

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

CARRERA DE MICROBIOLOGÍA

DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE MICROBIÓLOGO

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.

ALEXANDER DAVID SILVA GUACHAMÍN

DIRECTORA: Mtr. Jeniffer Yáñez

Quito, 2018

CERTIFICACIÓN

Certifico que la disertación de Microbiología del candidato Alexander David Silva Guachamín ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Jeniffer Yáñez Altuna, Mtr.

Directora de la Disertación

Quito, 19 de febrero de 2018

DEDICATORIA

A mi madre, mis tías y mis abuelos que siempre supieron apoyarme.

AGRADECIMIENTOS

El presente estudio formó parte del proyecto “Diagnóstico de las enfermedades y de las plagas en cultivos comerciales de uvilla (*Physalis peruviana*) en el Ecuador”, financiado por la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, convocatoria 2016 – 2017.

Gracias a Vismeli Santana miembro del DISERLAB PUCE y a la Escuela de Ciencias Biológicas, en especial a la Dra. Doris Vela Ph.D. del Laboratorio de Genética Evolutiva por facilitar sus instalaciones, equipos y ante todo su buena voluntad.

A la Mtr. Jeniffer Yáñez Altuna por todo el tiempo, paciencia y apoyo invertido en la realización de este proyecto.

A todos los profesores de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y en especial de la carrera de Microbiología que supieron colaborar con diferentes consejos e información frente a las inquietudes planteadas.

A mis compañeros y amigos de carrera por su ayuda y ánimos.

A mi familia por darme los medios, el cariño y la oportunidad de seguir avanzando.

TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
3.1. UVILLA.....	3
3.1.1. LIMITANTES DE LA PRODUCCIÓN.....	4
3.2. <i>Fusarium oxysporum</i>	4
3.2.1. CONTROL.....	5
3.2.2. BIOCONTROLADORES.....	5
3.3. <i>Trichoderma spp.</i>	6
3.4. MECANISMOS DE BIOCONTROL DE <i>Trichoderma</i>	6
3.5. <i>Bacillus subtilis</i>	8
3.6. CONTROL BIOLÓGICO INDIVIDUAL Y COMBINADO CONTRA <i>Fusarium</i>	9
3.7. OBJETIVOS.....	10
3.7.1. OBJETIVO GENERAL.....	10
3.7.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
4.1. MUESTREO PARA OBTENER <i>Trichoderma spp.</i> y <i>Bacillus spp.</i>	11
4.1.1. OBTENCIÓN DE <i>Trichoderma spp.</i>	11
4.1.2. OBTENCIÓN DE <i>Bacillus spp.</i>	12
4.2. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE <i>Trichoderma spp.</i>	12
4.3. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y BIOQUÍMICA DE <i>Bacillus</i> <i>spp.</i>	12
4.4. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR POR SECUENCIACIÓN.....	13
4.5. PRUEBAS DE ANTAGONISMO INDIVIDUALES <i>IN</i> <i>VITRO</i>	13
4.6. PRUEBAS DE COMPATIBILIDAD.....	15
4.7. PRUEBAS DE ANTAGONISMO CONJUNTAS <i>IN</i> <i>VITRO</i>	16
4.8. ANÁLISIS DE DATOS	16

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
5.1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Trichoderma</i> spp. y <i>Bacillus</i> <i>spp</i>	17
5.2. PRUEBAS DE ANTAGONISMO INDIVIDUALES <i>IN VITRO</i> , <i>Trichoderma</i>	18
5.3. PRUEBAS DE ANTAGONISMO INDIVIDUALES <i>IN VITRO</i> , <i>Bacillus spp</i>	20
5.4. PRUEBAS DE COMPATIBILIDAD.....	21
5.5. PRUEBAS DE ANTAGONISMO CONJUNTO <i>IN VITRO</i>	24
6. CONCLUSIONES.....	27
7. REFERENCIAS.....	28
8. FIGURAS.....	37
9. TABLAS.....	65
10. ANEXOS.....	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Proceso de obtención de <i>Trichoderma</i>	37
Figura 2. Proceso de obtención de <i>Bacillus</i>	38
Figura 3. Identificación morfológica de <i>Trichoderma</i>	39
Figura 4. Cultivo monospórico.....	40
Figura 5. Identificación morfológica de <i>Bacillus</i> y pruebas bioquímicas.....	41
Figura 6. Identificación molecular de <i>Trichoderma spp</i>	42
Figura 7. Frecuencia de la diversidad de especies obtenidas de <i>Trichoderma</i>	43
Figura 8. Pruebas de antagonismo individual <i>in vitro</i> , <i>Trichoderma</i>	43
Figura 9. Pruebas de antagonismo individual <i>in vitro</i> , <i>Bacillus</i>	44
Figura 10. Observación de antagonismo individual <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma</i>	45
Figura 11. PICR de los diferentes aislados de <i>Trichoderma</i>	47
Figura 12. Evaluación del micoparasitismo de <i>Trichoderma</i> sobre <i>Fusarium oxysporum</i> en los aislados obtenidos.....	48
Figura 13. Observación de antagonismo individual <i>in vitro</i> de <i>Bacillus</i>	50
Figura 14. Porcentaje de inhibición de <i>Bacillus</i> sobre <i>Fusarium oxysporum</i>	53
Figura 15. Identificación molecular de <i>Bacillus spp</i>	54
Figura 16. Pruebas de compatibilidad <i>Bacillus</i> 70%, grupo.....	55
Figura 17. Pruebas de compatibilidad <i>Bacillus</i> 70%, individual.....	56
Figura 18. Pruebas de compatibilidad <i>Bacillus</i> 40-50%.....	57

Figura 19. Comprobación de compatibilidad con <i>Bacillus cereus</i>	60
Figura 20. Pruebas de antagonismo conjunto.....	61
Figura 21. Pruebas de antagonismo conjunto.....	62
Figura 22. Combinaciones con presencia de exudados de <i>Trichoderma</i>	63
Figura 23. Comparación entre el porcentaje de inhibición micelial invidual y conjunto de las cepas compatibles.....	64

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Aislados de <i>Trichoderma</i> por morfología.....	65
Tabla 2. Aislados de <i>Bacillus</i> por morfología y pruebas químicas.....	71
Tabla 3. Especies de <i>Trichoderma</i> obtenidas por identificación molecular.....	78
Tabla 4. Porcentaje de inhibición micelial de <i>Trichoderma</i> sobre <i>Fusarium oxysporum</i>	80
Tabla 5. Evaluación de micoparasitismo de <i>Trichoderma</i> sobre <i>Fusarium oxysporum</i>	83
Tabla 6. Porcentajes de inhibición de <i>Bacillus</i> sobre <i>Fusarium oxysporum</i>	84
Tabla 7. Identificación molecular de <i>Bacillus</i> con capacidad antagonista.....	86
Tabla 8. Aislados de <i>Bacillus</i> seleccionados para pruebas de compatibilidad combinadas con <i>Trichoderma</i>	86
Tabla 9. Controles de crecimiento <i>Trichoderma</i> , pruebas de compatibilidad.....	86
Tabla 10. Prueba de compatibilidad para aislados con inhibición >70%.....	87
Tabla 11. Pruebas de compatibilidad para aislados con un 40%-50% de inhibición.....	88
Tabla 12. Organización de las combinaciones de <i>Bacillus</i> 40%-50% a los 5 días.....	89
Tabla 13. Pruebas de antagonismo conjunto, porcentajes de inhibición.....	90
Tabla 14. Comparación entre porcentajes de inhibición individual y conjuntos de las cepas compatibles.....	91

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Información de las localidades productoras de uvilla muestreadas.....	92
Anexo 2. Localidades productoras de uvilla muestreadas.....	93
Anexo 3. Muestras obtenidas de cada localidad.....	95
Anexo 4. <i>Primers</i> ITS 1, ITS 4.....	101
Anexo 5. Protocolo de PCR usado para <i>Trichoderma</i>	101
Anexo 6. <i>Primers</i> PA, PH, 16S rRNA.....	102
Anexo 7. Protocolo de PCR usado para <i>Bacillus</i>	102
Anexo 8. Tabla creada por Elías y Arcos (1984) para la evaluación de la capacidad antagónica (micoparasitismo)	102

1. RESUMEN

La uvilla (*Physalis peruviana*) ha logrado espacio en el mercado ecuatoriano, llegando a convertirse en la fuente principal de ingresos de muchas familias en la serranía. Uno de los principales problemas en la producción es el marchitamiento vascular, generado por el complejo fúngico del fitopatógeno *Fusarium oxysporum*. El control de esta enfermedad usando fungicidas es ineficaz y puede afectar la calidad del fruto. El objetivo de este estudio es el aislamiento, identificación morfológica, molecular y detección de actividad antagonista de *Trichoderma spp.* y *Bacillus* como alternativas biológicas conjuntas para controlar a *Fusarium oxysporum* en ensayos *in vitro*. Se muestrearon 12 localidades productoras de uvilla pertenecientes a las provincias de Pichincha, Tungurahua, Cotopaxi e Imbabura. Un total de 252 muestras de suelo fueron recolectadas y procesadas. Se obtuvieron 25 aislados de *Trichoderma spp.* y 36 de *Bacillus spp.* identificadas por su morfología macro y microscópica. Después de la extracción de ADN de los aislados, se realizó la PCR usando los *primers* ITS 1 y 4 para los hongos, y para las bacterias se utilizó los *primers* PA forward y PH reverse dirigidos al gen 16s rRNA. Por medio de un *screening* de antagonismo para *Bacillus*, se escogieron previamente 10 aislados, 6 con antagonismo medio y 4 con antagonismo positivo. Las cepas escogidas fueron identificadas molecularmente como *Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus*. Mediante las pruebas de antagonismo individual de *Trichoderma* se eligieron 7 aislados de diferente especie con porcentajes de inhibición superior al 50%. Se probó la compatibilidad de los microorganismos elegidos de forma conjunta en platos Petri con PDA. Las cepas de *Bacillus cereus* presentaron compatibilidad mientras que las cepas de *Bacillus subtilis* no. En total se obtuvieron 14 combinaciones con *Trichoderma*. La compatibilidad y viabilidad de ambos microorganismos fue comprobada por medio de microscopia y siembra del crecimiento micelial. Las pruebas de antagonismo conjunto entre cepas compatibles de *Bacillus spp.* y *Trichoderma spp.* contra *Fusarium oxysporum* presentaron porcentajes de inhibición superiores a los obtenidos de forma individual. Los resultados exitosos plantean nuevas pruebas conjuntas a nivel de invernadero y campo así como aplicaciones individuales de todos los microorganismos encontrados en este estudio por su destacable potencial antagonista.

2. ABSTRACT

The golden berry (*Physalis peruviana*) has achieved space in the Ecuadorian market, becoming the main source of income for many families. One of the main problems in the production is the vascular wilting generated by the fungal complex of the phytopathogen *Fusarium oxysporum*. The control of this disease using fungicides is ineffective and can affect the quality of the fruit. The objective of this study was the isolation, the morphological and molecular identification and detection of antagonistic activity of *Trichoderma spp.* and *Bacillus* as joint biological alternatives to control *Fusarium oxysporum* starting from *in vitro* assays. In the Ecuadorian highlands, 12 producing localities were sampled, belonging to the provinces of Pichincha, Tungurahua, Cotopaxi and Imbabura. A total of 252 samples were collected and processed. We obtained 25 isolates of *Trichoderma spp.* and 37 of *Bacillus spp.* identified by their macro and microscopic morphology. After the DNA extraction of the isolates, PCR was performed using the ITS *primers* 1 and 4 for the fungus, while for the bacterium the PA forward and PH reverse *primers* directed to the 16s rRNA gene were used. Based on a screening of antagonism for *Bacillus*, 10 strains were previously chosen, 6 with medium antagonism and 4 with positive antagonism. The chosen strains were molecularly identified as *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus*. Through the individual antagonism tests for *Trichoderma*, 7 isolates were chosen, each of different species with percentages of inhibition greater than 50%. The compatibility of the microorganisms chosen was tested together in Petri dishes with PDA. Strains of *Bacillus cereus* showed compatibility while strains of *Bacillus subtilis* did not. In total, 14 combinations with *Trichoderma* were obtained. The compatibility and viability of both microorganisms was verified by microscopy and sowing of mycelial growth. The joint antagonism test between compatible strains of *Bacillus spp.* and *Trichoderma spp.* against *Fusarium oxysporum* showed percentages of inhibition higher than those obtained individually. The successful propose new joint tests at the greenhouse and field level as well as individual applications for all the microorganisms found in this study for their remarkable antagonist potential.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. UVILLA

La uvilla (*Physalis peruviana*), es una especie frutícola andina clasificada como maleza, originaria de valles interandinos bajos de Ecuador y Perú. Es tolerante a diferentes condiciones ambientales y se adapta a cualquier tipo de suelo y condiciones agroecológicas (Altamirano, 2010; Góngora y Rojas, 2006). Su fruto es pequeño, amarillo y con alto contenido de vitaminas. Se considera diurético, depurativo, reconstituyente y beneficioso para el organismo (Obando, 2013). La uvilla crece entre 1800 y 2800 m.s.n.m, con una temperatura promedio anual entre los 13 y 18°C, precipitaciones entre 1000 a 2000 mm a lo largo del año y humedad relativa del 70 al 80%. Su floración es inducida por días cortos con ocho horas de luz (Góngora y Rojas, 2006).

En el Ecuador, el 40% de agricultores cultiva la variedad de uvilla colombiana, un 13% la ecuatoriana y un 7% la keniana. El 40% restante de agricultores desconoce la variedad que cultivan. Las variedades se diferencian principalmente en su tamaño e intensidad de color del fruto, abarcando la gama desde amarillo anaranjado al verdoso. En Ecuador existen aproximadamente 20 ecotipos, que se diferencian por el lugar de siembra y las características antes mencionadas, incluyendo al ecotipo keniano y colombiano. Se puede mencionar dos como los más comunes, uno pequeño color verde, dulce al estar maduro y un ecotipo de color anaranjado de tamaño mediano a grande que es el comercializable conocido como ecotipo ecuatoriano (Altamirano, 2010).

La uvilla ha logrado espacio en el mercado ecuatoriano, llegando a convertirse en la fuente principal de ingresos de muchas familias en la serranía, como es el caso de la organización de productores de Pataín, Salcedo en la provincia de Cotopaxi (Diario El Telégrafo, 2011). El ecotipo de uvilla colombiano es el más cultivado en el país por ser la más apetecida para el comercio interior y exterior (Altamirano, 2010). Actualmente, se dedican 700 hectáreas a la producción de uvilla para la exportación, principalmente en Pichincha, Cotopaxi, Imbabura y Carchi (Obando, 2013). El cultivo de uvilla se presenta como una alternativa sustentable con miras a exportación a mercados internacionales (Diario El Telégrafo, 2011). Los productores de uvilla pertenecientes a la asociación Sumak Mikuy en Imbabura, han introducido su producto de uvilla deshidratada al mercado alemán, presentando un

incremento de 160.4% en sus exportaciones del 2015 al 2016 (PROECUADOR, 2017). Los principales destinos de la uvilla ecuatoriana son Alemania, Holanda, España, Canadá e Italia (Altamirano, 2010).

3.1.1. LIMITANTES DE LA PRODUCCIÓN

Debido a su origen silvestre, la uvilla es resistente de forma natural a varias plagas, sin embargo, es vulnerable a pájaros, gusanos del fruto, áfidos, ácaros, nematodos de agallas (*Meloidogyne sp.*), gusanos cortadores (*Agrotis sp.*) y pulguitas (*Epitrix sp.*). Entre las enfermedades más comunes se encuentran: la pudrición de las raíces causada por *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pythium*, y *Phytophthora*, la roya blanca causada por *Penicillium sp.*, *Sclerotinia sp.*, y *Sclerotium sp.*, y la lancha causada por *Alternaria solani* (Pacheco y Núñez, 2012). Los patógenos que afectan el ciclo vegetativo de la uvilla pueden afectar gravemente los costos de producción e incluso provocar pérdidas críticas (Góngora y Rojas, 2006).

3.2. *Fusarium oxysporum*

Hongo ascomycete presente como saprófito del suelo o patógeno especializado, denominado según la planta hospedante que afecte. Se caracteriza por producir colonias de rápido crecimiento con morfología variable, siendo relevante aquella de tipo micelial con producción abundante de micelio aéreo, algodonoso, con una coloración que va de blanco a rosado durazno, usualmente tienen un tinte púrpura intenso en la superficie del agar (Acurio, 2010). De forma microscópica, se lo identifica por producir monofiálides en forma de botella, macroconidios en forma de media luna multiseptados y clamidosporas en el micelio (Monzón y Rodríguez, s.f.). El patógeno sobrevive en los restos de plantas infectadas en forma de micelio y esporas, se propaga a cortas distancias por agua y equipo agrícola contaminado, a largas distancias por trasplantes infectados. Si un área ha sido infectada se mantendrá así por tiempo indefinido (Agrios, 2005). Los síntomas de infección en plántulas incluyen una pérdida de turgencia, decaimiento e incluso marchitez. Los haces vasculares afectados en la planta son la característica típica del marchitamiento vascular causado por *Fusarium oxysporum*. En un cultivo establecido, los síntomas inician con una clorosis generalizada, un marchitamiento y un secado lateral que finalmente causa la muerte de la planta (Góngora y Rojas, 2006).

El marchitamiento vascular es considerado como una de las tres enfermedades económicamente importantes en el cultivo de uvilla. Debido a los daños severos, la producción es afectada y es común que esto obligue a los productores a abandonar o cambiar de cultivo para disminuir las pérdidas económicas (Fischer, Almanza y Miranda, 2014).

3.2.1. CONTROL

El control de esta enfermedad por medio de fungicidas es ineficaz y puede afectar la calidad del fruto. Varios estudios reportan que *Fusarium oxysporum* ya es resistente a una gran número de fungicidas a nivel de campo, como es el caso del Benzomyl, común para controlar este hongo (Giulliana et al., 2008). La generación de resistencia acarrea pérdidas económicas para los agricultores y para los consumidores. La microbiota del suelo y el ambiente en general, puede verse afectada si se incrementa la dosis, al tratar de controlar la enfermedad (Ramírez y Mijangos, 1999). Esta situación hace necesario considerar medidas de control alternativas que sean eficientes y amigables con el ambiente. Los biocontroladores cumplen con estas características y actualmente son una valiosa alternativa para el agricultor.

3.2.2. BIOCONTROLADORES

Son organismos capaces de controlar o reducir las poblaciones de otro/s organismo/s patógeno/s, sean estas bacterias, hongos, nematodos entre otros. Estos organismos son una alternativa natural para combatir plagas y enfermedades, no tienen efectos adversos reportados sobre el ambiente y representan una opción económica (Universidad de Costa Rica, 2010). Los biocontroladores tienen diferentes mecanismos de acción para inhibir el desarrollo de patógenos. Entre estos se incluye, la competencia por espacio y nutrientes, el micoparasitismo, antagonismo por antibiosis, secreción de enzimas, producción de compuestos inhibidores, inducción de mecanismos de defensa fisiológicos y bioquímicos de la planta y creación de un ambiente favorable para el desarrollo radical (Infante, Martínez, Gonzáles y Reyes, 2009). El antagonismo es una relación negativa que implica la inhibición, deterioro o muerte de un organismo por acción de otro, por la producción de sustancias tóxicas (Pérez, González, y Muñoz, 2014).

Los biocontroladores de *Fusarium oxysporum* incluyen hongos y bacterias. En el primer grupo, *Trichoderma harzianum* se evaluó como un controlador eficiente, capaz de neutralizar la acción patógena de *Fusarium* (Cubillos et al., 2011). En el grupo de bacterias, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens* son eficaces inhibidores de micelio patógeno de *Fusarium oxysporum* (Constanza et al., 2011; Avendaño et al., 2006).

3.3. *Trichoderma spp*

El género *Trichoderma* se encuentra ampliamente distribuido en los suelos e incluye especies que tienen papeles destacados en la ecología microbiana (Vargas, Rueda y Gilchrist, 2012). Sus colonias se caracterizan por un crecimiento rápido, coloración blanca y verdosa. Se aprecian anillos concéntricos en las áreas que presentan conidias. El revés de las colonias puede ser amarillo, ámbar o no estar coloreado. Microscópicamente se pueden observar conidióforos erectos, hialinos y ramificados en su mayoría. Las conidias son unicelulares subglobosas u oblogadas, lisas o equinuladas, hialinas o verdes y se presentan como masas en los ápices de las fiálides (Chávez, 2006).

3.4. MECANISMOS DE BIOCONTROL DE *Trichoderma*.

Los mecanismos de biocontrol de *Trichoderma* son diversos, complejos y capaces de actuar de forma sinérgica contra patógenos para lograr el control de enfermedades. Los mecanismos pueden ser clasificados como indirectos, sea por competencia por nutrientes o espacio, antibiosis produciendo metabolitos, modificando condiciones ambientales y por la producción de sustancias promotoras de crecimiento vegetal, la forma directa de biocontrol es por medio de micoparasitismo (Tovar, 2008). La competencia como mecanismo de biocontrol se define como un comportamiento desigual entre dos o más organismos frente a un sustrato o nutriente, el uso de este requerimiento por uno de los organismos reducirá la cantidad o espacio para el resto. Las características del biocontrolador como plasticidad ecológica y velocidad de desarrollo favorecen este tipo de antagonismo.

Trichoderma se encuentra presente de forma natural en diferentes suelos y se considera como un excelente competidor por espacio y recursos nutricionales según su especie, su alta velocidad de crecimiento y abundante esporulación en una variedad de sustratos lo convierten en un biocontrolador muy eficiente (Danay, Martínez, Gonzáles y Reyes, 2009).

El micoparasitismo es el ataque directo de un hongo a otro e incluye los siguientes pasos, reconocimiento, ataque, penetración y muerte del huésped. El micoparasitismo de *Trichoderma* comienza por el crecimiento quimiotrófico del antagonista hacia el hospedero estimulado por moléculas procedentes del mismo. El hongo se adhiere con carbohidratos unidos a lectinas en la pared del patógeno, una vez adherido se enrosca y forma un apresorio. Una vez adherido produce peptaiboles y enzimas hidrolíticas de pared celular para facilitar la entrada de la hifa en el lumen del hongo parasitado. La pared celular será degradada por enzimas hidrolíticas como celulasas, glucanasas, lipasas, proteasas y quitinasas. Las quitinasas de *Trichoderma* son divididas en 1,4 α -acetil glucosaminadasas, endoquitinasas y exoquitinasas. Las glucanasas inhiben la germinación de esporas (Tovar, 2008).

Antibiosis, se define como la acción directa de un antibiótico o metabolito producido por un microorganismo sobre otro sensible a estos. Las cepas de *Trichoderma* producen metabolitos secundarios volátiles y no volátiles, algunos de estos tienen la capacidad de inhibir el desarrollo de otros microorganismos sin la necesidad de contacto físico. Entre los compuestos no volátiles se encuentran la trichodermina y metabolitos peptídicos además de numerosos antibióticos como son: suzukacilina, alameticina, dermadina, trichotecenos y trichorzianina. Los antibióticos volátiles tienen acción fungistática, debilitando al patógeno y haciéndolo más sensible a los antibióticos no volátiles, este proceso se conoce como hiperparasitismo de origen enzimático (Danay et al., 2009).

Los daños visibles en estructuras de *Fusarium* son, presencia de macroconidios, estrangulamiento y lisis de hifas. También se puede observar proliferación de esporas del biocontrolador sobre el micelio patógeno provocando su enrollamiento para ser lisado a nivel de septo (Quiroz, Ferrera, Alarcón y Lara, 2008).

3.5. *Bacillus subtilis*

El género *Bacillus* incluye más de 60 especies formadoras de esporas, móviles y rodeadas de flagelos peritricos, anaerobios o aerobios facultativos. Son catalasa positivos y se encuentran en suelos y plantas, siendo habitantes comunes de aguas frescas y estancadas y además activos en sedimentos (Cuervo, 2010).

Bacillus subtilis es una bacteria comúnmente aislada de suelo y rizósfera. Sus colonias en agar sangre y nutritivo son de aspecto liso o rugoso, apariencia seca, bordes irregulares ondulados o extendidos en el medio. Microscópicamente son bacilos Gram positivos de 0.8 mm de diámetro por 2 a 3 mm de largo con sus bordes redondeados, posee esporas esféricas y centrales que no deforman el bacilo (Realpe, Hernández y Agudelo, 2002). Se caracteriza por una acción bactericida-fungicida y puede actuar como un solubilizador biológico. Por sus características, es usado para proteger una gran variedad de cultivos que incluyen, soya, camote, papa, chile dulce, café, piña, tomate, melón, hortalizas, flores y cítricos. La eficiencia de *Bacillus subtilis* fue probada para controlar enfermedades producidas por *Rhizoctonia* spp., *Pythium* spp., *Fusarium* spp., *Erwinia* spp., entre otros (Universidad de Costa Rica, 2010). Además, *Bacillus subtilis* pertenece al grupo de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR). Estas bacterias benefician el desarrollo de la planta por medio de varios mecanismos, como aumentar la disponibilidad de nutrientes, suprimir organismos causantes de enfermedades y producir hormonas vegetales o bioestimulantes (Almaghrabi et al., 2013). Las bacterias pertenecientes a la clase *Bacilli* y géneros relacionados son eficaces contra organismos fitopatógenos por su capacidad de producir antibióticos extracelulares, toxinas, enzimas hidrolasas y lipopéptidos antimicrobianos. Estos últimos ejercen una amplia acción antifúngica, antibacteriana y antiviral, además son capaces de activar mecanismos de resistencia inducida en la planta (Orberá, Serrat y Ortega, 2014).

3.6. CONTROL BIOLÓGICO INDIVIDUAL Y COMBINADO CONTRA

Fusarium.

En el estudio de Cubillos, Paéz y Lauris (2011) se presenta a *Trichoderma harzianum* como un controlador eficiente contra *Fusarium solani* en cultivos de maracuyá reduciendo el porcentaje de plántulas muertas tras la aplicación. La acción de este biocontrolador también ha sido probada en conjunto con *Pseudomonas fluorescens* contra *Fusarium oxysporum* en cultivos de fréjol (*Phaseolus vulgaris*). Como resultado de este estudio se observó la acción favorable de *Pseudomonas fluorescens* al aumentar el vigor de las plantas y la mejora en su crecimiento y además, un efecto antagonístico aceptable, pero no óptimo de *Trichoderma spp.* (Avendaño, Arbeláez y Rondón, 2006). Sin embargo, este estudio señala la posibilidad de implementar un biocontrolador conjunto que aumente la eficiencia de *Trichoderma* y permita un mejor control del patógeno. Una alternativa es combinar *Trichoderma* con *Bacillus subtilis*, un controlador que probó ser eficiente inhibidor del micelio patógeno de *Fusarium oxysporum* (Constanza et al., 2012). *Bacillus subtilis* también actúa como un promotor de crecimiento y su aplicación en plantas jóvenes favorecería el desarrollo óptimo de las mismas (Almaghrabi, Massoud y Abdelmoneim, 2013).

El uso conjunto de microorganismos rizosféricos ofrece tolerancia frente a patógenos y favorece el crecimiento de la planta, como es mencionado en el estudio de Jain, Singh¹, Sarma y Singh² (2011), donde incluye una combinación de *Pseudomonas aeruginosa*, *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* contra *Sclerotinia sclerotiorum* en plantas de guisantes. El uso conjunto de estos microorganismos desencadenó un aumento en las defensas de la planta y proporcionó una mejor protección contra *Sclerotinia* (Jain, Singh¹, Sarma y Singh², 2011). En Ecuador, el problema con *Fusarium oxysporum* se ha extendido a cultivos comerciales como es el caso del banano. Se han realizado estudios *in vitro* de *Bacillus spp.*, contra *Fusarium oxysporum*, obteniendo resultados promisorios en su control (Salas, 2015). Este estudio pretende aportar con alternativas biológicas para controlar a *Fusarium oxysporum* en cultivos de uvilla partiendo de ensayos *in vitro*. Se planteó la hipótesis, el uso conjunto de *Trichoderma spp.* y *Bacillus spp.* como biocontroladores tiene efecto antagonista *in vitro* eficiente contra *Fusarium oxysporum* en uvilla.

De esta manera, surgen una serie de interrogantes que esta investigación plantea resolver como, por ejemplo: ¿Cuáles son los biocontroladores más efectivos entre los aislados? ¿Cuál sería la combinación más efectiva para controlar a *Fusarium*? ¿Cómo comprobar la eficacia de la acción conjunta de dos biocontroladores? ¿Existen diferencias de efectividad entre los biocontroladores escogidos de forma individual y conjunta?

3.7. OBJETIVOS

3.7.1. OBJETIVO GENERAL

- Determinar la efectividad de un biofungicida nativo *in vitro* a base de *Bacillus spp.* y *Trichoderma spp.* para combatir al fitopatógeno *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos de uvilla en la serranía ecuatoriana.

3.7.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar *Trichoderma spp.* y *Bacillus spp.* de muestras de suelo en las diferentes zonas productoras de uvilla de la serranía ecuatoriana.
- Identificar morfológica y molecularmente a *Trichoderma spp.* y *Bacillus spp.* de los aislados obtenidos en plantaciones de uvilla.
- Detectar actividad antagonista contra *Fusarium oxysporum* de los dos microorganismos en ensayos *in vitro*.
- Seleccionar los microorganismos compatibles para pruebas de antagonismo conjunto *in vitro*.
- Analizar estadísticamente los datos obtenidos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Se muestreó 12 localidades productoras de uvilla de la serranía ecuatoriana pertenecientes a las provincias de Pichincha, Tungurahua, Cotopaxi e Imbabura (Anexo 1) (Anexo 2). Se obtuvo información sobre el tipo de abono usado, aplicación de biocontroladores y el uso de agroquímicos. La cepa de *Fusarium oxysporum* obtenida de las localidades productoras de uvilla fue suministrada por Martín Arellano, microbiólogo parte del proyecto.

