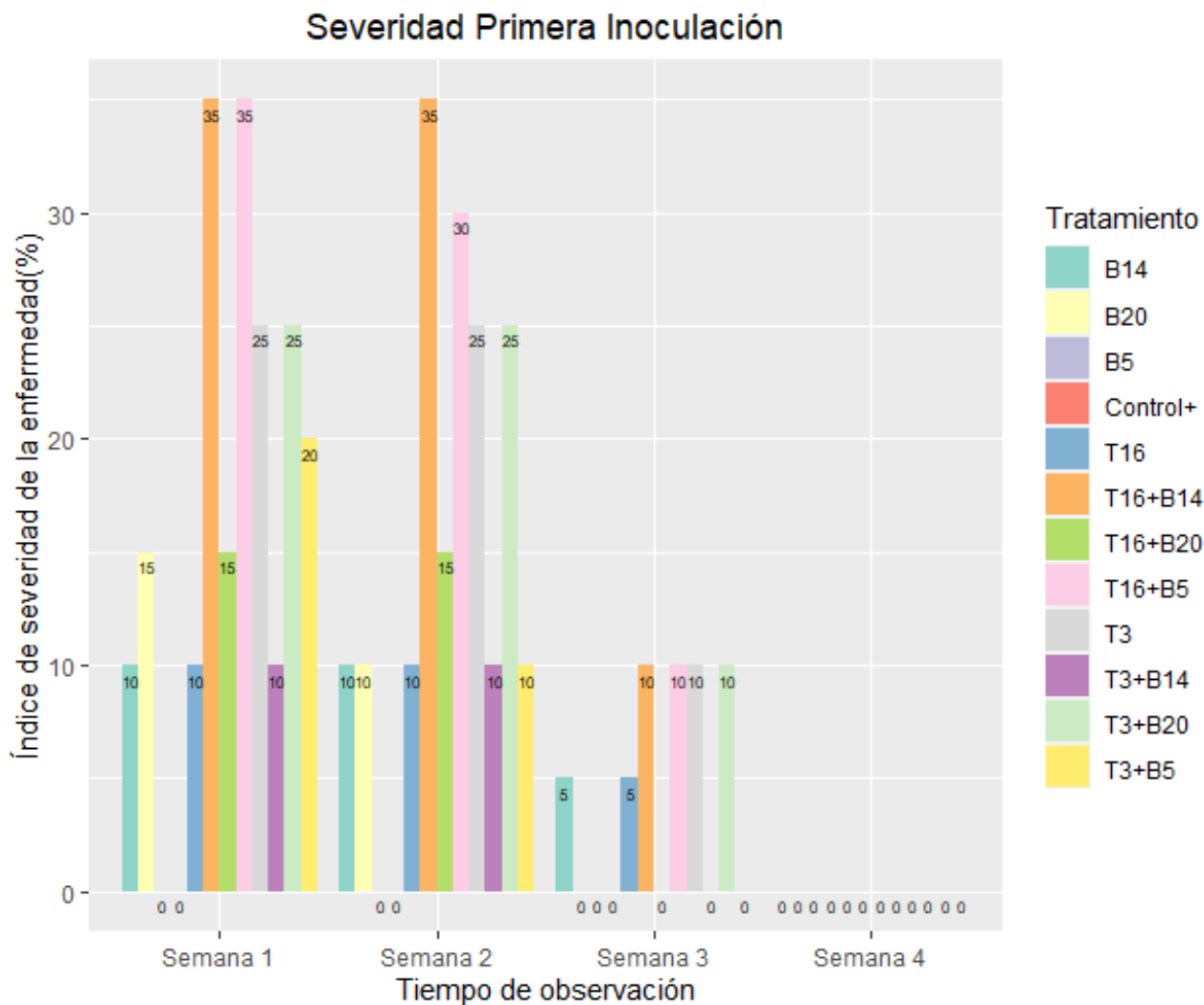


Figura 7. Gráfico de barras del índice de severidad de la enfermedad en la primera inoculación durante cuatro semanas de observación. B14 corresponde a *Bacillus cereus* Ap, B20 a *B. cereus* DA21, B5 a *B. subtilis* OJ1Aga, T16 a *T. tomentosum* YC1BS, T3 a *T. atroviride* SP2AS. El tratamiento B5 presentó un índice de severidad del 0% en las cuatro semanas de evaluación.

