

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

CARRERA DE MICROBIOLOGÍA

Evaluación de la capacidad inhibitoria *in vitro* e *in planta* de *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas* spp. y *Trichoderma* spp. frente al hongo *Boeremia exigua* (syn. *Phoma exigua*) en plantas de uvilla (*Physalis peruviana* L.).

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

EVELYN DOMENICA AGUILAR LLANOS

Quito, 2023

CERTIFICACIÓN

Certifico que, la disertación de Microbiología de la candidata Evelyn Doménica Aguilar Llanos, ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.



Mtr. Jeniffer Yáñez Altuna

Directora de la Disertación

Quito, 17 de febrero de 2023.

DEDICATORIA

A mis padres Dolly Llanos y Edgar Aguilar por su gran esfuerzo y motivación.

A mi hermano que ha sido un pilar fundamental en mi vida y siempre ha estado para ayudarme y sacarme una sonrisa.

A mis abuelitos maternos por haber estado en todos los momentos importantes de mi vida, por darme los mejores consejos y por ser mi apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres por su apoyo incondicional, por poner todo su esfuerzo y dedicación para que yo pueda continuar con mis estudios. A mi hermano Esteban por siempre estar para mí en lo bueno y en lo malo, por enseñarme muchas cosas de la vida, por ser mi compañero de aventuras y por alentarme a seguir adelante con mis sueños.

A mis tías, July y Wendy por acompañarme a lo largo de mi vida y siempre estar pendientes de mí. A mis primos Karelys, Juan Felipe y Farell por ser como mis hermanos, hacerme reír y compartir las locuras conmigo. A mis abuelitos por criarme con tanto amor, por siempre apoyarme y alentarme a dar lo mejor de mí.

Agradezco a mi directora de tesis la Mtr. Jeniffer Yánez por su paciencia y apoyo durante toda la tesis y por ser una excelente profesora y amiga. Al Dr. Martín Marcial por guiarme y apoyarme en el desarrollo de mi tesis y compartir su conocimiento. A todos mis profesores por sus enseñanzas, lecciones, paciencia y esfuerzo para impulsarnos a ser buenos profesionales.

Un agradecimiento especial a Alexis Quintana por ser un amigo incondicional y por aguantarme en todas mis facetas. A Gabriela Felicita que ha sido una buena amiga durante estos cinco años y me ha ayudado, escuchado y ha estado a mi lado a pesar de todo. A mi amiga Daniela Guarderas por nunca dejarme sola en mis momentos más difíciles durante la pandemia, por ser mi consejera y confidente.

A mi amigo Dennis Jacho por ser el mejor compañero de carrera, un amigo leal y que ha estado para sacarme una sonrisa. A mis amigos Sharon Villamarín, Sofía Quintana, Ivonne Iza, Shirma Caicedo y Bryan Sangoquiza por enseñarme el verdadero significado de la amistad.

TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT.....	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. OBJETIVOS	5
4.1 OBJETIVO GENERAL	5
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
5. MATERIALES Y MÉTODOS	6
5.1 REACTIVACIÓN DE CEPAS	6
5.2 PRUEBAS INDIVIDUALES DE ANTAGONISMO <i>IN VITRO</i>	6
5.3 PRUEBAS CONJUNTAS EN PLÁNTULAS DE UVILLA.....	8
5.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	10
6. RESULTADOS.....	11
6.1 EVALUACIÓN DE INCIDENCIA Y SEVERIDAD.....	13
6.2 ANALISIS ESTADISTICOS	15
7. DISCUSIÓN	17
8. CONCLUSIONES	21
9. AGRADECIMIENTOS	21
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22
11. ANEXOS.....	27

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Enfrentamiento bacteria contra hongo.....	7
Figura 2. Pruebas de Compatibilidad de las cepas de <i>Trichoderma harzianum</i> (T10) y <i>Trichoderma atroviride</i> (T3) con cepas de <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Pseudomonas</i> spp.....	9
Figura 3. Micoparasitismo de <i>Trichoderma</i> frente a <i>Phoma exigua</i> en el microscopio con un aumento de 40x. A) Enrollamiento de las hifas de <i>Trichoderma atroviride</i> (T3) con <i>Phoma exigua</i> y B) Presencia del enrollamiento de <i>Trichoderma harzianum</i> (T10) (hifas más oscuras) frente al fitopatógeno.	11
Figura 4. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) del enfrentamiento de <i>Trichoderma</i> spp. frente a <i>Phoma exigua</i>	12
Figura 5. Porcentaje de inhibición del crecimiento fúngico del enfrentamiento de <i>Bacillus</i> <i>subtilis</i> frente a <i>Phoma exigua</i>	12
Figura 6. Porcentaje de inhibición del crecimiento fúngico del enfrentamiento de <i>Pseudomonas</i> spp. frente a <i>Phoma exigua</i>	13
Figura 7. Incidencia de la enfermedad para el tratamiento del fitopatógeno con biocontroladores.....	14
Figura 8. Severidad de la enfermedad causada por <i>P. exigua</i> en los dos periodos de evaluación en plantas de uvilla.	15

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Organización de los 16 tratamientos para evaluación de biocontroladores para Phoma exigua en uvilla.	10
Tabla 2. Promedios de la evaluación biocontroladora de los tratamientos en condiciones de invernadero evaluadas a los 28 días. Prueba de TUKEY $p < 0.05$	16

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. A) Picnidios de <i>Phoma</i> en OMA a los 21 días de crecimiento. B) Picnidios (10x). C) Esporas liberadas por un picnidio (40x). D) Clamidosporas en OMA.	27
Anexo 2. Crecimiento de <i>Phoma exigua</i> en agar PDA. A) 7 días de incubación. B) 10 días de incubación. C) 15 días de incubación. D) Anverso y reverso de la colonia del patógeno a los 21 días de incubación.	28
Anexo 3. Selección de los enfrentamientos del patógeno <i>Phoma exigua</i> frente a las cepas de <i>Trichoderma</i> spp. (T8, T19, T23, T14, T17, T16, T6, T5, T9, T11, T13, T2, codificaciones internas del laboratorio).	29
Anexo 4. Screening de los enfrentamientos del patógeno <i>Phoma exigua</i> frente a las cepas de <i>Bacillus subtilis</i> (C2Y-VR, B5-OJI, B16-V2, C16, 24R, C25 son codificaciones internas del laboratorio).	30
Anexo 5. Screening de los enfrentamientos del patógeno <i>Phoma exigua</i> frente a las cepas de <i>Pseudomonas</i> spp. (16-VR, C14-VR, C12-VB, C19-VR y C11-VR son codificaciones internas del laboratorio).	31
Anexo 6. Tratamientos del 1 al 16 en consorcio sobre plantas de uvilla a los 10 y 28 días después de la inoculación. Se encuentran los controles positivos (tratamiento 1) y negativos (tratamiento 2).	34
Anexo 7. De izquierda a derecha <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Trichoderma atroviride</i> (40x) con tinción de azul de lactofenol.	35
Anexo 8. Parte superior <i>Bacillus subtilis</i> y parte inferior <i>Pseudomonas</i> spp, (40x) con tinción Gram.	36

1. RESUMEN

La uvilla (*Physalis peruviana* L.) es una planta que produce frutos con gran acogida en el mercado nacional e internacional. Al igual que todos los cultivos comerciales, es propenso al ataque de plagas y enfermedades que afectan a diferentes partes de la planta. Uno de los hongos que afecta a este cultivo es *Phoma exigua* conocido por producir la enfermedad denominada muerte descendente. Las investigaciones acerca de esta enfermedad y sus biocontroladores en Ecuador aun no son suficientes, por tanto, la presente investigación pretende evaluar la capacidad biocontroladora individual y en consorcio de *Trichoderma harzianum* (T10) y *Trichoderma atroviride* (T3), *Pseudomonas fluorescens* (C14-VR) y *Pseudomonas baetica* (16-VB) y dos cepas de *Bacillus subtilis* tanto *in vitro* como *in planta*. Para esto, se realizaron cultivos duales que evaluaron la capacidad inhibitoria de los microorganismos controladores. Del ensayo *in vitro*, se seleccionaron dos cepas de cada género y se realizó una prueba de compatibilidad para llevarlos a nivel de planta en invernadero. Se analizaron en total 48 plantas con 16 tratamientos, incluidos los tratamientos individuales y en consorcio. Se observó que *Bacillus subtilis* (B5-OJ1) presentó una mayor capacidad inhibitoria individual *in vitro* frente a *P. exigua* con valores superiores al 80% y los menos efectivos fueron las cepas de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma atroviride*. Al comparar la incidencia de la enfermedad en plantas se concluyó que el mejor tratamiento fue el consorcio de *Bacillus subtilis* 24R y *Trichoderma harzianum* T10, demostrando que estos microorganismos complementan sus mecanismos de acción favoreciendo la resistencia de la planta al ataque por *P. exigua*.