4.1. MUESTREO PARA OBTENER *Trichoderma spp.* y *Bacillus spp.*

El muestreo realizado fue estratificado al azar. En cada localidad se seleccionó al azar 3 plantas saludables distribuidas a lo largo del predio, y alrededor de cada planta se realizó el muestro de 3 plantas colindantes, dando un total de 9 plantas por localidad, con excepción de la Hacienda el Guápulo donde se muestreó 12 plantas. De cada planta de uvilla se extrajo 1 muestra de suelo y 1 muestra de la zona radicular para aislamiento de *Trichoderma spp.*, de igual manera se recolectó 1 muestra de suelo en *pool* para aislamiento de *Bacillus* por planta saludable, en total 3 muestras de suelo (Moya, García, Avilés, Andújar, y Núñez, 2014). Finalmente, se obtuvieron 259 muestras de las 12 localidades muestreadas (Anexo 3).

4.1.1. OBTENCIÓN DE *Trichoderma spp.*

Las muestras de suelo fueron tomadas a una profundidad aproximada de 0-20 cm. Para la muestra de raíces se extrajo el sistema radicular de la planta (Moya, García, Avilés, Andújar, y Núñez, 2014). Las muestras de suelo fueron homogenizadas y tamizadas en un colador con una abertura de poro de 4.75 mm. Las muestras de raíces fueron sacudidas, cortadas y colocadas en un recipiente estéril con 150 ml de agua destilada estéril para preparar una dilución madre (se agitó por unos minutos para homogenizar bien la mezcla). De igual forma, se preparó una solución madre con el suelo tamizado, que consistió en 10 g de la muestra en 90 ml de agua destilada. La solución madre, tanto de raíces como de suelo fue diluida hasta 10^{-3} , y se sembró las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} en cajas Petri de 90 mm con medio agar papa dextrosa (PDA por sus siglas en inglés) adicionado con 200 mg.l de gentamicina.

Para la siembra se colocó 100 µl de solución madre en cada caja Petri y se esparció cuidadosamente con un asa de Digralsky. Las cajas fueron incubadas a temperatura ambiente por 4 días (Figura 1). Una vez que se observó crecimiento micelial se procedió a realizar la identificación macroscópica y microscópica para su aislamiento (Moya et al., 2014).

4.1.2. OBTENCIÓN DE *Bacillus* spp.

Las muestras de suelo fueron tomadas a una profundidad de 10 cm, con un peso aproximado de 50 g. De esta muestra previamente homogenizada, se extrajo 1 g para un tubo con 10 ml agua destilada estéril y 1 g para un tubo con 10 ml de caldo peptona. Ambos tubos fueron colocados a baño María a 80 °C por 30 minutos y luego incubados a temperatura ambiente por 24 horas. Se realizó diluciones de los tubos hasta 10^{-6} , y se sembró las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} , y 10^{-6} por superficie en cajas Petri con agar nutritivo. Las cajas fueron incubadas a temperatura ambiente por 24 horas (Márquez, 2007) (Figura 2).

4.2. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE *Trichoderma* spp.

Las características comunes de *Trichoderma* a nivel macroscópico y microscópico fueron consideradas. Las observaciones microscópicas de las hifas fueron realizadas usando la técnica de la cinta adhesiva con azul de lactofenol como colorante (Figura 3). Se realizaron cultivos nuevos con las colonias monospóricas (Figura 4) provenientes de una sola conidia en medio PDA (Moya et al., 2014; Cañedo y Ames, 2004).

4.3. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y BIOQUÍMICA DE *Bacillus* spp.

A las colonias bacterianas con la morfología esperada se les realizó una tinción Gram para determinar si se trataba de bacterias Gram positivas. Las pruebas bioquímicas comunes para la identificación de *Bacillus*, son positivo para catalasa por liberación de oxígeno y negativo para oxidasa en el caso de *Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus* (disco de oxidasa sin cambios de color) (Márquez, 2007; Cuervo, 2010; Laboratorios Britania, s.f.) (Figura 5).

4.4. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR POR SECUENCIACIÓN

El kit Wizard Genomic DNA Purification de Promega fue utilizado para la extracción de ADN de *Trichoderma* y *Bacillus*. Para *Trichoderma* se usó cultivos de 7 a 10 días de edad y para *Bacillus* cultivos de 1 a 2 días. El ADN extraído fue cuantificado para determinar su pureza y concentración utilizando el espectrofotómetro Nanodrop, específicamente se consideró el parámetro 260/280 dentro del rango 1.7-2.0 y 260/230 en el rango 2.0-2.2 (Promega Corporation, s.f.). Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se usaron los *primers* ITS1 e ITS4 en el caso de *Trichoderma* (Anexo 4), esperando obtener bandas de 500 pb aproximadamente (Schoch et al., 2012). El protocolo de reacción fue basado en el expuesto por Castle, Speranzini, Rghei, Alm, Rinker y Bissett (1998) (Anexo 5). Para *Bacillus* se usó *primers* PA forward y PH reverse dirigidos a la zona 16S rRNA (Gomma y Momtaz, 2006) (Anexo 6), siguiendo el protocolo de PCR descrito por Barghouthi (2011) (Anexo 7). Esperando obtener bandas de 1500 pb (Dlamini y Ateba, 2014).

Los amplicones fueron purificados con Illustra ExoProStar GE-Healthcare, para su envío y secuenciación a Macrogen en Corea del Sur. Las secuencias fueron editadas en el software MEGA 5.05 e identificadas usando la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) (Tamura et al., 2011).

4.5. PRUEBAS DE ANTAGONISMO INDIVIDUALES *IN VITRO*.

Las pruebas para *Trichoderma* fueron realizadas en cajas Petri con PDA. De la caja con *Fusarium oxysporum* se tomó un disco de 5mm con crecimiento fúngico y se sembró en una nueva caja con PDA a 1 cm de distancia del borde e incubado a temperatura ambiente por 24 horas para acondicionamiento. Inmediatamente, *Trichoderma* se ubicó en el extremo opuesto a 1 cm del borde de la caja, manteniendo una distancia entre ambos hongos de 5 cm aproximadamente. En cajas separadas se sembró un disco de agar de 5mm de cada hongo antagonista y del patógeno como control (Figura 8). Los halos de crecimiento del patógeno y del antagonista, fueron medidos durante 10 días cada 24 horas a temperatura ambiente (Barbosa y Meza, 2009; Hoyos et al., 2008; Tovar, 2008).

El antagonismo fue comprobado según las siguientes variables: radio de crecimiento del antagonista (RCA), del patógeno (RCP), y porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR). El radio de crecimiento del antagonista y del patógeno fue medido para valorar la competencia por nutrientes y espacio comparando la velocidad de crecimiento de cada uno. Durante 9 días adicionales se observó si el patógeno fue parcial o completamente cubierto por el antagonista o si solo inhibió su crecimiento. El porcentaje de inhibición de crecimiento radial fue calculado empleando la fórmula de Ezziyyani et al. (2004), $PICR = (R1 - R2)/R1 \times 100$, donde R1 es el radio del patógeno testigo y R2 es el radio del patógeno en enfrentamiento (Barbosa y Meza, 2009; Hoyos et al., 2008).

También se evaluó el micoparasitismo como un posible mecanismo de acción antagonista. Para esto se realizó observaciones macroscópicas de la colonia del patógeno y se escogió los cultivos que presenten crecimiento del antagonista sobre la colonia de *F. oxysporum*. Se clasificó los cultivos según la tabla de Elías y Arcos (1984) citada en Barbosa y Meza (2009) que considera, invasión de la superficie, colonización y esporulación del antagonista sobre el patógeno (Anexo 8). Los mejores *Trichoderma* antagonistas fueron escogidos según su PICR superior al 50%, basándose en la metodología de Barbosa y Meza (2009).

Para las pruebas de antagonismo de *Bacillus* se siguió el protocolo descrito por Tejera, Heydrich y Rojas (2012). El patógeno se sembró en PDA y se incubó por 7 días aproximadamente para obtener crecimiento micelial abundante. Se tomó una asada de cada aislamiento bacteriano y se sembró en 5 ml de medio BHI en tubo, después de 1 hora de acondicionamiento y se procedió a ajustar la concentración a 1.5×10^8 cel.ml, usando como referencia el tubo 0,5 de la escala de Mc Farland con una absorbancia de 0.072. Para las diluciones necesarias se usó agua peptonada al 1%. Se usó el espectrofotómetro Thermo Spectronic Genesys 20 configurado en 546 nm para medir la absorbancia de los tubos y de la escala Mc Farland (Figura 9). Se inoculó 100 ul de los aislamientos bacterianos con la concentración establecida en agar PDA y se esparció completamente en la caja con un asa de Digradsky. Un fragmento de 5mm del hongo patógeno fue extraído y colocado en el centro de cada una de las cajas inoculadas con los aislados bacterianos.

Las cajas fueron incubadas a temperatura ambiente y observadas durante 11 días, en los cuales se midió el halo de crecimiento del hongo patógeno en presencia de las cepas bacterianas. Un cultivo puro de *F. oxysporum* en PDA se usó como control. Con las mediciones obtenidas se procedió a calcular el porcentaje de inhibición micelial usando la siguiente fórmula: porcentaje de inhibición = $(D.C.C - D.C.P)/D.C.C * 100$, donde D.C.C corresponde al diámetro de la colonia control y D.C.P es el diámetro de la colonia del hongo que se encuentra en interacción con las bacterias (Tejera, Heydrich y Rojas, 2012).

Los porcentajes de inhibición serán agrupados según lo expuesto por Constanza et al. (2011):

- **Negativo:** ausencia de inhibición o porcentaje menor al 10%, crecimiento fúngico similar al control.
- **Bajo:** ausencia de zona de inhibición o porcentaje entre 10–39%, con una disminución en el crecimiento de la colonia fúngica.
- **Medio:** zona de inhibición con un porcentaje entre 40–69%, con disminución en el crecimiento de la colonia fúngica.
- **Positivo:** zona de inhibición definida con un porcentaje entre 70–100%.

En este estudio, se escogieron las cepas clasificadas como antagonistas positivos y medios.

4.6. PRUEBAS DE COMPATIBILIDAD.

Se realizaron pruebas de crecimiento conjunto con los dos biocontroladores escogidos para garantizar que no exista inhibición entre ellos. Se colocó un disco de micelio de 5 mm de diámetro con crecimiento activo de *Trichoderma*, en el centro de un plato Petri con agar PDA. Las cepas bacterianas de *Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus* fueron sembradas por estriamiento en un extremo de la caja. De cada combinación se preparó un control en PDA (Tabla 9). El crecimiento de *Trichoderma* fue medido después de 5 días, cualquier crecimiento sobre el aislado bacteriano sin una zona de inhibición es considerado como compatibilidad entre ambos microorganismos. Se repitió el proceso para los mejores antagonistas (Jain et al., 2011).

Adicionalmente, se realizó una resiembra de las bacterias cubiertas por el hongo en agar PDA directamente de la caja para determinar la viabilidad de ambos microorganismos a los 5 días de incubación, además de un Gram para constatar su presencia. Basándose en las directrices establecidas en el protocolo de Chaves (2007).

4.7. PRUEBAS DE ANTAGONISMO CONJUNTAS *IN VITRO*.

Para las pruebas de antagonismo conjunto se usó la dilución 50:50 de microorganismos compatibles (Chaves, 2007). La dilución para hongos y bacterias fue ajustada a 1.5×10^8 cel.ml en agua destilada, se colocó 100 ul en una caja Petri y se esparció por toda la caja con ayuda del asa de Digrafsky. Se coló un disco de agar con micelio patógeno de 5 mm de 5 días de edad en el centro de la caja Petri y se incubó las cajas a temperatura ambiente. Las observaciones respectivas fueron realizadas durante 11 días en los que se midió el halo de crecimiento del hongo patógeno en presencia de los microorganismos compatibles. Como control o testigo se usó un cultivo individual de *Fusarium oxysporum* en PDA (Tejera, Heydrich y Rojas, 2012

4.8. ANÁLISIS DE DATOS

Se realizó estadística descriptiva para la organización y presentación de los datos obtenidos, utilizando el software Microsoft Excel 2010.

5. RESULTADOS y DISCUSIÓN

5.1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp.

De las 259 muestras obtenidas, 222 fueron destinadas para la obtención de *Trichoderma* (Anexo 3). Se obtuvo 25 aislados de *Trichoderma* (Tabla 1) basándose en la identificación morfológica macro y microscópica (Figura 3).

La mayoría de los aislados obtenidos provienen de fincas que usan abono orgánico como gallinaza para enriquecer su suelo, donde no aplican químicos con frecuencia o solamente en estadios tempranos de crecimiento de la planta. Sin embargo, la obtención de *Trichoderma* solo fue posible en 25 de las 222 muestras, pudiendo estar relacionado con el uso de fungicidas químicos (Anexo 1 y Tabla 1). Leandro et al. (2007), menciona que el uso de compostaje en el suelo puede servir como sustrato para establecer y promover la supervivencia de *Trichoderma*, además menciona que la manipulación química del suelo también puede afectar la dinámica poblacional de especies autóctonas presentes en el mismo y en las raíces.

Se consiguió un total de 36 aislados de *Bacillus* (Tabla 2), estos aislados fueron obtenidos de casi todas las zonas productoras muestreadas en las provincias de Pichincha, Tungurahua, Cotopaxi e Imbabura demostrando la prevalencia de *Bacillus* spp. en el suelo a pesar de tratamientos químicos o condiciones adversas. Esta resistencia a los factores ambientales está ligada a la capacidad de formar esporas y también depende mucho de la especie. Esporas de *B. subtilis*, *B. cereus* y *B. licheniformes* son capaces de persistir incluso sobre hojas de plantas en períodos prolongados de tiempo, mientras que esporas de *B. thuringiensis* son afectadas por varios factores ambientales y tienen una persistencia limitada (Sánchez y Peña, 2000).

El ADN extraído de *Trichoderma* y *Bacillus* tuvo concentración y calidad aceptable dentro de los parámetros medidos 260/280, 260/230. En la electroforesis se obtuvo geles con bandas de 500pb y 1500pb, tamaño esperado según los *primers* usados (Figura 6 y Figura 15).

La identificación molecular dio como resultado 7 diferentes especies de *Trichoderma* en una frecuencia variada (Tabla 3), siendo *Trichoderma harzianum*,

Trichoderma tomentosum y *Trichoderma gamsii* los más abundantes, mientras que *Trichoderma hamatum* y *Trichoderma atroviride* fueron los menos comunes (Figura 7). Otras especies como *T. asperellum* y *T. koningiopsis* también se presentaron en menor cantidad, dando un buen indicio de la población microbiológica beneficiosa de las zonas. Las especies de *Trichoderma* se encuentran ampliamente distribuidas en diferentes ambientes y la presencia de materia orgánica o desechos vegetales en descomposición favorecen su desarrollo. Su presencia es común en suelos con abundante materia orgánica. Partiendo de esta característica se puede relacionar la importancia del uso de compostaje natural y abono orgánico con la presencia y diversidad de hongos beneficiosos obtenidos (Martínez, Infante y Reyes, 2013).

Los *Bacillus* aislados con una capacidad antagonista superior al 70% fueron identificados como *B. subtilis*. Con una capacidad antagonista del 40%-50% se identificaron 5 *B. cereus* y un *B. subtilis* correspondiente al aislado 16 (Tabla 7). Como se citó anteriormente la prevalencia de estas especies en el suelo es bastante prolongada a pesar de factores ambientales adversos (Sánchez y Peña, 2000).

En el estudio de Constanza et al. (2012), los *Bacillus* escogidos tuvieron porcentajes de inhibición superiores al 50% y dentro del grupo se identificó a *B. cereus* y *B. subtilis*. Por lo tanto, el *screening* previo dio un indicio de la posible especie bacteriana por su capacidad controladora frente a *Fusarium*.

5.2. PRUEBAS DE ANTAGONISMO INDIVIDUALES IN VITRO, *Trichoderma*.

El PICR obtenido del enfrentamiento de *Trichoderma* contra *Fusarium oxysporum* (Figura 10), permitió la elección de 7 aislados que superan el 50% de inhibición micelial patógena (Tabla 4). Los aislados escogidos fueron 3, 8, 12, 16, 17, 23 y 26. Todos tuvieron contacto con el patógeno en el día 5 y presentaron una velocidad de crecimiento muy cercana a la de sus testigos, los cuales llenaron la caja para el mismo día (Tabla 4). Los aislados escogidos incluyen las siguientes especies: *T. atroviridae*, *T. gamsii*, *T. tomentosum* y *T. hamatum*. Los mejores antagonistas provienen de las provincias de Pichincha, Cotopaxi e Imbabura. Entre los 7 mencionados destacan *T. atroviridae* aislado 3, *T. gamsii* aislado 8 y *T. hamatum* aislado 26, con un PICR de 59,26%, siendo los antagonistas más eficientes del grupo (Figura 11).

Todas las cepas obtenidas tienen actividad biocontroladora reconocida contra varios fitopatógenos. *T. atroviridae* uno de los aislados que obtuvo el mejor PICR contra *F. oxysporum* también es considerado un biocontrolador efectivo contra *Rhizoctonia* y *Macrophomina phaseolina* en cultivos de papa, soja, garbanzo y maní (Pérez, Muñoz, Blengini, Cavaglia, Caballero, y Pinnoti, 2015), por lo tanto su aislamiento de zonas autóctonas tiene una amplia gama de aplicaciones futuras.

Los porcentajes de inhibición micelial obtenidos no siguen un patrón relacionado a la especie, como es el caso de *T. tomentosum* que presenta PICRs bajos de 25,93% en la cepa 25 proveniente de Imbabura, mientras que la cepa 16 de la misma especie y provincia, pero de diferente finca presenta un PICR de 55,56% (Tabla 4). De igual manera todos los aislados de *T. harzianum* tienen un PICR inferior al 50%, a pesar de que este biocontrolador ha sido reconocido como altamente eficiente contra *F. oxysporum* (Cubillos et al., 2011). Estos resultados apoyan lo expuesto por Hoyos et al. (2008), ya que no se puede generalizar la capacidad antagonista de una especie de *Trichoderma* por que esta depende del aislado obtenido según la zona y la cepa específica de patógeno al que se va a enfrentar. Considerando estos parámetros, es altamente recomendable obtener y probar cepas autóctonas como prioridad frente a cepas foráneas para tratar de controlar un patógeno.

Adicionalmente, se evaluó cualitativamente el micoparasitismo de 18 aislados que presentaron algún tipo de crecimiento sobre el patógeno (Tabla 5), según la tabla de Elías y Arcos (1984). En este grupo, se incluían los 7 escogidos con mayor PICR. El micoparasitismo fue evaluado de forma microscópica y se documentó las muestras que presentaban adherencia, apilotamiento, deformación y estrangulamiento (Figura 12). La deformación en las estructuras de *Fusarium*, así como la formación de clamidosporas como estructuras de resistencia, está relacionada con la producción de enzimas quitinasas, celulasas y proteasas por parte de las cepas de *Trichoderma* en el proceso de micoparasitismo (Quiroz et al., 2008). Los 7 aislados con mayor PICR presentaron micoparasitismo frente a *Fusarium oxysporum* como mecanismo antagonista. Las pruebas señalaron 9 cepas que no presentaron ningún crecimiento sobre el patógeno y además tuvieron actividad antagonista menor del 50%. En estos casos se puede considerar la presencia de mecanismos de antibiosis a distancia como sucede con *Trichoderma*

harzianum productor de metabolitos volátiles y no volátiles como pirones, isocianatos y trichocinas (Barbosa y Meza, 2009).

La presencia de micoparasitismo microscópico señala una potente actividad enzimática en los aislados obtenidos, en especial de la enzima b-1,3 glucanasa, este tipo de enzimas se encuentran directamente relacionadas con la capacidad controladora del hongo. De esta forma se explica que los 7 mejores aislados de *Trichoderma* con PICR superior también presentaron algún tipo de micoparasitismo. La observación microscópica y clasificación según el tipo de parasitismo es necesaria para determinar la presencia del mismo. El crecimiento de *Trichoderma* sobre la colonia de un patógeno en cultivo dual no es una garantía de una capacidad parasítica alta, las hifas de ambos pueden llegar a compartir espacios en el sustrato sin producirse el parasitismo (Martínez, Infante y Reyes, 2013). Este comportamiento se observó en los aislados 6, 11 y 13, los cuales tuvieron crecimiento sobre el patógeno, sin presencia de micoparasitismo microscópico evidente (Tabla 5).

5.3. PRUEBAS DE ANTAGONISMO INDIVIDUALES *IN VITRO*, *Bacillus spp.*

El *screening* previo (Figura 13) permitió que se escojan cuatro aislados con porcentajes de inhibición cercanos o superiores al 70% considerados como positivos y seis aislados con porcentajes de 40% a 50% clasificados como antagonismo medio según lo expuesto por Constanza et al. (2011) (Figura 14) (Tabla 6). En total se usó 10 aislados para pruebas de compatibilidad y subsecuente identificación molecular. Los aislados positivos escogidos del *screening* inicial pertenecen a las zonas de Cotopaxi e Imbabura, mientras que los aislados con inhibición media pertenecen a Imbabura, Pichincha y Tungurahua.

Salas (2015), obtuvo un porcentaje de inhibición máximo de 56,18% perteneciente a *Bacillus subtilis* contra el patógeno del banano *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense raza tropical 1 y Fiallos (2009), obtuvo porcentajes de inhibición del 65%. En el *screening* realizado se escogieron cepas con un porcentaje de inhibición sobre el 70% (Tabla 6). Estas cepas fueron identificadas como *Bacillus subtilis* y clasificadas como muy efectivas, resaltando en el grupo, el aislado 5 con un porcentaje de inhibición del 84,85%. Este alto porcentaje de efectividad podría ser aprovechado en aplicaciones preventivas a plántulas y

a nivel de semilla en otro tipo de cultivos, donde se ha demostrado que su aplicación es capaz de reducir la incidencia de varias enfermedades (Ashwini y Srividya, 2013).

Las cepas 1, 8, 10, 14, 20 con un porcentaje de inhibición del 40-50% fueron identificadas como *Bacillus cereus*, y la cepa 16 de este mismo grupo como *Bacillus subtilis* (Tabla 7). El aislado 20 de *Bacillus cereus* posee el porcentaje de inhibición mayor de todo el grupo, con 51,52%. Esta especie ya ha sido mencionada como biocontrolador efectivo contra *Fusarium oxysporum* en pruebas *in vitro*, obteniendo un porcentaje de inhibición del 45,27%, atribuyendo su potencial antagonista a la capacidad de producir zwittermicin A, un antibiótico similar al quitosano, con una fuerte acción contra fitopatógenos, capaz de suprimir enfermedades en la planta e inhibir el crecimiento bacteriano y fúngico (Constanza et al., 2011). En otro estudio, Castañeda y Consuelo (2016) probaron diferentes especies de *Bacillus* contra *Fusarium sp.*, obteniendo porcentajes de inhibición del 79,37% para *B. subtilis* y 61,2% para *B. cereus*.

La variedad de aislados obtenida supone una buena aplicabilidad futura con la identificación de cada especie y su utilidad individual como paso prioritario, debido a que muchos aislados presentaron una inhibición nula en el *screening* realizado. La utilidad individual puede incluir potencial entomopatógeno como *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus sphaericus* (Soberón y Bravo, 2007), biocontroladores de patógenos variados o efectivos promotores de crecimiento.

5.4. PRUEBAS DE COMPATIBILIDAD.

Se probaron 28 combinaciones de siete aislados de *Trichoderma* con antagonismo superior y cuatro *Bacillus subtilis* con potencial antagonista >70% (Tabla 8). Como resultado se observó incompatibilidad e inhibición en todos los casos probados (Tabla 10) (Figura 16). Se observó inhibición desde el día 3 en la mayoría de las combinaciones, en consecuencia el crecimiento de *Trichoderma* se detuvo o fue ralentizado y no llegó a tener contacto con la colonia bacteriana con excepción del aislado 16 de *T. tomentosum* cuyo contacto fue leve con las cuatro cepas bacterianas en el día 5. El mismo comportamiento se pudo observar en las combinaciones 17-24, 17-25, 23-22 de *T. gamsii* (Figura 17).

Para los seis *Bacillus* con potencial antagonista del 40-50% se probó 42 combinaciones, con los siete aislados de *Trichoderma* (Tabla 8). Se observó crecimiento conjunto y contacto entre las colonias de ambos microorganismos en la gran mayoría de los casos desde el día dos y tres. Como resultado se obtuvo compatibilidad y crecimiento fúngico sobre la bacteria sin halos de inhibición para el día cinco, en 14 combinaciones (Tabla 11). En nueve combinaciones se observó contacto del hongo con la bacteria y leve crecimiento sobre la colonia, sin embargo, no llegó a cubrirla y se mantuvieron pequeñas zonas de inhibición, por esta razón no fueron considerados como compatibles, 19 combinaciones presentaron inhibición y fueron clasificados como incompatibles (Figura 18) (Tabla 12). El aislado bacteriano 16 de *Bacillus subtilis* llegó a tener contacto en las combinaciones 12-16, 17-16, 23-16, y 26-16 pero no tuvo compatibilidad ni crecimiento del hongo sobre su colonia en ningún caso y mostró marcadas zonas de inhibición con el resto de combinaciones, siendo el menos compatible del grupo de bacterias. El aislado bacteriano 14 de *Bacillus cereus* presentó cubrimiento de su colonia sin halos de inhibición en todas las combinaciones, excepto la 26, siendo el más compatible de este grupo (Figura 18). El aislado fúngico 26 correspondiente a la especie *Trichoderma hamatum* fue el menos compatible y presentó inhibición con los seis aislados bacterianos. El aislado 16 que corresponde a *Trichoderma tomentosum* y el aislado 23 perteneciente a *Trichoderma gamsii* fueron los que presentaron mayor compatibilidad con los aislados bacterianos (Figura 18) (Tabla 11). Las 14 combinaciones compatibles de *Bacillus cereus* que fueron repicadas, tuvieron crecimiento y ambos microorganismos estuvieron presentes, tanto en el medio de cultivo como en la tinción Gram (Figura 19). Esto confirma la viabilidad y compatibilidad de las bacterias y el hongo.

Las pruebas señalaron nuevamente antagonismo entre *Bacillus subtilis* y *Trichoderma*, sin embargo, se obtuvo compatibilidad con las cepas de *Bacillus cereus*. Los resultados de compatibilidad obtenidos con *Bacillus cereus* son un buen indicador para pruebas de antagonismo conjunto tanto *in vitro* como *in vivo*. Las cepas fúngicas de *Trichoderma gamsii* del aislado 16 y *Trichoderma tomentosum* del 23 también fueron las únicas en tener contacto con la bacteria al combinarlas con *Bacillus* >70%. Por lo tanto, son las cepas fúngicas que tuvieron mejor compatibilidad y las más aptas para ser usadas en pruebas de antagonismo conjunto *in vitro* y a nivel de planta (Chen et al., 2016).

La inhibición entre biocontroladores puede estar relacionada a sus mecanismos de acción y producción enzimática. Las cepas probadas de *Bacillus* y *Trichoderma* poseen una elevada capacidad inhibitoria y una variedad de mecanismos de control. El uso combinado de ambos en un mismo medio de cultivo pudo llevar a la competencia por nutrientes, siendo el tipo y grado de interacción entre ambos un factor importante a ser elucidado para entender su antagonismo (Xu, Jeffries, Pautasso y Jeger, 2011). Xu et al. (2011) también menciona que en un combinado de agentes biocontroladores, las interacciones antagonistas son más propensas a tener lugar frente a las interacciones de sinergismo, por lo antes expuesto. El estudio realizado por Ali y Nadarajah (2014) señala que la inoculación dual de *Trichoderma sp.* y *B. subtilis* contra *Magnaporthe grisea* en arroz bajo condiciones de invernadero fue muy efectiva y la acción antagonista conjunta fue significativamente superior a la aplicación individual del biocontrolador. Además, menciona que la efectividad contra el patógeno fue aumentada por la combinación de compuestos activos producidos por ambos organismos. De igual forma Ruth et al. (2002) señala que la combinación a nivel de planta de *Pichia guilhermondii* y *Bacillus mycooides* como biocontroladores de *Botrytis cinerea* fue eficiente y con una actividad superior debido a la combinación de los mecanismos de biocontrol. Además, señala que los microorganismos combinados tienen diferentes requerimientos nutricionales, por lo tanto, no competirán por nutrientes y no afectarán su desarrollo mutuo.

Estos resultados abren la posibilidad de probar las 28 combinaciones incompatibles *in vitro*, en condiciones de invernadero, donde la interacción entre ambos microorganismos sea dirigida según su ubicación en la planta, reduciendo el riesgo de competencia por nutrientes y antagonismo entre ellos. En este aspecto, Yobo (2005) menciona que la compatibilidad de *Trichoderma* y *Bacillus* si es posible, debido a que ambos microorganismos tienen requerimientos ecológicos diferentes, nichos distintos pero complementarios y zonas de actividad focalizada en la planta. *Bacillus* es más activo en la zona rizosférica de la planta hospedera mientras que *Trichoderma* se encuentra a nivel general del suelo y en la rizósfera. De esta forma *Bacillus* no interfiere con la captación de nutrientes por parte de *Trichoderma* y su actividad saprófita. En cuanto a la producción enzimática, el estudio de Yobo (2005) mantiene que la combinación de los diferentes mecanismos de biocontrol y promotores de crecimiento en la planta, da como resultado un aumento en el espectro de efectividad y no un antagonismo. Las pruebas realizadas en el

estudio mencionado tuvieron como resultado compatibilidad entre ambos microorganismos en pruebas duales *in vitro* y a nivel de invernadero.