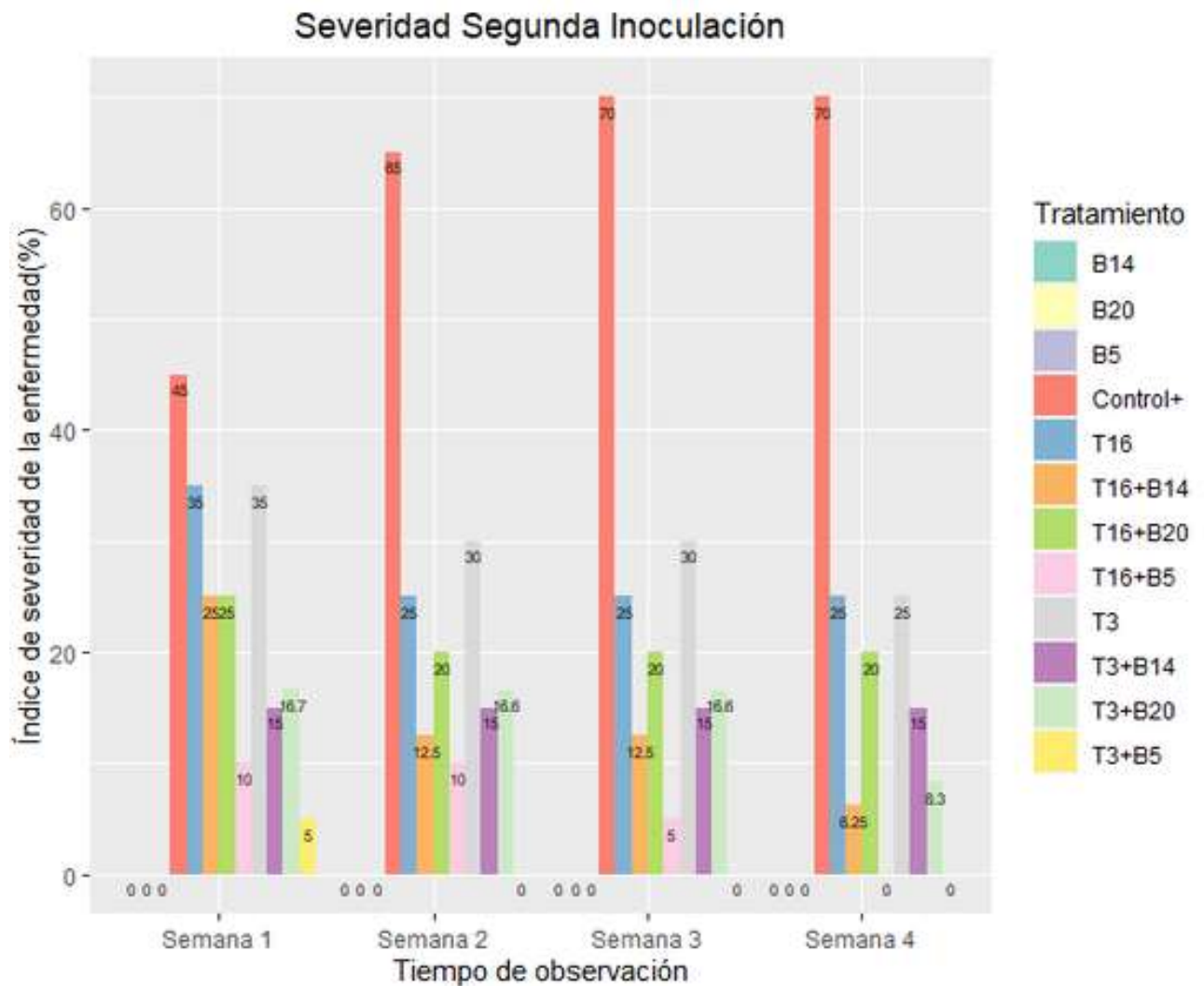


Figura 8. Gráfico de barras del índice de severidad de la enfermedad en la segunda inoculación durante cuatro semanas de observación. B14 corresponde a *Bacillus cereus* Ap, B20 a *B. cereus* DA21, B5 a *B. subtilis* OJ1Aga, T16 a *T. tomentosum* YC1BS, T3 a *T. atroviride* SP2AS. Los tratamientos B14, B20 y B5 presentaron un índice de severidad del 0% en las cuatro semanas de evaluación.



