

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**CARRERA DE MICROBIOLOGÍA**

Evaluación *in vitro* de cepas de *Trichoderma atroviride*, *T. gamsii*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens* como potenciales biocontroladores contra los patógenos de uvilla *Botrytis cinerea* y *Cercospora* sp.

**Disertación previa a la obtención del título de Microbiólogo**

**ALEXIS MATEO QUINTANA CUEVA**

**Quito, 2023**

## **CERTIFICACIÓN**

Certifico que la Disertación de grado en Microbiología del candidato Alexis Mateo Quintana Cueva ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.



**Mtr. Jeniffer Yáñez Altuna**

Directora de la Disertación

Quito, 16 de agosto 2023

## **DEDICATORIA**

A mis padres, hermana y todas las personas que supieron darme su apoyo incondicional.

A mi abuelito que, desde el cielo, sigue cuidándome en cada nueva etapa.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mis padres, Angel y Lupita, por siempre estar ahí a pesar de las dificultades. Por todo el cariño y amor que he recibido. Gracias por enseñarme el valor del esfuerzo y la dedicación. Por buscar siempre mi felicidad a pesar de los malos momentos y por darme un ejemplo digno de seguir. Estoy seguro de que todo lo que han sacrificado por nosotros siempre será recompensado con el amor puro que tenemos hacia ustedes.

A mi hermana Paola, mi segunda madre. Viviré siempre agradecido por todo el apoyo y cariño que he recibido de tu parte. Sé que todo el esfuerzo que haces por mí tiene como único objetivo verme brillar y aprovechar las oportunidades que en su momento no fueron posibles para ti. Sin tu ayuda nada de esto hubiera sido posible.

A la Mtr. Jeniffer Yánez, quien desde los inicios de mi vida universitaria estuvo siempre ahí. El cariño y agradecimiento que le tengo es infinito por confiar en mí. Gracias por ser mi profe, mi jefa, mi amiga, mi mentora y mi madre en muchos de los casos. Solo Dios sabe dónde pone a sus hijos y sé que puso en mi vida a una persona extraordinaria para seguir su ejemplo y apoyarme siempre en lo que necesite, por más difícil que se pongan las cosas.

Al PhD. Carlos Zárate, quien se ha convertido en un referente y ejemplo a seguir dentro de la mi carrera científica. Gracias por esos consejos y guías para mejorar, y sobre todo por las experiencias vividas en campo.

A Mishell, quién es uno de mis pilares más importantes. Gracias por todo ese amor y cariño que siempre ha estado presente. Por entenderme y apoyarme en todo momento por más difícil que sea, porque a pesar de todo siempre queremos vernos felices. Finalmente, a mis amigos, Amanda, Carlita, Dome y Alejo quienes fueron parte de toda esta experiencia. Gracias por ser un apoyo incondicional, por ofrecerme su verdadera amistad, por todas esas experiencias y momentos vividos.

## MANUSCRITO PARA PUBLICACIÓN

### Revista

La Granja: Revista de Ciencias de la Vida.

### Título

Evaluación *in vitro* de cepas de *Trichoderma atroviride*, *T. gamsii*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens* como potenciales biocontroladores contra los patógenos de uvilla *Botrytis cinerea* y *Cercospora* sp.

### Autores

Alexis Mateo Quintana Cueva\*, Jeniffer Marcela Yáñez Altuna\*\*

### Correo electrónico

\*amquintana@puce.edu.ec, jyanez989@puce.edu.ec\*\*.

### Dirección

Laboratorio de Fitopatología y Control Biológico. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. 170102. Quito, Ecuador.

El siguiente trabajo de investigación se presenta en el formato de La Granja: Revista de Ciencias de la Vida. Las normas para autores pueden ser revisadas en el enlace descrito a continuación:

<https://lagranja.ups.edu.ec/pdf/granja/normas.pdf>

**Sección (Marcar)**

Artículo científico \_\_\_x\_

Revisión Bibliográfica \_\_\_

Punto de vista \_\_\_

Special Issue" Sustentabilidad Organizacional, Desarrollo y Gestión Ambiental" \_\_\_

**Evaluación *in vitro* de cepas de *Trichoderma atroviride*, *T. gamsii*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens* como potenciales biocontroladores contra los patógenos de uvilla *Botrytis cinerea* y *Cercospora* sp.**

***In vitro* screening of *Trichoderma atroviride*, *T. gamsii*, *Bacillus subtilis*, and *Pseudomonas fluorescens* as potential biocontrol agents against the gooseberry pathogens *Botrytis cinerea* and *Cercospora* sp.**

Alexis Quintana<sup>1</sup>, Jeniffer Yáñez<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Fitopatología y Control Biológico, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. 170102, Quito, Ecuador.

\*Autor para correspondencia: amquintana@puce.edu.ec

**RESUMEN**

La uvilla (*Physalis peruviana*) se ha convertido en un producto de interés para mercados internacionales por sus propiedades nutricionales y bioactivas. Su producción es extensa en varios mercados emergentes distribuidos alrededor del mundo. Este cultivo es propenso al desarrollo de patologías como el moho gris (*B. cinerea*) y la mancha foliar (*Cercospora* sp.) que afectan gravemente hojas y capachos. El control se basa en la utilización de productos químicos dañinos para el ambiente, los cuales pueden ser reemplazados por microorganismos biocontroladores. Estos últimos pueden ser bacterias u hongos capaces de producir metabolitos, fitohormonas, sustancias volátiles o utilizar otros mecanismos para promover el crecimiento vegetal y/o inhibir el desarrollo de patógenos dentro de la planta. En este estudio, se emplearon cultivos duales para la evaluación *in vitro* de cepas de *B. subtilis*, *P. fluorescens*, *T. atroviride* y *T. gamsii* como posibles antagonistas de los patógenos *B. cinerea* y *Cercospora* sp. La mayor inhibición del crecimiento contra *B. cinerea* se obtuvo con *B. subtilis* (Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial de 52,94%±5,88%). Mientras que entre los tratamientos evaluados contra

33 *Cercospora* sp., *B. subtilis*, *T. gamsii* y *T. atroviride* sobrepasaron el 40% de inhibición a pesar  
34 de no representar diferencias significativas al compararlos entre ellos. Todos los  
35 microorganismos ensayados mostraron capacidad antagonica frente a los patógenos *B. cinerea*  
36 y *Cercospora* sp., a excepción de la cepa de *P. fluorescens*.

### 37 **ABSTRACT**

38 *The gooseberry is becoming a product of interest in international markets due to its nutritional*  
39 *and bioactive properties. Its production is extensive in some emerging markets distributed around*  
40 *the world. This crop is in danger of various phytopathologies such as gray mold (*B. cinerea*) and*  
41 *leaf spot (*Cercospora* sp.). Those fungi severely affect leaves and clusters. In general, farmers*  
42 *use harmful chemicals to control those diseases. However, biological control is an alternative that*  
43 *employs harmless microorganisms. They can be bacteria or fungi capable of producing*  
44 *metabolites, phytohormones, volatile substances, or other mechanisms to promote plant growth*  
45 *or inhibit the development of diseases. The dual-culture methodology was used for in vitro assays*  
46 *with *B. subtilis*, *P. fluorescens*, *T. atroviride*, *T. gamsii*, *B. cinerea*, and *Cercospora* sp. to search*  
47 *for antagonisms. The greatest growth inhibition against *B. cinerea* was obtained with *B. subtilis**  
48 *(Percentage of Inhibition of Radial Growth of 52.94%±5,88%). Meanwhile, among the treatments*  
49 *evaluated against *Cercospora* sp., *B. subtilis*, *T. gamsii*, and *T. atroviride* surpassed 40%*  
50 *inhibition despite not showing significant differences when compared to the control. All the tested*  
51 *microorganisms exhibited antagonistic capability against the pathogens *B. cinerea* and*  
52 **Cercospora* sp., except for the strain of *P. fluorescens*.*

53

### 54 **Palabras clave**

55 *Physalis peruviana*, actividad antifúngica, PGPR, hongos fitopatógenos, *Trichoderma* spp.