5.5. PRUEBAS DE ANTAGONISMO CONJUNTO *IN VITRO*.

Al enfrentar las 14 combinaciones compatibles entre *Trichoderma spp.* y *Bacillus cereus* contra *Fusarium oxysporum*, se observó el control total sobre el patógeno con diferentes porcentajes de inhibición según las cepas combinadas (Tabla 13). Los porcentajes de inhibición conjuntos fueron superiores al 50% en todas las combinaciones. El porcentaje de inhibición de la combinación 16 y 14 fue la más alta del grupo, seguida de 16 y 1, 23 y 8, 3 y 20. Las cepas mencionadas corresponden a *Trichoderma tomentosum*, *Trichoderma gamsii* y *Trichoderma atroviride*. La combinación 8 y 1 de *Trichoderma gamsii* tuvo el porcentaje de inhibición menor de todo el grupo con 66,67%. Sin embargo, el porcentaje conjunto obtenido, es superior al individual de la cepa 8 de *Trichoderma* con 59,26% y al de la cepa 1 de *Bacillus cereus* con 42,42% (Tabla 14).

Los porcentajes obtenidos son clasificados como positivos en su mayoría (Constanza et al., 2011), marcando un notable incremento desde su clasificación individual como antagonistas con potencial medio, en el caso de *Bacillus cereus* (Tabla 13). De igual forma para los hongos, al comparar los porcentajes de inhibición conjunta con el antagonismo individual de *Trichoderma* en las especies compatibles, se observa un incremento en el porcentaje hasta llegar a un 80,95%, superando el 59,26%, establecido como el mayor PICR del grupo en antagonismo individual de hongos (Figura 23). Al quinto día de observación se apreció el crecimiento de *Trichoderma* junto con diferentes mecanismos de control macroscópicos sobre el patógeno (Figura 21). Se observó al patógeno cubierto por el antagonista en su totalidad en las combinaciones 3 y 14, 3 y 20, 12 y 14, 16 y 1, 16 y 8, 16 y 10, 16 y 14, 17 y 14. Ligeramente cubierto y completamente rodeado por el hongo y la bacteria en las combinaciones 8 y 14, 8 y 1. Con su crecimiento frenado y la presencia de pequeñas colonias de *Trichoderma* con exudados en las combinaciones 23 y 1, 23 y 10, 23 y 14, 23 y 8 (Figura 22).

Los porcentajes de inhibición conjuntos y superiores a los individuales, señalan una acción eficiente y combinada de los compuestos activos bacterianos y fúngicos de ambos antagonistas. La combinación de mecanismos de control, enzimas, fungistáticos y compuestos inhibidores dio como resultado un espectro de acción aumentado, frenando el crecimiento del patógeno por completo y reduciendo el tiempo de efectividad *in vitro* (Yobo, 2005). La capacidad de inhibición conjunta depende de factores como, la relación entre ambos microorganismos antagonistas *in vitro*. *Bacillus cereus* modifica la composición iónica del medio, aumentado el pH y excretando amonio. Estas condiciones son desfavorables para ciertos patógenos como los oomicetes, siendo un importante mecanismo de control (Emmert y Handelsman, 1999). Por otro lado, estas características podrían favorecer el crecimiento de *Trichoderma*, el cual tiene un rango de pH óptimo bastante amplio entre 4.0 y 7.0, siendo capaz de soportar hasta 2.0 y 9.0. Además, es capaz de asimilar como fuente de nitrógeno a compuestos como amoníaco y sulfatos de amonio, que estimulan e incrementan su crecimiento, aprovechando de esta forma los productos del metabolismo bacteriano (Cruz, 2007).

El comportamiento de las diferentes cepas de *Trichoderma* frente al patógeno está relacionado con las características de control previamente identificadas y observadas, como es el micoparasitismo. El aislado 23 mostró un comportamiento diferente al ser usado en conjunto con *Bacillus* contra *Fusarium*, con la presencia de exudados en la superficie de sus colonias. Estos exudados posiblemente corresponden a enzimas o compuestos inhibidores presentes por la cercanía con el patógeno y la competencia por nutrientes *in vitro* (Infante et al., 2009).

La presencia de compatibilidad y antagonismo conjunto abre la posibilidad de su aplicación a nivel de planta, específicamente en raíz. El uso de *Bacillus cereus* a nivel de campo requiere consideraciones previas, debido a la capacidad de producir enterotoxinas que lo convierten en causante de intoxicaciones alimentarias (Pérez, 2011). Sin embargo, no todas las cepas poseen el mismo nivel de virulencia y no todas son causantes de intoxicación. La cepa de *Bacillus cereus* UW85 conocida por su capacidad para frenar el marchitamiento fúngico en la alfalfa y su producción de zwittermicin A y kanosamina, ha sido estudiada, analizada y probada a nivel de campo. Silo et al. (1994) mencionan a esta cepa como una fuente de antibióticos con capacidad fungistática en especial contra

Phytophthora medicaginis. La base de datos de biopesticidas de la Universidad de Hertfordshire clasifica a la cepa de *Bacillus cereus* UW85 como un biopesticida natural sin riesgo para el ser humano (Universidad de Hertfordshire, 2016). Por lo tanto, la incapacidad de producir toxinas eméticas o diarreicas junto con la identificación adecuada de la cepa, deben ser factores claves previos a la aplicación de *Bacillus cereus* como biopesticida (Rubin, 2010).

Más allá del género y la especie se debe considerar las características individuales de la cepa obtenida y el grado de interacción que puede tener *in vitro* y a nivel de suelo con otros biocontroladores. Este grado de interacción está determinado por factores como, la disponibilidad de nutrientes, mecanismos de acción antagonista individuales, ubicación en la planta y requerimientos nutricionales. Por lo tanto, las pruebas de compatibilidad y antagonismo conjunto deben ser realizadas *in vivo* e *in vitro* para complementar los datos obtenidos y tener un panorama completo de su efectividad en la planta.

Los resultados obtenidos de las dos especies de *Bacillus* aportan información importante para futuras pruebas conjuntas *in vivo*, de igual manera las cepas individuales representan eficientes biocontroladores con una amplia aplicabilidad.

6. CONCLUSIONES

1. Las especies de *Trichoderma* obtenidas e identificadas con capacidad antagonista fueron *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. tomentosum*, *T. gamsii*, *T. koningiopsis*, *T. hamatum* y las especies bacterianas fueron *Bacillus cereus* y *Bacillus subtilis*.
2. Las pruebas de compatibilidad fueron negativas para *Bacillus subtilis* en todas las combinaciones con *Trichoderma*, pero positivas para *Bacillus cereus*.
3. El mayor grado de compatibilidad fue observado en el aislado 14 de *Bacillus cereus*, el aislado 16 de *Trichoderma tomentosum* y el aislado 23 de *Trichoderma gamsii*.
4. Las pruebas de antagonismo conjunto *in vitro* entre *Trichoderma* y *Bacillus cereus* contra *Fusarium oxysporum* dieron como resultado un control eficiente sobre el patógeno en todas las combinaciones y datos de inhibición micelial superiores a los obtenidos en pruebas individuales.
5. Se observó diferentes mecanismos de control de *Trichoderma* frente a *Fusarium*, relacionados a su especie y previamente analizados en pruebas de antagonismo individual.

7. REFERENCIAS

- 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 Grado)*. Recuperada de <http://repo.uta.edu.ec/bitstream/123456789/1868/1/tesis-010%20Gesti%C3%B3n%20de%20la%20prod.%20de%20flores%20y%20Frut.....pdf>
- Agrios, G. (2005). *Plant Pathology. (5ta ed)*. California, USA: ELSEVIER Academic Press.
- Ali, H. & Nadarajah, K. (2014). Evaluating the efficacy of *Trichoderma spp* and *Bacillus subtilis* as biocontrol agents against *Magnaporthe grisea* in rice. *Australian Journal of Crop Science*, 8 (9). Recuperado de http://www.cropj.com/nadarajah_8_9_2014_1324_1335.pdf
- Almaghrabi, O., Massoud, S., & Abdelmoneim, T. (2013). Influence of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on tomato plant growth and nematode reproduction under greenhouse conditions. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 20, 57-61. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3730550/pdf/main.pdf>
- Altamirano, M. (2010). *Estudio de la cadena productiva de uvilla (Physalis peruviana L.) en la Sierra Norte del Ecuador (Tesis de Grado)*. Recuperada de <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/950/1/95220.pdf>
- Ashwini, N., & Srividya, S. (2014). Potentiality of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent for management of anthracnose disease of chilli caused by *Colletotrichum gloeosporioides* OGC1. *3 Biotech*, 4 (2), 127 -136. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3964249/>
- Avendaño, C., Arbeláez, G., & Rondón, G. (2006). Control biológico del marchitamiento vascular causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* en fríjol *Phaseolus vulgaris* L., mediante la acción combinada de *Entrophospora colombiana*, *Trichoderma sp.* y *Pseudomonas fluorescens*. *Agronomía Colombiana*, 24(1). Recuperado de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99652006000100008
- Barbosa, R., & Meza, C. (2009). Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp *passiflorae* en maracuyá (*Passiflora edulis* Sims var.

Flavicarpa) del municipio zona bananera Colombiana. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 62 (1), 4743-4748. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v62n1/a01v62n1.pdf>

Barghouthi, S. (2011). A Universal Method for the Identification of Bacteria Based on General PCR Primers. *Indian Journal of Microbiology*, 51(4), 430-444. Recuperado de https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3209952/pdf/12088_2011_Article_122.pdf

Castañeda, E. & Consuelo, L. (2016). Evaluación del crecimiento de cuatro especies del género *Bacillus sp.*, primer paso para entender su efecto biocontrolador sobre *Fusarium sp.* *Revista Nova*, 13(26), 53-65. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v14n26/v14n26a06.pdf>

Castle, A., Speranzini, D., Rghei, N., Alm, G., Rinker, D., & Bissett, J. (1998). Morphological and Molecular Identification of Trichoderma Isolates on North American Mushroom Farms. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (1), 133-137. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC124683/#>

Cañedo, M. & Ames, T. (2004). *Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos*. Recuperado de <http://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/09/AN65216.pdf>

Chaves, N. (2007). *Utilización de bacterias y hongos endofíticos para el control biológico del nematodo barrenador Radopholus similis (Cobb) Thorn. (Tesis de Mestría)*. Recuperado de <http://www.sidalc.net/repdoc/a1654e/a1654e.pdf>

Chávez, M. (2006). *Producción de Trichoderma sp. y evaluación de su efecto en cultivo de Crisantemo (Dendranthema grandiflora) (Tesis de Grado)*. Recuperado de <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis286.pdf>

Constanza, L., Sánchez, L., Cuervo, J., Joya, A., & Márquez, K. (2012). Efecto biocontrolador de *Bacillus spp.*, frente a *Fusarium sp.*, bajo condiciones de invernadero en plantas de tomillo (*Thymus vulgaris L.*). *Publicación científica en ciencias biomédica*, 10 (17), 1794-2470. Recuperado de http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/nova17_art6.pdf

- Constanza, L., Sánchez, L., Cuervo, J., Bautista, D., González, L., & Guevara, M. (2011). Evaluación del efecto biocontrolador de *Bacillus spp.*, frente a *Fusarium spp.*, bajo condiciones de invernadero en *Rosmarinus officinalis L. NOVA*. *Publicación Científica en ciencias biomédicas*, 8 (13). Recuperado de http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/NOVA13_ARTORIG6.pdf
- Cruz, L. (2007). *Estandarización del proceso de producción masiva del hongo Trichoderma koningii Th 003 mediante fermentación bifásica a escala piloto (Tesis de grado)*. Recuperado de <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis23.pdf>
- Cubillos, J., Páez, A., & Lauris, M. (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. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 64(1), 5821-5830. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v64n1/a08v64n01.pdf>
- Cuervo, J. (2010). *Aislamiento y caracterización de Bacillus spp como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales (Tesis de Grado)*. Recuperado de <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis404.pdf>
- Danay, I., Martínez, B., Gonzáles, N. & Reyes, Y. (2009). *Mecanismos de acción Trichoderma frente a hongos fitopatógenos*. *Revista de Protección Vegetal*, 24(1). Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522009000100002
- Diario El Telégrafo. (09 de enero del 2011). Uvilla: fruta con miras al desarrollo industrial. *Diario el telégrafo*. Recuperado de <http://www.cotopaxinoticias.com/seccion.aspx?sid=11&nid=2085>
- Dlamini, S. & Ateba, C. (2014). Isolation of *Corynebacterium* Species from Retail Mutton and Lamb in the North West Province, South Africa. *Journal of Food and Nutrition Research*, 2 (7), 377-382. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/263889341_Isolation_of_Corynebacterium_Species_from_Retail_Mutton_and_Lamb_in_the_North_West_Province_South_Africa

- Emmert, E. & Handelsman, J. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *Federation of European microbiological societies*, 171 (1), 1-9. Recuperado de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13405.x/full>
- Fiallos, D. (2009). Uso de bacterias endofíticas para el control biológico del Mal de Panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. cubense) en el cultivar Gros Michel (AAA). 45 (Tesis de maestría). Recuperado del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza de la página: <http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A3774E/A3774E.PDF>
- Fischer, G., Almanza, P., & Miranda, D. (2014). Importancia y cultivo de la uchuva (*Physalis peruviana* L.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36(1). Recuperado de http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452014000100003
- Giulliana, L., Reque, R., Sánchez, F., Campos, L., Krugg, J., & Ríos, M. (2008). Resistencia *in vitro* de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* a los fungicidas Benzomil 500, Rhizolex-T y Homai-WP. *Revista REBIOL*, 28 (2). Recuperado de http://www.facbio.unitru.edu.pe/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=47&tmpl=component&format=raw&Itemid=62
- Gomma, O., & Momtaz, O. (2006). 16S rRNA characterization of a *Bacillus* isolate and its tolerance profile after subsequent subculturing. *Agricultural Genetic Engineering Research Institute (AGERI)*, 10 (1). Recuperado de http://applications.emro.who.int/imemrf/arab_j_biotec_2007_10_1_107.pdf
- Góngora, A. & 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 Grado)*. Recuperado de <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis244.pdf>
- Hidalgo, I. (s.f.). *Tipos de estudio y métodos de investigación*. Recuperado de <http://www.gestiopolis.com/tipos-estudio-metodos-investigacion/>
- Hoyos, L., Duque, G., & Orduz, S. (2008). Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma spp.* sobre aislamientos de *Sclerotinia spp.* y *Rhizoctonia spp.* *Revista Colombiana de Ciencias*

Hortícolas, 2(1), 76-86. Recuperado de <http://www.soccolhort.com/revista/pdf/magazin/Vol2/vol.2%20no.1/Vol.2.No.1.Art.7.pdf>

Infante, D., Martínez, B., González, N. & Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*, 24 (1). Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522009000100002

Jain, A., Singh, S., Sarma, K., & Singh, B. (2011). Microbial consortium mediated reprogramming of defense network in pea to enhance tolerance against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Applied Microbiology*, 112, 537-550. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22181349>

Kamie, M., Pandey, B., Kumar, P., & Muthu, K. (2013). A Species-Specific PCR Based Assay for Rapid Detection of Mango Anthracnose Pathogen *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. and Sacc. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*. Recuperado de <https://www.omicsonline.org/a-species-specific-pcr-based-assay-for-rapid-detection-of-mango-anthracnose-pathogen-colletotrichum-gloeosporioides-penz-and-sacc-2157-7471.1000184.php?aid=14947&view=mobile>

Márquez, F. (2007). *Aislamiento y taxonomía de bacterias del género Bacillus recolectadas en suelos de un bosque de Pinus radiata y una pradera permanente en distintas épocas de muestreo (Tesis de Grado)*. Recuperado de <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2007/fcm357a/doc/fcm357a.pdf>

Martínez, B., Infante, D., & Reyes, Y. (2013). *Trichoderma spp.* y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista de Protección Vegetal*, 28 (1). Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522013000100001

Moya, J., García, S., Avilés, E., Andújar, F., & Núñez, P. (2014). Aislamiento de cepas de *Trichoderma* de suelos, sustratos y raíces de plantas en invernaderos en la República Dominicana. *Revista de la Sociedad Dominicana de Investigadores Agropecuarios y Forestales, SODIAF*, 3(2), 11-16. Recuperado de http://www.sodiaf.org.do/revista/sodiaf/vol3_n2_2014/articulo/11_16_APF_V03_N02_2014.pdf

- Monzón, A. & Rodríguez, L. (s.f.). *Infecciones causadas por el género Fusarium*. Recuperado de <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/micologia/fusarium.pdf>
- Laboratorios Britania. (s.f.). *Discos de oxidasa*. Recuperado de http://www.britanialab.com/productos/195_insero_es.pdf
- Leandro, L., Guzman, T., Ferguson, L., Fernandez, G., & Louwsa, F. (2007). Population dynamics of *Trichoderma* in fumigated and compost-amended soil and on strawberry roots. *Applied Soil Ecology*, 35 (1), 237-246. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0929139306000989>
- Obando, Z. (25 de noviembre del 2013). La uvilla, fruta exótica y medicinal. *El norte.ec*. Recuperado de <http://www.elnorte.ec/opinion/editorialistas/43768-la-uvilla,-fruta-ex%C3%B3tica-y-medicinal.html>
- Orberá, M., Serrat, M., & Ortega, E. (2014). Potencialidades de la cepa SR/B-16 de *Bacillus subtilis* para el control de enfermedades causadas por hongos en cultivos de interés agrícola. *Biología Aplicada*, 31, 7-12. Recuperado de <http://elfoscientia.cigb.edu.cu/PDFs/Biotecnol%20Apl/2014/31/1/336-01-13.pdf>
- Pacheco, L., & Núñez, J. (2012). *Evaluación de fertilizantes foliares y dos tipos de podas en el cultivo de uvilla (Physalis peruviana) en las condiciones edafoclimáticas del lote 17 en el Ceypsa (Tesis de Grado)*. Recuperado de <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/735/1/T-UTC-0572.pdf>
- Pérez, I. (2011). *Bacillus cereus y su papel en las intoxicaciones alimentarias*. Recuperado de http://bvs.sld.cu/revistas/spu/vol38_1_12/spu10112.htm
- Pérez, R., González, T., & Rojas, J. (2014). Antagonismo microbiano asociado a cepas bacterianas provenientes de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) y maíz (*Zea Mays*). *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 1(3), 53-60. Recuperado de <http://reibci.org/publicados/2014/agosto/3300118.pdf>
- Promega Corporation (s.f.). *How do I determine the concentration, yield and purity of a DNA sample?*. Recuperado de <https://worldwide.promega.com/resources/pubhub/enotes/how-do-i-determine-the-concentration-yield-and-purity-of-a-dna-sample/#tab-0>

- PROEcuador. (2017). *Incrementa la exportación de uvilla deshidratada hacia Alemania en un 160%*. Recuperado de <http://www.proecuador.gob.ec/2017/01/31/incrementa-la-exportacion-de-uvilla-deshidratada-hacia-alemania-en-un-160/>
- Quiroz, V., Ferrera, R., Alarcón, A., & Lara, M. (2008). Antagonismo in vitro de cepas de *Aspergillus* y *Trichoderma* hacia hongos filamentosos que afectan al cultivo del ajo. *Revista mexicana de micología*, 26, 52-228. Recuperado de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-31802008000100005
- Rada, G. (2007). *Estudio Experimentales*. Recuperado de <http://escuela.med.puc.cl/recursos/recepidem/estExper02.htm>
- Ramírez, A. & Mijangos, L. (1999). *Efectos Nocivos Provocados por el Uso de Plaguicidas en la Fauna Silvestre de México y sus Consecuencias Ecológicas*. Recuperado de <http://www.ambiente-ecologico.com/revist54/ramire54.htm>
- Realpe, M., Hernández, C., & Agudelo, C. (2002). *Especies del género Bacillus: morfología macroscópica y microscópica*. Recuperado de <https://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/viewFile/1148/1263>
- Rubin, L. (2010). Microbial Pest Control Agents: Use Patterns, Registration Requirements, and Mammalian Toxicity. En R. Krieger (Ed.), *Hayes Handbook of Pesticide Toxicology* (441-461). University of California, Riverside, U.S.A: Academic Press. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/bacillus-cereus>
- Ruth, G., Shtienberg, D., Elad, Y., Fischer, E. & Dinoor, A. (2002). Improving biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of disease suppression. *Phytopathology*, 92 (9). Recuperado de <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO.2002.92.9.976>
- Sánchez, J. & Peña, J. (2000). Persistencia de esporas de *Bacillus thuringiensis* en hojas de maíz, de frijol y en el suelo. *Terra Latinoamericana*, 18(4). Recuperado de <http://www.redalyc.org/html/573/57318406/>
- Salas, V. (2015). *Determinación del antagonismo in vitro de Bacillus spp. aislado del suelo de los cultivos de banano de la región costa del Ecuador frente al hongo fitopatógeno Fusarium*

oxysporum f. sp. cubense raza tropical 1. (Tesis de grado). Recuperado de <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/10162/Salas%20Veronica.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Silo, L., Lethbridge, B., Raffel, S., Clardy, H. & Handelsman, J. (1994). Biological Activities of Two Fungistatic Antibiotics Produced by *Bacillus cereus* UW85. *Applied and environmental microbiology*, 60 (6). Recuperado de <http://aem.asm.org/content/60/6/2023.short>

Soberón, M., & Bravo, A. (2007). Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación. *Instituto de Biotecnología UNAM, 14*. Recuperado de http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/libro_25_aniv/capitulo_27.pdf

Schoch, C., Seifert, K., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J., Levesque, A., & Chen, W., Fungal Barcoding Consortium. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109 (16), 6241-6246. Recuperado de <http://www.pnas.org/content/109/16/6241.full.pdf>

Sánchez, J. (2015). *Introducción a la estadística en ciencias biológicas*. Quito, Ecuador: Ediciones J.C.S.O.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. y Kumar, S. (2011). MEGA (5.05) [Software de cómputo]. *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*.

Tejera, B., Heydrich, M., & Rojas, M. (2012). Antagonismo de *Bacillus spp.* frente a hongos fitopatógenos del cultivo del arroz (*Oryza sativa L.*). *Revista de protección Vegetal*, 2(27). Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522012000200008

Tovar, J. (2008). *Evaluación de la capacidad antagonista “in vivo” de aislamientos de Trichoderma spp. frente al hongo fitopatógeno Rhizoctonia solani. (Tesis de Grado)*. Recuperado de <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis98.pdf>

- Universidad de Costa Rica. (2010). *Boletín Biocontroladores. Universidad de Costa Rica Centro de Investigaciones Agronómicas*. Recuperado de http://www.cia.ucr.ac.cr/pdf/BOLETIN_UCR_2010.pdf
- Universidad de Hertfordshire. (2016). *Bio- Pesticides Data Base*. Recuperado de <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/bpdb/Reports/3014.htm>
- Vargas, H., Rueda, E., & Gilchrist, E. (2012). Actividad antagónica de *Trichoderma asperellum* (fungi: Ascomycota) a diferentes temperaturas. *Actualidades Biológicas*, 34 (96). Recuperado de http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0304-35842012000100008&script=sci_arttext&tlng=en
- White, T., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. (1990). *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. Recuperado de <https://nature.berkeley.edu/brunslab/papers/white1990.pdf>
- Xu, M., Jeffries, P., Pautasso, M., & Jeger, M. (2011). *Combined Use of Biocontrol Agents to Manage Plant Diseases in Theory and Practice*. *Phytopathology*, 101 (9). Recuperado de <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdfplus/10.1094/PHYTO-08-10-0216>
- Yobo, K. (2005). Biological control and plant growth promotion by selected *Trichoderma* and *Bacillus* species. (Tesis de doctorado). Recuperado de http://researchspace.ukzn.ac.za/bitstream/handle/10413/5335/Yobo_KS_2005_Thesis.pdf?sequence=1&isAllowed=y

8. FIGURAS

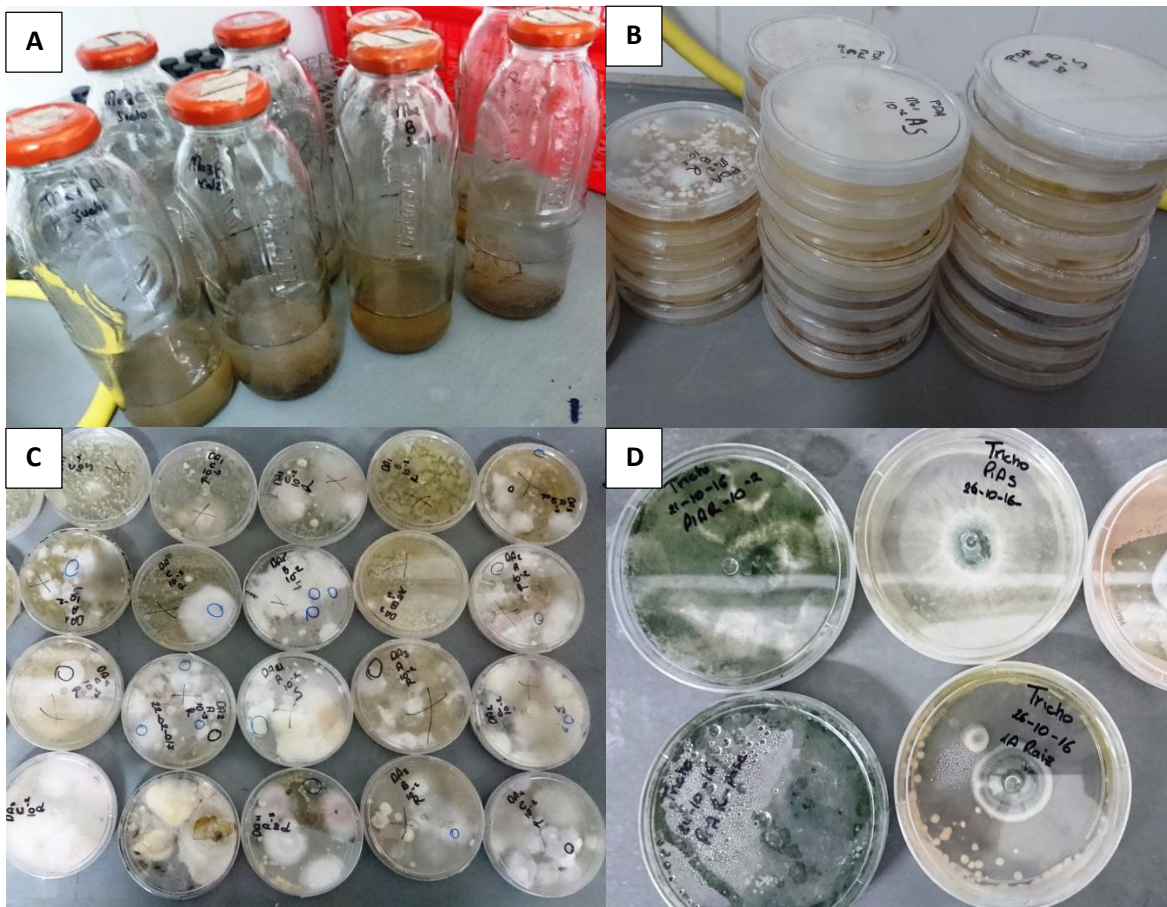


Figura 1. Proceso de obtención de *Trichoderma*. (A) Solución madre de suelo y raíces para siembra en diluciones. (B) Cajas Petri sembradas con las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} (C) (D). Selección y aislamiento de posibles colonias de *Trichoderma*.

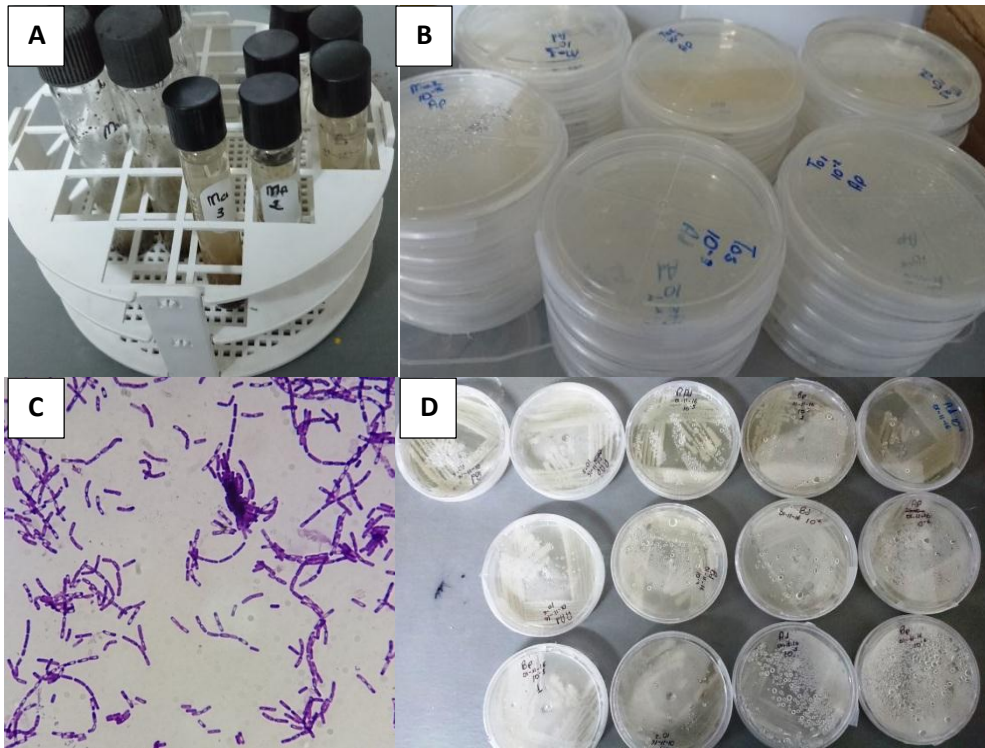


Figura 2. Proceso de obtención de *Bacillus*. (A) Tubos de agua peptonada y agua destilada estéril con 1 g de suelo (B) Cajas Petri sembradas con las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} , y 10^{-6} (C) Gram de posibles colonias de *Bacillus* (D) Aislamiento de las colonias escogidas.