Palabras clave: Biocontroladores, *Trichoderma sp.*, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Phoma exigua*, *Physalis peruviana*.

2. ABSTRACT

The goldenberry (*Physalis peruviana* L.) is a plant that produces fruits with great acceptance in the national and international markets. Like all commercial crops, pests and diseases are likely to attack different parts of the plant. One of the fungi that affects this crop is *Phoma exigua* known for producing the disease called descending death. Research on this disease and its biocontrollers in Ecuador are still not enough, therefore, this research aims to evaluate the individual and consortium biocontroller capacity of *Trichoderma harzianum* (T10) and *Trichoderma atroviride* (T3), *Pseudomonas fluorescens* (C14-VR) and *Pseudomonas baetica* (16-VB) and two strains of *Bacillus subtilis* both *in vitro* and in planta. For this, dual cultures were performed to evaluate the inhibitory capacity of the controlling microorganisms. From the *in vitro* test, two strains of each genus were selected and a compatibility test was carried out to reach a plant level in the greenhouse. A total of 48 plants with 16 treatments, including individual and consortium treatments, were analyzed. It was shown that *Bacillus subtilis* (B5-OJ1) presented a greater individual inhibitory capacity *in vitro* against *P. exigua* with values higher than 80% and the least effective were the strains of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma atroviride*. When comparing the incidence of the disease in plants, it was concluded that the best treatment was the consortium of *Bacillus subtilis* 24R and *Trichoderma harzianum* T10, demonstrating that these microorganisms complement their mechanisms of action favoring plant resistance to attack by *P. exigua*.

Key words: Biocontrollers, *Trichoderma* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Phoma exigua*, *Physalis peruviana*.

3. INTRODUCCIÓN

La uvilla (*Physalis peruviana* L.) es una planta herbácea que crece en zonas subtropicales y produce frutas jugosas con forma ovoide (Puente et al., 2011). Este cultivo se ha expandido en el mercado interno y externo, gracias a sus valores nutricionales se fomentó su producción en Ecuador. La acogida en el mercado internacional es grande debido a su sabor y se considera una fruta exótica (Basantes, 2015).

En la actualidad, el campo agrícola ecuatoriano produce 700 hectáreas de uvilla para la exportación (EL COMERCIO, 2011) y existen 52 productores con aproximadamente 87 hectáreas con potencial de exportación (Agrocalidad, 2019). El problema radica en que los cultivos de uvilla son propensos al ataque de plagas y enfermedades que pueden dañar a diferentes partes de la planta. Los hongos como *Phoma* sp., *Fusarium oxysporum*, *Cercospora* spp., *Alternaria* sp., entre otros, afectan a este cultivo (Díaz, 2016).

Las enfermedades más comunes son: la muerte descendente, la esclerotiniosis, el mal del semillero, la mancha gris, el secamiento descendente de ápice del cáliz y los nematodos (Gongora & Rojas, 2006). La muerte descendente es provocada por el hongo *Phoma* sp., cuyos síntomas se desarrollan en las hojas con la aparición de pequeñas manchas oscuras, continúa a lo largo del tallo generando debilitamiento y en consecuencia el marchitamiento de la planta (Silva Tamayo, 2006; Zapata et al., 2002). Las temperaturas bajas y la humedad alta crean las condiciones ideales para el apareamiento de los síntomas en la planta (García et al., 2014). *Phoma* es un género perteneciente al orden Pleosporales, división Ascomycota. Sus colonias son aterciopeladas y en medio agar papa dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés) presentan color café oscuro con tonos verde oliva y en agar harina de avena (OMA por sus siglas en inglés) un color crema con centro café. Este género produce picnidios, conidios y clamidosporas, que ayudan con la identificación y diseminación del hongo (Aguilar, 2020; Rai et al., 2014) (Anexo 1).

En Ecuador, las investigaciones sobre las enfermedades de la uvilla aún no son suficientes. Chicaiza (2008) nombra varias enfermedades fúngicas presentes en la planta y *Phoma* sp. es uno de los patógenos más importantes, pero en Latinoamérica solamente se reporta en Colombia (Góngora & Rojas, 2006). Sin embargo, recientemente se registró por primera vez la presencia de *Phoma* sp. de la planta de uvilla en la serranía de Ecuador (Aguilar, 2020).

Para controlar la aparición de este tipo de enfermedades y evitar la pérdida de los cultivos, los agricultores recurren al uso de agroquímicos que afectan a la planta, incrementando la susceptibilidad a diversos tipos de patógenos. Además, incrementan los costos de producción y eventualmente disminuirá el rendimiento. Este patógeno también afecta al fruto, lo que causa una pérdida del 40% del cultivo (Altamirano, 2010; Palacios, 2013).

Por ello, Agrocalidad (Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario) plantea una estrategia basada en una combinación de técnicas como: el control biológico, la manipulación del hábitat, la modificación de las prácticas culturales y el uso de variedades resistentes (Agrocalidad, 2016). El control biológico promueve el uso de organismos vivos como alternativas más rentables y menos nocivas tanto para el ambiente como para la planta. Dicho de otra manera, se introduce un organismo para que se produzca un cambio en la comunidad presente e impida o minimice el desarrollo de un agente patógeno sin dañar a la planta (Mondino & Vero, 2006).

Los microorganismos más estudiados como biocontroladores son *Trichoderma* spp., *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* sp. Estos han sido enfrentados a diferentes fitopatógenos en plantas de ajo, cebolla, tomate, uvilla, entre otras (Izzeddin & Medina, 2011). Varios estudios han observado la actividad antagónica y los efectos que provocan estos biocontroladores frente a la diversidad de hongos fitopatógenos, como microorganismos que producen enfermedades en las plantas (Agrios, 2005). Se considera un buen antagonista al organismo capaz de impedir el crecimiento y colonización del patógeno para evitar el desarrollo de la enfermedad (Mondino & Vero, 2006).

Para comprobarlo, se utilizan varias metodologías, desde evaluaciones *in vitro* hasta *in planta*, que son estudios en cultivo a pequeña escala de laboratorio y en la planta como hospedero, respectivamente (Agrios, 2005). También, se analizó la acción biocontroladora conjunta de distintas cepas (Soria, 2020). Por ejemplo, Silva (2018) evaluó el efecto antagónico de *Trichoderma* spp. en cajas Petri con PDA y *Bacillus* spp. en medio caldo infusión cerebro corazón (BHI, por sus siglas en inglés) frente al hongo *Fusarium oxysporum*, patógeno de la uvilla. Soria (2020), estudió a la bacteria *Pseudomonas* sp. y al hongo *Trichoderma* spp. como controladores de hongos en la uvilla en el medio PDA. Por su parte, Reyes et al. (2011) examinaron la actividad antifúngica de *Bacillus* spp. en PDA y agar nutriente (AN). No obstante, los tres estudios ponen en práctica una metodología estándar al momento de evaluar la capacidad antifúngica, para producir una alteración en la estructura de una célula fúngica y, así, inhibir su crecimiento (Gregorí, 2005).

Como resultado de las investigaciones sobre los biocontroladores mencionados, se concluyó que *Trichoderma* spp., *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* sp. ejercen un control efectivo en el crecimiento de hongos fitopatógenos de la uvilla. Por otra parte, algunas especies de *Trichoderma* y *Bacillus* en consorcio no produjeron la inhibición esperada del hongo (Silva, 2018). Sin embargo, consorcios formados por *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. sí inhibieron el crecimiento del patógeno (Soria, 2020). Además, los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* actuaron en conjunto e inhibieron el crecimiento micelial (Caviedes, 2010).

No obstante, no se ha encontrado información sobre el comportamiento individual y en consorcio de los tres microorganismos mencionados como biocontroladores de *Phoma* sp. en la uvilla ecuatoriana. Por tanto, esta investigación evaluó la capacidad inhibitoria individual y en consorcio *in vitro* de los tres microorganismos frente al hongo *Phoma exigua*, con el fin de ayudar al control de la enfermedad y evitar pérdidas económicas futuras en los cultivos susceptibles al patógeno.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad inhibitoria *in vitro* e *in planta* de *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas* spp. y *Trichoderma* spp. frente al hongo *Boeremia exigua* (syn. *Phoma exigua*) en plantas de uvilla (*Physalis peruviana* L.).

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Comparar la actividad antagonista contra *Boeremia exigua* var. *exigua* (syn. *Phoma exigua*) de los biocontroladores *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas* spp. y *Trichoderma* spp. en ensayos *in vitro*.