### 56 **Keywords**

57 *Physalis peruviana*, antifungal activity, PGPR, phytopathogenic fungi, *Trichoderma* spp.

58

### 59 **1. Introducción**

60 La uvilla (*Physalis peruviana*) es una planta frutal nativa de los Andes sudamericanos que crece  
61 entre los 1500 y 3000 m.s.n.m. Se caracteriza por el desarrollo de un arbusto que puede alcanzar  
62 una altura de 1,5 metros en un tiempo promedio de dos años. El fruto es una baya que se

63 encuentra protegido por un capuchón principalmente durante el tiempo de maduración, que varía  
64 entre los 60 y 80 días. El fruto se caracteriza por su forma esférica y color amarillo (Fischer,  
65 Almanza-Merchán y Miranda, 2014). Su importancia ha tomado revuelo durante los últimos años  
66 gracias a su alto valor nutricional caracterizado por un gran porcentaje de vitamina C,  $\beta$ -carotenos  
67 y minerales, los cuales están relacionados, directa e indirectamente con las propiedades  
68 bioactivas de la uvilla. Por ejemplo, efectos antiinflamatorios, antiasmáticos, diuréticos,  
69 analgésicos, entre otros (Bazalar Pereda, Nazareno y Viturro, 2019; Puente *et al.*, 2011). Dicho  
70 antecedente ha incrementado la tasa de producción de uvilla en Suramérica, sobresaliendo en  
71 países como Colombia, Ecuador y Perú, como también en África, en Zimbabue, Kenia y Egipto  
72 (Bazalar Pereda, Nazareno y Viturro, 2019). Esto ubica a la uvilla dentro del mercado emergente  
73 de exportaciones para varias naciones. En el caso de Ecuador, del 2012 al 2017 se registró un  
74 crecimiento del 10% del cultivo de uvilla dentro de la región interandina. Esto significó una  
75 cosecha de aproximadamente 4 000 toneladas del fruto que, en un 70% se destinó a  
76 exportaciones y un 30% al consumo interno (Moreno-Miranda *et al.*, 2019). Hasta 2018, los entes  
77 de control contabilizaron 43 mercados distintos para el producto ecuatoriano, entre los que se  
78 destacaron Francia, Países Bajos y Canadá (MPCEIP, 2019). Igualmente, en Colombia, el cultivo  
79 de uvilla significó exportaciones por alrededor de 38 millones de dólares en 2022 (Ardila y Murillo,  
80 2023). El particular interés de los mercados internacionales constituye una gran oportunidad para  
81 el aumento significativo de ingresos en pequeños y grandes productores de uvilla.

82 Uno de los condicionantes para el desarrollo de cultivos de uvilla es la falta de conocimiento en  
83 torno al manejo de problemas fitosanitarios, sinónimos de grandes pérdidas económicas en  
84 pequeñas y grandes empresas (Moreno-Miranda *et al.*, 2020). Por ejemplo, las enfermedades  
85 como el moho gris causada por *Botrytis cinerea* y la mancha foliar causada por *Cercospora* sp,  
86 provocan grandes pérdidas en los cultivos por las graves afecciones en hojas y capachos  
87 (Paredes, Yáñez y Marcial-Coba, 2021). El desarrollo de las fitopatologías se combate con la  
88 aplicación de agentes químicos de amplio espectro que provocan distintas afectaciones a la salud  
89 humana y al ambiente entre el corto y largo plazo (Jiménez-Quintero, Pantoja-Estrada y Leonel,  
90 2016; Ruiz-Gaitán, Castellanos-Gonzáles y Jair-Villamizar, 2018). Uno de los casos más graves  
91 es la presencia de elementos químicos en productos de consumo final. En Colombia, se  
92 demostró la existencia de residuos de distintos pesticidas en frutos de uvilla listos para

93 comercialización dentro del mercado colombiano, lo que representa un riesgo a la salud del  
94 consumidor (Cadavid-Muñoz *et al.*, 2017).

95 El biocontrol es una alternativa ampliamente utilizada para reducir el desarrollo de enfermedades  
96 e incentivar el desuso de agroquímicos. Dicha estrategia, se basa en el uso de microorganismos  
97 capaces de reducir el efecto del patógeno sobre las plantas, sin causar daño en el ambiente,  
98 dejar residuos o causar algún tipo de riesgo (Wang *et al.*, 2021). Muchos de estos  
99 microorganismos se clasifican como Promotores del Crecimiento Vegetal (PGPR). Este grupo se  
100 caracteriza por ayudar a las plantas a aumentar su disponibilidad de nutrientes, mejorar su  
101 sistema de resistencia a enfermedades o atacar directamente a los patógenos. Tal es el caso de  
102 *Trichoderma* spp., que se describe como uno de los mejores controladores de hongos patógenos  
103 (Ramírez-Olier *et al.*, 2019). Por otro lado, se destacan a los géneros bacterianos *Bacillus* y  
104 *Pseudomonas*. El primero resalta por la producción de antibióticos y enzimas y el segundo por  
105 sintetizar compuestos antifúngicos que inhiben el crecimiento de varios fitopatógenos (Tejera,  
106 Heydrich y Rojas, 2012; Wang *et al.*, 2021). Los resultados de varias investigaciones se resumen  
107 en efectos favorables para el combate de *B. cinerea* en plantas de mora y *Cercospora* sp. en  
108 plantas de tomate con los agentes microbianos descritos anteriormente (Calvo-Araya *et al.*, 2012;  
109 Pincay *et al.*, 2021). Estos efectos podrían comprobarse, también, en la uvilla. Por ello, se busca  
110 con esta investigación demostrar, mediante ensayos *in vitro*, la capacidad inhibitoria de distintos  
111 microorganismos contra fitopatógenos de la uvilla *B. cinerea* y *Cercospora* sp.

112

## 113 **2. Materiales y Métodos**

### 114 **2.1 Reactivación de cepas bacterianas y fúngicas**

115 Las cepas antagonistas y fitopatógenas se reactivaron de la colección del Laboratorio de  
116 Fitopatología de Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE). En total se reactivaron  
117 cinco cepas: *B. subtilis* (B5-OJI), *P. fluorescens* (SnR6), *T. gamsii* (T25), *T. atroviride* (T3), *B.*  
118 *cinerea* (OT-05-10) y *Cercospora* sp. (ET-24). Las bacterias se sembraron en el medio de cultivo  
119 Agar Nutritivo (AN) e incubadas a 25±2 °C por 72 horas. Por otro lado, los hongos fueron  
120 inoculados en Agar Papa Dextrosa (PDA) e incubados a 25±2 °C por 7 días. Se comprobaron  
121 características morfológicas y pureza de cultivos mediante tinción de Gram (bacterias) y tinción

122 de Azul de Lactofenol (hongos) (Sosa *et al.*, 2011; Ladino-Rey, Rubio y Chacin-Zambrano, 2016;  
123 Paredes, Yáñez y Marcial-Coba, 2021).