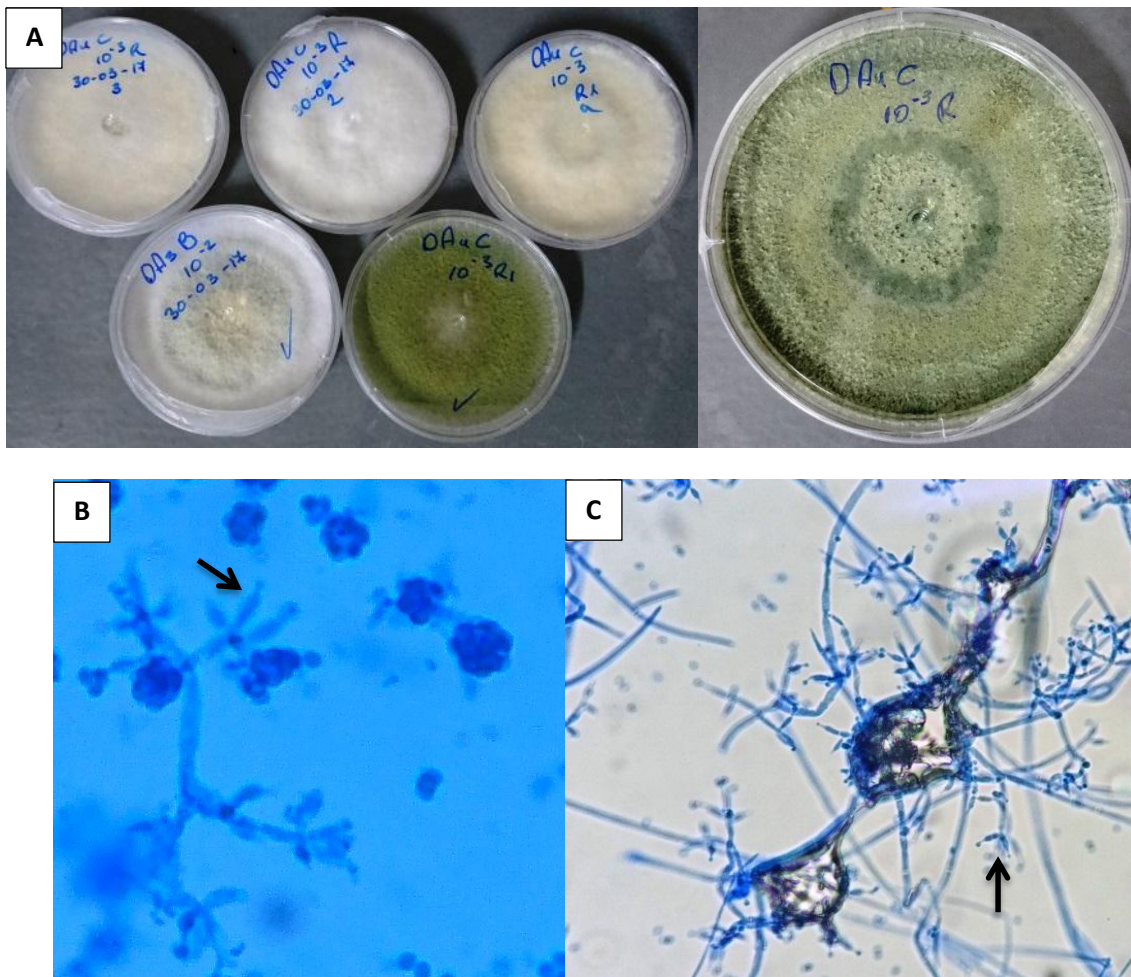


Figura 3. Identificación morfológica de *Trichoderma*. (A) Macroscópica: colonias verdes, presencia de anillos concéntricos en el área con conidias, micelio ralo y fino. (B) Microscópica: fiálides en forma de botella. (C) Conidióforos hialinos ramificados en forma de árbol, conidias subglobosas presentes como masas en los ápices de las fiálides.

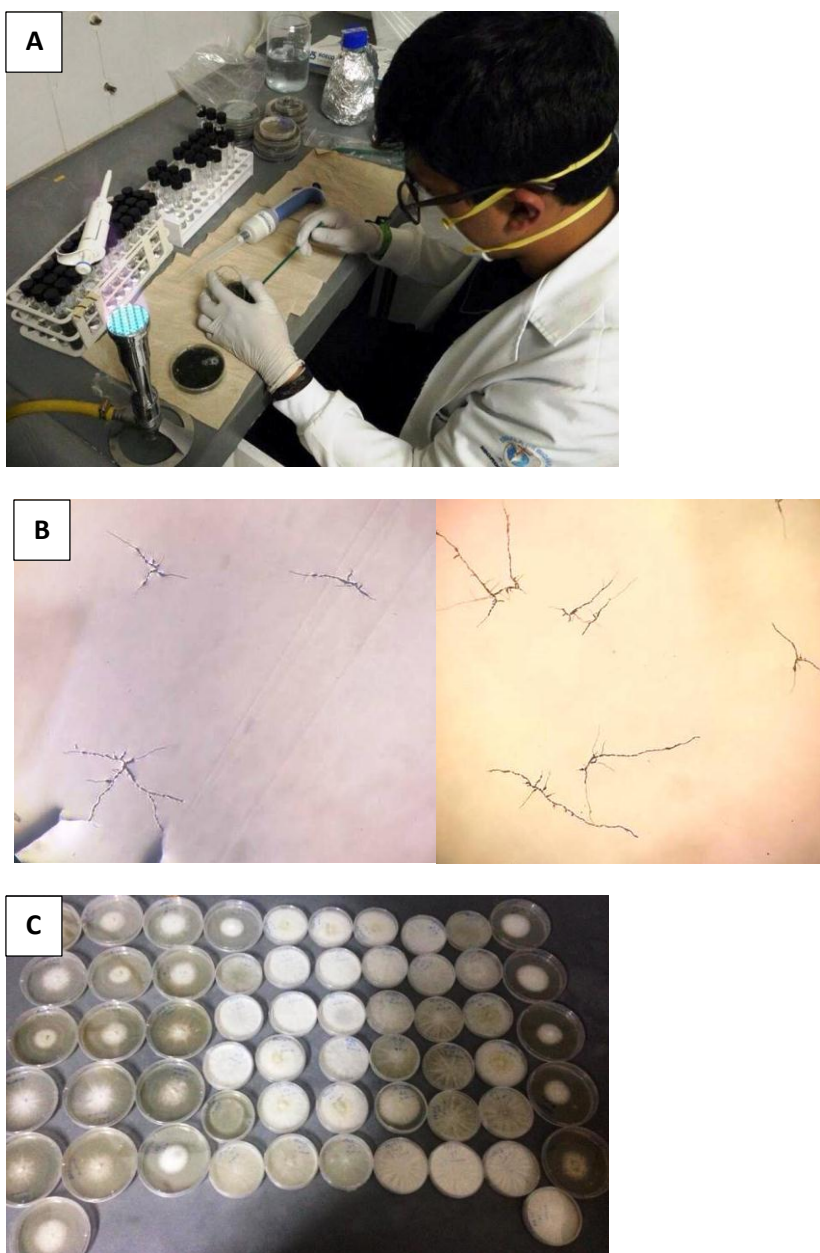


Figura 4. Cultivo monospórico. (A) Lavado y dilución con Tween 0,1% previo a la siembra en agar PDA. (B) Hifas observadas al estereo microscopio a las 24 horas de incubación (C) Cultivos monospóricos por duplicado.

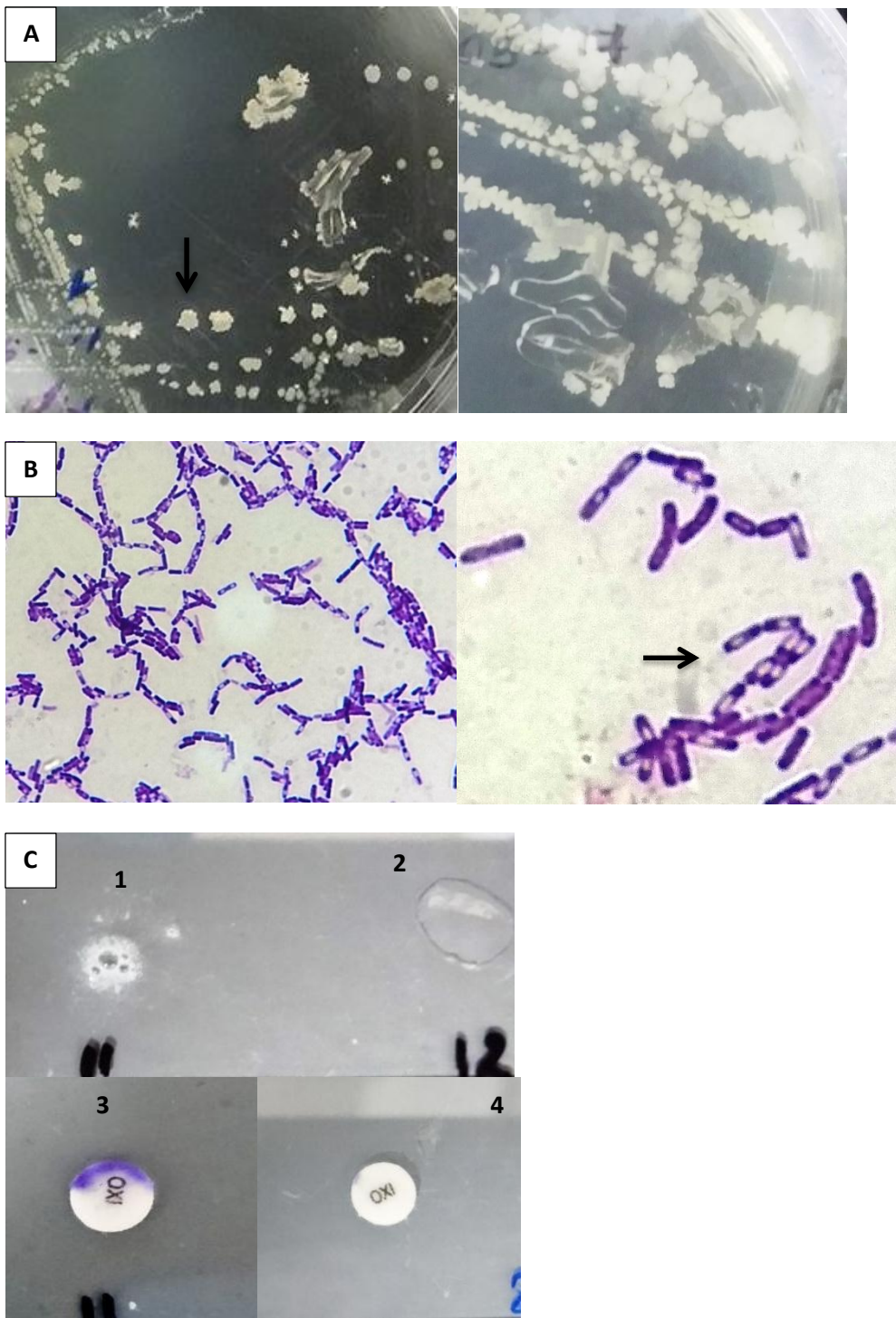


Figura 5. Identificación morfológica de *Bacillus* y pruebas bioquímicas. (A) Colonias rugosas, apariencia seca, bordes irregulares, de color blanquecino (B) Bacilos Gram +, medianos, bordes redondeados con presencia de esporas esféricas y centrales que no los deforman. (C) 1, prueba de catalasa positiva; 2, prueba de catalasa negativa; 3, prueba de oxidasa positiva; 4, prueba de oxidasa negativa.

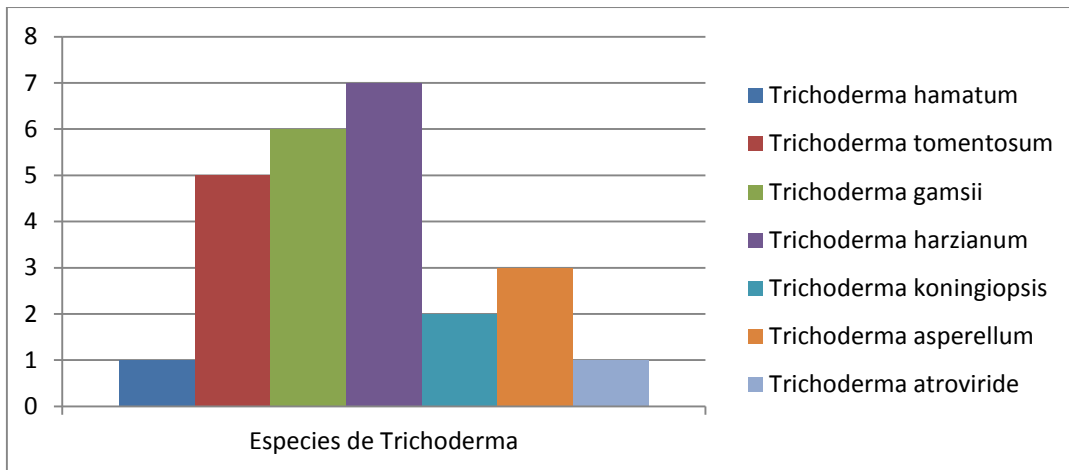


Figura 7. Frecuencia de la diversidad de especies obtenidas de *Trichoderma*.

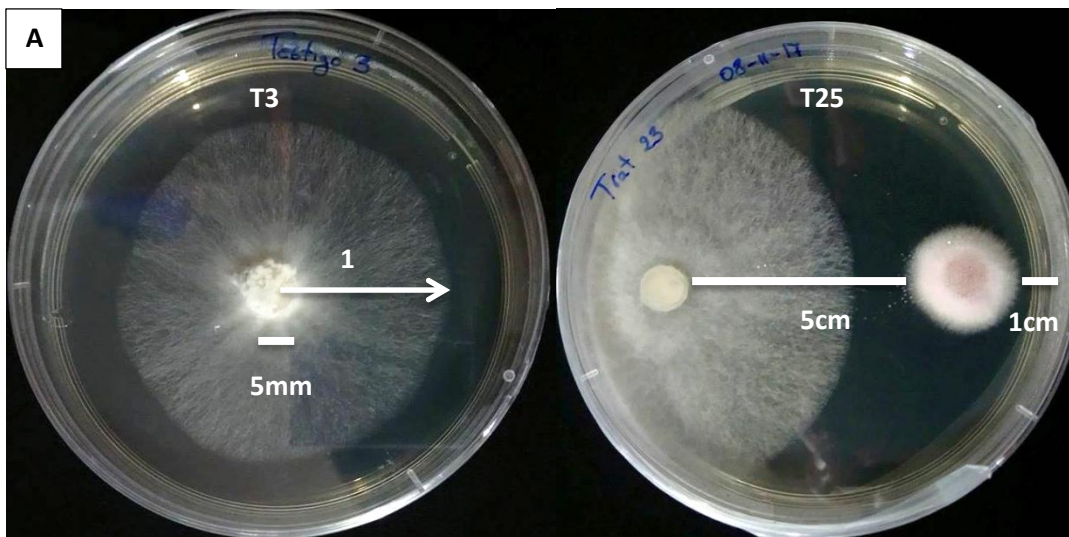


Figura 8. Pruebas de antagonismo individual *in vitro*, *Trichoderma*. (A) Parámetros y medidas para la preparación de las pruebas de antagonismo, T3, *Trichoderma atroviride*; T25, *Trichoderma gamsii*; 1, rango de medida del radio para determinar el crecimiento micelial.

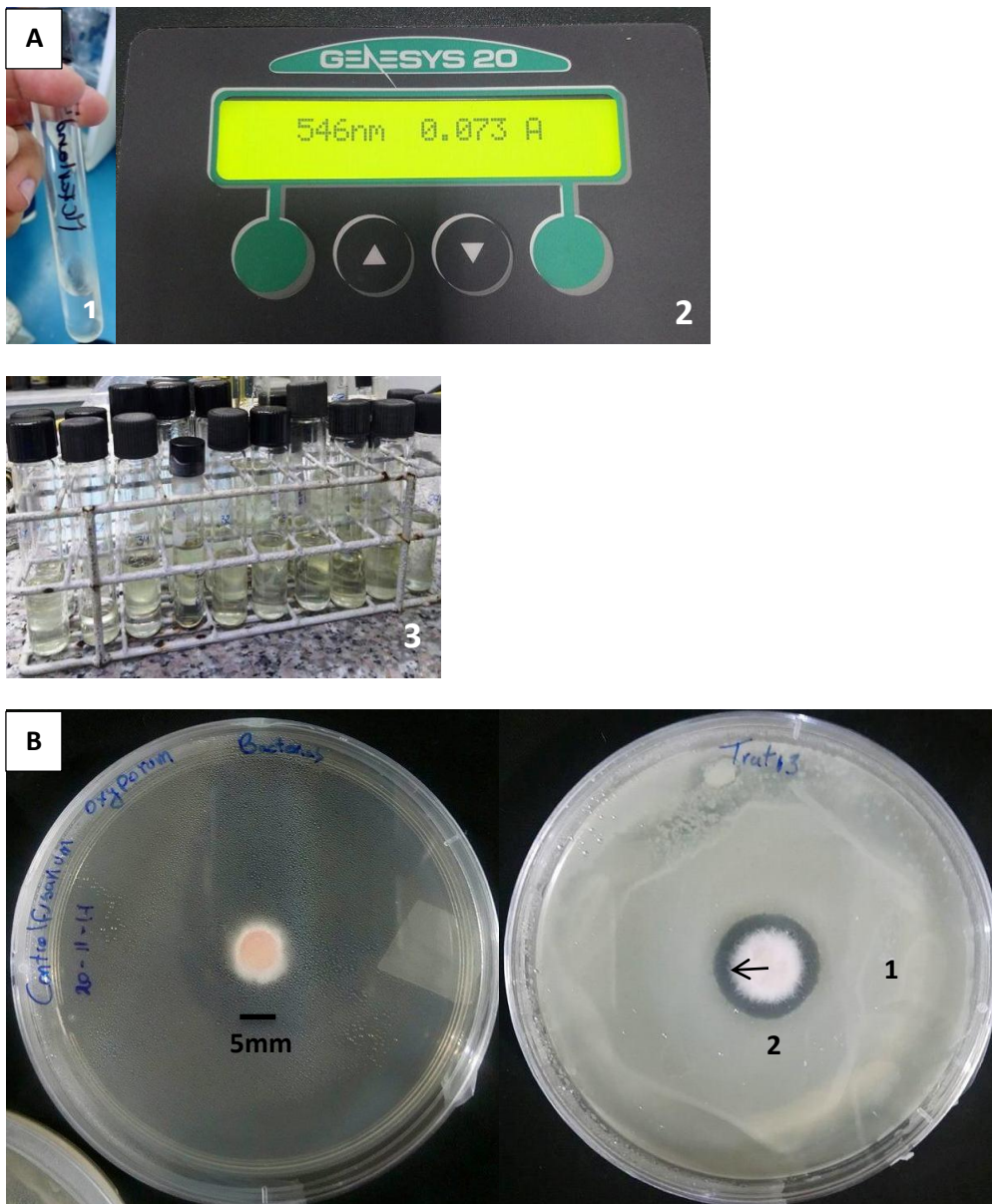


Figura 9. Pruebas de antagonismo individual *in vitro*, *Bacillus*. (A) 1, escala 0.5 de Mc Farland; 2, espectrofotómetro configurado en 546 nm; 3, tubos de agua peptonada para escalar la absorbancia deseada (B) 1, crecimiento de la cepa de *Bacillus* a ser probada; 2, corte de micelio del patógeno y rango de medida del radio para determinar el crecimiento micelial.

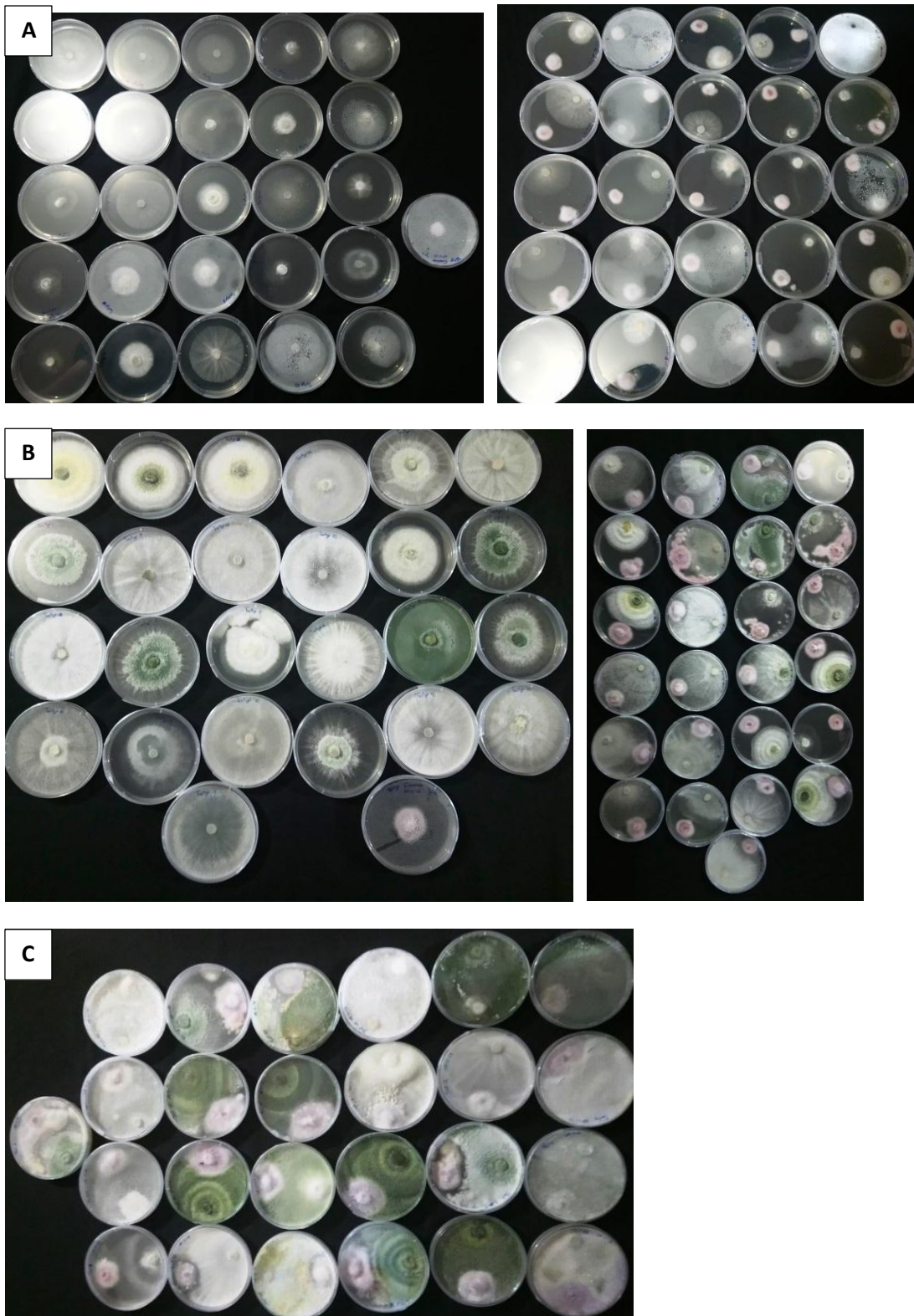


Figura 10. Observación de antagonismo individual *in vitro* de *Trichoderma*. (A) Testigos y enfrentamientos día 2 (B) Testigos y enfrentamientos día 5. (C) Enfrentamientos día 10.

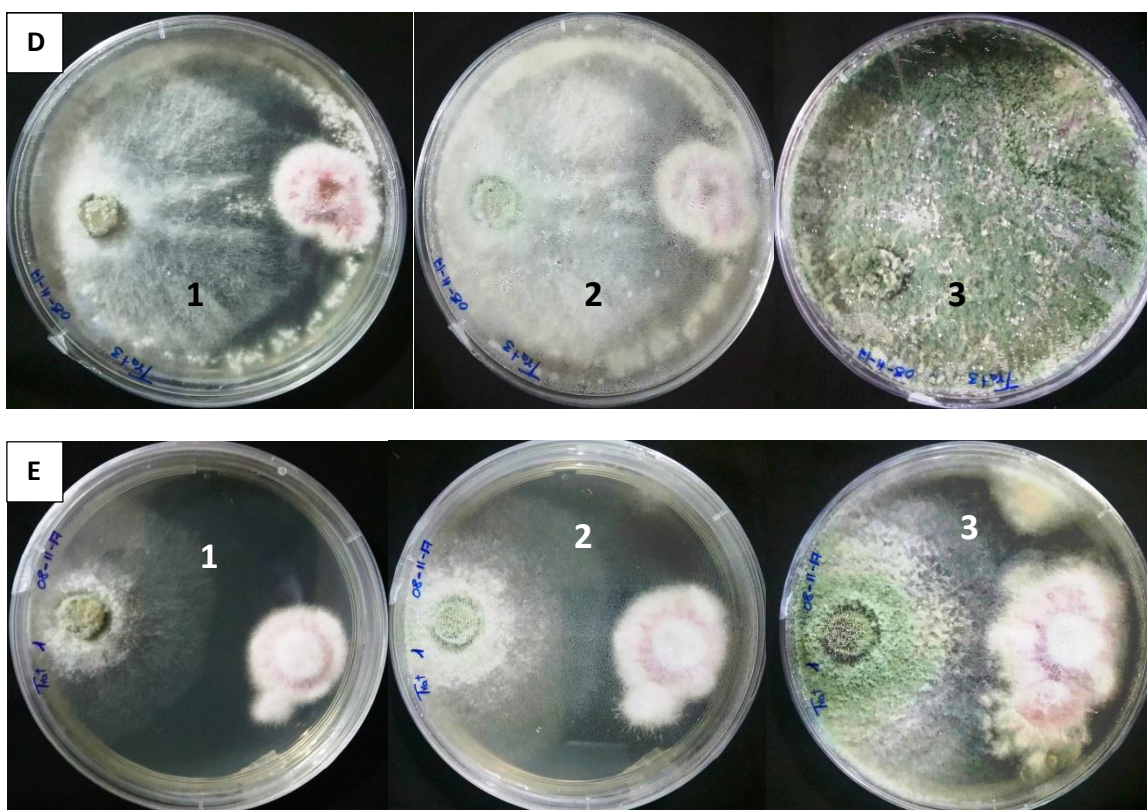


Figura 10. Observación de antagonismo individual *in vitro* de *Trichoderma* (continuación). (D) Aislado 3 con el mejor PICR y rango de micoparasitismo, 1, contacto con el fitopatógeno a los 5 días; 2, cubrimiento del fitopatógeno sin esporulación a los 8 días; 3, cubrimiento total y esporulación sobre la colonia de *Fusarium oxysporum* a los 15 días. (E) Aislado 1 con el PICR menor de todo el grupo y ausencia de micoparasitismo, 1, sin contacto entre las dos colonias a los 5 días; 2, primer contacto con el fitopatógeno a los 8 días; 3, sin señales de crecimiento sobre la colonia de *Fusarium oxysporum* a los 15 días.

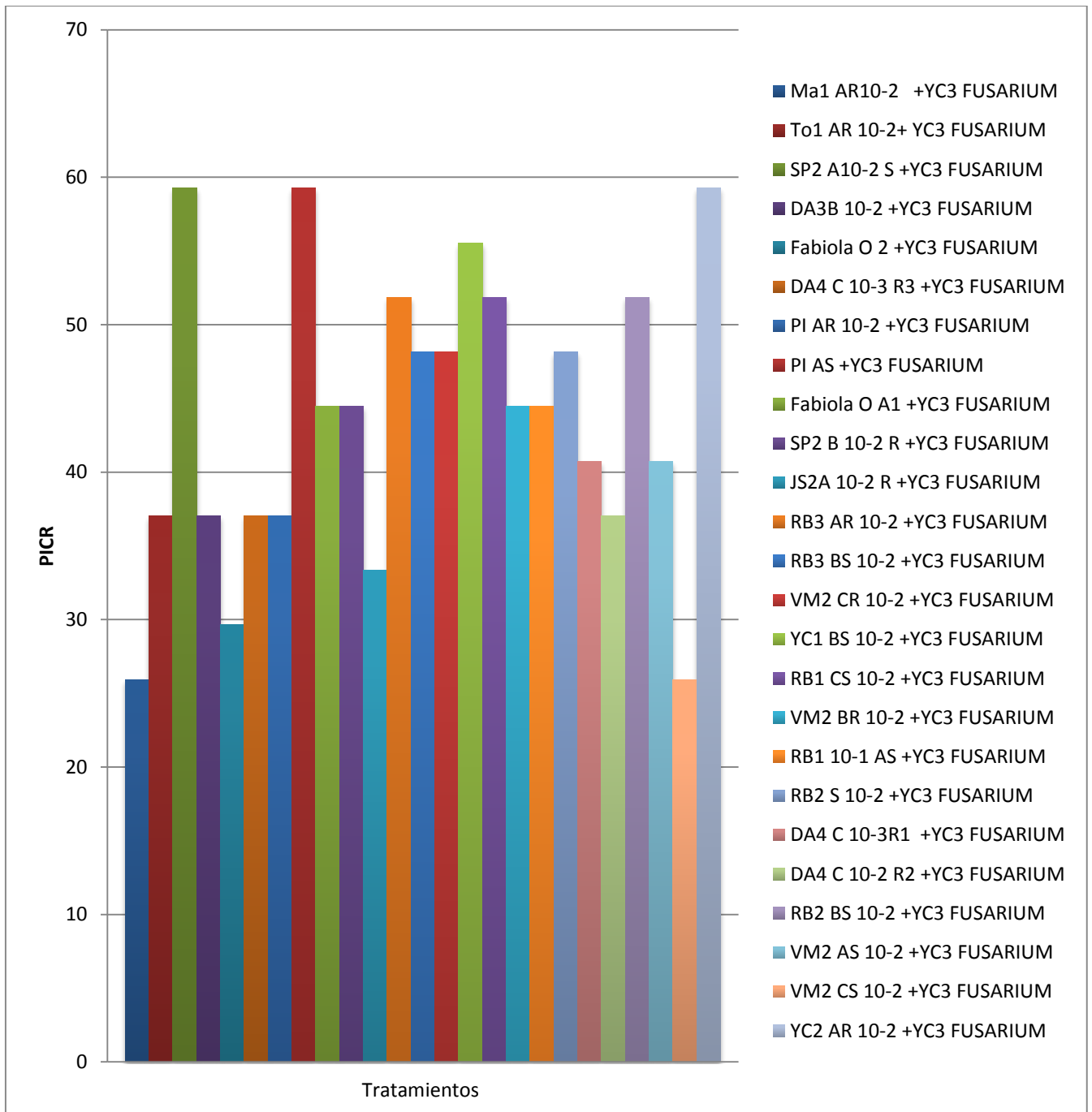


Figura 11. PICR de los diferentes aislados de *Trichoderma*. 7 aislados superan el 50% y son escogidos como potenciales antagonistas.