Evaluar la efectividad de los biocontroladores ensayados en consorcio *in vivo* en plántulas de uvilla.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Las pruebas se realizaron en el laboratorio de fitopatología y control biológico de la PUCE y en un invernadero particular. Los ensayos del antagonismo fueron tipo experimental, se utilizaron como controladores biológicos a tres microorganismos de los géneros de *Trichoderma*, *Pseudomonas* y *Bacillus* contra el fitopatógeno *Phoma exigua*.

5.1 REACTIVACIÓN DE CEPAS

Se reactivaron 20 cepas de *Trichoderma*, 10 de *Bacillus subtilis* (Silva, 2018) y cinco de *Pseudomonas* (Soria, 2020) con las cuales se realizó una pre selección de las cepas que inhibieron el crecimiento del hongo. Se seleccionaron dos cepas de cada microorganismo, *Bacillus subtilis* (B5-OJ1y 24R), *Trichoderma harzianum* (T10) y *Trichoderma atroviride* (T3), *Pseudomonas fluorescens* (C14-VR) y *Pseudomonas baetica* (16-VB). Del estudio realizado por Aguilar (2020) se reactivó la cepa codificada como NJC2. Las cepas de *Trichoderma* spp. y *Phoma exigua* fueron reactivadas en PDA e incubadas durante siete días a 25°C. Mientras tanto, las cepas bacterianas se reactivaron en agar nutriente (AN) e incubaron por 72 horas a 28°C. Para comprobar la identidad y pureza de las cepas, se utilizó el microscopio compuesto, realizando tinción con azul de lactofenol para hongos (Anexo 7) y tinción Gram para bacterias (Anexo 8) (Sosa et al., 2011).

5.2 PRUEBAS INDIVIDUALES DE ANTAGONISMO *IN VITRO*

Los inóculos bacterianos fueron sembrados en 5 mL del medio BHI a 28°C, después de 24 horas se ajustó la concentración a 10^8 mediante el espectrofotómetro (Tejera et al., 2012). La capacidad inhibitoria de *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas* spp. y *Trichoderma* spp., fueron evaluadas mediante cultivos duales, técnica descrita por Fernández y Suárez (2009). Los microorganismos fueron enfrentados en platos Petri con medio de cultivo PDA. Para los hongos se colocó un disco de agar con crecimiento fúngico de 5 mm del fitopatógeno a 1 cm de distancia de los bordes de la caja Petri y se incubó por siete días. En el extremo opuesto, se ubicó el disco con micelio del biocontrolador y se dejó a 28°C por 10 días (Fernández & Suárez, 2009) (Anexo 3).

En el caso del antagonismo con bacterias (*Bacillus subtilis* y *Pseudomonas* spp.) se colocó un disco de 5 mm de *P. exigua* en el centro de la caja Petri y a 3 cm de distancia se realizaron estrías paralelas de la bacteria en cuatro posiciones distintas, se incubó a 30°C durante diez días (Slama et al., 2019) (Figura 1).

Este proceso se realizó por triplicado para cada biocontrolador y cada 24 horas por 10 días se midió el halo de inhibición (Soria, 2020). Como control se empleó un disco con el micelio del fitopatógeno en el centro de la caja Petri con medio PDA, se incubó por diez días a 28°C y durante ese tiempo, se fue registrando el crecimiento radial en cm (Anexo 2).



Figura 1. Enfrentamiento bacteria contra hongo.

Para bacterias el cálculo del porcentaje de inhibición del crecimiento fúngico se calculó con la fórmula propuesta por Alenezi et al. (2016) después de haber transcurrido los 10 días:

$$PICR = 1 - (a/b) \times 100\%$$

Donde (a) representa el radio de la colonia enfrentada y (b) el radio de la colonia control (Slama et al., 2019).

Por otro lado, para calcular la capacidad antagonista de *Trichoderma* spp. se empleó la fórmula del porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) propuesta por Ezziyyani et al. (2004)

$$PICR = (R1 - R2) / R1 \times 100$$

Donde R1 es el radio de la colonia del patógeno control y R2 es el radio del patógeno que está en enfrentamiento.

5.3 PRUEBAS CONJUNTAS EN PLÁNTULAS DE UVILLA

Se utilizaron 48 plantas de uvilla sanas, sin síntomas o signos de enfermedad, obtenidas de la empresa Terrafertil/Nature's Heart y se incluyeron tres controles negativos y tres controles positivos. Las plantas fueron mantenidas en condiciones de invernadero, regadas cada dos días y cada semana se utilizó fertilizante foliar Nitrofoska (Vera, 2021). Al mismo tiempo, se realizó una fermentación líquida de dos cepas seleccionadas de *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas* spp., que consistió en inocular una asada de una colonia en medio BHI. Se incubó a 25°C durante 24 horas y se mantuvo en agitación a 90 rpm. Para verificar la reproducción de los cultivos bacterianos, se midió la absorbancia en espectrofotómetro (Soria, 2020).

Para el inóculo fúngico se utilizó para cada cepa una caja Petri de 10 días de incubación. Se lavaron las esporas con agua estéril en un frasco con Tween 80 al 0.1% se colocó un embudo con gasas para filtrar las conidias. Esta solución se agitó utilizando el vórtex por 30 segundos y las esporas se contabilizaron con la cámara de Neubauer (Cañedo & Ames, 2004). La cantidad de esporas adecuadas para producir una infección en la planta es de 1×10^6 conidias/ml, que fue calculado con la fórmula planteada por Castellanos, Jara y Mosquera (Castellanos et al., 2011).

$$\text{Conidias/ml} = \text{Número de conidias contadas} \times 50\,000$$

Dependiendo de la concentración de conidias del inóculo original, se estandarizó el volumen final del inóculo con la siguiente fórmula:

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

Donde C_1 será el resultado del cálculo de conidias/ml, V_2 será el volumen que se necesita para la aspersión y C_2 la concentración de 1×10^6 (conidias/ml) (Castellanos et al., 2011).

Previo a la inoculación en plantas, se realizó una prueba de compatibilidad en agar PDA para comprobar que no exista inhibición entre los biocontroladores y para determinar la organización de los consorcios. La prueba consistió en colocar el pedazo de agar con crecimiento del hongo antagonista y a 3 cm de distancia se realizaron estrías paralelas de cada bacteria (Soria, 2020) (Figura 2).

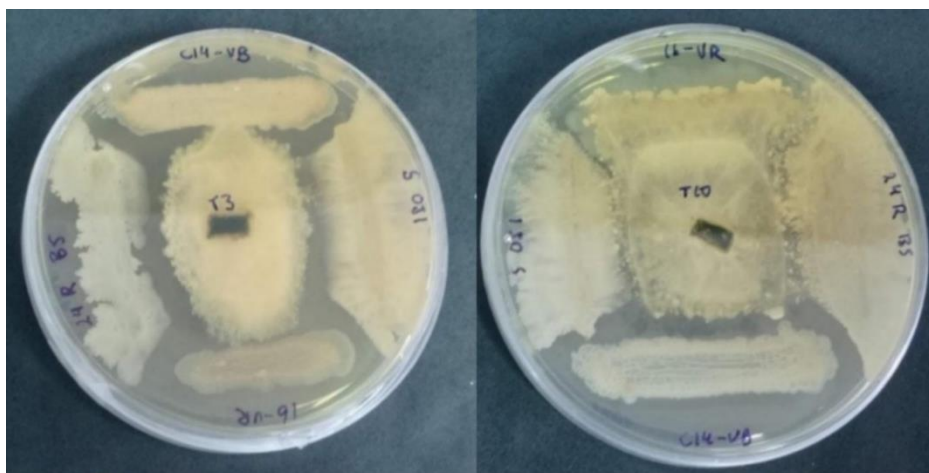


Figura 2. Pruebas de Compatibilidad de las cepas de *Trichoderma harzianum* (T10) y *Trichoderma atroviride* (T3) con cepas de *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas spp.*

Por último, las plántulas se trataron con las suspensiones de los tres biocontroladores en consorcio y fueron colocados directamente al suelo. Una vez inoculados, se colocó la suspensión de conidias del fitopatógeno en atomizadores y se esparció al follaje a las plantas de uvilla. Después de 10 días se evaluó el desarrollo de la sintomatología en condiciones de invernadero (13-20 °C) y a los 28 días finalizó la evaluación y recolección de datos (Urrea et al., 2011).

La incidencia de la enfermedad se calculó utilizando los datos registrados durante 28 días de observación y la fórmula establecida por Arguedas Gamboa et al. (2018).

$$I (\%) = \frac{\text{Total de plantas enfermas}}{\text{Total de plantas evaluadas}} \times 100$$

Para la severidad de la enfermedad se utilizaron los datos generados por la escala de cinco grados propuesta por Arguedas Gamboa et al. (2018). Siendo el grado de severidad “A” la ausencia de síntomas (0,1-20%), el grado “B” es equivalente al 21-40% de hojas que se encuentran marchitas o cloróticas, en el grado “C” se encuentra el 41-60% de las hojas marchitas, grado “D” oscila entre el 61-80% de las hojas marchitas, secas o cloróticas y por último el grado “E” que está entre el 81-100% de la enfermedad (muerte de la planta o severamente afectada). Todos estos valores fueron calculados con la siguiente fórmula (Castellanos González et al., 2020):

$$S (\%) = \frac{\sum (n \times V)}{(K \times N)} \times 100$$

Donde n es el número de plantas enfermas en cada categoría de infección, V indica el valor numérico de las categorías de severidad, K es la constante (número de réplicas por cada tratamiento) y N el número total de plantas utilizadas en el ensayo.