Figura 9. Plántulas de uvilla ubicadas en bloques completos al azar bajo condiciones de invernadero.

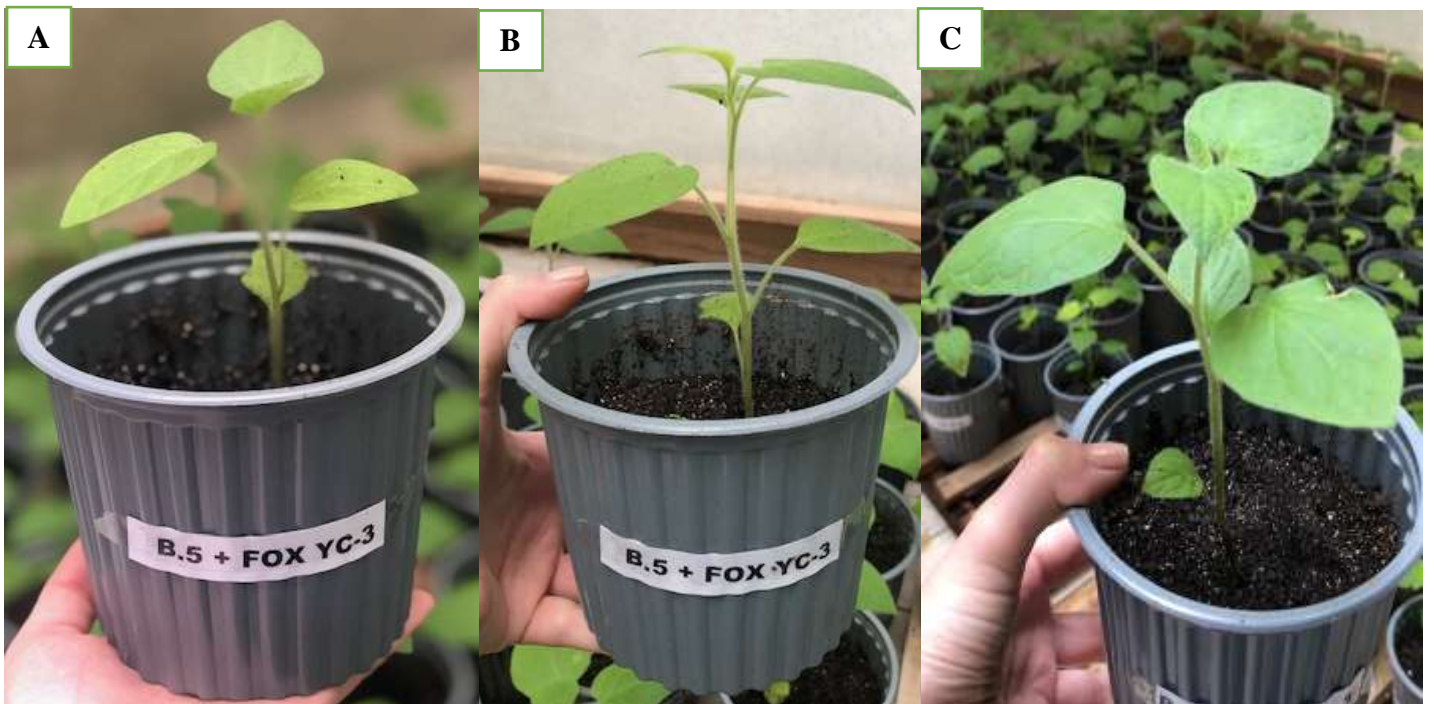


Figura 10. Plántulas de uvilla con tratamiento *B. subtilis* OJ1Aga durante la primera infección. A) semana 1 de observación B) semana 2 de observación 3) semana 4 de observación.