## 124 **2.2 Productividad bacteriana en medios de cultivo**

125 Se utilizó el método ecométrico desarrollado por Mossel *et al.* (1983) y modificado por Kornacki  
126 *et al.* (2003) para evaluar la productividad de *B. subtilis* y *P. fluorescens* en medio Agar Papa  
127 Zanahoria (APZ) (ATCC 335) mediante el cálculo del índice de crecimiento absoluto (ICA) y el  
128 índice de crecimiento relativo (ICR). Se utilizó un asa calibrada de 10  $\mu$ L para inocular las  
129 bacterias según el modelo ecométrico propuesto, tanto en el medio evaluado como en PDA, el  
130 cual se utilizó como medio referencial. Los cultivos se incubaron a  $25\pm 2$  °C por 48 horas. Luego  
131 de este periodo se cuantificaron los resultados. Cada estría con crecimiento puntúa como 0.2,  
132 excepto la transversal que se ubica en el centro del plato, esta obtiene un valor de 1. Su suma  
133 se representa como ICA. Se estima que si se obtiene un ICA < 2.5 el medio es bajamente  
134 productivo, si se encuentra entre 2.5 y 4.0 es medianamente productivo y si el ICA > 4.0 se trata  
135 un medio altamente productivo (Michanie *et al.*, 1992; Montilla-Escudero *et al.*, 2011). Por otro  
136 lado, el ICR se obtiene de la relación entre el ICA del medio de prueba e ICA del medio referencia  
137 con un resultado esperado de 1 (Lara Mantilla, Mendoza y Oviedo Zumaqué, 2010).

## 138 **2.3 Pruebas de antagonismo**

### 139 **2.3.1 Cultivos duales bacterias contra hongos**

140 Se empleó el modelo de cultivo dual detallado por Slama *et al.* (2019) para comprobar la actividad  
141 antifúngica de *B. subtilis* y *P. fluorescens*. Las bacterias fueron inoculadas en agua peptonada al  
142 1% a  $25\pm 2$  °C hasta alcanzar una concentración bacteriana de  $10^8$  UFC/ml. Se utilizó un  
143 espectrofotómetro a una longitud de onda de 625 nm hasta obtener valores entre de 0.08 y 0.1  
144 que corresponden al 0.5 en la escala de McFarland (Lozano Guzmán, 2018). Se utilizó medio  
145 PDA en placas Petri de 90 mm para los enfrentamientos entre las bacterias y *B. cinerea*. Por otro  
146 lado, se empleó APZ para las pruebas que involucraron a *Cercospora* sp. En ambos casos, se  
147 colocó un disco de micelio del fitopatógeno de siete días de crecimiento con un diámetro de 5  
148 mm en el centro de plato. Se inoculó una estría bacteriana por cada lado, a una distancia de 3  
149 cm desde el disco como se indica en la Figura 1. Además, se estableció un control donde se  
150 colocó únicamente el disco del fitopatógeno en el centro del plato. Cabe resaltar que, por cada  
151 enfrentamiento y control se realizaron tres repeticiones. Los platos fueron incubados a  $25\pm 2$  °C

152 por 10 días en el caso de *B. cinerea* y 15 para *Cercospora* sp. Al culminar el periodo de  
153 incubación, se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) con base en la  
154 siguiente ecuación propuesta por Alenezi *et al.* (2016), dónde *a* hace referencia al radio de la  
155 colonia evaluada y *b* al radio de la colonia control.

$$156 \quad PIC = 1 - (a/b) \times 100\% \quad (1)$$

### 157 2.3.2 Cultivos duales hongos contra hongos

158 El modelo de cultivo dual propuesto por Pincay *et al.* (2021), con algunas modificaciones, se  
159 empleó para evaluar la capacidad antagónica de las cepas de *T. gamsii* y *T. atroviride*. Se utilizó  
160 medio PDA para los enfrentamientos con *B. cinerea* y APZ en el caso de *Cercospora* sp. En una  
161 caja Petri de 90 mm, se colocaron discos de 5 mm de diámetro. Los discos se ubicaron de forma  
162 opuesta, en los extremos de la caja sobre la línea media, cada uno en el borde como se muestra  
163 en la Figura 1 (Rahman, Begum y Alan, 2009). Los cultivos de para *B. cinerea* fueron incubados  
164 durante 10 días y los de *Cercospora* sp. por 15 días (Galleti *et al.*, 2008) a 25±2 °C. El control  
165 consistió en una caja Petri con un disco de 5 mm del micelio del fitopatógeno ubicado en el  
166 centro. Cabe resaltar que, por cada enfrentamiento y control se realizaron tres repeticiones. Al  
167 culminar el periodo de incubación, el antagonismo se evaluó fenotípicamente en base a la escala  
168 descrita por Bell, Wells y Markham (1982). Del mismo modo, se calculó el PICR con base en la  
169 ecuación descrita por Skidmore y Dickinson (1976):

$$170 \quad PICR = [(C1 - C2 / C1)] \times 100 \quad (2)$$

171 Donde *C1* hace referencia al crecimiento radial del control y *C2* al crecimiento radial del  
172 fitopatógeno enfrentado.

173

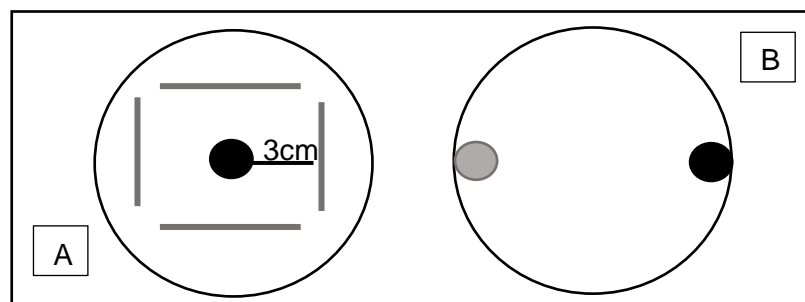
174

175

176

177

178



179 **Figura 1.** Representación gráfica de los cultivos duales. A) Modelo propuesto por Slama *et al.*  
180 (2019) en el caso de *B. subtilis* y *P. fluorescens* contra *B. cinerea* y *Cercospora* sp. B) Modelo  
181 propuesto por Rahman, Begum y Alan (2009) en el caso de *T. gamsii* y *T. atroviride* contra *B.*  
182 *cinerea* y *Cercospora* sp.  
183  
184

185 **2.3 Análisis estadísticos**

186 Se empleó un diseño de bloques al azar. Los datos fueron transformados mediante función  
187 logarítmica. Se comprobó homogeneidad y normalidad entre los datos mediante las pruebas de  
188 Levene y Shapiro-Wilks respectivamente. Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) y la  
189 prueba *post hoc* de Tukey. Se determinaron diferencias significativas entre los tratamientos a un  
190 nivel de significancia del 95%. Los análisis se ejecutaron en el software estadístico R con la  
191 utilización de los paquetes ggplot2, dplyr, PASWR, car, multcomp y tidy.

192

193 **3. Resultados y Discusión**

194 Los microorganismos reactivados mostraron características fenotípicas correspondientes a su  
195 naturaleza, lo que coincide con lo descrito en la literatura (Villareal-Delgado *et al.*, 2018; Alemu  
196 y Alemu, 2013; García-Núñez *et al.*, 2017; Zin y Badaluddin, 2020) (Fig.1).