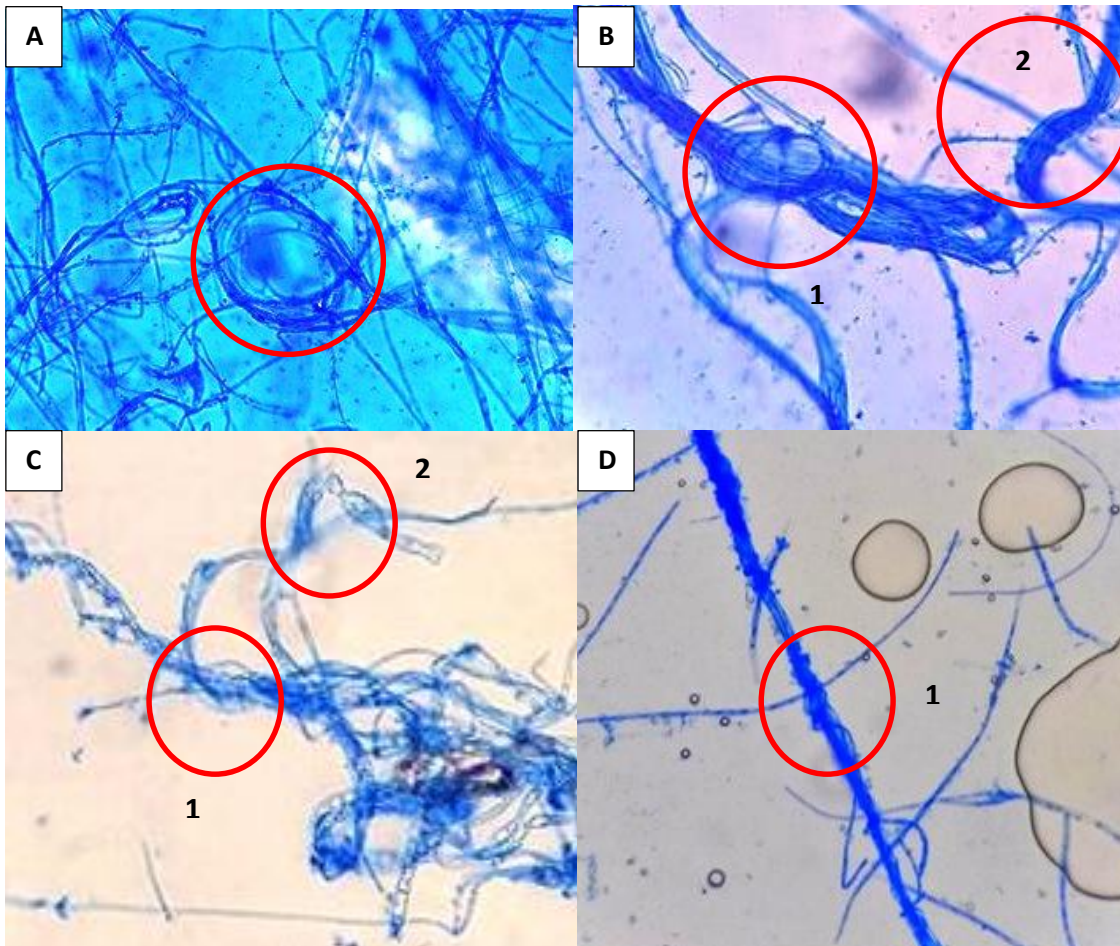


Figura 12. Evaluación del micoparasitismo de *Trichoderma* sobre *Fusarium oxysporum* en los aislados obtenidos. (A) Aislado 20, enrollamiento de las hifas de *Fusarium*. (B) Aislado 23, 1, enrollamiento; 2, micoparasitismo. (C) Aislado 26, 1, micoparasitismo; 2, lisis de hifas patógenas. (D) Aislado 3, 1, micoparasitismo.

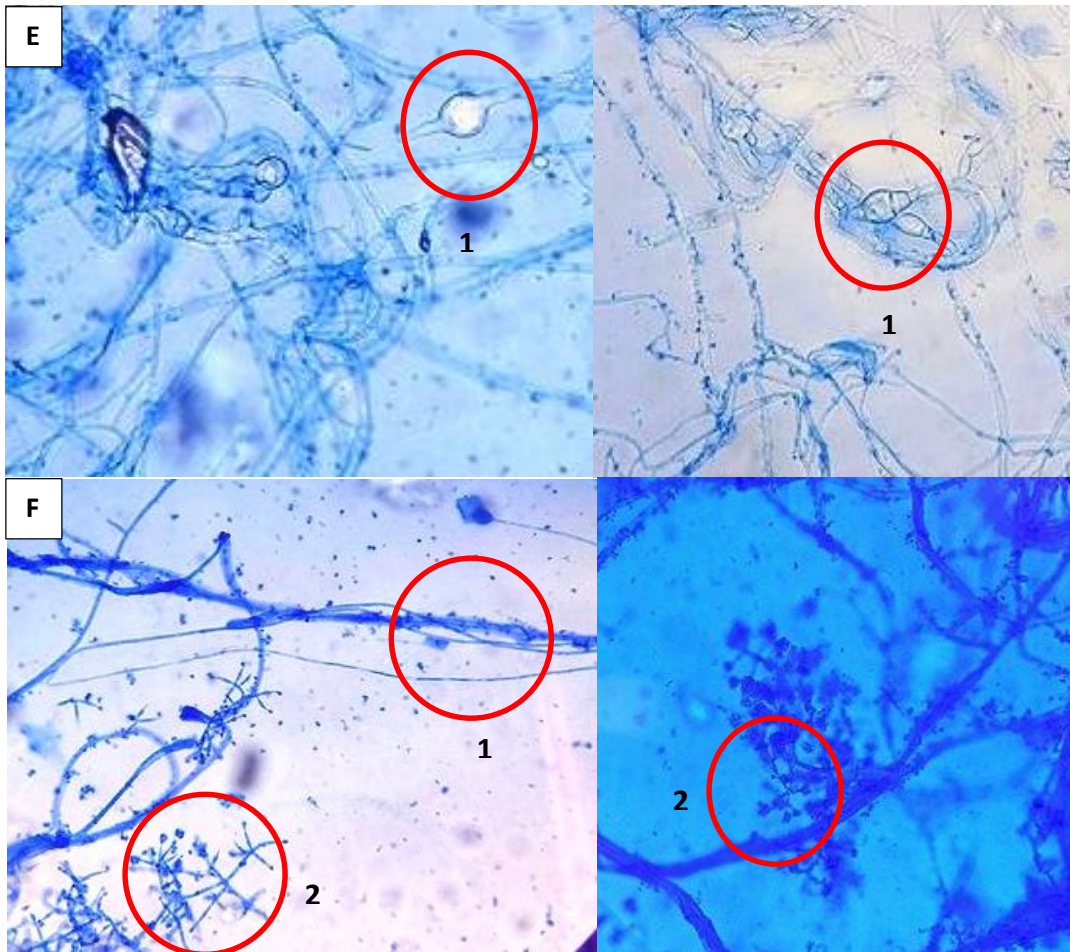


Figura 12. Evaluación del micoparasitismo de *Trichoderma* sobre *Fusarium oxysporum* en los aislados obtenidos (continuación). (E) Aislado 26, 1, formación de clamidosporas. (F) Aislado 23, 1, micoparasitismo; 2, esporulación.

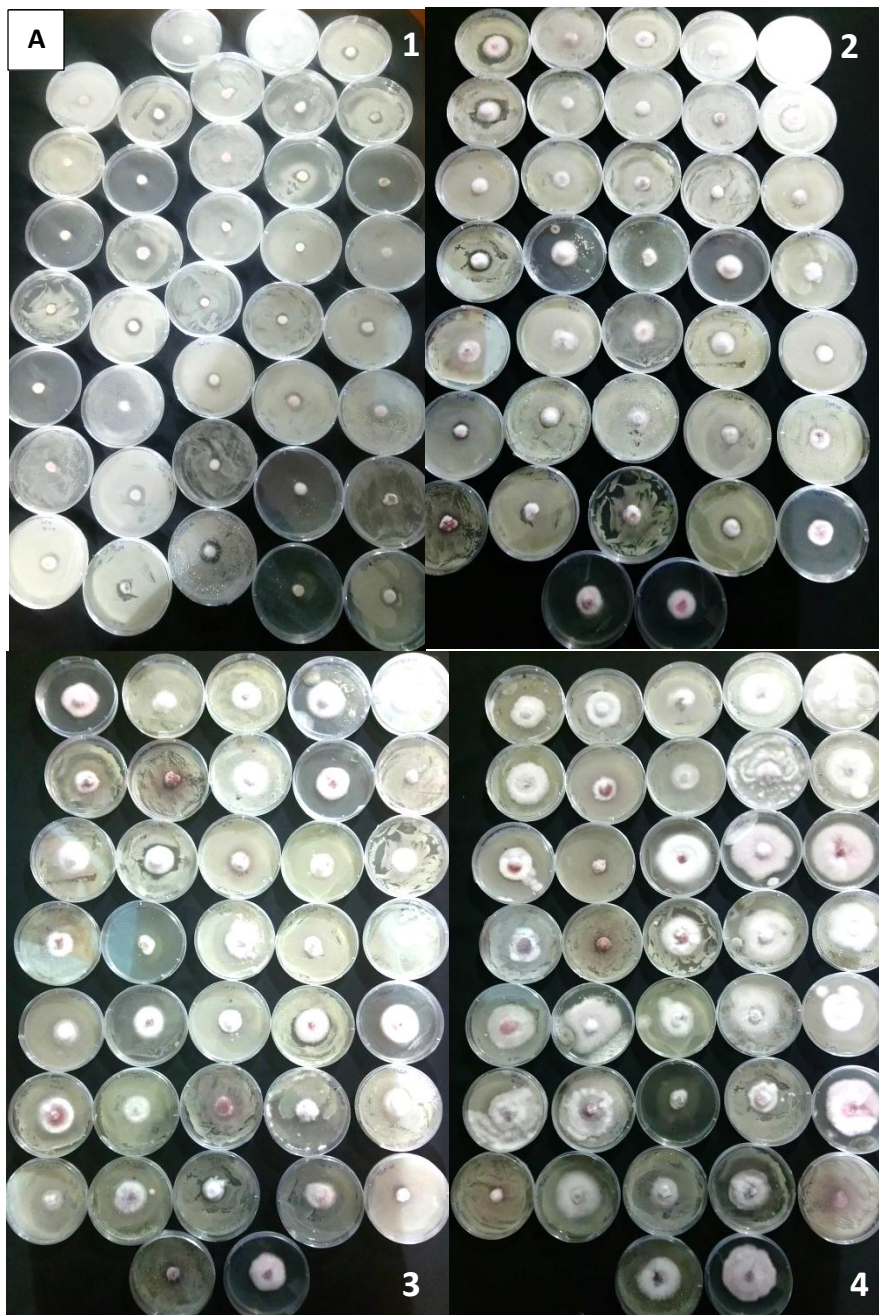


Figura 13. Observación de antagonismo individual *in vitro* de *Bacillus*. (A) 1, enfrentamientos día 2; 2, enfrentamientos día 5; 3, enfrentamientos día 7; 4, enfrentamientos día 11.

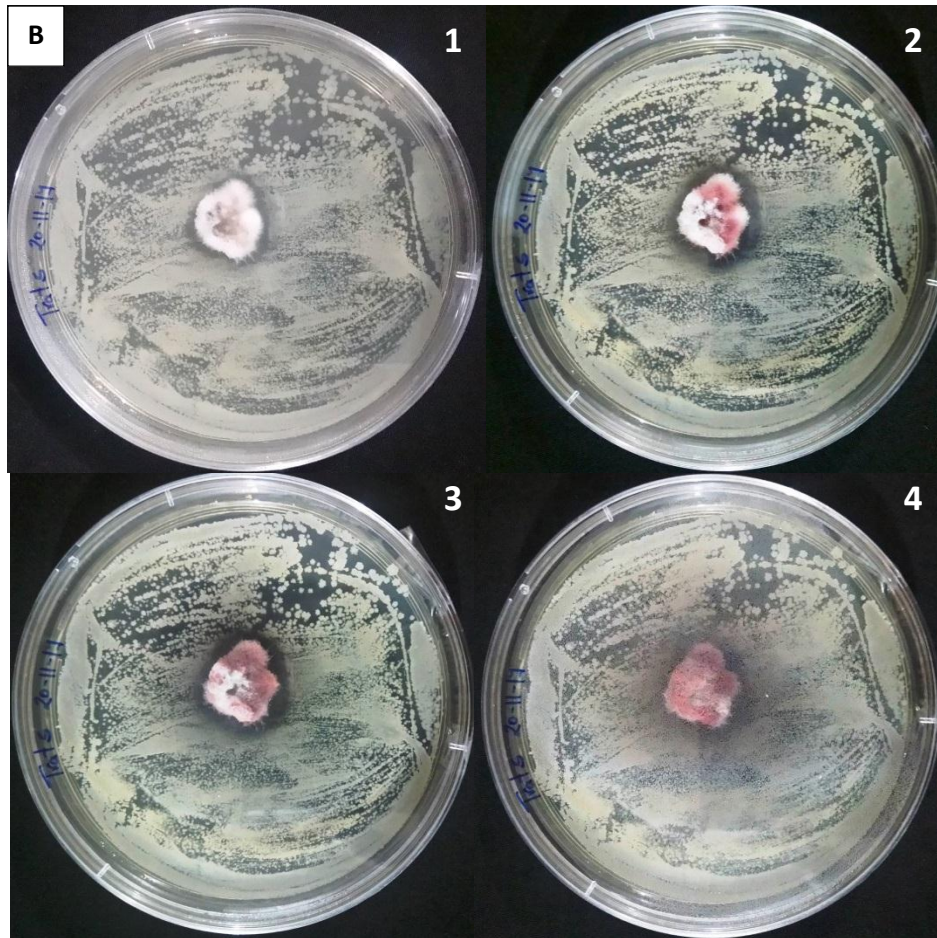


Figura 13. Observación de antagonismo individual *in vitro* de *Bacillus* (continuación...). (B) Aislado 3 con un porcentaje de inhibición positivo, 1, enfrentamiento a los 3 días; 2, enfrentamiento a los 5 días; 3, enfrentamiento a los 7 días; 4, enfrentamiento a los 11 días.

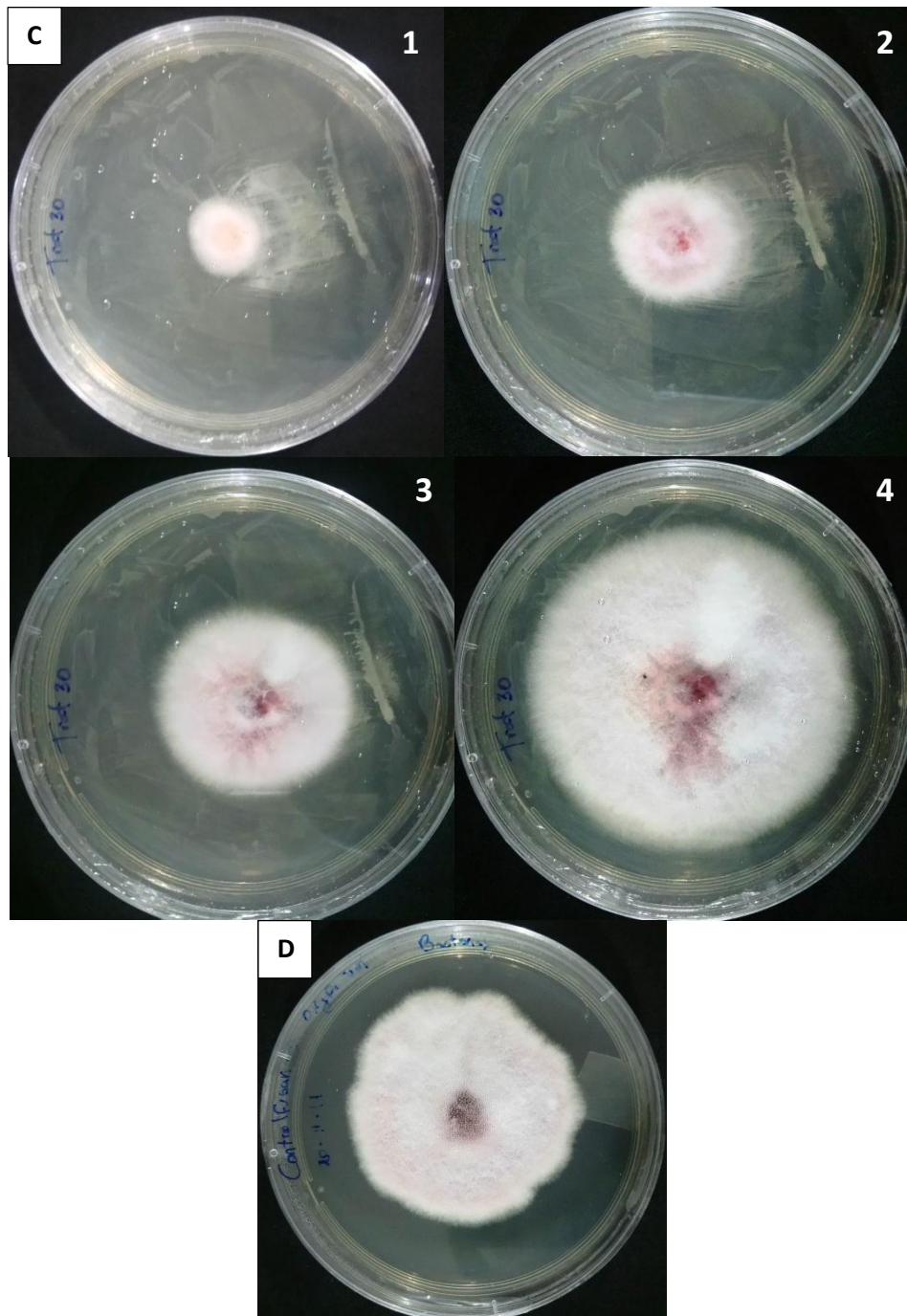


Figura 13. Observación de antagonismo individual *in vitro* de *Bacillus* (continuación). (C) Aislado 30 con un porcentaje de inhibición 0 o negativo, 1, enfrentamiento a los 3 días; 2, enfrentamiento a los 5 días; 3, enfrentamiento a los 7 días; 4, enfrentamiento a los 11 días. (D) Control *Fusarium oxysporum*.

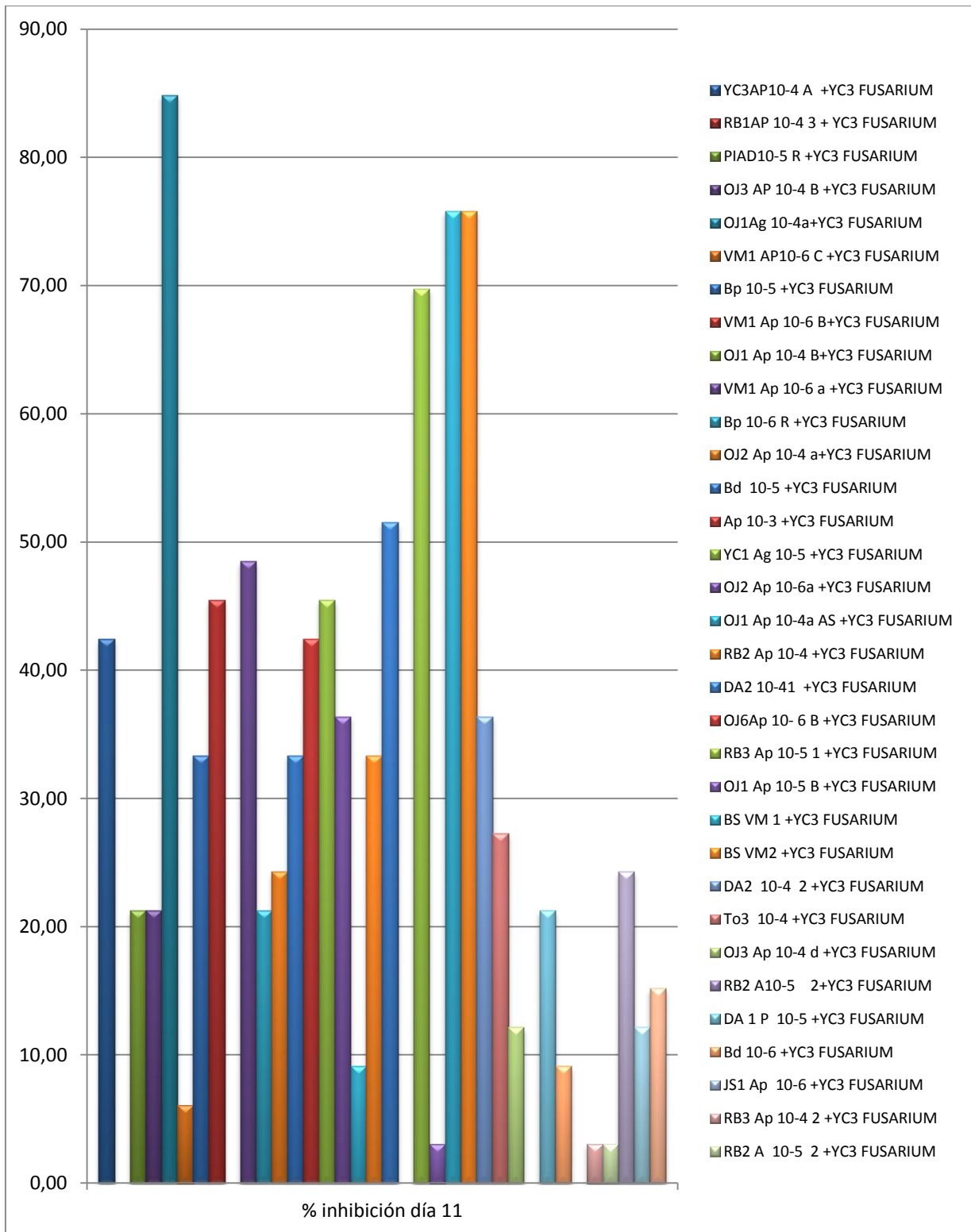


Figura 14. Porcentaje de inhibición de *Bacillus* sobre *Fusarium oxysporum*. 3 aislados superan el 70% de inhibición y fueron clasificados como positivos. Adicionalmente se escogió el aislado 22 con un 69,70%

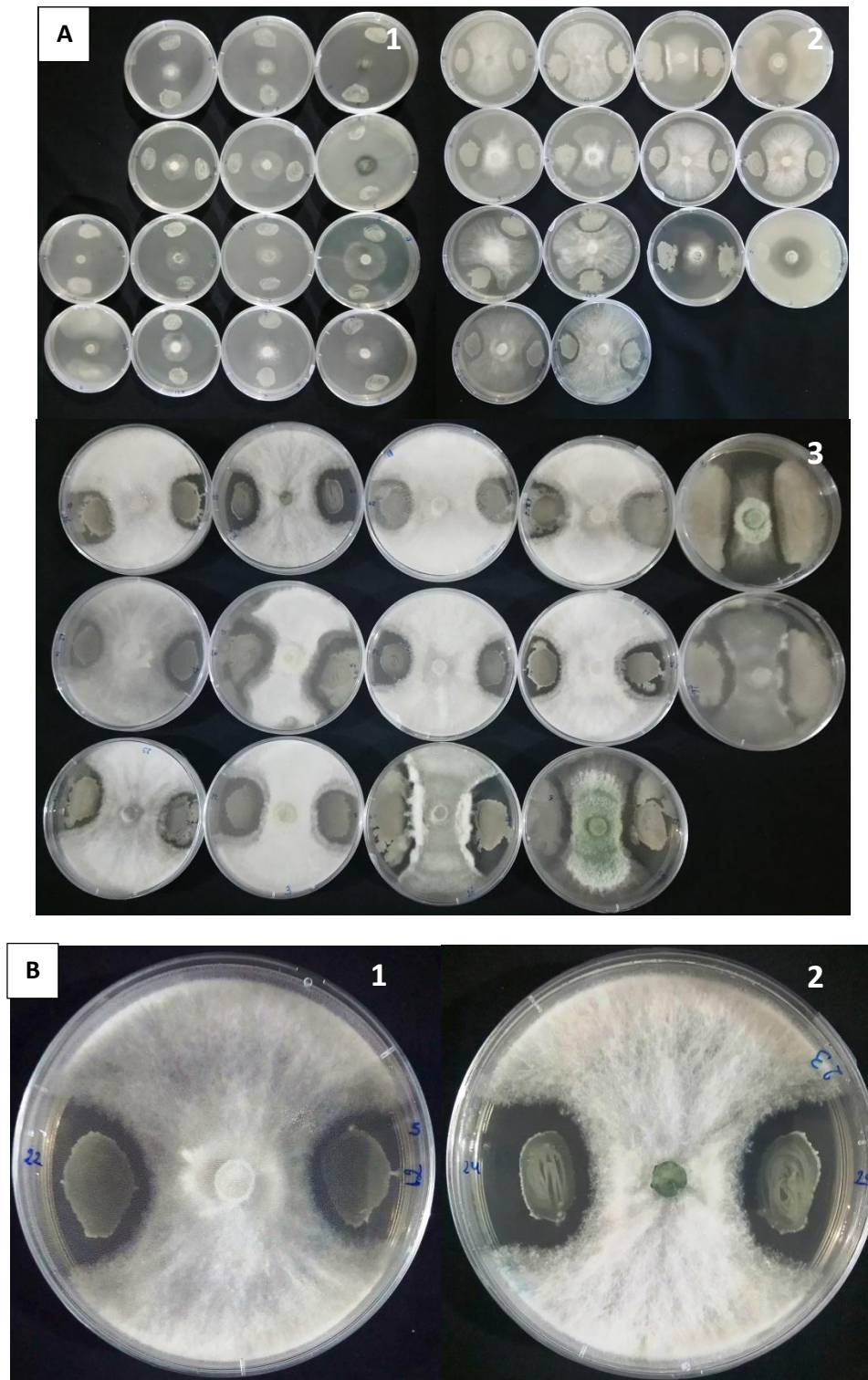


Figura 16. Pruebas de compatibilidad *Bacillus* 70%, grupo. (A) 1, combinaciones día 1; 2, combinaciones día 3; 3, combinaciones día 5. (B) 1, combinación 12-22 y 12- 5 día 5, presencia de halos de inhibición; 2, combinaciones 23-24 y 23-25 día 5, presencia de halos de inhibición.

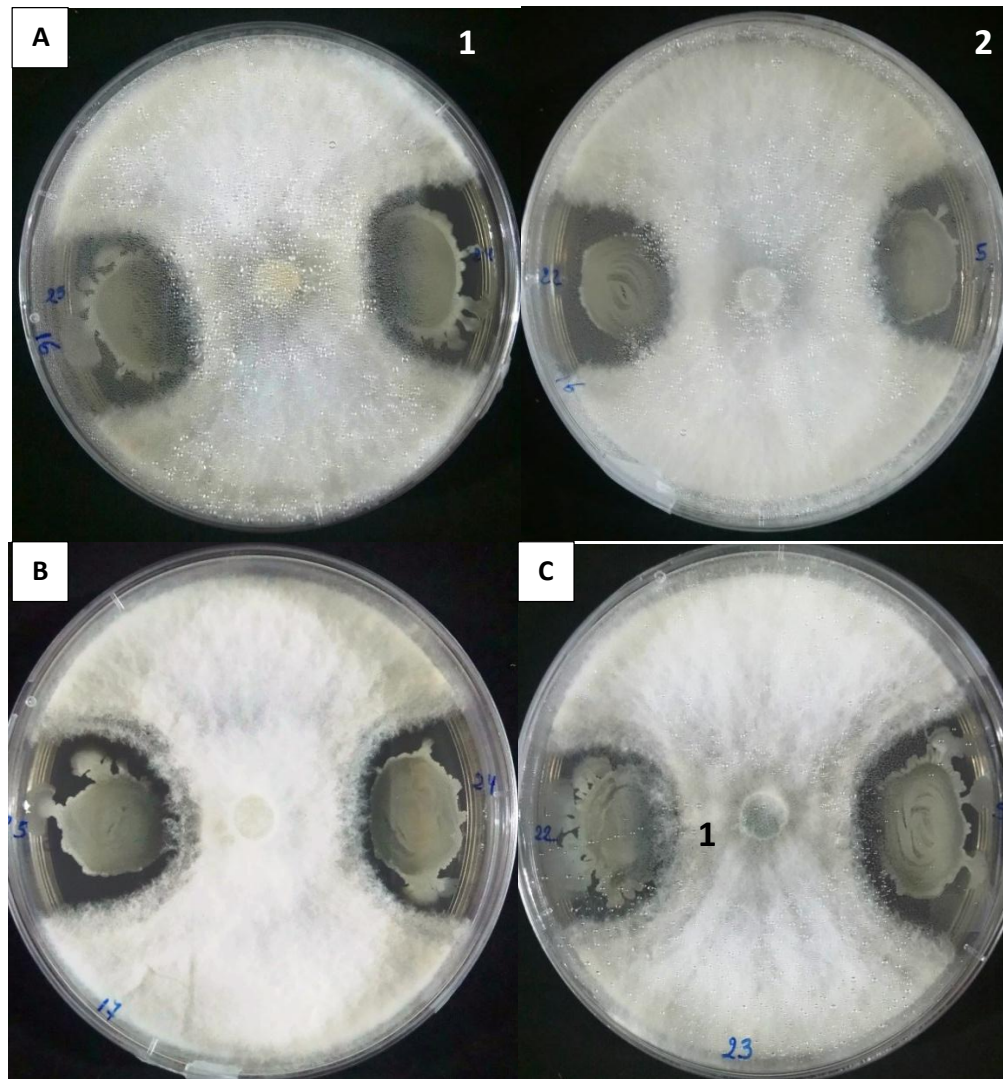


Figura 17. Pruebas de compatibilidad *Bacillus* 70%, individual. Leve contacto entre hongo y bacteria, día 5. (A) *Trichoderma tomentosum*, 1, combinaciones 16-24 y 16-25; 2, combinaciones 16-22 y 16-5 (B) *Trichoderma gamsii*, combinaciones 17-24 y 17-25 (C) *Trichoderma gamsii*, 1, combinación 23-22.