5.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Este estudio fue organizado en un diseño completo al azar, donde se evaluaron por triplicado cada tratamiento frente al hongo *P. exigua*, estableciéndose un total de 16 tratamientos incluidos los controles; se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba post hoc de Tukey para determinar diferencias significativas entre los tratamientos utilizados, con un nivel de significancia del 95% (Tabla 1). Previo a la aplicación del ANOVA, se confirmó la normalidad y homogeneidad de los datos. Estas pruebas estadísticas se procesaron en el programa IBM SPSS Statistics 21 (Bakieva et al., 2015).

Tabla 1. Organización de los 16 tratamientos para evaluación de biocontroladores para *Phoma exigua* en uvilla.

Código	Tratamiento
1	Control positivo (solo la planta)
2	Control negativo (<i>Phoma exigua</i>)
3	<i>Trichoderma harzianum</i> . (T10)
4	<i>Trichoderma atroviride</i> (T3)
5	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (C14-VB)
6	<i>Pseudomonas baetica</i> (16-VB)
7	<i>Bacillus subtilis</i> (B5-OJI)
8	<i>Bacillus subtilis</i> (24R)
9	<i>Bacillus subtilis</i> (24R) + <i>Pseudomonas baetica</i> (16-VB)
10	<i>Bacillus subtilis</i> (B5-OJI) + <i>Pseudomonas fluorescens</i> (C14-VB)
11	<i>Bacillus subtilis</i> (24R) + <i>Trichoderma harzianum</i> (T10)
12	<i>Bacillus subtilis</i> (B5-OJI) + <i>Trichoderma atroviride</i> (T3)
13	<i>Pseudomonas</i> sp. (C14-VB) + <i>Trichoderma atroviride</i> (T3)
14	<i>Pseudomonas</i> sp. (16-VB) + <i>Trichoderma harzianum</i> (T10)
15	<i>Pseudomonas</i> sp. (16-VB) + <i>Trichoderma harzianum</i> (T10) + <i>Bacillus subtilis</i> (24R)
16	<i>Pseudomonas</i> sp. (C14-VB) + <i>Trichoderma atroviride</i> (T3) + <i>Bacillus subtilis</i> (B5-OJI)

6. RESULTADOS

Para evaluar la actividad antagonista in vitro contra *Phoma exigua* se enfrentaron un total de 14 cepas de *Trichoderma* spp. (Anexo 3), seis de *Bacillus subtilis* (Anexo 4) y cinco de *Pseudomonas* spp. (Anexo 5) de las cuales se seleccionaron dos cepas de cada biocontrolador, los que presentaron el mejor porcentaje de inhibición del crecimiento del fitopatógeno. El antagonismo in vitro de *Trichoderma* hongo frente a *Phoma exigua* mostró una inhibición del crecimiento micelial y se comprobó el micoparasitismo por microscopia (40x) (Figura 3). La cepa de *Trichoderma atroviride* (T3) presentó un PICR del 34,92%, mientras que la cepa de *Trichoderma harzianum* (T10) un 33,86% (Figura 4).

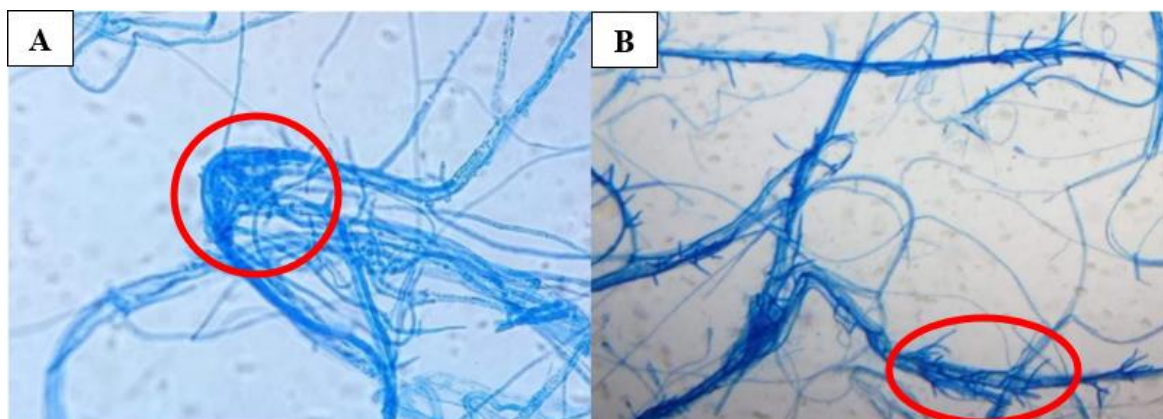


Figura 3. Micoparasitismo de *Trichoderma* frente a *Phoma exigua* en el microscopio con un aumento de 40x. A) Enrollamiento de las hifas de *Trichoderma atroviride* (T3) con *Phoma exigua* y B) Presencia del enrollamiento de *Trichoderma harzianum* (T10) (hifas más oscuras) frente al fitopatógeno.

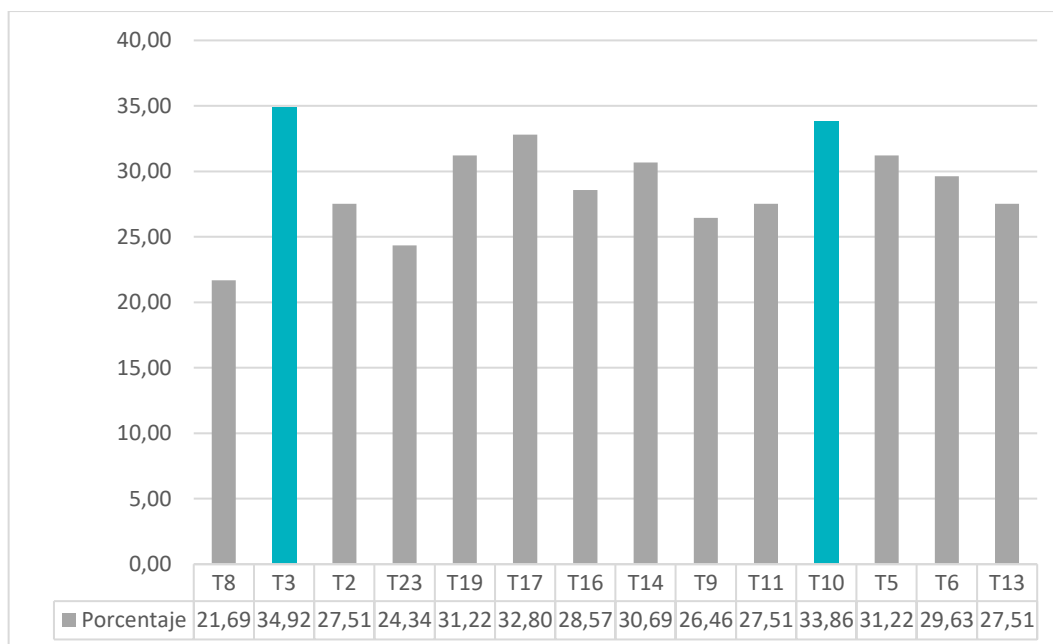


Figura 4. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) del enfrentamiento de *Trichoderma* spp. frente a *Phoma exigua*.

Por otro lado, de las cepas de *Bacillus subtilis* seleccionadas son codificadas como B5-OJ1 y 24R presentando un PICR del 84,13% y 82,01% respectivamente (Figura 5). Por último, la cepa de *Pseudomonas fluorescens* (C14-VR) presentó una inhibición del 72,22% y *Pseudomonas baetica* (16-VB) un 84,13% (Figura 6).