197

198

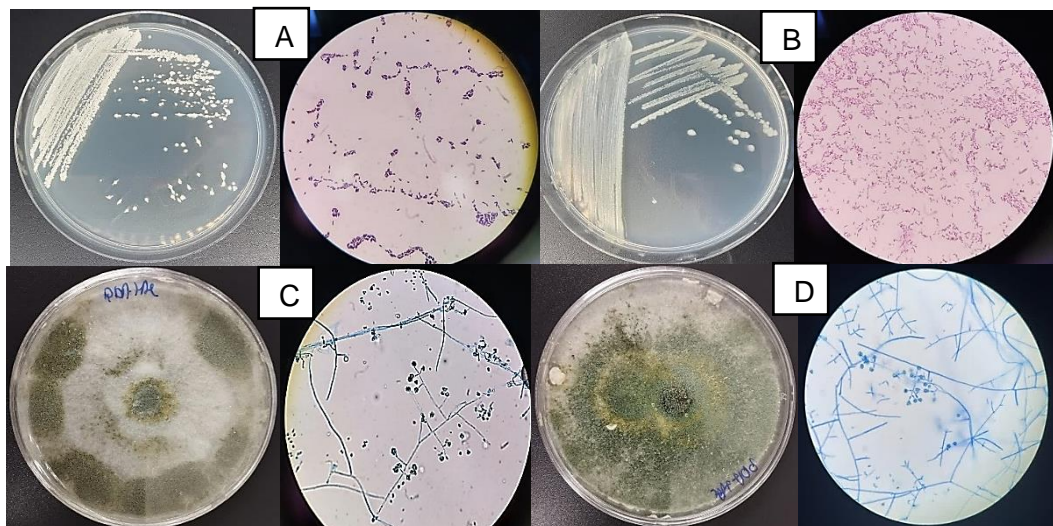
199

200

201

202

203



204

205

206

207

208

**Figura 2.** Microorganismos biocontroladores evaluados. Imagen izquierda corresponde al cultivo macroscópico y derecha a morfología microscópica; bacterias bajo aumento de 100x y hongos a 40x. A) *B. subtilis*, B) *P. fluorescens*, C) *T. atroviride*. y D) *T. gamsii*.

209

210

211

212

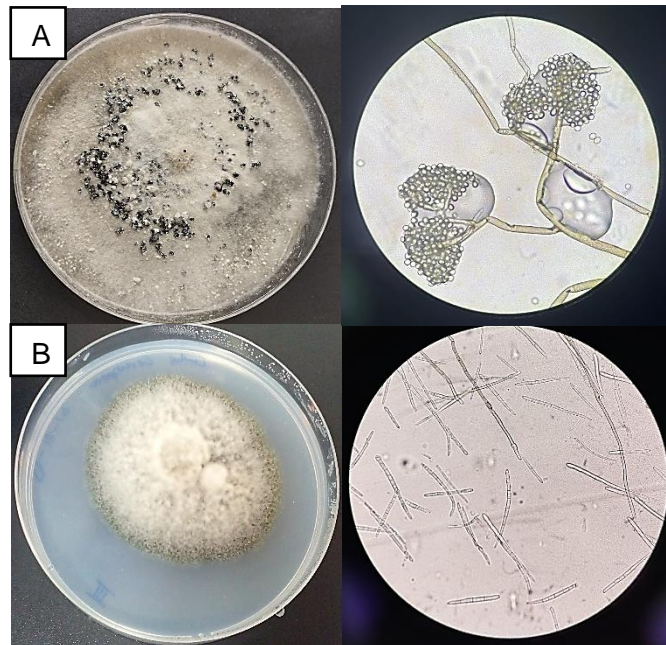
213

214

Del mismo modo, los caracteres de las cepas de los fitopatógenos *B. cinerea* y *Cercospora* sp. coincidieron con lo reportado en otras investigaciones (Figura 3). Se destaca la presencia de esclerocios en las colonias de *B. cinerea*. Las observaciones microscópicas presentaron conidióforos largos y septados que portaban conidios redondos y elípticos (Terrones-Salgado *et al.*, 2019). La cepa de *Cercospora* sp. mostró un desarrollo lento en medio PDA, aproximadamente dos semanas, con la presencia de colonias de forma irregular, micelio aéreo de color blanco y bordes erosionados (Paredes, Yáñez y Marcial-Coba, 2021). Esto representó

215 una complicación para los enfrentamientos duales en la cuantificación del crecimiento radial del  
216 fitopatógeno. Por ello, se empleó para las pruebas de antagonismo el medio APZ, dónde  
217 *Cercospora* sp. mostró un crecimiento fúngico más rápido, con la formación de colonias circulares  
218 de borde definido que se extendieron sobre toda la placa (Figura 3) (Paredes, Yáñez y Marcial-  
219 Coba, 2021; Pun, Kumar y Pandey, 2020).

220  
221  
222  
223  
224  
225  
226  
227  
228

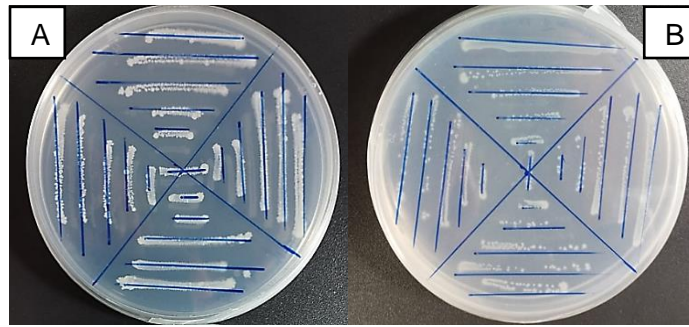


229 **Figura 3.** Microorganismos fitopatógenos ensayados. Las imágenes de los paneles de la  
230 izquierda corresponden a la morfología macroscópica y los de la derecha a la morfología  
231 microscópica, ambos bajo aumento de 40x. A) *B. cinerea* en PDA y B) *Cercospora* sp. en APZ.  
232

233 Los resultados de la prueba de productividad bacteriana determinaron que el medio APZ es  
234 altamente productivo, tanto para *B. subtilis* como *P. fluorescens* (Figura 4). En ambos casos, se  
235 cuantificó un valor de 5 para ICA y 1 para ICR. Los resultados significaron una tasa de crecimiento  
236 bacteriano del 95 al 100% en el medio evaluado en comparación al medio de referencia (PDA)  
237 (Lara Mantilla, Mendoza y Oviedo Zumaqué, 2010). Existen estudios similares que definen la  
238 productividad de dichos agentes, pero no en el medio anteriormente mencionado. El método  
239 ecométrico de Mossel evalúa efectivamente la calidad de un medio comercial o una formulación  
240 ideada en laboratorio, con la finalidad de determinar si los medios empleados son los correctos  
241 para propiciar el crecimiento bacteriano o inhibir el mismo (Kornacki *et al.*, 2003; Villalobos *et al.*,  
242 2007).

243

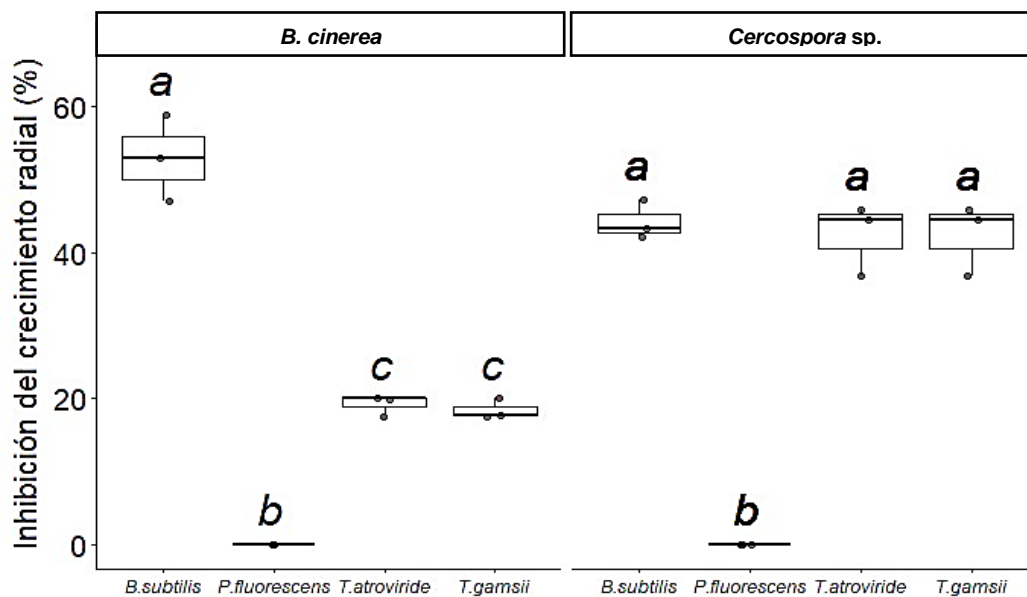
244  
245  
246  
247  
248  
249  
250



251 **Figura 4.** Prueba de productividad bacteriana en medio APZ. A) *B. subtilis* y B) *P. fluorescens*