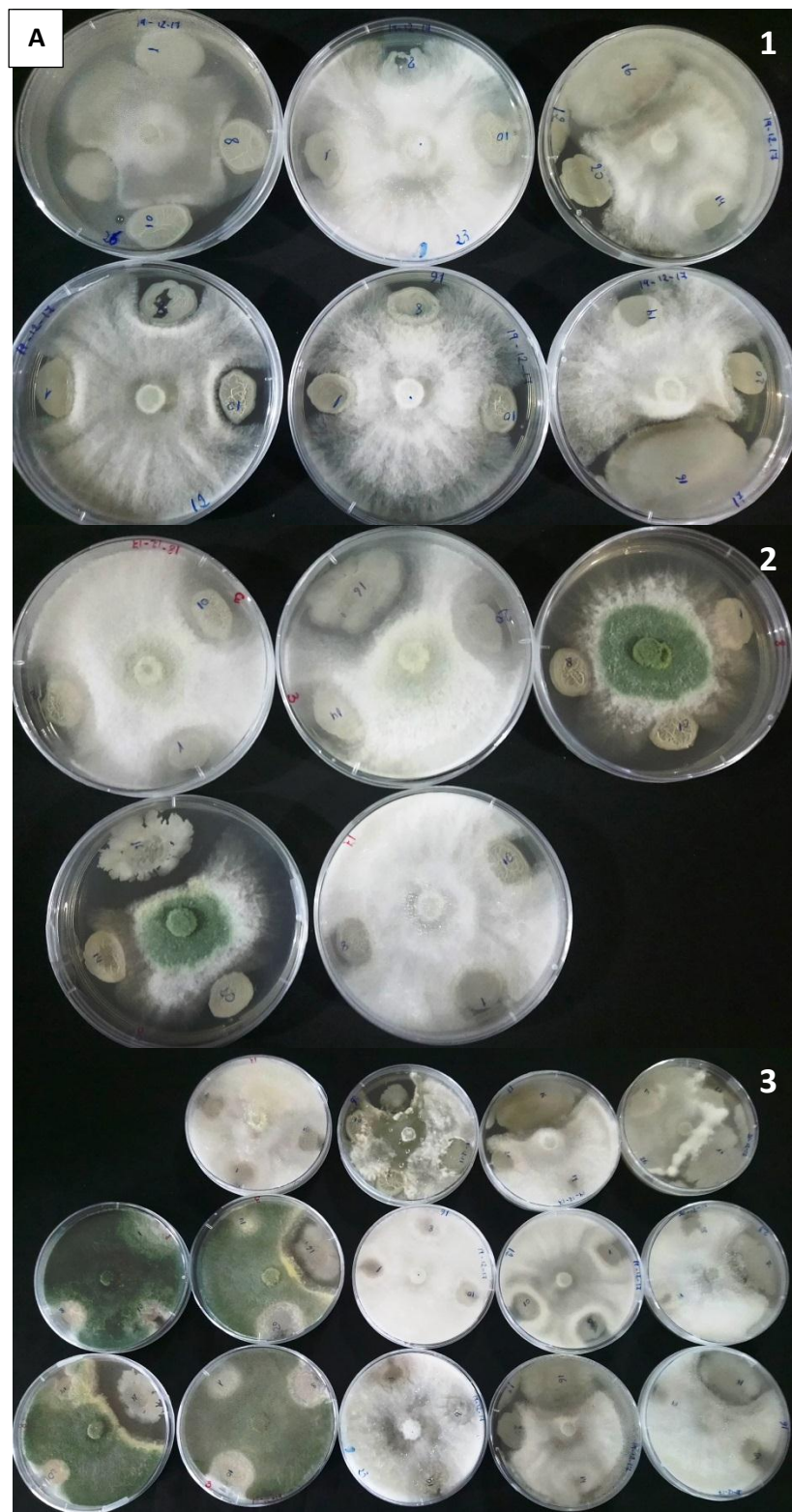


Figura 18. Pruebas de compatibilidad *Bacillus* 40-50%. (A) 1, combinaciones día 3; 2, combinaciones día 4; 3, combinaciones día 5.

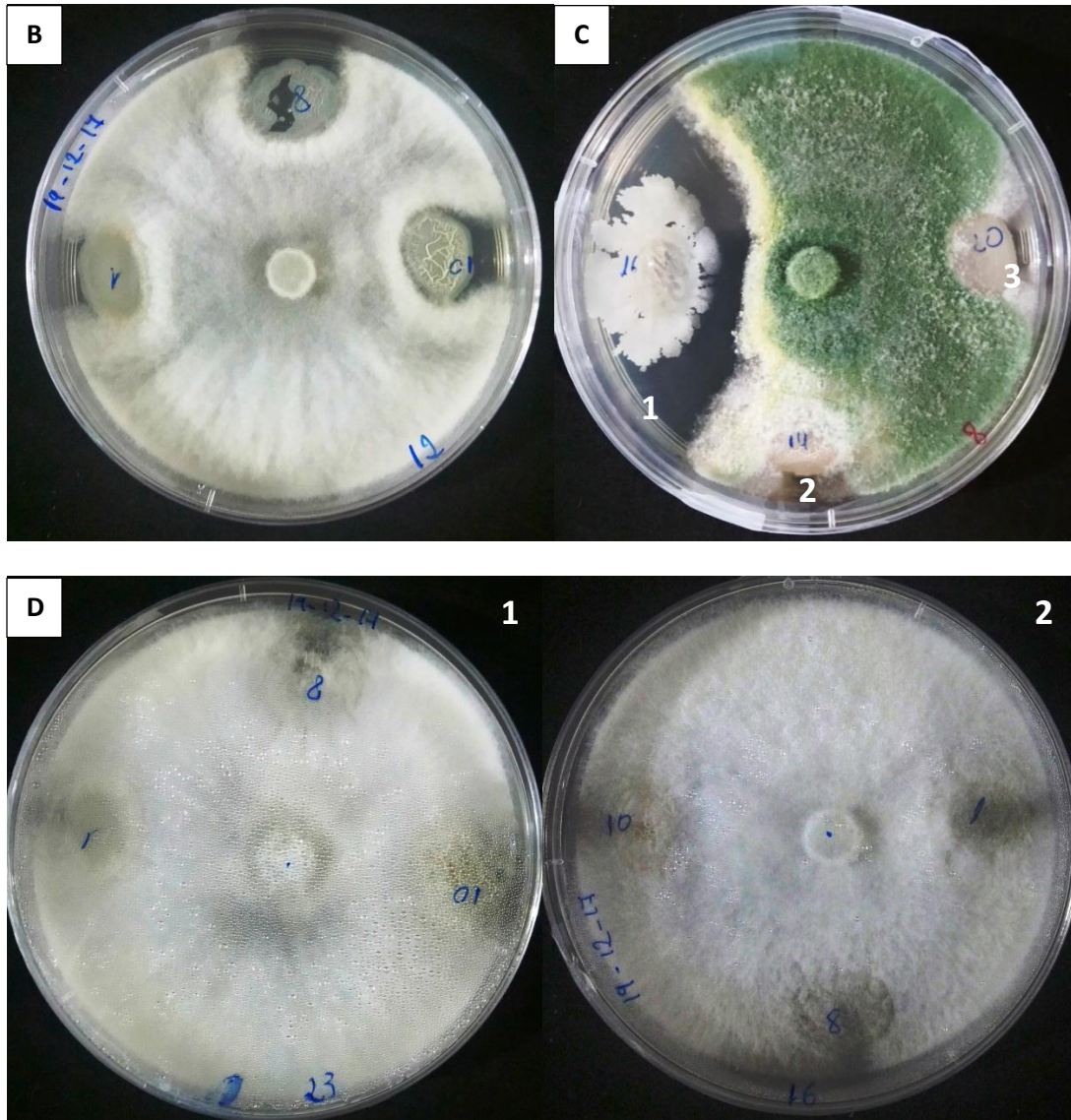


Figura 18. Pruebas de compatibilidad *Bacillus* 40-50% (continuación...). (B) Combinaciones 12-1, 12-8, 12-10 incompatibles. (C) 1, combinación 8-16 incompatible; 2, combinación 8-14 compatible; 3, combinación 8-20 leve crecimiento. (D) Aislados fúngicos más compatibles de todo el grupo, 1, combinaciones 23-1, 23-8, 23-10 compatibles; 2, combinaciones 16-1, 16-8, 16-10 compatibles.

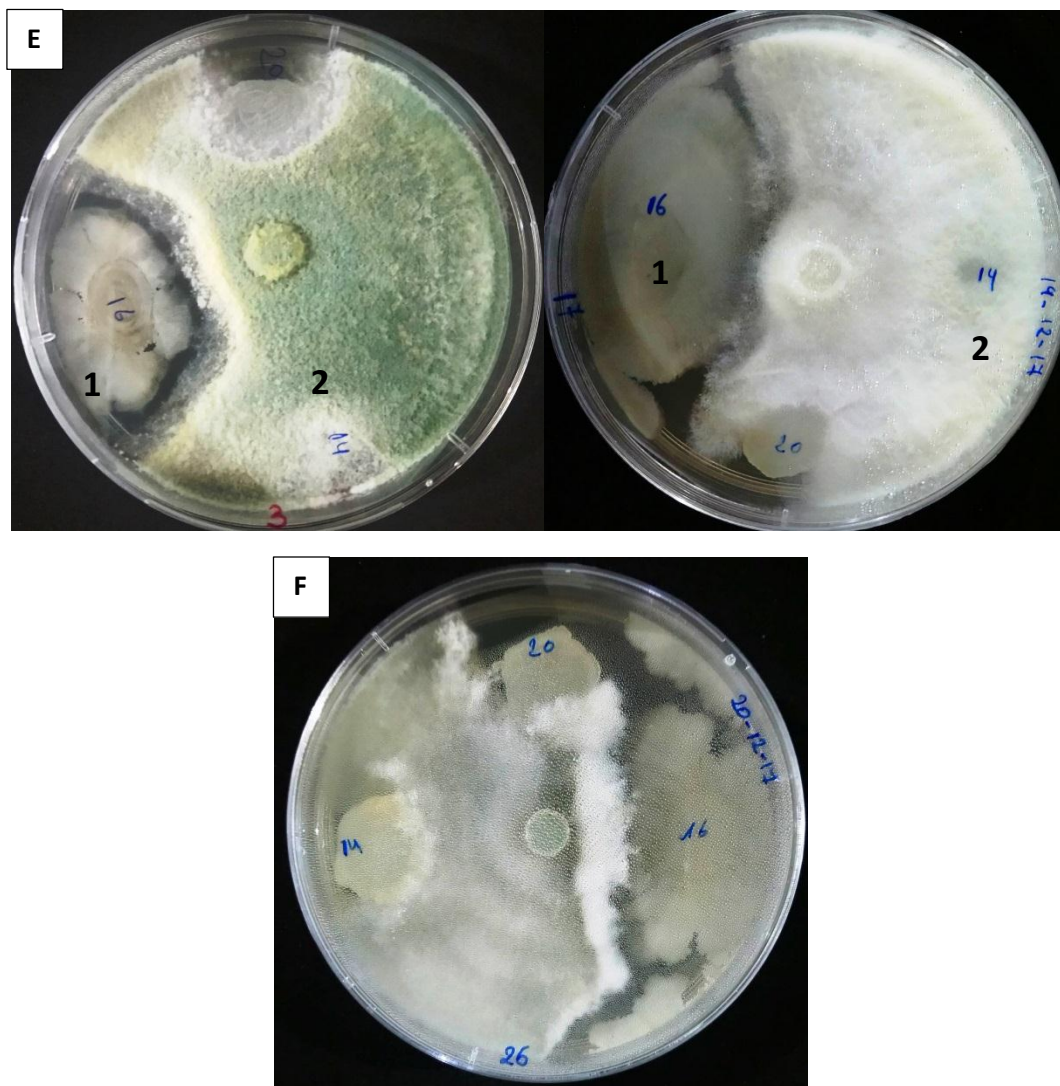


Figura 18. Pruebas de compatibilidad *Bacillus* 40-50% (continuación). (E) 1, aislado bacteriano 16, menos compatible del grupo, correspondiente a *Bacillus subtilis*; 2, aislado bacteriano 14, más compatible del grupo, correspondiente a *Bacillus cereus*. (F) Aislado fúngico 26, menos compatible del grupo, correspondiente a *Trichoderma hamatum*.

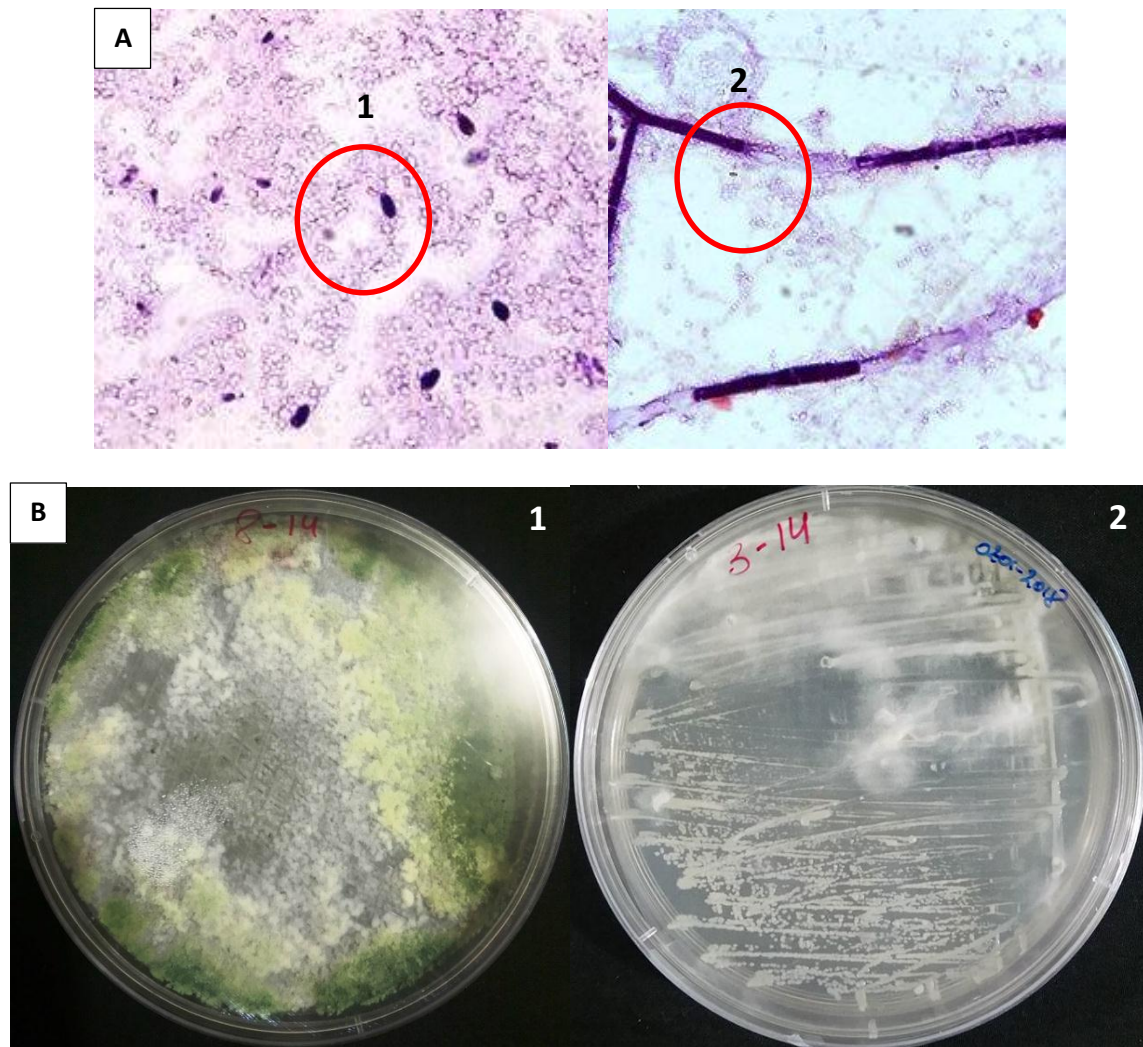


Figura 19. Comprobación de compatibilidad con *Bacillus cereus*. (A) Gram directo de la colonia bacteriana cubierta, 1, esporas fúngicas y cápsulas bacterianas en la combinación 16-1; 2, hifas y cápsulas bacterianas a su alrededor en la combinación 16-14. (B) Repique de la colonia de *Bacillus* cubierta, 1, combinación 8-14 crecimiento de *Trichoderma gamsii* y *Bacillus cereus*; 2, combinación 3-14 crecimiento de *Trichoderma atroviride* y *Bacillus cereus*.

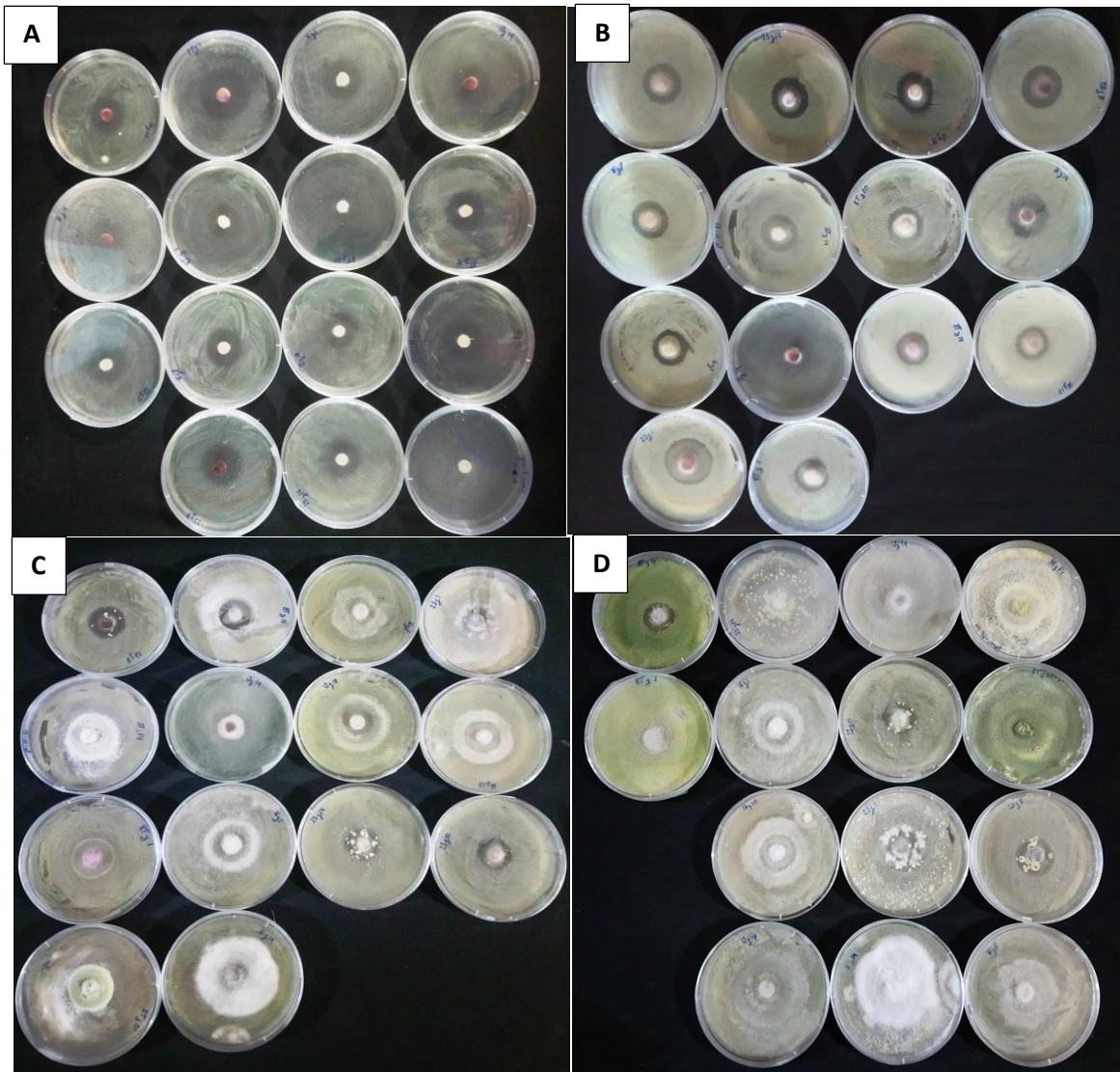


Figura 20. Pruebas de antagonismo conjunto. (A) Combinaciones compatibles contra *Fusarium oxysporum* día 1. (B) Combinaciones compatibles día 3. (C) Combinaciones compatibles día 6. (D) Combinaciones compatibles día 11.

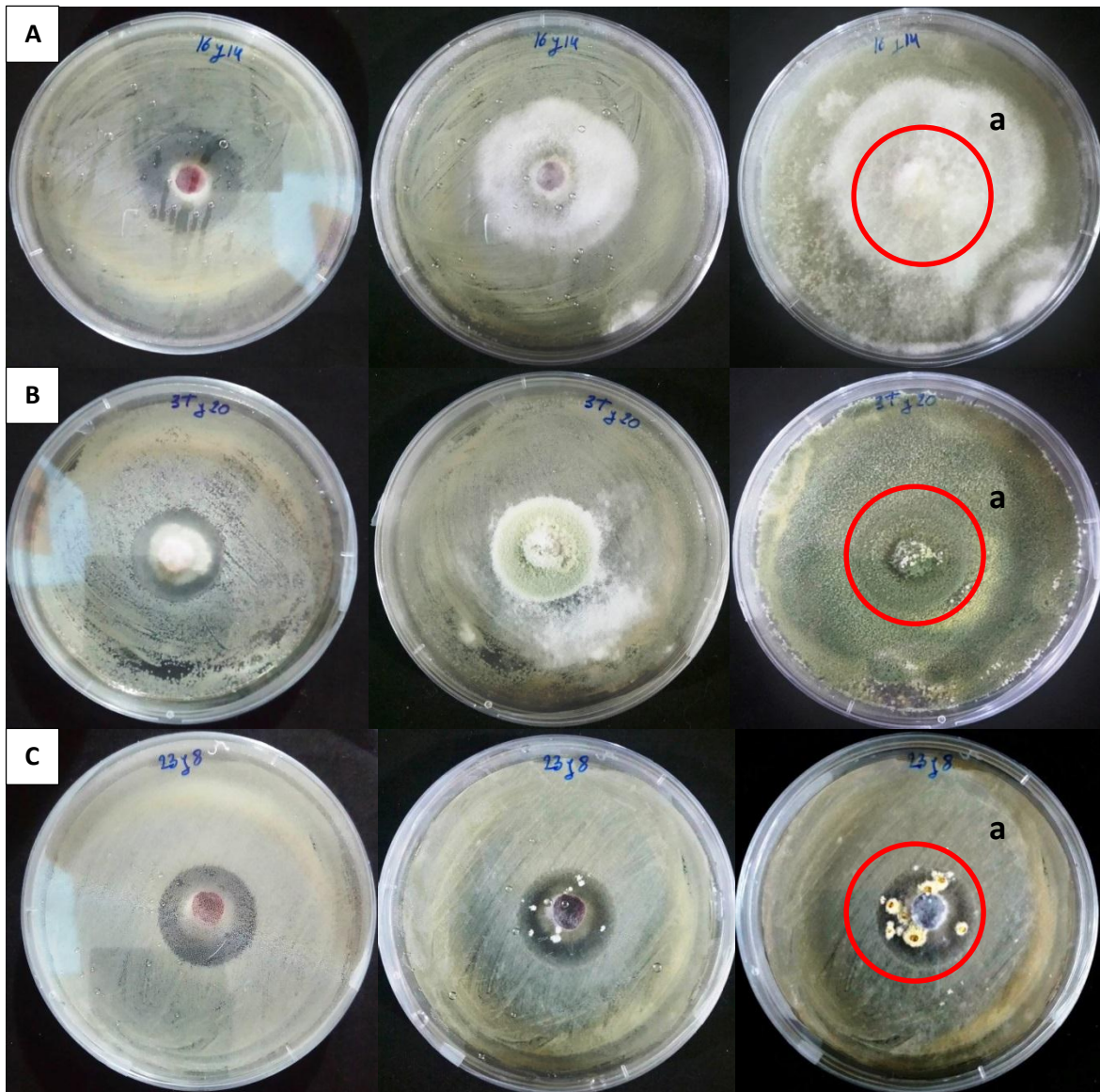


Figura 21. Pruebas de antagonismo conjunto. (A) Combinación compatible 16 y 14, días 3, 6, 11, a, patógeno cubierto completamente. (B) Combinación compatible 3 y 20, días 3, 6, 11, a, patógeno cubierto y esporulación de *Trichoderma*. (C) Combinación compatible 23 y 8, días 3, 6, 11, a, crecimiento del patógeno controlado y rodeado de pequeñas colonias de *Trichoderma* con exudados.

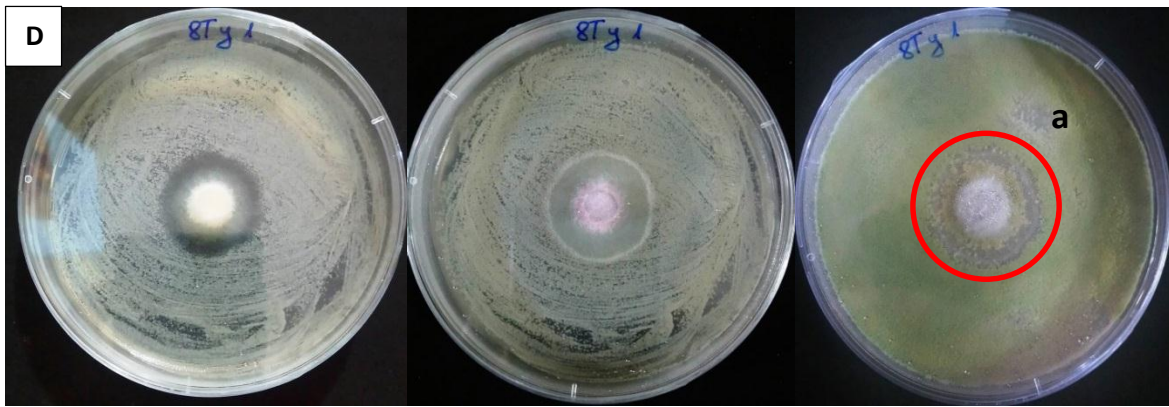


Figura 21. Pruebas de antagonismo conjunto (continuación). (D) Combinación compatible 8 y 1, días 3, 6, 11, a, patógeno rodeado por el antagonista y ligeramente cubierto.

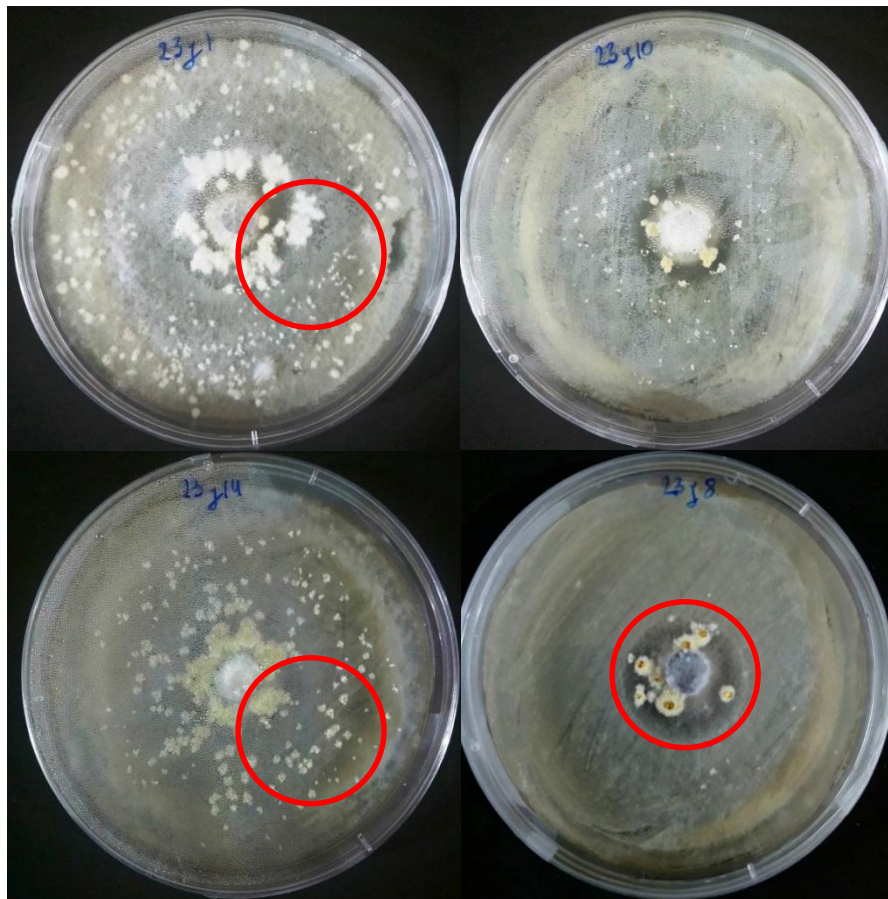


Figura 22. Combinaciones con presencia de exudados de *Trichoderma*. Exudados color marrón en la superficie de las colonias de la cepa 23 de *Trichoderma gamsii*.