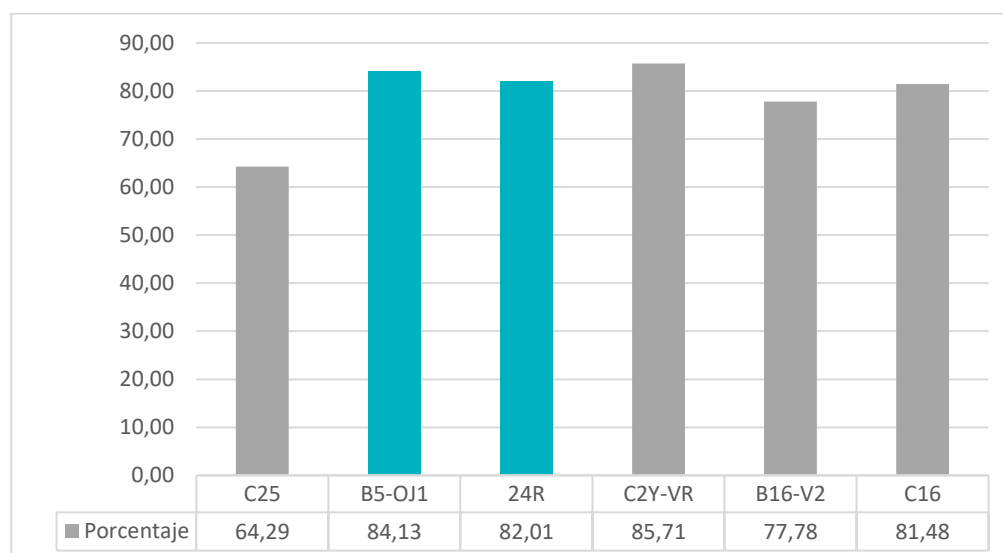


Figura 5. Porcentaje de inhibición del crecimiento fúngico del enfrentamiento de *Bacillus subtilis* frente a *Phoma exigua*.

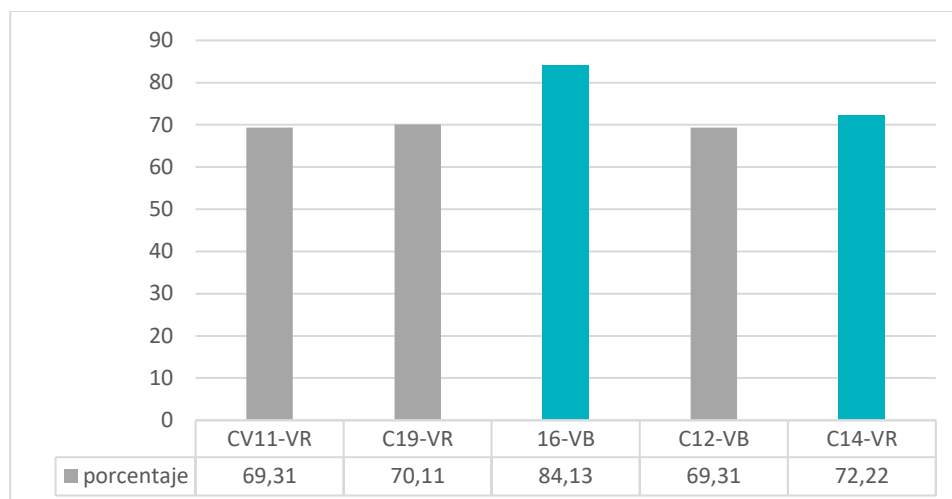


Figura 6. Porcentaje de inhibición del crecimiento fúngico del enfrentamiento de *Pseudomonas* spp. frente a *Phoma exigua*.

6.1 EVALUACIÓN DE INCIDENCIA Y SEVERIDAD

Los controles negativos presentaron los síntomas característicos de *Phoma exigua*. Los tratamientos restantes evidenciaron síntomas al día 10 (27 plantas enfermas) y a los 28 días (34 plantas enfermas) (Anexo 6). La incidencia de la muerte descendente en hojas a los 10 y 28 días de evaluación reveló un porcentaje del 52,08 y 72,92 respectivamente, demostrando una disminución de la enfermedad en los primeros 10 días de observación. No obstante, en el último día de evaluación se observó un aumento de los síntomas presentes en las hojas de la mayoría de las plantas (Figura 7).

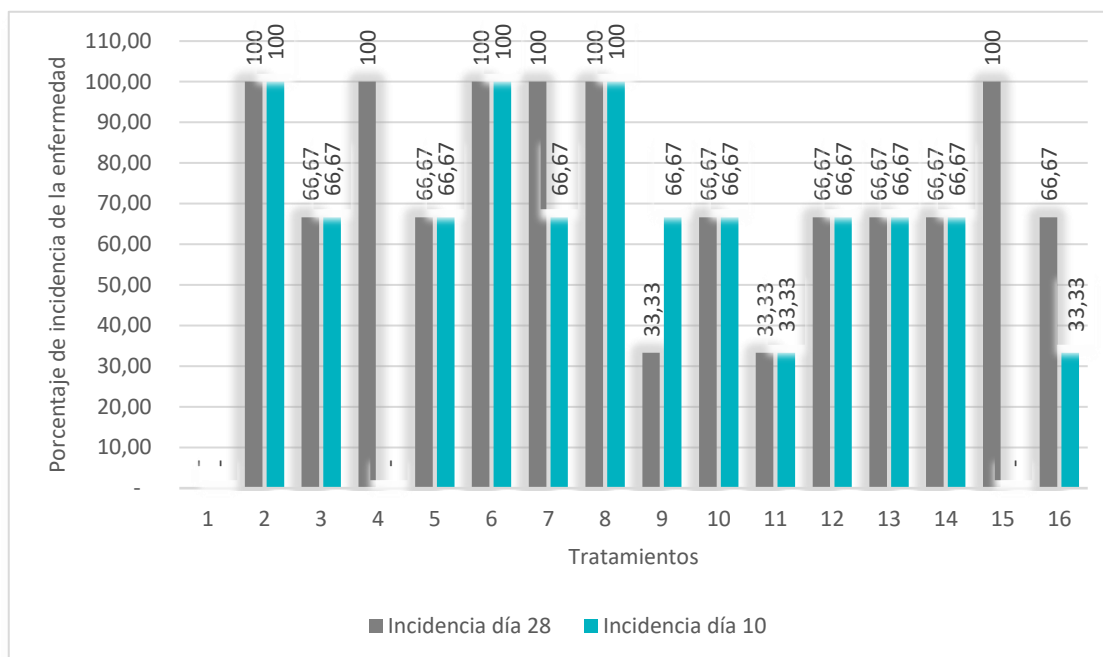


Figura 7. Incidencia de la enfermedad para el tratamiento del fitopatógeno con biocontroladores.

En el día 10 de observación después de la inoculación del fitopatógeno, la severidad osciló entre 0-55,56% y a los 28 días entre 6,94 y 62,5% en la totalidad de plantas evaluadas. Dentro de los tratamientos que presentaron mejores resultados en los 10 días se encuentran los consorcios de *Bacillus subtilis* (24R) + *Trichoderma harzianum* (T10) y el de *Pseudomonas fluorescens* (C14-VR) + *Trichoderma atroviride* (T3) + *Bacillus subtilis* (B5-OJ1), con una severidad <10%. Al día 28 se observó que el consorcio *Bacillus subtilis* (24R) + *Trichoderma harzianum* (T10) mantuvo el mismo porcentaje de severidad en ambas fechas de evaluación. El tratamiento de *Bacillus subtilis* (24R) + *Pseudomonas baetica* (16-VB) presentó una disminución de la enfermedad en un 50% en los dos periodos de evaluación. Por otro lado, los tratamientos de *Pseudomonas baetica* (16-VB) y de *Bacillus subtilis* (24R) presentaron mayor porcentaje de severidad de la enfermedad en planta, tanto a los 10 como a los 28 días dando del 81-100% (Figura 8). El resumen fotográfico de este estudio se encuentra en el **Anexo 6**. Tratamiento 1 al 16 en consorcio sobre plantas de uvilla a los 10 y 28 días después de la inoculación. Incluye control positivo (tratamiento 1) y negativo (tratamiento 2).(Anexo 6).

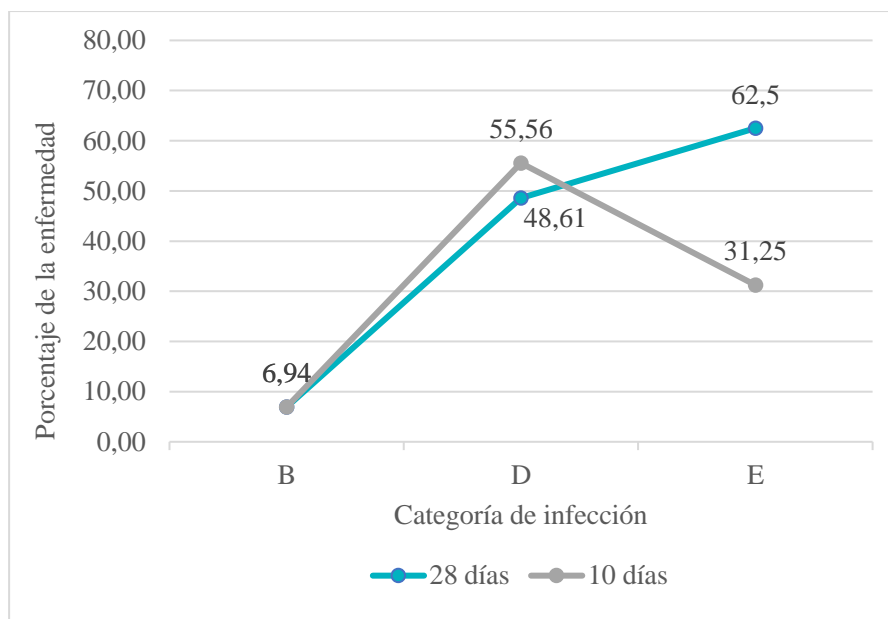


Figura 8. Severidad de la enfermedad causada por *P. exigua* en los dos periodos de evaluación en plantas de uvilla.