252 Las pruebas de antagonismo se agruparon por fitopatógeno enfrentado. La cepa de *B. subtilis*  
253 presentó el mayor efecto inhibitorio ante los patógenos de la uvilla *B. cinerea* y *Cercospora* sp.  
254 seguido por las cepas de *T. atroviride* y *T. gamsii*. En el caso de *B. cinerea* se encontraron  
255 diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) al comparar los tratamientos frente al control. La cepa de *B.*  
256 *subtilis* se situó como el mejor agente antagónico al registrar un valor de PICR del  
257  $52,94\% \pm 5,88\%$ . En cuanto a los tratamientos aplicados a *Cercospora* sp., estos resultaron  
258 homogéneos al compararse con el control y obtenerse un valor no significativo ( $p \geq 0.05$ ). A pesar  
259 de ello, *B. subtilis*, *T. gamsii* y *T. atroviride* representaron un porcentaje de inhibición que supera  
260 el 40% que los coloca como agentes antagónicos de *Cercospora* sp. Los valores se representan  
261 en la Figura 5.

262  
263  
264  
265  
266  
267  
268  
269



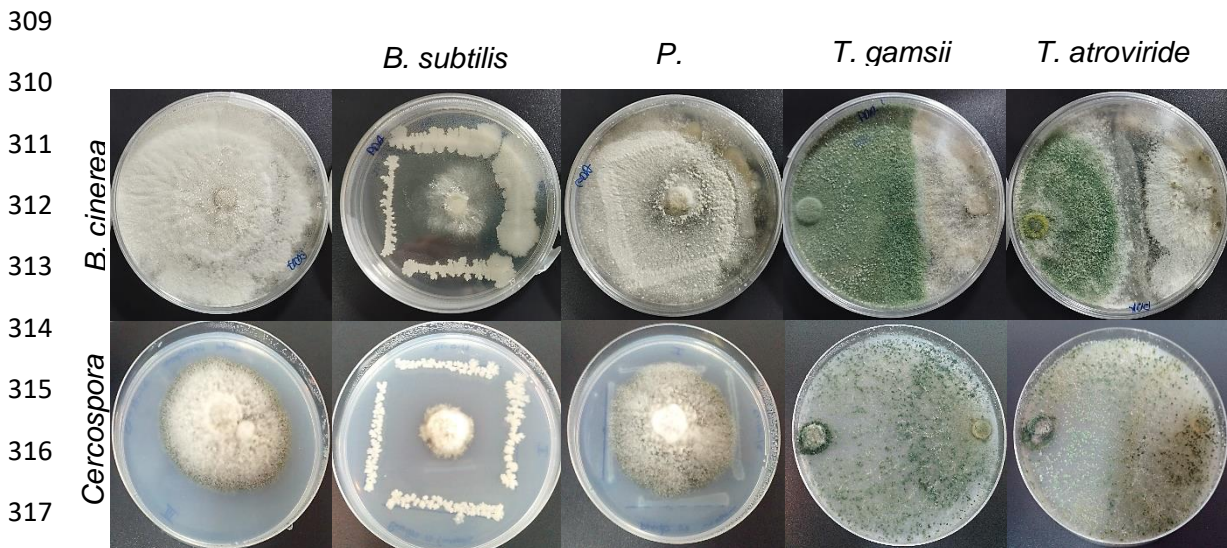
270 **Figura 5.** PICR de *B. cinerea* y *Cercospora* sp. frente a los distintos agentes biocontroladores.  
271 Letras distintas muestran diferencias significativas, con un valor de  $p \leq 0.05$ , según la prueba  
272 de Tukey.

273 Los valores de PICR posicionan a *B. subtilis* como el agente biocontrolador con la mayor acción  
274 antagonista ante los dos fitopatógenos de la uvilla. Li *et al.* (2022) reportó como el mejor agente  
275 antifúngico a una cepa de *Bacillus* sp. que mostró un porcentaje de inhibición del 78,42% ante  
276 una cepa de *B. cinerea* aislada de una planta de vid. En el caso de *Cercospora* sp., Poornima y  
277 Jagdish (2011) registraron un porcentaje de inhibición del 55.07% en ensayos *in vitro*, al enfrentar  
278 una cepa de *B. subtilis* frente a una de *C. beticola*, Mejores resultados fueron descritos por  
279 Soldano *et al.*, 2010, quienes reportaron una inhibición 78,95% al enfrentar *B. subtilis* a una cepa  
280 de *C. kikuchii*. Esto, al igual que en otras investigaciones, indica que las cepas pertenecientes al  
281 género *Bacillus* son uno de los mejores antagonistas para dichos fitopatógenos bajo condiciones  
282 *in vitro*.

283 Se describe a *Bacillus* como un género con potencial para la agricultura al promover el  
284 crecimiento vegetal y controlar varios tipos de patologías. Esto bajo distintos mecanismos de  
285 acción como la inducción de resistencia sistémica en la planta, producción de compuestos  
286 antimicrobianos, fitohormonas, compuestos orgánicos volátiles, enzimas líticas y péptidos de  
287 síntesis no ribosomal (NRPs) (Pedraza, López y Uribe-Vélez, 2020). Estos últimos compuestos  
288 son relevantes para el control de fitopatologías producidas por agentes fúngicos. En el caso  
289 específico de *B. cinerea*, *Bacillus* tiene la capacidad de sintetizar surfactina, un metabolito  
290 perteneciente a los NRPs, con la capacidad de reducir el daño causado por dicho patógeno en  
291 plantas de tabaco y tomate (Cawoy *et al.*, 2014; Pedraza, López y Uribe-Vélez, 2020).

292 *Trichoderma* se constituye como uno de los mejores representantes fúngicos para el control de  
293 patógenos, promoción del crecimiento vegetal, descomponedor de materia orgánica y agente de  
294 biorremediación (Zin y Badaluddin, 2020). Entre sus mecanismos de acción ante patógenos  
295 resaltan el micoparasitismo y restructuración de la arquitectura radicular que impide la entrada  
296 de otro tipo de microorganismos (Bhat, 2017; Kumar *et al.*, 2019). En los enfrentamientos contra  
297 *B. cinerea*, los valores del PICR de las dos cepas de *Trichoderma* bordean el 19% y se ubican  
298 en la escala III de Bell, que indica que el microorganismo antagonístico y el patogénico colonizan  
299 aproximadamente cada uno la mitad del espacio dispuesto con poca o nula sobreposición (Bell  
300 *et al.*, 1982; Pincay *et al.*, 2021). Por otro lado, en los ensayos dispuestos para *Cercospora* sp.,  
301 las dos cepas de *Trichoderma* obtuvieron un 42,41%±4,88% de inhibición y se situaron en la  
302 escala I de Bell que representa un desarrollo del antagonista por todo el espacio a disposición

303 con una completa sobreposición sobre la colonia del patógeno (Bell *et al.*, 1982; Pincay *et al.*,  
304 2021) (Figura 6). Otras investigaciones reportaron un PICR que se sitúa desde el 40% hasta un  
305 86% al enfrentar distintas cepas de *Trichoderma* contra *C. beticola* y *C. malayensis*. Por otro  
306 lado, al enfrentarse cepas de *B. cinerea* con diferentes cepas de *Trichoderma* el PICR se situó  
307 entre el 50% al 90% (Li *et al.*, 2020; Calvo-Araya *et al.*, 2012; Poornima y Jagdish, 2011; Vasava  
308 y Patel, 2020).