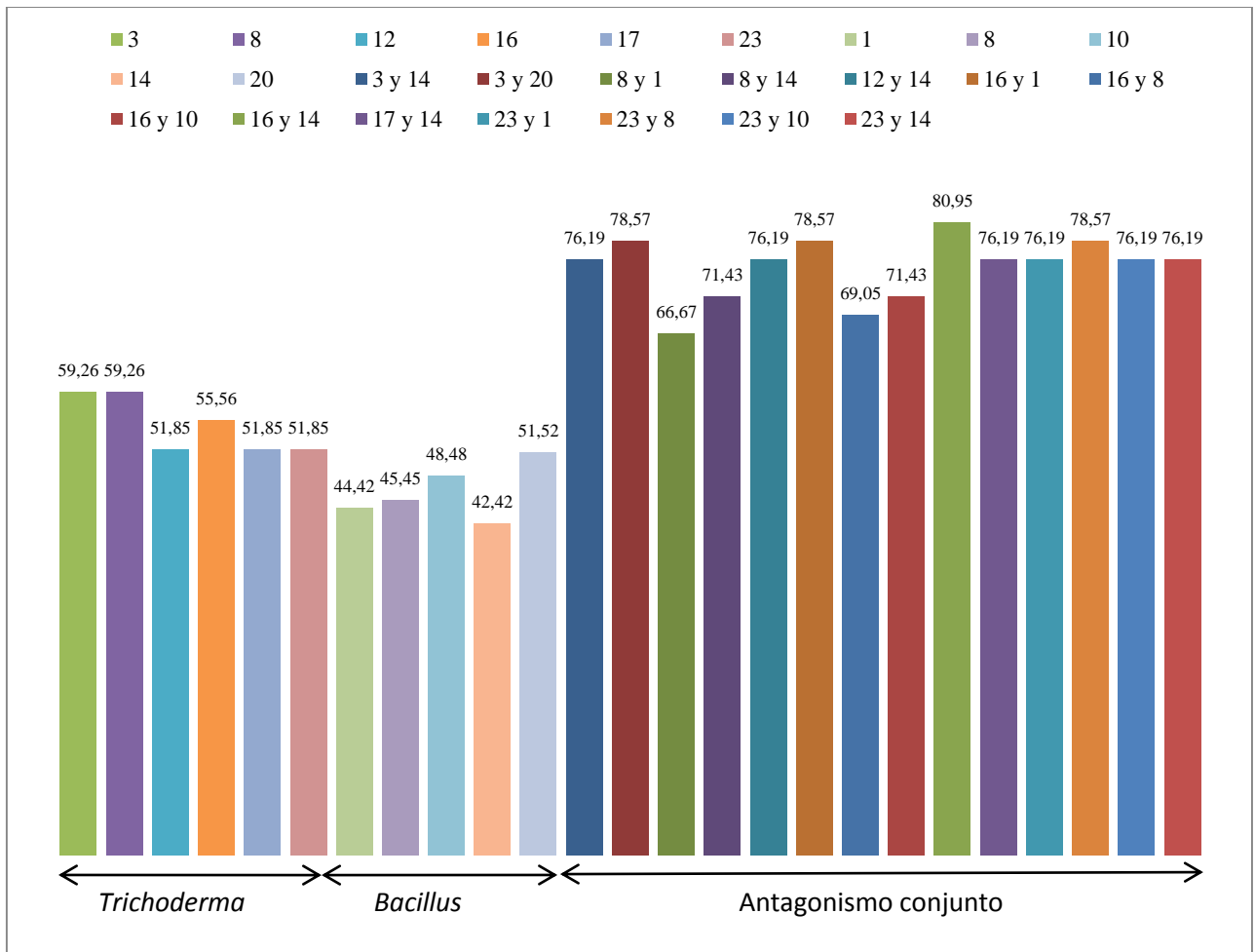


Figura 23. Comparación entre el porcentaje de inhibición micelial invidual y conjunto de las cepas compatibles. La inhibición micelial del patógeno *Fusarium oxysporum* por antagonismo conjunto es superior a la inhibición por antagonismo individual de *Trichoderma* y *Bacillus* con valores superiores al 50%.

9. TABLAS

Tabla 1. Aislados de *Trichoderma* por morfología.


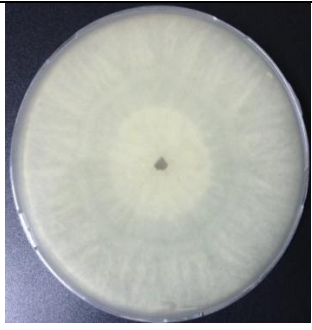
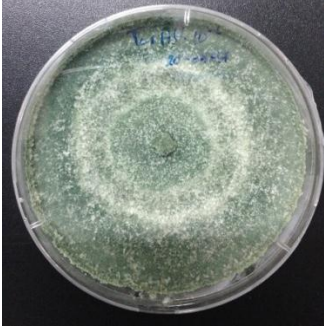

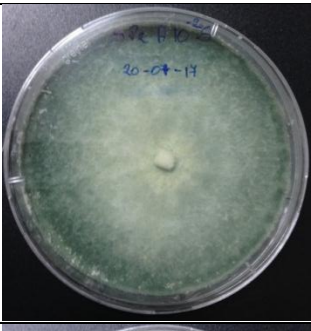

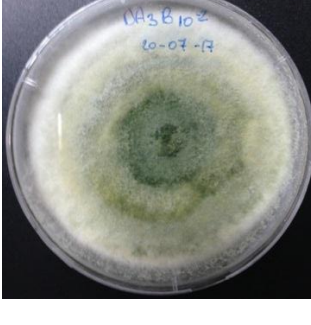

No	Codificación	Localidad	Anverso	Reverso
1	Ma 1 AR 10 ⁻²	Pichincha-Ascázubi		
2	To1 AR 10 ⁻²	Pichincha-Tomalón		
3	SP2 AS 10 ⁻²	Cotopaxi-Salcedo-Pataín		
4	DA3 B 10 ⁻²	Tungurahua - Ambato		

Tabla 1. Aislados de *Trichoderma* por morfología (continuación...).

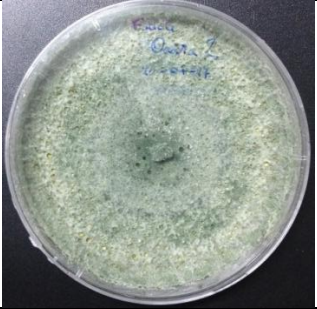



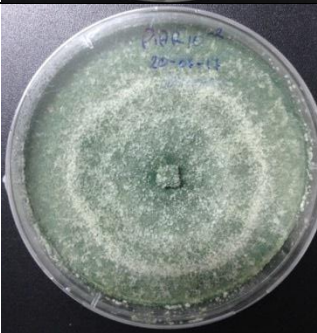
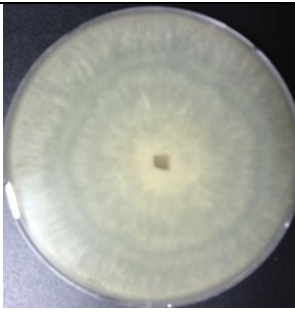


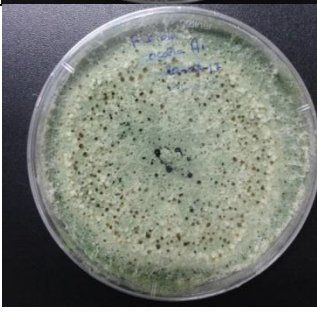

5	Fabiola Ocaña 2	Tungurahua-Quero		
6	DA4 C 10 ⁻³ R3	Tungurahua-Ambato		
7	PIAR 10 ⁻²	Pichincha, San Isidro-Pintag		
8	PIAS	Pichincha, San Isidro-Pintag		
9	Fabiola O A1	Tungurahua-Quero		

Tabla 1. Aislados de *Trichoderma* por morfología (continuación...).

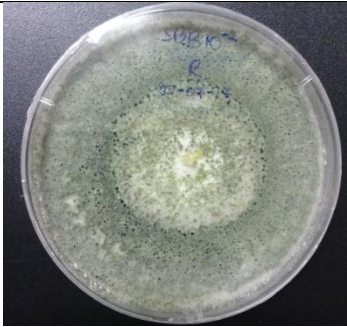

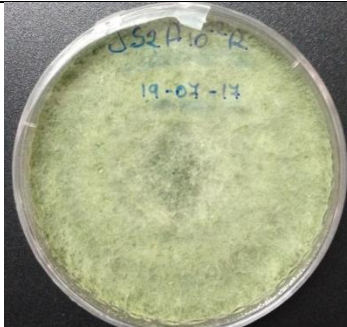

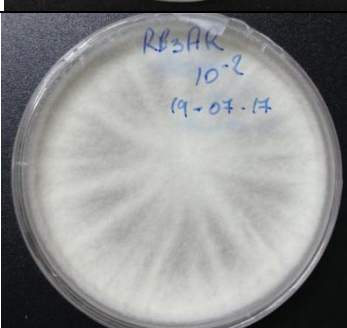
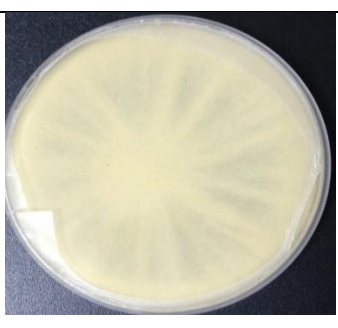
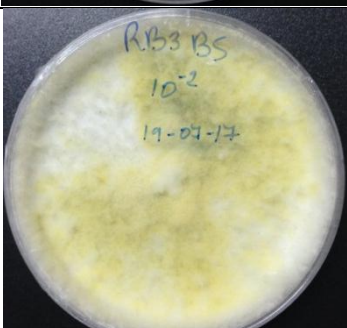

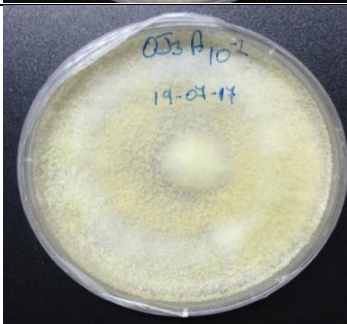

10	SP2B 10 ⁻² R	Cotopaxi- Salcedo- Pataín		
11	JS2 A 10 ⁻² R	Tungurahua – Quero		
12	RB3 AR 10 ⁻²	Cotopaxi- Latacunga		
13	RB3 BS 10 ⁻²	Cotopaxi- Latacunga		
14	OJ3 A 10 ⁻²	Cotopaxi – Salcedo- San Marcos		

Tabla 1. Aislados de *Trichoderma* por morfología (continuación...).



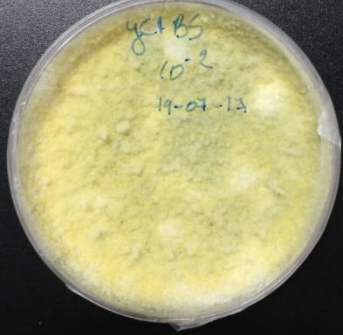

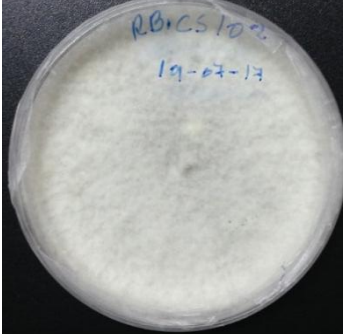



15	VM2 C R 10 ⁻²	Imbabura- Quiroga		
16	YC1 BS 10 ⁻²	Imbabura- Quiroga		
17	RB1 CS 10 ⁻²	Cotopaxi- Latacunga		
18	VM2 BR 10 ⁻²	Imbabura- Quiroga		

Tabla 1. Aislados de *Trichoderma* por morfología (continuación...).



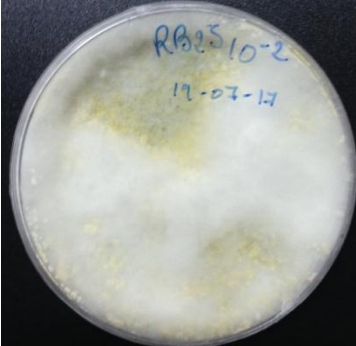
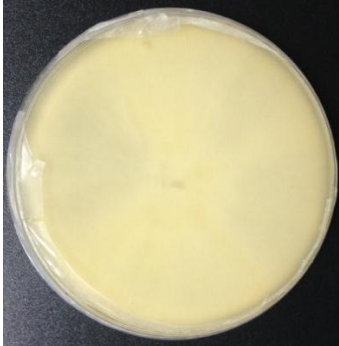
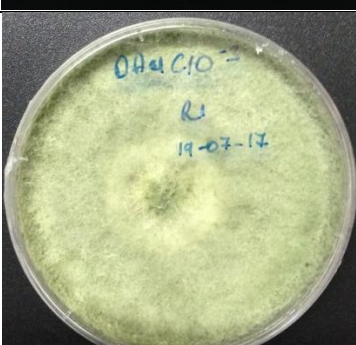

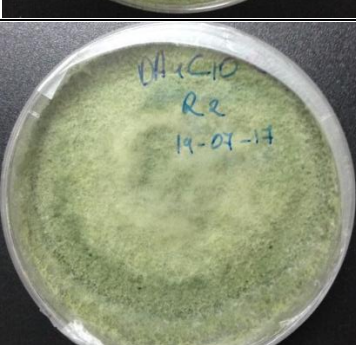

19	RB1 10 ⁻² AS	Cotopaxi-Latacunga		
20	RB2 S 10 ⁻²	Cotopaxi-Latacunga		
21	DA4 C 10 ⁻³ R1	Tungurahua - Ambato		
22	DA4 C 10 ⁻² R2	Tungurahua - Ambato		

Tabla 1. Aislados de *Trichoderma* por morfología (continuación).

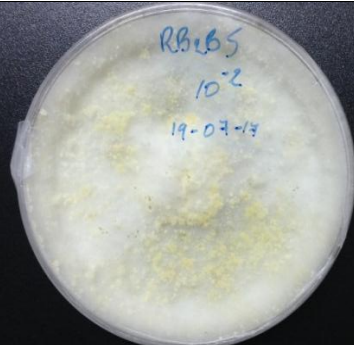

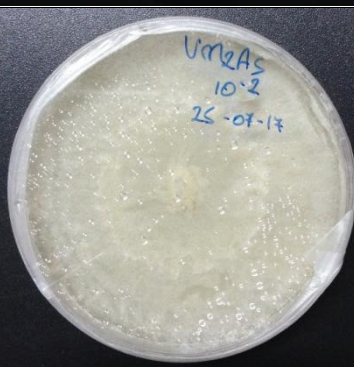



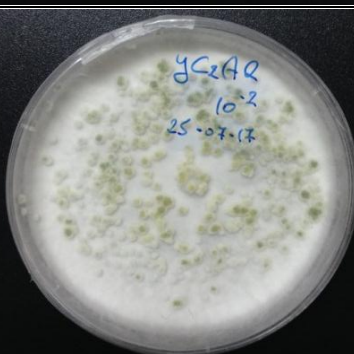

23	RB2 BS 10 ⁻²	Cotopaxi-Latacunga		
24	VM2 AS 10 ⁻²	Imbabura-Quiroga		
25	VM2 CS 10 ⁻²	Imbabura-Quiroga		
26	YC2 AR 10 ⁻²	Imbabura-Quiroga		

Tabla 2. Aislados de *Bacillus* por morfología y pruebas químicas.






No	Codificación	Localidad	Anverso
1	YC3AP10 ⁻⁴ A	Imbabura-Quiroga	
2	RB1AP 10 ⁻⁴ 3	Cotopaxi-Salcedo	
3	PIAD10 ⁻⁵ R	Pichincha -San Isidro-Pintag	
4	OJ3 AP 10 ⁻⁴ B	Cotopaxi-Salcedo- San Marcos	
5	OJ1Ag 10 ⁻⁴ a	Cotopaxi-Salcedo- San Marcos	

Tabla 2. Aislados de *Bacillus* por morfología y pruebas químicas (continuación...).






6	VM1 AP10 ⁻⁶ C	Imbabura-Quiroga		
7	Bp 10 ⁻⁵	Tungurahua-Quero		
8	VM1 Ap 10 ⁻⁶ B	Imbabura-Quiroga		
9	OJ1 Ap 10 ⁻⁴ B	Cotopaxi-Salcedo- San Marcos		
10	VM1 Ap 10 ⁻⁶ a	Imbabura- Quiroga		

Tabla 2. Aislados de *Bacillus* por morfología y pruebas químicas (continuación...).






11	Bp 10 ⁻⁶ R	Tungurahua- Quero		
12	OJ2 Ap 10 ⁻⁴ a	Cotopaxi-Salcedo- San Marcos		
13	Bd 10 ⁻⁵	Tungurahua- Quero		
14	Ap 10 ⁻³	Tungurahua- Quero		
16	YC1 Ag 10 ⁻⁵	Imbabura- Quiroga		

Tabla 2. Aislados de *Bacillus* por morfología y pruebas químicas (continuación...).






17	OJ2 Ap 10^{-6} a	Cotopaxi-Salcedo- San Marcos		
18	OJ1 Ap 10^{-4} a AS	Cotopaxi-Salcedo- San Marcos		
19	RB2 Ap 10^{-4}	Cotopaxi- Salcedo		
20	DA2 10^{-4} 1	Tungurahua- Ambato- Hacienda el Guápulo		
21	OJ6Ap 10^{-6} B	Cotopaxi-Salcedo- San Marcos		

Tabla 2. Aislados de *Bacillus* por morfología y pruebas químicas (continuación...).




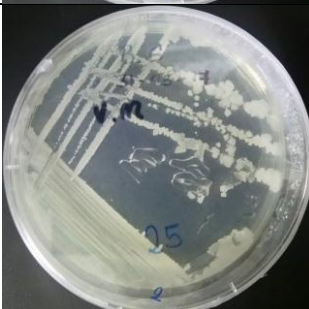

22	RB3 Ap 10^{-5} 1	Cotopaxi- Salcedo		
23	OJ1 Ap 10^{-5} B	Cotopaxi-Salcedo- San Marcos		
24	BS VM 1	Imbabura- Quiroga		
25	BS VM2	Imbabura- Quiroga		
27	DA2 10^{-4} 2	Tungurahua- Ambato- Hacienda el Guápulo		

Tabla 2. Aislados de *Bacillus* por morfología y pruebas químicas (continuación...).






28	To3 10 ⁻⁴	Pichincha- Tomalón	
29	OJ3 Ap 10 ⁻⁴ d	Cotopaxi-Salcedo- San Marcos	
30	RB2 A10 ⁻⁵ 2	Cotopaxi- Salcedo	
31	DA 1 P 10 ⁻⁵	Tungurahua- Ambato- Hacienda el Guápulo	
32	Bd 10 ⁻⁶	Tungurahua- Quero	

Tabla 2. Aislados de *Bacillus* por morfología y pruebas químicas (continuación...).






33	JS1 Ap 10^{-6}	Tungurahua – Quero- Pilco		
36	RB3 Ap 10^{-4} 2	Cotopaxi- Salcedo		
37	RB2 A 10^{-5} 2	Cotopaxi- Salcedo		
38	PI Ad 10^{-6}	Pichincha- San Isidro- Pintag		
39	Pi Ad 10^{-5}	Pichincha , San Isidro, Pintag		

Tabla 2. Aislados de *Bacillus* por morfología y pruebas químicas (continuación).


40	Ap 10 ⁻⁶	Tungurahua- Quero	
----	---------------------	-------------------	--

Tabla 3. Especies de *Trichoderma* obtenidas por identificación molecular.

ID	Codificación	Identificación molecular	# Gen Bank	Request ID
1	Ma1 AR 10 ⁻²	<i>Trichoderma asperellum</i>	KY397967.1	01VUYB3G015
2	To1 AR 10 ⁻²	<i>Trichoderma asperellum</i>	KX681721.1	01GF57G0014
3	SP2 A10 ⁻² S	<i>Trichoderma atroviride</i>	KX421474.1	01F260VK01N
4	DA3B 10 ⁻²	<i>Hypocrea lixii</i> / <i>Trichoderma harzianum</i>	HQ259985.1	01EG7F6801N
5	Fabiola O 2	<i>Trichoderma asperellum</i>	KY358077.1	01UZ15KF015
6	DA4 C 10 ⁻³ R3	<i>Trichoderma harzianum</i>	KT959280.1	01UM78Z3015
7	PI AR 10 ⁻²	<i>Trichoderma tomentosum</i>	MF470187.1	01TRWCRT014
8	PI AS	<i>Trichoderma gamsii</i>	MF061792.1	01T3GT60014
9	Fabiola O A1	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	KC428393.1	019AE8PX015
10	SP2 B 10 ⁻² R	<i>Trichoderma harzianum</i>	KX632479.1	01HN1R36014
11	JS2A 10 ⁻² R	<i>Trichoderma harzianum</i>	KT959280.1	01SBUXVN015
12	RB3 AR 10 ⁻²	<i>Trichoderma gamsii</i>	KX343105.1	01RZBU9R014
13	RB3 BS 10 ⁻²	<i>Trichoderma gamsii</i>	KX343105.1	01RPN6K0015

Tabla 3. Especies de *Trichoderma* obtenidas por identificación molecular (continuación).

15	VM2 CR 10^{-2}	<i>Trichoderma tomentosum</i>	KC561062.1	01RE6G6C015
16	YC1 BS 10^{-2}	<i>Trichoderma tomentosum</i>	HQ115667.1	01R56CNM014
17	RB1 CS 10^{-2}	<i>Trichoderma gamsii</i>	KX343105.1	01PGA2BX014
18	VM2 BR 10^{-2}	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	KY381959.1	01378DA1015
19	RB1 10^{-1} AS	<i>Trichoderma harzianum</i>	KY795990.1	01NBH50F014
20	RB2 S 10^{-2}	<i>Trichoderma gamsii</i>	KX343117.1	018AASVD014
21	DA4 C 10^{-3} R1	<i>Hypocrea lixii</i> / <i>Trichoderma harzianum</i>	HQ259985.1	01MWXDFG014
22	DA4 C 10^{-2} R2	<i>Hypocrea lixii</i> / <i>Trichoderma harzianum</i>	HQ259985.1	01KENTZZ014
23	RB2 BS 10^{-2}	<i>Trichoderma gamsii</i>	KY381956.1 mycobank	017R66S3015
24	VM2 AS 10^{-2}	<i>Trichoderma tomentosum</i>	MF470187.1	01JVSRMZ015
25	VM2 CS 10^{-2}	<i>Trichoderma tomentosum</i>	MF470187.1	01JC1FKF014
26	YC2 AR 10^{-2}	<i>Trichoderma hamatum</i>	KY569445.1 mycobank	013XKMG8015

Tabla 4. Porcentaje de inhibición micelial de *Trichoderma* sobre *Fusarium oxysporum* (continuación).

CONTROLES											
Testigos		Días									
ID	Codificación	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	Ma1 AR 10 ⁻²	0,7	1,6	2,6	3,8	4	4	4	4	4	4
2	To1 AR 10 ⁻²	1	2,1	3,2	3,9	4,3	4,3	4,3	4,3	4,3	4,3
3	SP2 A10 ⁻² S	1	3,1	4,2	4,3	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
4	DA3B 10 ⁻²	1,2	2,2	3	3,6	3,8	4	4,2	4,2	4,2	4,2
5	Fabiola O 2	0,9	2,1	3,2	3,8	4,3	4,3	4,3	4,3	4,3	4,3
6	DA4 C 10 ⁻³ R3	1	2,1	2,9	3,9	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2
7	PI AR 10 ⁻²	0,8	2	2,7	3,9	3,8	4	4	4	4	4
8	PI AS	0,8	2	2,9	3,9	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1
9	Fabiola O A1	0,7	1,7	3	3,5	3,7	3,7	3,7	3,7	3,7	3,7
10	SP2 B 10 ⁻² R	1,2	3	3,6	4	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1
11	JS2A 10 ⁻² R	0,9	1,8	2,5	3,2	3,5	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2
12	RB3 AR 10 ⁻²	1	3,1	4	4	4	4	4	4	4	4
13	RB3 BS 10 ⁻²	0,8	1,9	2,9	4	4	4	4	4	4	4
15	VM2 CR 10 ⁻²	1,2	3	3,7	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1
16	YC1 BS 10 ⁻²	1,3	3,4	4	4,2	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4
17	RB1 CS 10 ⁻²	1,1	3,2	4	4,2	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
18	VM2 BR 10 ⁻²	1	2,7	3,1	3,8	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2
19	RB1 10 ⁻¹ AS	1,1	2,6	3,9	4,3	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
20	RB2 S 10 ⁻²	1,1	3,3	4	4,2	4,3	4,3	4,3	4,3	4,3	4,3
21	DA4 C 10 ⁻³ R1	0,9	2	2,7	4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4
22	DA4 C 10 ⁻² R2	0,9	2	2,6	3,2	3,6	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2
23	RB2 BS 10 ⁻²	1	3,3	4,1	4,2	4,3	4,3	4,3	4,3	4,3	4,3
24	VM2 AS 10 ⁻²	1,1	2,9	3,8	4,1	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2
25	VM2 CS 10 ⁻²	1,8	3,3	4	4,2	4,3	4,3	4,3	4,3	4,3	4,3
26	YC2 AR 10 ⁻²	1,5	3,5	3,9	4,2	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
	YC3 FUSARIUM (R1)	0,7	1,2	1,4	1,6	1,9	2,1	2,3	2,5	2,6	2,7

Medición de combinaciones y controles.

Tabla 5. Evaluación de micoparasitismo de *Trichoderma* sobre *Fusarium oxysporum*.

ID	Combinaciones	Día 19 (27-11-2017)	Escala	Características, lente 40x
2	To1 AR 10 ⁻² + YC3 FUSARIUM	Crecimiento sobre el patógeno	1	Esporulación y micoparasitismo.
3	SP2 A10 ⁻² S +YC3 FUSARIUM	Patógeno cubierto completamente	4	Enrollamiento, esporulación y micoparasitismo.
6	DA4 C10 ⁻³ R3+ YC3 FUSARIUM	Leve crecimiento sobre el patógeno	-	Sin esporulación ni micoparasitismo.
7	PI AR 10 ⁻² +YC3 FUSARIUM	Crecimiento sobre el patógeno	1	Esporulación y micoparasitismo.
8	PI AS +YC3 FUSARIUM	Patógeno cubierto completamente	4	Enrollamiento, esporulación y micoparasitismo.
9	Fabiola O A1 +YC3 FUSARIUM	Patógeno cubierto completamente	4	Enrollamiento, esporulación y micoparasitismo.
10	SP2 B 10 ⁻² R +YC3 FUSARIUM	Leve crecimiento sobre el patógeno	< 1/4	Esporulación y micoparasitismo.
11	JS2A 10 ⁻² R +YC3 FUSARIUM	Leve crecimiento sobre el patógeno	-	Esporulación, sin micoparasitismo.
12	RB3 AR 10 ⁻² +YC3 FUSARIUM	Patógeno cubierto completamente	3	Micoparasitismo, sin esporulación.
13	RB3 BS 10 ⁻² +YC3 FUSARIUM	Crecimiento sobre el patógeno	-	Sin esporulación ni micoparasitismo.
16	YC1 BS 10 ⁻² +YC3 FUSARIUM	Patógeno cubierto completamente	3	Micoparasitismo, sin esporulación.
17	RB1 CS 10 ⁻² +YC3 FUSARIUM	Patógeno cubierto completamente	3	Micoparasitismo, sin esporulación.
18	VM2 BR 10 ⁻² +YC3 FUSARIUM	Patógeno cubierto completamente	3	Micoparasitismo, sin esporulación, clamidosporas del patógeno.
19	RB1 10 ⁻¹ AS +YC3 FUSARIUM	Crecimiento sobre el patógeno	2	Esporulación, micoparasitismo, clamidosporas del patógeno.
20	RB2 S 10 ⁻² +YC3 FUSARIUM	Patógeno cubierto completamente	3	Micoparasitismo, enrollamiento, sin esporulación.
23	RB2 BS 10 ⁻² +YC3 FUSARIUM	Patógeno cubierto completamente	4	Enrollamiento, esporulación y micoparasitismo.
25	VM2 CS 10 ⁻² +YC3 FUSARIUM	Patógeno cubierto completamente	3	Micoparasitismo, sin esporulación, enrollamiento.
26	YC2 AR 10 ⁻² +YC3 FUSARIUM	Patógeno cubierto completamente	4	Enrollamiento, esporulación, micoparasitismo y clamidosporas del patógeno.

Tabla 6. Porcentajes de inhibición de *Bacillus* sobre *Fusarium oxysporum*.