6.2 ANALISIS ESTADISTICOS

Los datos obtenidos cumplieron con los supuestos del ANOVA. La prueba post hoc de Tukey presentó diferencias entre las medias de los tratamientos ($p < 0,05$). El control positivo fue el mejor con una media de 37,67 cm, seguido del tratamiento de *Bacillus subtilis* (24R) + *Trichoderma harzianum* (T10) con una media de 31,33 cm. Además, el consorcio de *Pseudomonas fluorescens* (C14-VB), *Trichoderma atroviride* (T3) y *Bacillus subtilis* (B5-OJ1) siguieron la tendencia con una media de 30,33 cm, seguido del consorcio de *Pseudomonas baetica* (16-VB) + *Trichoderma harzianum* (T10) + *Bacillus subtilis* (24R) con una media de 28 cm. Por último, los tratamientos que menos favorecieron al crecimiento de la planta fueron: el control negativo, *Pseudomonas baetica* (16-VB) + *Trichoderma harzianum* (T10) y *Bacillus subtilis* (B5-OJ1) con 17,67 cm, 19,67 cm y 20,33 cm respectivamente (Tabla 2).

Tabla 2. Promedios de la evaluación biocontroladora de los tratamientos en condiciones de invernadero evaluadas a los 28 días. Prueba de TUKEY p<0.05.

Código de tratamiento	Tratamiento	Longitud de tallos (cm)
2	Control negativo (<i>Phoma exigua</i>)	17,67 ^A
14	<i>Pseudomonas</i> sp. (16-VB) + <i>Trichoderma</i> sp. (T10)	19,67 ^{AB}
7	<i>Bacillus subtilis</i> (B5-OJ1)	20,33 ^{AB}
9	<i>Bacillus subtilis</i> (24R) + <i>Pseudomonas</i> sp. (16-VB)	20,67 ^{AB}
10	<i>Bacillus subtilis</i> (B5-OJ1) + <i>Pseudomonas</i> sp. (C14-VB)	21,33 ^{AB}
6	<i>Pseudomonas baetica</i> . (16-VB)	21,67 ^{AB}
4	<i>Trichoderma atroviride</i> (T3)	22,00 ^{AB}
5	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (C14-VB)	24,00 ^{AB}
8	<i>Bacillus subtilis</i> (24R)	24,67 ^{AB}
3	<i>Trichoderma harzianum</i> (T10)	26,67 ^{ABC}
12	<i>Bacillus subtilis</i> (B5-OJ1) + <i>Trichoderma</i> sp. (T3)	27,33 ^{ABC}
13	<i>Pseudomonas</i> sp. (C14-VB) + <i>Trichoderma</i> sp. (T3)	28,00 ^{ABC}
15	<i>Pseudomonas</i> sp. (16-VB) + <i>Trichoderma</i> sp. (T10) + <i>Bacillus subtilis</i> (24R)	28,00 ^{ABC}
16	<i>Pseudomonas</i> sp. (C14-VB) + <i>Trichoderma</i> sp. (T3) + <i>Bacillus subtilis</i> (B5-OJ1)	30,33 ^{BC}
11	<i>Bacillus subtilis</i> (24R) + <i>Trichoderma</i> sp. (T10)	31,33 ^{BC}
1	Control positivo (solo la planta)	37,67 ^C

*Los valores que tienen diferente letra difieren estadísticamente

7. DISCUSIÓN

La muerte descendente en la uvilla provocada por el hongo *Phoma exigua* afecta a cualquier estado de desarrollo de la planta, desde las hojas, tallos, capuchones hasta los frutos. Para evitar la muerte de la planta, se han evaluado microorganismos propios del suelo como *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas* spp. y *Trichoderma* spp (Villarreal-Delgado et al., 2018). Cada uno actúa de manera diferente frente al hongo e inciden directamente en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Estos microorganismos fueron seleccionados por ser los géneros más favorables para las plantas aportando diferentes nutrientes y estimulando su crecimiento, además de su intervención como controladores biológicos (Cano, 2011). El género *Pseudomonas* posee varios mecanismos que ayudan a presentar un efectivo antagonismo e inducen resistencia en la planta frente a los fitopatógenos. Producen metabolitos como sideróforos, fitohormonas, aminoácidos, vitaminas, enzimas, además de ser promotores específicos del crecimiento de la planta (Pérez Álvarez et al., 2015). Asimismo, *Bacillus subtilis* comparte similitudes con *Pseudomonas* en cuanto a sus mecanismos de acción, se diferencian en que el género *Bacillus* posee endosporas que le ayudan a desarrollar una capacidad de diseminación y prevalencia en los distintos ecosistemas (Villarreal-Delgado et al., 2018). Mientras que, el género *Trichoderma* es un hongo con una alta capacidad reproductiva y de diseminación. Compite por espacio y nutrientes (carbono, hierro, nitrato), además es capaz de realizar micoparasitismo y producir metabolitos antibióticos que inhiben o controlan al patógeno, sustancias que ayudan al desarrollo vegetal y a acelerar el desarrollo de las raíces permitiendo la resistencia por parte de las plantas al estrés provocado por el patógeno (Martínez, Infante & Reyes, 2013).

En este estudio se evaluaron seis aislados en total, dos de cada género tanto *in vitro* como *in planta*, obteniendo resultados distintos. Al comparar los enfrentamientos *in vitro* de los tres microorganismos biocontroladores se obtuvieron mejores resultados de *Bacillus subtilis* B5-OJ1 con una inhibición fúngica del 84,13%. Esta cepa en específico fue evaluada por Silva (2018) y Vera (2021) frente a *Fusarium oxysporum* en cultivos de uvilla alcanzando valores *in vitro* similares a los obtenidos frente a *Phoma exigua*, evidenciándose que es el mejor tratamiento bacteriano probado frente a hongos fitopatógenos. Al contrario, al probarlo en planta no se visualizó el mismo resultado, debido a que este tratamiento fue uno de los menos efectivos con una incidencia del 100% a los 28 días de observación.

Villarreal-Delgado y colaboradores (2018) mencionan que inocular cepas de *B. subtilis* con capacidad biocontroladora ocasionan diversos impactos en los cultivos. En algunos no afecta a la comunidad microbiana y en otras altera las condiciones del suelo, a pesar de actuar como controlador. Por ello, se precisa realizar más estudios con respecto a la manera en la que interviene cada microorganismo para así no modificar el ecosistema y que cumpla con el propósito de inhibir al patógeno.

Al inocular las plantas con *B. subtilis* en consorcio con otros microorganismos como *Pseudomonas fluorescens* y *Trichoderma atroviride* se evidenció una disminución de la enfermedad al igual que en el consorcio de *Bacillus subtilis* (24R) junto a *Pseudomonas baetica* y *Trichoderma harzianum*. Demostrando que la combinación de microorganismos puede ser positiva en la mayoría de los casos por los efectos sinérgicos entre ellos. Según Jambhulkar et al. (2018) existe una compatibilidad entre *T. harzianum* y *P. fluorescens*, debido a que no existe competencia o inhibición entre ellos. En la presente investigación no se probaron estas especies en conjunto porque al probar la compatibilidad *in vitro* se observó una mejor afinidad entre *P. fluorescens* y *T. atroviride* en lugar de *T. harzianum* a pesar de existir un contacto leve entre dichos microorganismos (Figura 2).

La especie *Bacillus subtilis* B5-OJ1 mostró el porcentaje de inhibición micelial más alto en comparación con los otros tratamientos con 84,13%, esto puede deberse a que uno de sus mecanismos de acción es la producción de enzimas líticas. Dentro de las más importantes se encuentran las quitinasas y β -1,3-glucanasas que degradan la pared celular de hongos e incluso causan lisis celular. Durante este proceso también se liberan oligómeros de glucano y quitina que ayudan a las plantas a crear defensas contra patógenos (Pedraza et al., 2020). A diferencia del hongo *Trichoderma harzianum* T10 que obtuvo el PICR más bajo (33,86%) seguido de *Trichoderma atroviride* (34,92%) (Figura 4), demostrando que a pesar de ser uno de los antagonistas más utilizados no siempre tiene el mismo efecto en todos los fitopatógenos. Infante, Martínez, González y Reyes (2009) indican que este género tuvo varias interacciones hifales sobre *Alternaria padwickii*, *Bipolaris oryzae*, *Curvularia lunata*, excepto frente a *Phoma* sp. a pesar de tener una alta capacidad competitiva.