318 **Figura 6.** Imágenes representativas de los enfrentamientos duales. Cultivos para *B. cinerea* en  
319 medio PDA a los 10 días de crecimiento. *Cercospora* sp. en medio APZ a los 15 días de  
320 crecimiento.

321 *P. fluorescens* tiene la capacidad de disminuir el efecto de enfermedades fúngicas gracias su  
322 interacción directa con las plantas. Entre sus mecanismos de acción se describe la facultad de  
323 formar biopelículas, sintetizar metabolitos secundarios que incluyen sideróforos, antibióticos y  
324 fitohormonas (Bhetwal *et al.*, 2021; Kumar *et al.*, 2017). A pesar de ello, la cepa utilizada en este  
325 estudio no mostró inhibición del crecimiento, tanto para *B. cinerea* como *Cercospora* sp. Datos  
326 que discrepan de lo presentado por otros investigadores. Por ejemplo, Poornima y Jagdish  
327 (2011), reportaron un porcentaje de inhibición del 68.35% al enfrentar *P. fluorescens* con una  
328 cepa de *C. beticola*.

329

#### 330 4. Conclusiones

331 La cepa de *B. subtilis* resultó ser el microorganismo con el mayor efecto inhibitorio ante los  
332 patógenos de la uvilla *B. cinerea* y *Cercospora* sp. seguido por las cepas de *T. atroviride* y *T*  
333 *gamsii*. En cuanto a la cepa de *P. fluorescens*, no mostró efecto inhibitorio sobre dichos  
334 patógenos bajo los ensayos *in vitro*. Los efectos de estos microorganismos deben ser

335 contrastados con el desarrollo de ensayos *in planta* que permitan definir cuál es la mejor opción  
336 para el control biológico de los patógenos en cultivos de uvilla.

### 337 **Agradecimientos**

338 A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador por el financiamiento de la investigación  
339 adjudicado a través del Fondo Públícalo 2022. Al PhD. Carlos Zárate por el acompañamiento en  
340 el análisis de los resultados.

### 341 **Referencias**

- 342 Alemu, F. y Alemu, T. (2013). *Pseudomonas fluorescens* isolates as an inducer of physiological  
343 activities of faba bean (*Vicia faba*). African Journal of Agricultural Research [en línea], 8  
344 (38), 4868-4871. Disponible en <10.5897/AJAR2013.7297>[consulta: 29 junio 2023].
- 345 Alenezi, F., Rekik, I., Belka, M., Ibrahim, A., Luptakova, L., Jaspars, M., Woodward, S. y Belbahri,  
346 L. (2016). Strain-level diversity of secondary metabolism in the biocontrol species  
347 *Aneurinibacillus migulanus*. Microbiological Research [en línea], 182, 116-124.  
348 Disponible en <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2015.10.007>[consulta: 27 junio 2023].
- 349 Ardila, S. y Murillo, Y. 2023, 'Informe exportaciones de uchuva 2022', Asociación Nacional de  
350 Comercio Exterior, 9 de febrero. Disponible en: t.ly/kYcMw. [06 agosto 2023].
- 351 Bazalar Pereda, M., Nazareno, M. y Viturro, C. (2019). Nutritional and Antioxidant Properties of  
352 *Physalis peruviana* L. Fruits from the Argentinean Northern Andean Region. Plant Foods  
353 for Human Nutrition [en línea], 74, 68-75. Disponible en <https://doi.org/10.1007/s11130-  
354 018-0702-1>[consulta: 26 junio 2023].
- 355 Bell, D., Wells, D. y Markham, C. (1982). *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six  
356 fungal plant pathogens. Phytopathology [en línea], 72 (4), 379-382. Disponible en  
357 <10.1094/Phyto-72-379>[consulta: 27 junio 2023].
- 358 Bhat, K. (2017). A New Agar Plate Assisted Slide Culture Technique to Study Mycoparasitism of  
359 *Trichoderma* sp. on *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporium*.  
360 Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci [en línea], 6 (8), 3176-3180. Disponible en  
361 <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.608.378> [consulta: 22 julio 2023].
- 362 Bhetwal, S., Rijal, R., Das, S., Sharma, A., Pooja, A. y Malannavar, A. (2021). *Pseudomonas*  
363 *fluorescens*: Biological Control Aid for Managing Various Plant Diseases: A Review.  
364 Biological Forum – An International Journal [en línea], 13 (1), 484-494. Disponible en  
365 <t.ly/wdcA->[consulta: 27 junio 2023].
- 366 Cadavid Muñoz, N., Floriano, L., De Souza, M., Bandeira, N., Prestes, O. y Zanella, R. (2017).  
367 Determination of pesticide residues in golden berry (*Physalis peruviana* L.) by modified  
368 QuEChERS method and ultra-high performance liquid chromatography-tandem  
369 quadrupole mass spectrometry. Food Analytical Methods [en línea], 13, 320-329.  
370 Disponible en <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0582-7>[consulta: 26 junio 2023].
- 371 Calvo-Araya, J., Rivera-Coto, G., Orozco-Cayasso, S. y Orozco-Rodríguez, R. (2012).  
372 Aislamiento y evaluación *in vitro* de antagonistas de *Botrytis cinerea* en mora. Agronomía  
373 Mesoamericana [en línea], 23 (2), 225-231. Disponible en <t.ly/iy2i1 >[consulta: 26 junio  
374 2023].
- 375 Cawoy, H., Mariutto, M., Henry, G., Fisher, C., Vasilyeva, N., Thonart, P., Dommes, J. y Ongena,  
376 M. (2014). Plant Defense Stimulation by Natural Isolates of *Bacillus* Depends on Efficient  
377 Surfactin Production. Molecular Plant-Microbe Interactions [en línea], 27 (2), 87-100.  
378 Disponible en <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-09-13-0262-R>[consulta: 22 julio 2023].
- 379 Fischer, G., Almanza-Merchán, P. y Miranda, D. (2014). Importancia y cultivo de la Uchuva  
380 (*Physalis peruviana* L.). Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP [en línea], 36 (1), 1-15.  
381 Disponible en <http://dx.doi.org/10.1590/0100-2945-441/13>[consulta: 26 junio 2023].