Figura 11. Plántulas de uvilla con tratamientos que presentaron el índice de severidad más alto durante la primera infección. A) plántula con tratamiento *T. tomentosum*YC1BS + *B. subtilis* OJ1Aga en la primera semana de observación. B) plántula con tratamiento *T. tomentosum*YC1BS + *B. cereus* Ap durante la primera semana de observación tras la infección.



Figura 12. Testigos positivos en la primera infección. Plántulas con *Fusarium oxysporum* en la segunda semana de observación.

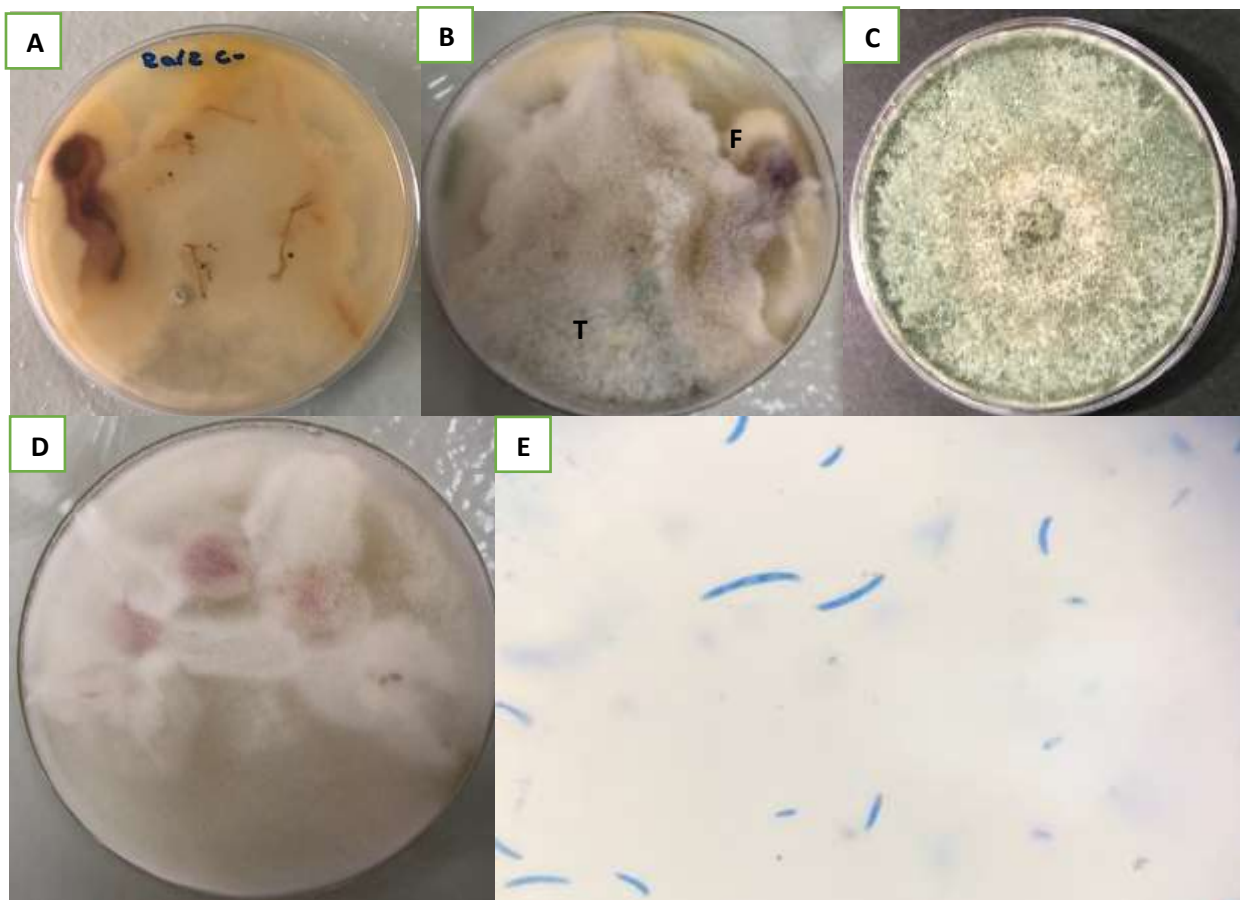


Figura 13. Cultivo de raíces de testigos positivos en la primera infección. A) Reverso del cultivo de raíces. B) Anverso del cultivo de raíces. Se puede observar crecimiento de *F. oxysporum* (F) y *Trichoderma* spp. (T) C) *Trichoderma* spp. aislado del Plato Petri de la imagen B. D) Crecimiento de *Fusarium oxysporum*. E) Macroconidios de *F. oxysporum* AT 400x.



Figura 14. Planta con el consorcio *T. atroviride* SP2AS + *B. cereus* Ap en la tercera semana de observación de la segunda inoculación.



Figura 15. Plantas con tratamientos en la cuarta semana luego de la segunda inoculación. A) *T. atroviride* SP2AS B) *T. tomentosum* YC1BS C) *B. cereus* Ap D) *B. subtilis* OJ1Aga E) *B. cereus* DA21 F) *T. atroviride* SP2AS + *B. subtilis* OJ1Aga G) *T. atroviride* SP2AS + *B. cereus* DA21 H) *T. atroviride* SP2AS + *B. cereus* Ap I) *T. tomentosum* YC1BS + *B. cereus* Ap J) *T. tomentosum* YC1BS + *B. subtilis* OJ1Aga K) *T. tomentosum* YC1BS + *B. cereus* DA21 L) Control positivo M) Control cero