En el enfrentamiento *in vitro* de *Trichoderma atroviride* (T3) se pudo evidenciar de mejor manera la competencia por espacio y nutriente debido a que se observó el crecimiento del antagonista sobre la superficie de la colonia del fitopatógeno al igual que los resultados obtenidos por Soria (2020).

Páramo-Aguilera y Hernández-Mendoza (2018) concluyen que *T. atroviride* resultó mejor que *T. harzianum* porque no influye en el crecimiento de *F. oxysporum* por la emisión de compuestos volátiles que, a pesar de inhibir al patógeno, aceleran su desarrollo.

A nivel de planta, las especies de *Trichoderma* no actuaron de la misma manera que en los ensayos *in vitro*. *Trichoderma harzianum* alcanzó una incidencia de 66,67% y *Trichoderma atroviride* de 100%. Estos resultados se deben a varios factores como la especie de planta, disponibilidad de nutrientes, la humedad, temperatura y tipo de suelo (Infante, Martínez, González & Reyes, 2009). Por lo tanto, se demuestra que no siempre las cepas que obtienen un mayor porcentaje antagonista a nivel *in vitro* muestren los mejores resultados *in vivo* como lo mencionado por Vera (2021). El consorcio de *T. harzianum* junto a *B. subtilis* (24R) se presentó como el mejor tratamiento puesto que mantuvieron la incidencia de la enfermedad al día 10 y 28 con un 33,3%. De acuerdo a Zaim et al. (2018) al combinar estos controladores, la incidencia y gravedad de la enfermedad se reduce considerablemente en comparación con las pruebas individuales. De igual manera, Pierson y Weller (1994) demostraron que al combinar microorganismos se complementan sus mecanismos de acción para actuar en beneficio de la planta.

En este estudio, de manera individual, las cepas de *Pseudomonas* presentaron valores similares a *Bacillus subtilis*, probando así su alta capacidad biocotroladora para *Phoma* sp. En la actualidad se desconoce el mecanismo o sustancia que produce este género para ejercer el control *in vitro* sobre fitopatógenos. No obstante, se proponen teorías como la producción de varios antibióticos y sideróforos que actúan secuestrando el hierro y así dejar sin este recurso al fitopatógeno (Valencia-Cantero et al., 2005). Los ensayos *in planta* reflejaron una incidencia de la enfermedad del 100% para *P. baetica* y del 66,6% para *P. fluorescens*. Estos tratamientos no fueron eficientes por los niveles aumentados de hierro en el medio otorgados por el fertilizante, razón por la cual se inhibió la producción de sideróforos por *Pseudomonas* y, por ende, la competencia por este mineral entre el controlador y el patógeno (Valencia-Cantero et al., 2005).

Los ensayos en planta a nivel de promoción de crecimiento demostraron que el mejor tratamiento con respecto a la altura y estado de la misma fue el control positivo, presentando una media de 37,67 cm. Esto sucedió debido a que las plantas únicamente estaban tratadas con fertilizante foliar (NITROFOSKA) que contiene macro y micronutrientes necesarios para el crecimiento vegetal como nitrógeno (20%), fósforo (19%), potasio (19%), magnesio (0,5%),

calcio y hierro (COMPO GmbH & Co, 2012; Marín, 2011). El segundo tratamiento con resultados favorables fue el consorcio *Bacillus subtilis* (24R) y *Trichoderma harzianum* T10 con una media de 31,33 cm, siendo mencionados por Yépez (2020) como promotores de crecimiento y control de fitopatógenos, aumentando la disponibilidad de nutrientes gracias a la asociación simbiótica con la planta. Entre los cinco mejores tratamientos encontramos al género *Trichoderma*. Este hongo es efectivo contra patógenos específicos debido al reconocimiento molecular entre ellos a través de interacciones entre lectinas-carbohidratos (Infante, Martínez, González & Reyes, 2009). Mondino y Vero (2006) concluyen que este antagonista coloniza las raíces de las plantas para luego actuar como promotor del crecimiento. Asimismo, inactiva las enzimas producidas por patógenos durante la infección, incorpora nutrientes y aumenta el desarrollo radical.

8. CONCLUSIONES

1. La cepa de *Bacillus subtilis* codificada como B5-OJ1 presentó una mayor capacidad inhibitoria individual *in vitro* frente al hongo *Phoma exigua*, seguido de *Pseudomonas baetica* con valores superiores al 80%. Mientras que los resultados menos efectivos fueron las cepas de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma atroviride* con valores menores al 50%.
2. Al comparar la incidencia de la enfermedad se determinó que el mejor tratamiento a nivel de planta fue el consorcio de *Bacillus subtilis* 24R y *Trichoderma harzianum* T10 manteniendo la incidencia de la enfermedad controlada en los dos periodos de evaluación en comparación con los tratamientos individuales. Además, mejoró el crecimiento de la planta presentando la media más alta sin contar con las plantas testigo. Por tanto, es importante analizar la cepa antes de colocarla en la planta para conocer las condiciones y concentraciones necesarias para que se produzca una correcta supresión del fitopatógeno y se recomienda realizar más estudios para evaluar diferentes dosis de los biocontroladores por planta.

9. AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por el proyecto “Diagnóstico de problemas fitosanitarios y agentes de control biológico asociados a uvilla (*Physalis peruviana*) en el Ecuador 2019-2020”. Convocatoria Proyectos de Investigación PUCE, 2018 a cargo de la Mtr. Jeniffer Yánez dentro del laboratorio de Fitopatología y Control Biológico de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Además, un agradecimiento especial a la sala de preparaciones por su colaboración y a Terrafertil por proporcionar las plantas de uvilla para esta investigación.

10.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrios, G. (2005). *Plant Pathology* (5ta Ed.): Florida (Estados Unidos): Elsevier Academic Press.
- Agrocalidad. (2016). *Guía de buenas prácticas agrícolas para el cultivo de uvilla*. Recuperado de <https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2020/05/guia19.pdf>
- Agrocalidad. (2019). *Primer envío de uvilla ecuatoriana con destino a estados unidos*. Recuperado de <https://www.agrocalidad.gob.ec/primer-envio-de-uvilla/>
- Aguilar, J. S. (2020). *Identificación del hongo fitopatógeno Phoma spp. aislado a partir de plantas de uvilla (Physalis peruviana L.) en localidades de zona norte y centro-norte de la serranía ecuatoriana*. [Tesis de Pregrado]. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Recuperado de <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/18033/Trabajo%20de%20titulaci%C3%B3n%202811%29.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Alenezi, F. N., Rekik, I., Belka, M., Ibrahim, A. F., Luptakova, L., Jaspars, M., Woodward, S., & Belbahri, L. (2016). Strain-level diversity of secondary metabolism in the biocontrol species *Aneurinibacillus migulanus*. *Microbiological Research*, 182, 116–124. doi.org/10.1016/j.micres.2015.10.007
- Altamirano, M. (2010). *Estudio de la cadena productiva de uvilla (Physalis Peruviana L.) en la Sierra Norte del Ecuador*. [Tesis de pregrado]. [Quito (Ecuador)]: Universidad San Francisco de Quito. Recuperado de <https://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/950/1/95220.pdf>
- Arguedas Gamboa, M., Rodríguez Solís, M., Guevara Bonilla, M., Esquivel Segura, E., Sandoval Rocha, S., & Briceño-Elizondo, E. (2018). Incidencia y severidad de *Olivea tectonae* y *Rhabdopterus* sp. en plantaciones jóvenes de *Tectona grandis* l.f. bajo distintas modalidades de control de arvenses. *Agronomía Costarricense*, 43(1), 9–19. doi.org/10.15517/rac.v43i1.35631
- Bakieva, M., Gonzales Such, J., & Jornet, J. (2015). *SPSS: ANOVA de un factor*. *InnovaMIDE*, 1–7. Recuperado de https://www.uv.es/innomide/spss/SPSS/SPSS_0702b.pdf
- Basantes, G. (2015). *Producción de uvilla (Physalis peruviana l.) con dos abonos orgánicos humus y gallinaza y dos dosis en la finca gabriela del cantón pangua provincia de cotopaxi 2014*. (Vol. 1). Recuperado de <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/4501/1/PI-000727.pdf>
- Cañedo, V., & Ames, T. (2004). *Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos*. doi.org/cip@cgiar.org, www.cipotato.org
- Cano, M. A. (2011). Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. una revisión. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 14(2), 15–31. doi.org/10.31910/rudca.v14.n2.2011.771
- Castellanos, G., Jara, C. E., & Mosquera Cifuentes, G. M. (2011). *Guías prácticas de laboratorio para el manejo de patógenos del frijol*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, CO. 232 p. (Publicación CIAT No. 375). Recuperado de <https://cgspace.cgiar.org/handle/10568/54435>