- 382 Galletti, S., Burzi, P., Cerato, C., Marinello, S. y Sala, E. (2008). *Trichoderma* as a potential  
383 biocontrol agent for *Cercospora* leaf spot of sugar beet. *BioControl* [en línea], 53, 917–  
384 930. Disponible en <doi:10.1007/s10526-007-9113-1>[consulta: 03 julio 2023].
- 385 García-Núñez, H., Martínez-Campos, A., Hermosa-Prieto, M., Monte-Vázquez, E., Aguilar-  
386 Ortigoza, C. y González-Esquivel, C. (2016). Morphological and molecular  
387 characterization of native isolates of *Trichoderma* and its potential biocontrol against  
388 *Phytophthora infestans*. *Revista Mexicana de Fitopatología* [en línea], 35, 58-79.  
389 Disponible en <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1605-4> [consulta: 29 junio 2023].
- 390 Jiménez-Quintero, C., Pantoja-Estrada, A. y Leonel, H. (2016). Riesgos en la salud de  
391 agricultores por uso y manejo de plaguicidas, microcuenca “La Pila”. *Rev Univ. Salud.*  
392 [en línea], 18 (3), 417-431. Disponible en  
393 <http://dx.doi.org/10.22267/rus.161803.48>[consulta: 26 junio 2023].
- 394 Kornacki, J., Gurtler, J., Yan, Z. y Cooper, C. (2003). Evaluation of Several Modifications of an  
395 Ecometric Technique for Assessment of Media Performance. *Journal of Food Protection*  
396 [en línea], 66 (9), 1727-1732. Disponible en <10.4315/0362-028x-66.9.1727>[consulta:  
397 26 junio 2023].
- 398 Kumar, R., Kumari, K., Hembram, K., Kandha, L. y Kumar Bindhani, B. (2019). Expression of an  
399 endo  $\alpha$ -1, 3-Glucanase gene from *Trichoderma harzianum* in rice induces resistance  
400 against sheath blight. *J. Plant Biochem. Biotechnol.* [en línea], 28, 84-90. Disponible en  
401 <https://doi.org/10.1007/s13562-018-0465-7>[consulta: 22 julio 2023].
- 402 Kumar, S., Jaiswal, S., Lal, A., Kumar, A. y Verma, A. (2017). Influenced of natural products and  
403 bio-fungicide against tikka disease of groundnut caused by *Cercospora* spp. *The Pharma*  
404 *Innovation Journal* [en línea], 6 (3), 213-216. Disponible en <t.ly/T3zpl>[consulta: 22 julio  
405 2023].
- 406 Ladino-Rey, O., Rubio, J. y Chacin-Zambrano, C. (2016). Evaluación de dos métodos de  
407 conservación de hongos filamentosos patógenos de palma de aceite. *Centro Agrícola.*  
408 [en línea], 43 (2), 36-41. Disponible en <t.ly/ihn1J>[consulta: 26 junio 2023].
- 409 Lara Mantilla, C., Mendoza, C. y Oviedo Zumaqué, L. (2010). Productividad y selectividad del  
410 medio de cultivo a partir de guayaba agria (*Psidium araca*) en el crecimiento de levaduras  
411 nativas del género *Candida* sp. *Rev. Colomb. Biotecnol.* [en línea], 7 (2), 116-123.  
412 Disponible en <t.ly/ZPpw1>[consulta: 26 junio 2023].
- 413 Li, P., Feng, B., Yao, Z., Bohui, W., Zhao, Y. y Shi, S. (2022). Antifungal Activity of Endophytic  
414 *Bacillus* K1 Against *Botrytis cinerea*. *Front. Microbiol.* [en línea], 13, 935675. Disponible  
415 en <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.935675>[consulta: 22 julio 2023].
- 416 Li, T., Zhang, J., Tang, J., Liu, Z., Li, Y., Chen, J. y Zou, L. (2020). Combined Use of *Trichoderma*  
417 *atroviride* CCTCCSBW0199 and Brassinolide to Control *Botrytis cinerea* Infection in  
418 Tomato. *Plant Disease.* [en línea], 104 (5), 1298-1304. Disponible en  
419 <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-19-1568-RE>[consulta: 22 julio 2023].
- 420 Lozano Guzmán, E., Santos Ramirez, B., Cervantes Flores, M., Nieto Pescador, M. y Moreno  
421 Cruz, J. (2018). Low accuracy of the McFarland method for estimation of bacterial  
422 populations. *African Journal of Microbiology Research* [en línea], 12 (31), 736-740.  
423 Disponible en <https://doi.org/10.5897/AJMR2018.8893>[consulta: 29 junio 2023].
- 424 Michanie, S., Rodríguez Hernández, A., Lara Cabello, E. y Brizzio, A. (1992). Comparación de  
425 tres métodos empleados para el control de calidad de medios de cultivo sólido. *Acta*  
426 *bioquím. clín. latinoam.* [en línea], 26 (3), 311-317. Disponible en <t.ly/CgONT>[consulta:  
427 26 junio 2023].
- 428 Montilla-Escudero, E., Dulce-Rivadeneira, M., Quevedo-Hidalgo, B., Mercado-Reyes, M.,  
429 Álvarez-León, R., Molina-Vargas, J. y Trespacios-Rangel, A. (2011). Efecto del  
430 tratamiento alcalino sobre la productividad y las propiedades físicas del agar-agar  
431 proveniente de *Gracilaria verrucosa*. *Bol. Invest. Mar. Cost.* [en línea], 40 (1), 75-88.  
432 Disponible en <t.ly/-SDN6>[consulta: 26 junio 2023].
- 433 Moreno-Miranda, C., Moreno-Miranda, R., Pilamala-Rosales, J., Molina-Sánchez, J. y Cerda-  
434 Mejía, L. (2019). El sector hortofrutícola de Ecuador: Principales características socio-  
435 productivas de la red agroalimentaria de la uvilla (*Physalis peruviana*). *Ciencia y*