TABLAS. –

Tabla 1. Organización de los tratamientos

Tratamiento	Cepa
1	<i>T. atroviride</i> SP2AS
2	<i>T. tomentosum</i> YC1BS
3	<i>B. cereus</i> DA21
4	<i>B. cereus</i> Ap
5	<i>B. subtilis</i> DJ1Aga
6	<i>T. atroviride</i> SP2AS + <i>B. cereus</i> DA21
7	<i>T. atroviride</i> SP2AS + <i>B. cereus</i> Ap
8	<i>T. atroviride</i> SP2AS + <i>B. subtilis</i> DJ1Aga
9	<i>T. tomentosum</i> YC1BS + <i>B. cereus</i> DA21
10	<i>T. tomentosum</i> YC1BS + <i>B. cereus</i> Ap
11	<i>T. tomentosum</i> YC1BS + <i>B. subtilis</i> DJ1Aga
12	Control positivo (<i>Fusarium oxysporum</i>)
13	Control cero (solo planta)

Tabla 2. Análisis de la varianza de la actividad promotora de crecimiento de consorcios microbianos aplicados para el control de *Fusarium oxysporum* en uvilla.

		ANOVA				
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	*Sig.
Peso fresco de follaje	Entre grupos	6921,675	12	576,806	22,494	,000
	Dentro de grupos	1000,043	39	25,642		
	Total	7921,718	51			
Altura	Entre grupos	17470,923	12	1455,910	16,780	,000
	Dentro de grupos	3383,750	39	86,763		
	Total	20854,673	51			
Número de hojas	Entre grupos	1787,692	12	148,974	8,860	,000
	Dentro de grupos	655,750	39	16,814		
	Total	2443,442	51			

* Significancia estadística al 5%

Tabla 3. Promedios y desviación estándar de la evaluación biocontroladora de los tratamientos frente a *F. oxysporum* en condiciones de invernadero en la cuarta semana después de la segunda inoculación. Tukey (5%).