Día 0: 21-11-2017		Unidades cm											% inhibición	Clasificación
Enfrentamiento		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
ID	Combinaciones	D.C.P	D.C.P	D.C.P	D.C.P	D.C.P	D.C.P	D.C.P	D.C.P	D.C.P	D.C.P	D.C.P	día 11	
1	YC3AP10 ⁻⁴ A +YC3 FUSARIUM	0,4	0,6	0,6	0,8	0,8	0,9	1	1,2	1,6	1,7	1,9	42,42	Medio
2	RB1AP 10 ⁻⁴ 3 + YC3 FUSARIUM	0,4	0,6	0,8	1	1,5	1,7	2,1	2,5	2,9	3,1	3,3	0,00	Negativo
3	PIAD10 ⁻⁵ R +YC3 FUSARIUM	0,5	0,6	0,6	0,8	0,9	1,1	1,5	1,8	2	2,2	2,6	21,21	Bajo
4	OJ3 AP 10 ⁻⁴ B +YC3 FUSARIUM	0,4	0,6	0,8	1	1,5	1,7	1,9	2	2,1	2,5	2,6	21,21	Bajo
5	OJ1Ag 10 ⁻⁴ a+YC3 FUSARIUM	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	84,85	Positivo
6	VM1 AP10 ⁻⁶ C +YC3 FUSARIUM	0,3	0,7	0,9	1	1	1,1	1,3	1,4	1,6	3,1	Lleno	6,06	Negativo
7	Bp 10 ⁻⁵ +YC3 FUSARIUM	0,4	0,6	0,6	0,8	1	1,2	1,5	1,7	2	2,1	2,2	33,33	Bajo
8	VM1 Ap 10 ⁻⁶ B+YC3 FUSARIUM	0,4	0,6	0,7	0,8	0,9	1	1,3	1,4	1,6	1,8	1,8	45,45	Medio
9	OJ1 Ap 10 ⁻⁴ B+YC3 FUSARIUM	0,4	0,6	0,8	1,1	1,4	1,6	2,1	2,5	2,8	3,1	3,3	0,00	Negativo
10	VM1 Ap 10 ⁻⁶ a +YC3 FUSARIUM	0,4	0,6	0,6	0,7	0,9	1	1,2	1,3	1,4	1,5	1,7	48,48	Medio
11	Bp 10 ⁻⁶ R +YC3 FUSARIUM	0,5	0,7	0,8	0,9	1	1,3	1,7	1,9	2,2	2,4	2,6	21,21	Bajo
12	OJ2 Ap 10 ⁻⁴ a+YC3 FUSARIUM	0,4	0,6	0,8	1	1	1,4	1,9	2	2,2	2,3	2,5	24,24	Bajo
13	Bd 10 ⁻⁵ +YC3 FUSARIUM	0,5	0,7	0,8	1	1	1,2	1,5	1,7	1,9	2	2,2	33,33	Bajo
14	Ap 10 ⁻³ +YC3 FUSARIUM	0,4	0,6	0,8	0,8	1	1	1,4	1,5	1,8	1,9	1,9	42,42	Medio
16	YC1 Ag 10 ⁻⁵ +YC3 FUSARIUM	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1	1,1	1,2	1,5	1,5	1,8	45,45	Medio
17	OJ2 Ap 10 ⁻⁶ a +YC3 FUSARIUM	0,3	0,6	0,7	0,9	1	1,2	1,4	1,6	1,8	2	2,1	36,36	Bajo
18	OJ1 Ap 10 ⁻⁴ a AS +YC3 FUSARIUM	0,4	0,6	0,8	0,9	1,2	1,4	1,9	2,1	2,5	2,8	3	9,09	Negativo
19	RB2 Ap 10 ⁻⁴ +YC3 FUSARIUM	0,5	0,7	0,8	1	1,2	1,5	1,7	1,9	2	2,1	2,2	33,33	Bajo
20	DA2 10 ⁻⁴ 1 +YC3 FUSARIUM	0,4	0,6	0,7	0,8	0,9	1	1,2	1,5	1,5	1,5	1,6	51,52	Medio
21	OJ6Ap 10 ⁻⁶ B +YC3 FUSARIUM	0,4	0,7	1	1	1,4	1,5	2	2,3	2,9	3	3,3	0,00	Negativo

Tabla 6. Porcentajes de inhibición de *Bacillus* sobre *Fusarium oxysporum* (continuación).

22	RB3 Ap 10 ⁻⁵ 1 +YC3 FUSARIUM	0,6	0,6	0,8	0,9	1	1	1	1	1	1	1	69,70	Medio
23	OJ1 Ap 10 ⁻⁵ B +YC3 FUSARIUM	0,5	0,8	1	1,2	1,5	1,8	2,1	2,4	2,8	3,1	3,2	3,03	Negativo
24	BS VM 1 +YC3 FUSARIUM	0,5	0,6	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	75,76	Positivo
25	BS VM2 +YC3 FUSARIUM	0,6	0,7	0,7	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	75,76	Positivo
27	DA2 10 ⁻⁴ 2 +YC3 FUSARIUM	0,5	0,9	0,9	1,2	1,2	1,2	1,5	1,8	1,8	2,1	2,1	36,36	Bajo
28	To3 10 ⁻⁴ +YC3 FUSARIUM	0,6	0,9	1	1,3	1,5	1,6	1,8	1,8	2	2,2	2,4	27,27	Bajo
29	OJ3 Ap 10 ⁻⁴ d +YC3 FUSARIUM	0,6	0,7	0,9	1,1	1,2	1,2	1,6	1,8	2	2,4	2,9	12,12	Bajo
30	RB2 A 10 ⁻⁵ 2 +YC3 FUSARIUM	0,4	0,7	0,9	1,2	1,5	1,8	2,2	2,5	2,8	3,2	3,3	0,00	Negativo
31	DA 1 P 10 ⁻⁵ +YC3 FUSARIUM	0,3	0,7	0,7	0,8	1	1,1	1,4	1,7	2,1	2,5	2,6	21,21	Bajo
32	Bd 10 ⁻⁶ +YC3 FUSARIUM	0,6	0,9	1	1,4	1,6	1,7	1,9	2,2	2,5	2,7	3	9,09	Negativo
33	JS1 Ap 10 ⁻⁶ +YC3 FUSARIUM	0,5	0,2	0,8	1	1,2	1,5	2	2,2	2,8	3	3,3	0,00	Negativo
36	RB3 Ap 10 ⁻⁴ 2 +YC3 FUSARIUM	0,6	0,8	1	1,3	1,5	1,6	2	2,4	2,6	2,8	3,2	3,03	Negativo
37	RB2 A 10 ⁻⁵ 2 +YC3 FUSARIUM	0,5	0,7	1	1,3	1,6	1,9	2,2	2,6	2,9	3,2	Lleno	3,03	Negativo
38	PI Ad 10 ⁻⁶ +YC3 FUSARIUM	0,6	0,8	0,9	1	1,1	1,3	1,5	1,8	2	2,3	2,5	24,24	Bajo
39	Pi Ad 10 ⁻⁵ +YC3 FUSARIUM	0,5	0,9	1,2	1,5	1,7	1,9	2,1	2,3	2,4	2,7	2,9	12,12	Bajo
40	Ap 10 ⁻⁶ +YC3 FUSARIUM	0,6	0,9	1	1,1	1,2	1,4	1,9	2	2,3	2,5	2,8	15,15	Bajo
	Testigo Fusarium (D.C.C)	0,5	0,9	1	1,5	1,7	2	2,4	2,6	2,9	3,1	3,3		

Tabla 7. Identificación molecular de *Bacillus* con capacidad antagonista

ID	Codificación	Identificación molecular	# Gen Bank	Request ID
5	OJ1Ag 10 ⁻⁴ a	<i>Bacillus subtilis</i>	HQ333017.1	4B3CJH26014
25	BS VM2	<i>Bacillus subtilis</i>	MF187644.1	4AVUJYX901R
24	BS VM 1	<i>Bacillus subtilis</i>	KT027658.1	4AWWU76N014
22	RB3 Ap 10 ⁻⁵ 1	<i>Bacillus subtilis</i>	CP023257.1	4AYDUYFJ014
20	DA2 10 ⁻⁴ 1	<i>Bacillus cereus</i>	MF138124.1	4B0F018A01R
14	Ap 10 ⁻³	<i>Bacillus cereus</i>	KX941839.1	4B10AHZW01R
10	VM1 Ap 10 ⁻⁶ a	<i>Bacillus cereus</i>	MF138124.1	4B1T7PCR015
8	VM1 Ap 10 ⁻⁶ B	<i>Bacillus cereus</i>	KX453935.1	4B2JTUZJ015
16	YC1 Ag 10 ⁻⁵	<i>Bacillus subtilis</i>	KT921421.1	4ATREEBY015
1	YC3AP10 ⁻⁴ A	<i>Bacillus cereus</i>	MF767513.1	4B41GBB3014

Tabla 8. Aislados de *Bacillus* seleccionados para pruebas de compatibilidad combinadas con *Trichoderma*.

<i>Trichoderma</i>	<i>Bacillus</i> >70%	<i>Bacillus</i> 40%-50%
3	5	1
8	22	8
12	24	10
16	25	14
17		16
23		20
26		

Tabla 9. Testigos de *Trichoderma*, pruebas de compatibilidad.

Día 0: 13-12-17	Días / Unidades cm			
Testigos	1	2	3	4
3	0,8	2,3	4,5	
8	0,7	1,6	3,5	4,4
12	1	3	4,5	
16	0,9	2,5	4,5	
17	1	2,8	4,4	
23	0,8	2,3	4,3	
26	0,8	2,2	4,5	

Tabla 10. Prueba de compatibilidad para aislados con inhibición >70%.

Día 0: 13-12-17	Días / cm				
Días	1	2	3	4	5
Combinaciones					
3 y5	0,8	1	1,8	1,9	1,9
3 y22	0,7	0,9	1,4	1,4	1,5
3 y 24	0,8	1,2	1,5	1,6	1,6
3 y25	0,8	1	1,1	1,2	1,2
8 y 5	0,6	0,7	1,5	1,6	1,6
8 y 22	0,6	0,7	1,4	1,4	1,4
8 y24	0,7	1,2	1,3	1,3	1,3
8 y25	0,5	1,2	1,2	1,2	1,1
12 y 5	1,3	1,1	1,8	1,8	1,9
12 y 22	1	1,4	1,9	2	2
12 y24	1,4	1,5	1,7	1,7	2
12 y 25	1,2	1,8	2,3	2,3	2,5
16 y 5	1,1	1,6	2,2	2,3	2,4
16 y 22	1,2	1,4	1,8	1,8	1,9
16 y24	1	1,6	1,8	1,9	2
16 y 25	1	1,4	1,7	1,9	2
17 y5	0,9	1	1,2	1,6	1,8
17 y22	1,2	1,5	2	2	2
17 y 24	0,9	1,2	1,3	2	2,1
17 y25	1,2	1,2	1,4	1,5	1,7
23 y5	0,8	1,4	1,8	1,9	1,9
23y22	1	1,3	1,7	2	2,2
23y24	0,8	1,5	1,7	1,7	1,8
23y 25	0,8	1,4	1,8	1,9	1,9
26y5	0,7	1,2	1,5	1,7	1,8
26y22	0,8	1,5	1,6	1,8	1,8
26y24	0,9	1,3	1,5	1,7	2,1
26y25	1	1,4	1,6	1,7	1,9

Presencia de inhibición desde el día 3. Sin compatibilidad en ningún aislado.

Tabla 11. Pruebas de compatibilidad para aislados con un 40%-50% de inhibición.

Día 0: 18-12-17	cm/ día				
Días	1	2	3	4	5
Combinaciones					
3 y1	1,3	2,5	2,7	3,4	3,4
3 y8	1,2	2,5	2,8	3,3	3,3
3 y 10	1,3	2,3	2,5	3	3
3 y14	1,7	2,9	3	3,8	CUBIERTO
3y16	1,3	1,7	1,8	1,8	1,8
3y20	1,4	2	2,2	2,7	CUBIERTO
8y1	1,2	2	2,5	3,2	CUBIERTO
8y8	1,4	2	2,4	2,4	2,4
8 y 10	1,4	2	2,3	2,3	2,3
8 y14	1,1	1,8	2,4	2,6	CUBIERTO
8y16	1	1,3	1,3	1,3	1,4
8y20	1,1	1,9	2,4	2,5	3
12y1	2,1	2,6	2,6	2,7	2,7
12y8	2	2,5	2,6	2,6	2,6
12y10	1,9	2,2	2,3	2,3	2,3
12y14	1,9	2,3	2,7	CUBIERTO	CUBIERTO
12y16	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6
12y20	2	2,5	2,6	2,6	2,6
16y1	1,5	1,8	2,2	2,2	CUBIERTO
16y8	1,9	2,5	2,9	CUBIERTO	CUBIERTO
16y10	1,8	2,6	3	CUBIERTO	CUBIERTO
16y14	1,2	2,1	2,4	2,6	CUBIERTO
16y16	1,1	1,4	1,5	1,5	1,5
16y20	1,2	2,2	2,4	2,6	2,6
17y1	1,7	2,5	2,6	2,6	3
17y8	1,8	2,4	2,5	2,5	2,8
17 y 10	1,9	2,5	2,5	2,5	2,7
17y14	2	2,2	2,6	2,8	CUBIERTO
17y16	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
17y20	1,9	2,4	2,4	2,6	2,6
23y1	1,7	2,6	3	3,2	CUBIERTO
23y8	1,6	2,4	2,4	CUBIERTO	CUBIERTO
23y10	1,5	2,2	2,2	3,4	CUBIERTO
23y14	1,5	2,2	2,7	CUBIERTO	CUBIERTO
23y16	1,6	1,9	2,2	2,4	2,4
23y20	1,7	2,4	2,8	3	3

Tabla 11. Pruebas de compatibilidad para aislados con un 40%-50% de inhibición (continuación).

26y1	1,2	2	2,3	2,5	2,5
26y8	1,2	2,1	2,4	2,4	2,4
26y10	1,1	2,1	2,5	3	3
26y14	0,6	1,5	2,2	2,2	2,2
26y16	0,2	1,1	1,2	1,2	1,6
26y20	0,2	1,2	2	2	2

Tabla 12. Organización de las combinaciones de *Bacillus* 40%-50% a los 5 días.

Compatibles	Incompatibles	Contacto y leve crecimiento
3 y14	26y1	3 y1
3y20	26y8	3 y8
8y1	26y10	8y20
8 y14	26y14	16y20
12y14	26y16	23y16
16y1	26y20	8y8
16y8	17y16	8 y 10
16y10	17y20	23y20
16y14	17y1	3y10
17y14	17y8	
23y1	17 y 10	
23y8	16y16	
23y10	12y16	
23y14	12y20	
	12y1	
	12y8	
	12y10	
	8y16	
	3y16	

Tabla 13. Pruebas de antagonismo conjunto, porcentajes de inhibición.

Día 0: 17-01-2018												% inhibición día 11	Clasificación
Enfrentamiento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
Combinaciones compatibles	D.C.P	D.C.P	D.C.P	D.C.P	D.C.P	D.C.P	D.C.P	D.C.P	D.C.P	D.C.P	D.C.P		
3 y 14	0,7	0,9	0,9	1	1	1	1	1	1	1	1	76,19	Positivo
3 y 20	0,7	0,8	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	78,57	Positivo
8 y 1	0,6	0,8	1	1,3	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	66,67	Medio
8 y 14	0,6	0,8	1,1	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	71,43	Positivo
12 y 14	0,6	0,8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	76,19	Positivo
16 y 1	0,7	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	78,57	Positivo
16 y 8	0,6	0,8	0,9	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	69,05	Medio
16 y 10	0,6	0,8	0,9	1	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	71,43	Positivo
16 y 14	0,6	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	80,95	Positivo
17 y 14	0,6	0,7	0,8	0,8	0,8	1	1	1	1	1	1	76,19	Positivo
23 y 1	0,6	0,9	0,9	1	1	1	1	1	1	1	1	76,19	Positivo
23 y 8	0,6	0,8	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	78,57	Positivo
23 y 10	0,7	0,9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	76,19	Positivo
23 y 14	0,7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	76,19	Positivo
Testigo Fusarium (D.C.C)	0,6	0,9	1,3	1,7	1,9	2,2	2,6	3,1	3,6	4	4,2		

Tabla 14. Comparación entre porcentajes de inhibición individual y conjuntos de las cepas compatibles.

<i>Trichoderma</i>	PICR	<i>Bacillus</i>	% inhibición	Antagonismo conjunto	% inhibición
3	59,26	1	44,42	3 y 14	76,19
8	59,26	8	45,45	3 y 20	78,57
12	51,85	10	48,48	8 y 1	66,67
16	55,56	14	42,42	8 y 14	71,43
17	51,85	20	51,52	12 y 14	76,19
23	51,85			16 y 1	78,57
				16 y 8	69,05
				16 y 10	71,43
				16 y 14	80,95
				17 y 14	76,19
				23 y 1	76,19
				23 y 8	78,57
				23 y 10	76,19
				23 y 14	76,19

10. ANEXOS

Anexo 1. Información de las localidades productoras de uvilla muestreadas

Lugar	Tungurahua, Quero	Tungurahua, Quero	Pichincha, San Isidro, Pintag	Pichincha, Tomalón	Pichincha, Ascázubi	Tungurahua, Ambato, Hacienda el Guápulo	Tungurahua, Quero, Pilco, Asociación de productores	Cotopaxi, Salcedo, Hacienda Pataín	Cotopaxi, Latacunga	Cotopaxi, Salcedo, San Marcos, Asociación Narcisca de Jesús	Imbabura, Quiroga, Asociación Sumak Mikui	Imbabura, Quiroga, Asociación Sumak Mikui
Fecha de visita	20/10/2016	20/10/2016	20/10/2016	22/11/2016	22/11/2016	18/02/2017	25/02/2017	11/03/2017	18/03/2017	18/03/2017	29/03/2017	29/03/2017
Coordenadas	S 1° 23' 18.782" O 78° 36' 15.874"	S 1° 23' 34.736" O 78° 36' 37.979"	0,3619627;- 78,3719490	S 0,4° 42' 737" W 0,79° 26' 30"	S 0,4° 42' 137" W 0,79° 26' 33"	S01 ° 12' 713" W 078 ° 37' 633"	S01 ° 0' 0" W 078 ° 38' 39.058"	S01 ° 04,935' W 078 ° 35, 077'- Elevación 2561 msnm	S0 ° 04,700" W 068 ° 34, 628"- Elevación 2982 msnm	S01 ° 03,727" W 078 ° 34, 680'- Elevación 2686 msnm	S01 ° 03,727' W 078 ° 34, 680'- Elevación 2569 msnm	N00 ° 16,484' W 78 ° 17, 613'- Elevación 2489 msnm
Aplica químico	No	Rara vez	No se aplica	No se aplica insecticidas, fungicidas si	No se aplica ningún químico	Fungicida en plantas adultas	No se aplica	Ninguno	Fumigación con sello verde	Fungicidas en la siembra, fertilizantes químicos.	No se aplica	No se aplica
Tipo de abono	Humus y abono orgánico	Abono orgánico	Biocontroladores	Lixiviado de humus, compostaje de lombriz	abono orgánico	Abono orgánico, gallinaza	Abono orgánico, bioles	Abono orgánico	Abono orgánico	Abono orgánico	Abono orgánico, bioles	Abono orgánico, gallinaza, cuy y ganado.
Nombre de dueño	Fabiola Ocaña	Benigna Núñez	Pablo Proaño	Santiago Landázuri	María Taimal	Diego Altamirano	Jesús Sánchez	Paul Balseca presidente asociación	Jorge Navarrete	Orlando Jácome	Yolanda Cumba	Víctor Mediavilla
Nombre de responsable	Fabiola Ocaña	Benigna Núñez	Pablo Proaño	Santiago Landázuri	María Taimal	Diego Altamirano	Jesús Sánchez	Luz Acosta	Paul Balseca	Orlando Jácome	Yolanda Cumba	Víctor Mediavilla

Anexo 2. Localidades productoras de uvilla muestreadas

Pichincha, Tomalón



Pichincha, Ascázubi



Tungurahua, Quero, Pilco



Tungurahua, Ambato, Hacienda El Guápulo



Cotopaxi, Salcedo, Hacienda Pataín



Cotopaxi, Latacunga



Cotopaxi, Salcedo, San Marcos



Imbabura, Quiroga, Asociación Sumak Mikui



Imbabura, Quiroga, Asociación Sumak Mikui



Anexo 3. Muestras obtenidas de cada localidad.

<i>Trichoderma</i>	S=Suelo R=Raíz	<i>Bacillus</i> Pool de Muestra	<i>Trichoderma</i>	S=Suelo R=Raíz	<i>Bacillus</i> Pool de Muestra
Localidad	ID muestras	ID muestras	Localidad	ID muestras	ID muestras
Tungurahua- Quero	1AS (Fa O1)	1A	Tungurahua- Quero	1BS	1B
Fabiola Ocaña	2AS (Fa O2)	2A	Benigna Núñez	2BS	2B
	3AS	3A		3BS	3B
	4AS			4BS	
	5AS			5BS	
	6AS			6BS	
	7AS			7BS	
	8AS			8BS	
	9AS			9BS	
	1AR			1BR	
	2AR			2BR	
	3AR			3BR	
	4AR			4BR	
	5AR			5BR	
	6AR			6BR	
	7AR			7BR	
	8AR			8BR	
	9AR			9BR	

Anexo 3. Muestras obtenidas de cada localidad (continuación...).

<i>Trichoderma</i>	S=Suelo R=Raíz	<i>Bacillus</i> Pool de Muestra	<i>Trichoderma</i>	S=Suelo R=Raíz	<i>Bacillus</i> Pool de Muestra
Localidad	ID muestras	ID muestras	Localidad	ID muestras	ID muestras
Pichincha-San Isidro- Pintag	1PIAS	1PI	Pichincha- Tomalón	To1AR	To1
Pablo Proaño	2PIAS	2PI	Santiago Landázuri	To1BR	To2
	3PIAS	3PI		To1CR	To3
	4PIAS			To2AR	
	5PIAS			To2BR	
	6PIAS			To2CR	
	7PIAS			To3AR	
	8PIAS			To3BR	
	9PIAS			To3CR	
	1PIAR			To1AS	
	2PIAR			To1BS	
	3PIAR			To1CS	
	4PIAR			To2AS	
	5PIAR			To2BS	
	6PIAR			To2CS	
	7PIAR			To3AS	
	8PIAR			To3BS	
	9PIAR			To3CS	

Anexo 3. Muestras obtenidas de cada localidad (continuación...).

Trichoderma	S=Suelo R=Raíz	Bacillus Pool de Muestra	Trichoderma	S=Suelo R=Raíz	Bacillus Pool de Muestra
Localidad	ID muestras	ID muestras	Localidad	ID muestras	ID muestras
Pichincha- Ascázubi	Ma1AR	Ma1	Tungurahua –Ambato-	DA1AR	DA1
María Taimal	Ma1BR	Ma2	Hacienda El Guápulo	DA1BR	DA2
	Ma1CR	Ma3	Diego Altamirano	DA1CR	DA3
	Ma2AR			DA2AR	DA4
	Ma2BR			DA2BR	
	Ma2CR			DA2CR	
	Ma3AR			DA3AR	
	Ma3BR			DA3BR	
	Ma3CR			DA3CR	
	Ma1AS			DA4AR	
	Ma1BS			DA4BR	
	Ma1CS			DA4CR	
	Ma2AS			DA1AS	
	Ma2BS			DA1BS	
	Ma2CS			DA1CS	
	Ma3AS			DA2AS	
	Ma3BS			DA2BS	
	Ma3CS			DA2CS	
				DA3AS	
				DA3BS	
				DA3CS	
				DA4AS	
				DA4BS	
				DA4CS	

Anexo 3. Muestras obtenidas de cada localidad (continuación...).

<i>Trichoderma</i>	S=Suelo R=Raíz	<i>Bacillus</i> Pool de Muestra	<i>Trichoderma</i>	S=Suelo R=Raíz	<i>Bacillus</i> Pool de Muestra
Localidad	ID muestras	ID muestras	Localidad	ID muestras	ID muestras
Tungurahua-Quero-Pilco	JS1AR	JS1	Cotopaxi- Salcedo-Hacienda Pataín	SP1AR	SP1
Jesús Sánchez	JS1BR	JS2	Paul Balseca	SP1BR	SP2
	JS1CR	JS3		SP1CR	SP3
	JS2AR			SP2AR	
	JS2BR			SP2BR	
	JS2CR			SP2CR	
	JS3AR			SP3AR	
	JS3BR			SP3BR	
	JS3CR			SP3CR	
	JS1AS			SP1AS	
	JS1BS			SP1BS	
	JS1CS			SP1CS	
	JS2AS			SP2AS	
	JS2BS			SP2BS	
	JS2CS			SP2CS	
	JS3AS			SP3AS	
	JS3BS			SP3BS	
	JS3CS			SP3CS	

Anexo 3. Muestras obtenidas de cada localidad (continuación...).

<i>Trichoderma</i>	S=Suelo R=Raíz	<i>Bacillus</i> Pool de Muestra	<i>Trichoderma</i>	S=Suelo R=Raíz	<i>Bacillus</i> Pool de Muestra
Localidad	ID muestras	ID muestras	Localidad	ID muestras	ID muestras
Cotopaxi- Latacunga	RB1AR	RB1	Cotopaxi- Salcedo	OJ1AR	OJ1
Jorge Navarrete	RB1BR	RB2	San Marcos	OJ1BR	OJ2
Paul Balseca	RB1CR	RB3	Orlando Jácome	OJ1CR	OJ3
	RB2AR			OJ2AR	
	RB2BR			OJ2BR	
	RB2CR			OJ2CR	
	RB3AR			OJ3AR	
	RB3BR			OJ3BR	
	RB3CR			OJ3CR	
	RB1AS			OJ1AS	
	RB1BS			OJ1BS	
	RB1CS			OJ1CS	
	RB2AS			OJ2AS	
	RB2BS			OJ2BS	
	RB2CS			OJ2CS	
	RB3AS			OJ3AS	
	RB3BS			OJ3BS	
	RB3CS			OJ3CS	

Anexo 3. Muestras obtenidas de cada localidad (continuación).

Trichoderma	S=Suelo R=Raíz	Bacillus Pool de Muestra	Trichoderma	S=Suelo R=Raíz	Bacillus Pool de Muestra
Localidad	ID muestras	ID muestras	Localidad	ID muestras	ID muestras
Imbabura- Quiroga-	YC1AR	YC1	Imbabura- Quiroga-	VM1AR	VM1
Asociación Sumak	YC1BR	YC2	Asociación Sumak	VM1BR	VM2
Mikui	YC1CR	YC3	Mikui	VM1CR	VM3
Yolanda Cumba	YC2AR		Víctor Mediavilla	VM2AR	
	YC2BR			VM2BR	
	YC2CR			VM2CR	
	YC3AR			VM3AR	
	YC3BR			VM3BR	
	YC3CR			VM3CR	
	YC1AS			VM1AS	
	YC1BS			VM1BS	
	YC1CS			VM1CS	
	YC2AS			VM2AS	
	YC2BS			VM2BS	
	YC2CS			VM2CS	
	YC3AS			VM3AS	
	YC3BS			VM3BS	
	YC3CS			VM3CS	

Anexo 4. Primers ITS 1, ITS 4.

Gen	Primers	Secuencias
ITS	ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G
	ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC

Recuperado de White, Bruns, Lee y Taylor (1990).

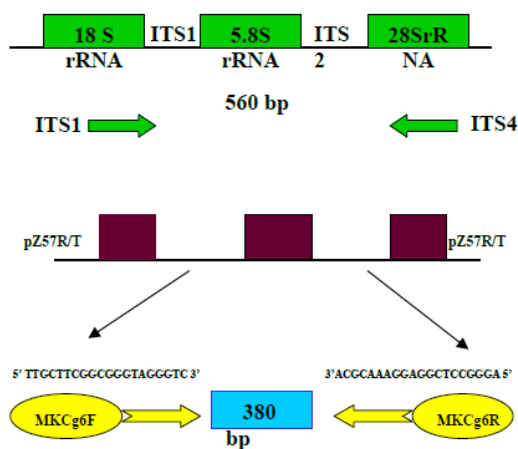


Figure 1: Internal Transcribed spacer (ITS) region primers ITS1 and ITS 4 [8] used for *Colletotrichum* species-specific primer designing.

Recuperado de Kamie et al. (2013).

Anexo 5. Protocolo de PCR usado para *Trichoderma*.

Reactivos	Volumen por reacción (ul)
Agua estéril	9.5
Go Taq Mix	12.5
Primer F	1
Primer R	1
DNA (100ng/ul)	1
Volumen total	25 ul

Recuperado de Castle et al. (1998).

Ciclo de PCR, 35 ciclos.

3 min	94 °C
30s	94 °C
30s	54 °C
1 min	72 °C
10 min	72 °C
-	4 °C

Recuperado de Castle et al. (1998).

Anexo 6. Primers PA, PH, 16S rRNA.

Gen	Primers	Secuencias
16S rRNA	PA forward	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG
	PH reverse	AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA

Recuperado de Gomma y Momtaz (2006).

Anexo 7. Protocolo de PCR usado para *Bacillus*.

Reactivos	Volumen por reacción (ul)
Agua estéril	10.4
Go Taq Mix	12.5
Primer F	0.8 ul
Primer R	0.8 ul
DNA (100ng/ul)	0.5
Volumen total	25 ul

Recuperado de Barghouthi (2011).

Ciclo de PCR, 33 ciclos.

5 min	94 °C
30s	94 °C
30s	55 °C
30s	72 °C
10 min	72 °C
-	4 °C

Recuperado de Barghouthi (2011).

Anexo 8. Tabla creada por Elías y Arcos (1984) para la evaluación de la capacidad antagónica (micoparasitismo).

Grado	Capacidad antagónica
0	Ninguna invasión de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
1	Invasión de ¼ de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
2	Invasión de ½ de la superficie de la colonia hongo patógeno.
3	Invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
4	Invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno esporulación sobre ella.

Recuperado de Barbosa y Meza (2009).