- 436 Agricultura [en línea], 16 (1), 31-51. Disponible en  
437 <<https://doi.org/10.19053/01228420.v16.n1.2019.8809>>[consulta: 26 junio 2023].
- 438 Moreno-Miranda, C., Pilamala, A., Moreno-Miranda, R., Molina, J., Cerda-Mejía, L. y Rama, D.  
439 (2020). Análisis de las dimensiones sociales, productivas y de gobernanza de la cadena  
440 de *Physalis peruviana*: un estudio de caso de la zona interandina en Ecuador. Ciencia y  
441 Tecnología Agropecuaria [en línea], 21 (2), e1304. Disponible en  
442 <[https://doi.org/10.21930/rcta.vol21\\_num2\\_art:1304](https://doi.org/10.21930/rcta.vol21_num2_art:1304)>[consulta: 26 junio 2023].
- 443 Mossel, D., Bonants-Van Laarhoven, T., Ligtenberg-Merkus, A. y Werdler, M. (1983). A Quality  
444 assurance of selective culture media for bacteria, moulds and yeasts: an attempt at  
445 standardization at the international level. J Appl Bacteriol. [en línea], 54 (3), 313-327.  
446 Disponible en <<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1983.tb02623.x>>[consulta: 26 junio  
447 2023].
- 448 MPCEIP. 2019, 'Ecuador inicia exportaciones de uvilla hacia Estados Unidos', Ministerio de  
449 Producción Comercio Exterior Inversiones y Pesca, 10 de noviembre. Disponible en:  
450 [t.ly/uZ1JC](http://t.ly/uZ1JC) [26 junio 2023].
- 451 Paredes, J., Yáñez, J. y Marcial-Coba, M. (2021). Identificación de *Cercospora* spp. como agente  
452 causal de mancha foliar en cultivos de uvilla (*Physalis peruviana* L.) en la Sierra norte del  
453 Ecuador. Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas [en línea], 42 (2), 103-  
454 121. Disponible en <<https://doi.org/10.26807/remcb.v42i2.899>>[consulta: 26 junio 2023].
- 455 Pedraza, L., López, C. y Uribe-Vélez, D. (2020). Mecanismos de acción de *Bacillus* spp.  
456 (Bacillaceae) contra microorganismos fitopatógenos durante su interacción con plantas.  
457 Acta biol. Colomb. [en línea], 53 (1), 112–125. Disponible en  
458 <<http://dx.doi.org/10.15446/abc.v25n1.75045>> [consulta: 22 julio 2023].
- 459 Pincay, A., Noboa, M., Viera, W., Herrera, K., León, A. y Jackson, T. (2021). Evaluación in vitro  
460 del potencial antagonista de *Trichoderma* sp. y hongos endófitos de mora (*Rubus glaucus*  
461 Benth) para el control de *Botrytis cinerea*. Journal Of Science And Research [en línea], 6  
462 (1), 109-124. Disponible en <<https://doi.org/10.5281/zenodo.4917695>>[consulta: 26 junio  
463 2023].
- 464 Poornima, Y. y Jagdish, J. (2011). Biological Management of Leaf Spot of Palak Caused by  
465 *Cercospora beticola* Sacc. Research Journal of Agricultural Sciences [en línea], 2 (3),  
466 655-657. Disponible en <[t.ly/n\\_u4Q](http://t.ly/n_u4Q)>[consulta: 22 julio 2023].
- 467 Puente, L., Pinto-Muñoz, C., Castro, E. y Cortés, M. (2011). *Physalis peruviana* Linnaeus, the  
468 multiple properties of a highly functional fruit: A review. Food Research International [en  
469 línea], 44, 1733-1740. Disponible en  
470 <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.09.034>>[consulta: 26 junio 2023].
- 471 Pun, M., Kumar, V. y Pandey, A. (2020). Growth Study of *Cercospora capsici* Causing Leaf Spot  
472 Disease of Chilli on Different Media, pH and Temperature. International Journal of  
473 Science and Research [en línea], 9 (4), 1043-1045. Disponible en  
474 <<https://doi.org/10.21275/SR20409144503>>[consulta: 29 junio 2023].
- 475 Rahman, M., Begun, M. y Alan, M. (2009). Screening of *Trichoderma* Isolates as a Biological  
476 Control Agent against *Ceratocystis paradoxa* Causing Pineapple Disease of Sugarcane.  
477 Mycobiology [en línea], 37 (4), 277-285. Disponible en  
478 <<https://doi.org/10.4489/MYCO.2009.37.4.277>>[consulta: 27 junio 2023].
- 479 Ramírez-Olier, J., Trujillo-Salazar, J., Osorio-Echeverri, V., Jaramillo-Ciro, M. y Botero-Botero, L.  
480 (2019). *In vitro* antagonism of *Trichoderma asperellum* against *Colletotrichum*  
481 *gloeosporioides*, *Curvularia lunata*, and *Fusarium oxysporum*. Rev. UIS Ing. [en línea],  
482 18 (2), 159-166. Disponible en <[https://doi.org/10.18273/revuin.v18n2-  
483 2019015](https://doi.org/10.18273/revuin.v18n2-2019015)>[consulta: 26 junio 2023].
- 484 Ruiz-Gaitan, M., Castellanos González, L. y Jair Villamizar, C. (2018). El cultivo de la uchuva  
485 (*Physalis peruviana* L.). Revista Científica Agroecosistemas [en línea], 6 (1), 46-53.  
486 Disponible en <<https://t.ly/oJ1oo>>[consulta: 26 junio 2023].
- 487 Skidmore, A. y Dickinson, C. (1976). Colony interactions and hyphal interference between  
488 *Septoria nodorum* and phylloplane fungi. Transactions of the British Mycological Society

- 489 [en línea], 66 (1), 57-64. Disponible en <[https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(76\)80092-7](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(76)80092-7)>[consulta: 27 junio 2023].  
490
- 491 Slama, H., Cherif-Silini, H., Chenari Bouket, A., Qader, M., Silini, A., Yahiaoui, B., Alenezi, F.,  
492 Luptakova, L., Triki, M., Vallat, A., Oszako, T., Rateb, M. y Belbahri, L. (2019). Screening  
493 for *Fusarium* Antagonistic Bacteria From Contrasting Niches Designated the Endophyte  
494 *Bacillus halotolerans* as Plant Warden Against *Fusarium*. *Front. Microbiol.* [en línea], 9,  
495 3236. Disponible en <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03236>>[consulta: 27 junio  
496 2023].
- 497 Soldano, A., Vera Garate, V., Vaccari, M., Latorre Rapela, G., Lurá, M. y González, A. (2010).  
498 Inhibición del crecimiento de *Cercospora kikuchii* por especies de *Bacillus* y efecto sobre  
499 la acumulación de cercosporina. *FABICIB* [en línea], 14, 97-106. Disponible en  
500 <<https://t.ly/7C0RL>>[consulta: 22 julio 2023].
- 501 Sosa, A., Álvarez-Rivera, V., Borges, G., González, M., y Ponce, E. (2011). Evaluación del  
502 método de conservación en papel de filtro en dos cepas de *Bacillus subtilis* Cohn  
503 mediante la actividad antagonica frente a *Rhizoctonia solani* Kühn. *Fitosanidad* [en línea],  
504 15 (1), 45-50. Disponible en <[t.ly/lqejE](https://t.ly/lqejE)>[consulta: 26 junio 2023].
- 505 Tejera, B., Heydrich, M. y Rojas, M. (2012). Antagonismo de *Bacillus* spp. frente a hongos  
506 fitopatógenos del cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Rev. Protección Veg.* [en línea], 27  
507 (2), 117-122. Disponible en <[t.ly/G8sZJ](https://t.ly/G8sZJ)>[consulta: 26 junio 2023].
- 508 Terrones-Salgado, J., Nieto-Angel, D., Nava-Díaz, C., Téliz-Ortiz, D., García-Velasco, R., Vallejo-  
509 Pérez, M. y Sánchez-García, P. (2019). *Botrytis cinerea* causing gray mold in blackberry  
510 fruit in Mexico. *Mexican Journal of Phytopathology* [en línea], 37 (3), 365-382. Disponible  
511 en <<https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1906-1>>[consulta: 26 junio 2023].
- 512 Vasava, K. y Patel, P. (2020). In vitro evaluation of various antagonists against *Cercospora*  
513 *malayensis* causing leaf spot of okra. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* [en  
514 línea], 9 (5), 2649-2651. Disponible en <[t.ly/4B9hw](https://t.ly/4B9hw)>[consulta: 22 julio 2023].
- 515 Villalobos, A., Calderón, L., Figueroa, C., Fierro, J., Otálora, G., Álvarez, R., Quevedo-Hidalgo,  
516 M., Mercado-Reyes, M., Huertas-Valero, M. y Trespalacios-Rangel, A. (2007).  
517 Evaluación por método ecométrico de agar obtenido de algas rojas colombianas.  
518 *Universitas Scientiarum* [en línea], 12 (3), 57-65. Disponible en <[t.ly/DY-nO](https://t.ly/DY-nO)>[consulta:  
519 01 julio 2023].
- 520 Villarreal-Delgado, M., Villa-Rodríguez, E., Cira-Chávez, L. y Estrada-Alvarado, M. (2018). The  
521 genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural  
522 biosecurity. *Revista Mexicana de Fitopatología* [en línea], 36 (1), 95-130. Disponible en  
523 <<https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1706-5>>[consulta: 29 junio 2023].
- 524 Wang, X., Zhou, X., Cai, Z., Guo, L., Chen, X., Chen, X., Liu, J., Feng, M., Qiu, Y., Zhang, Y. y  
525 Wang, A. (2021). A Biocontrol Strain of *Pseudomonas aeruginosa* CQ-40 Promote  
526 Growth and Control *Botrytis cinerea* in Tomato. *Pathogens* [en línea], 10 (22), 95-130.  
527 Disponible en <<https://doi.org/10.3390/pathogens10010022>>[consulta: 26 junio 2023].
- 528 Zin, N. y Badaluddin, N. (2020). Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture  
529 applications. *Annals of Agricultural Sciences* [en línea], 65, 168-178. Disponible en  
530 <<https://doi.org/10.1016/j.aosas.2020.09.003>>[consulta: 29 junio 2023].  
531