Tratamiento	Altura (cm)	Número de hojas	Peso en fresco (g)
Control positivo <i>F. oxysporum</i>	41,00 ± 2,000 ^{degfhjikml}	7,25 ± 0,957 ^{efghjkm}	4,775 ± 0,6946 ^{efghjikml}
Control cero	47,50 ± 1,732 ^{defghijklm}	9,50 ± 0,5777 ^{efghkm}	6,975 ± 0,5123 ^{efghjikml}
<i>T. atroviride</i> SP2AS	63,75 ± 8,995 ^{efgjikm}	9,25 ± 0,500 ^{efghkm}	9,600 ± 0,7118 ^{efghjikml}
<i>T. tomentosum</i> YC1BS	73,25 ± 16,399 ^{abgf}	11,50 ± 3, ^{000fgh}	13,450 ± 2,4502 ^{efghjikm}
<i>B. subtilis</i> OJ1Aga	91,00 ± 4,243 ^{abc}	21,50 ± 5,066 ^{abc}	31,700 ± 4,6347 ^{abcd}
<i>B. cereus</i> Ap	97,00 ± 7,958 ^{abcd}	23,50 ± 5,196 ^{abcdl}	32,525 ± 5,9997 ^{abcd}
<i>B. cereus</i> DA21	98,25 ± 7,411 ^{abcd}	23,00 ± 5,715 ^{abcdl}	40,625 ± 1,2842 ^{abcdl}
<i>T. atroviride</i> SP2AS + <i>B. subtilis</i> OJ1Aga	84,25 ± 9,845 ^{ab}	24,75 ± 2,872 ^{abcdl}	29,575 ± 7,6687 ^{abcd}
<i>T. atroviride</i> SP2AS + <i>B. cereus</i> Ap	91,75 ± 14,477 ^{abce}	16,25 ± 4,113	29,750 ± 8,3688 ^{abcd}
<i>T. atroviride</i> SP2AS + <i>B. cereus</i> DA21	91,75 ± 7,632 ^{abc}	19,25 ± 7,500 ^a	32,800 ± 4,4520 ^{abcd}
<i>T. tomentosum</i> YC1BS + <i>B. subtilis</i> OJ1Aga	94,75 ± 3,775 ^{abc}	20,00 ± 5,354 ^{abc}	33,650 ± 4,1861 ^{abcd}
<i>T. tomentosum</i> YC1BS + <i>B. cereus</i> Ap	79,75 ± 12,842	12,50 ± 2,646 ^{gfh}	24,225 ± 8,3392 ^{abcg}
<i>T. tomentosum</i> YC1BS + <i>B. cereus</i> DA21	95,25 ± 9,535 ^{abc}	20,50 ± 2,380 ^{abc}	35,025 ± 5,5889 ^{abcd}

Cada valor numérico corresponde a la media de 5 muestras ± desviación estándar. ^a ES en comparación con el control positivo, ^b ES en comparación con el control cero, ^c ES en comparación con *T. atroviride* SP2AS, ^d ES en comparación con *T. tomentosum* YC1BS, ^e ES en comparación con *B. subtilis* OJ1Aga, ^f ES en comparación con *B. cereus* Ap, ^g ES en comparación con *B. cereus* DA21, ^h ES en comparación con *T. atroviride* SP2AS + *B. subtilis* OJ1Aga, ⁱ ES en comparación con *T. atroviride* SP2AS + *B. cereus* Ap, ^j ES en comparación con *T. atroviride* SP2AS + *B. cereus* DA21, ^k ES en comparación con *T. tomentosum* YC1BS + *B. subtilis* OJ1Aga, ^l ES en comparación con *T. tomentosum* YC1BS + *B. cereus* Ap, ^m ES en comparación con *T. tomentosum* YC1BS + *B. cereus* DA21. ES= Estadísticamente significativo p<0,05.