- Castellanos Gonzalez, L., Céspedes Novoa, N., & Baldovino Sanjuan, A. (2020). Alternativas orgánicas para el logro de producciones más limpias de la fresa en Pamplona, Norte de Santander. *Inge Cuc*, 16(1), 187–196. doi.org/10.17981/ingecuc.16.1.2020.14
- Caviedes, D. (2010). *Aislamiento y selección de Pseudomonas sp. y Bacillus sp., promotoras del crecimiento vegetal en cultivo de uchuva (Physalis peruviana L.) con actividad antagónica frente a Fusarium oxysporum*. [Tesis de pregrado]. Pontificia Universidad Javeriana. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/10554/8628>
- Chicaiza, G. (2008). *Inventario de enfermedades fungosas de la uvilla (Physalis peruviana) en las parroquias de Yaruquí y Amaguaña del Cantón Quito, provincia de Pichincha*. [Tesis de grado]. [Guaranda (Ecuador)]: Universidad Estatal de Bolívar. Recuperado de <https://www.dspace.ueb.edu.ec/bitstream/123456789/73/3/02.pdf>
- COMPO GmbH & Co. (2012). *Basfoliar® 20-19-19 SP*. Recuperado de https://www.e-agrizon.com/wp-content/uploads/2019/08/HT-Nitrofosca-_20-19-19.pdf
- Díaz, J., Chaves-Acuña, W., & Yáñez, J. (2016). Diversity of fungal communities inhabiting symptomatic leaves of Capegooseberry (*Physalis peruviana*) in the Ecuadorian Andes. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, 40(2), 77-86. doi.org/10.26807/remcb.v40i2.55
- EL COMERCIO. (2011). *El cultivo de la uvilla crece en el país*. Recuperado de: <https://www.elcomercio.com/actualidad/negocios/cultivo-de-uvilla-crece-pais.html#:~:text=La uvilla%2C>
- Ezziyyani, M., Sánchez, C. P., Requena, M. E., Rubio, L., & Candela, M. E. (2004). Biocontrol por *Streptomyces rochei* – Ziyani –, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. *Anales de Biología*, 26, 69–78. Recuperado de <https://www.um.es/analesdebiologia/numeros/26/PDF/08-BIOCONTROL.pdf>
- Fernández, R. J., & Suárez, C. L. (2009). Antagonismo invitro de *Trichoderma harzianum* Rifai SOBRE *Fusarium oxysporum*. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 62(1), 4743–4748. Recuperado de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-28472009000100001
- García, M. C., Peña, A. C., & Brito Grandes, B. (2014). *Physalis peruviana* L.: Fruta para el Mundo. *Cyted*. Recuperado de <https://www.vidarium.org/wp-content/uploads/2021/07/Uchiva-Physalis-peruviana-L-Fruta-andina-para-el-mundo.pdf>
- Gongora, A., & Rojas, P. (2006). *Incidencia de las enfermedades en uchuva *Physalis peruviana*, por estado fenológico y de acuerdo con la ubicación en los diferentes estratos de la planta, en el departamento de Cundinamarca*. [Tesis de pregrado]. Pontificia Universidad Javeriana. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/10554/8260>
- Gregorí, B. (2005). Estructura y actividad de los antifúngicos. *Revista Cubana de Farmacia*, 39(2), 1–15. Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152005000200012
- Infante, D., Martínez, B., González, N., & Reyes, Y. (2009). *Mecanismos de acción de Trichoderma frente a hongos fitopatógenos*. *Revista de Protección Vegetal*, 24(1), 14-21. Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522009000100002&lng=es&tlng=es.

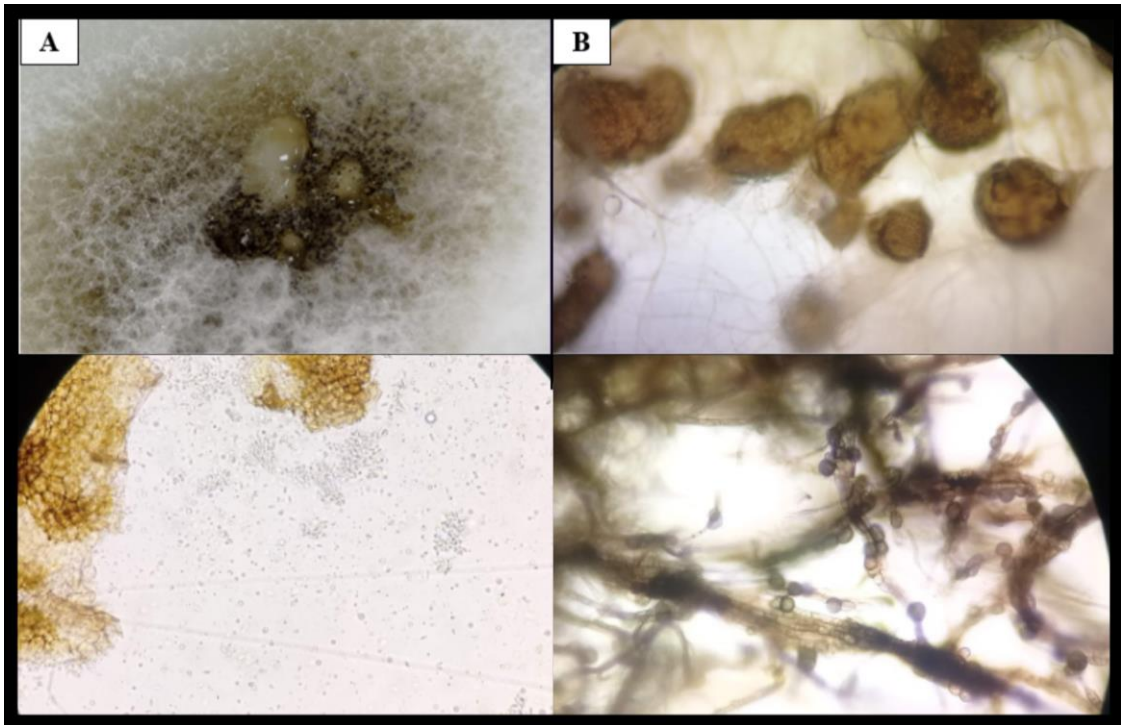
- Izzeddin, N., & Medina, L. (2011). Efecto del control biológico por antagonistas sobre fitopatógenos en vegetales de consumo humano. *Salus*, 15(3), 8–18. Recuperado de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-71382011000300005&lng=es&tlng=es.
- Jambhulkar, P. P., Sharma, P., Manokaran, R., Lakshman, D. K., Rokadia, P., & Jambhulkar, N. (2018). Assessing synergism of combined applications of *Trichoderma harzianum* and *Pseudomonas fluorescens* to control blast and bacterial leaf blight of rice. *European Journal of Plant Pathology*, 152(3), 747–757. doi.org/10.1007/s10658-018-1519-3
- Marín, G. (2011). Sistemas de producción vegetal II. *Proyecto Única. Colombia. Universidad de Caldas-Unión Europea*. Recuperado de https://www.uaeh.edu.mx/investigacion/productos/4781/sistemas_de_produccion_vegetal_2.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), 1-11. Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522013000100001&lng=es&tlng=es.
- Mondino, P., & Vero, S. (2006). *Control biológico de patógenos de plantas*. 17–23. Recuperado de <http://hdl.handle.net/20.500.12324/1772>
- Palacios, M. (2013). *Evaluación de la respuesta a la fertilización química y orgánica de la uvilla Physalis peruviana L. en la provincia de Imbabura Cantón Antonio Ante*. [Tesis de grado]. Escuela Politécnica Nacional. Recuperado de <http://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/6798>
- Páramo-Aguilera, L. A., & Hernández-Mendoza, J. L. (2018). CARACTERIZACION DE *Trichoderma viridae* Y *T. atroviridae* AISLADOS DE MONUMENTOS HISTORICOS EN CIUDAD DE MEXICO. *Nexo Revista Científica*, 30(2), 60–72. doi.org/10.5377/nexo.v30i2.5525
- Pedraza, L. A., López, C. E., & Uribe-Vélez, D. (2020). Mechanisms of action of bacillus spp. (bacillaceae) against phytopathogenic microorganisms during their interaction with plants. *Acta Biologica Colombiana*, 25(1), 112–125. doi.org/10.15446/abc.v25n1.75045
- Pérez Álvarez, S., Coto Arbelo, O., Echemendía Pérez, M., & Ávila Quezada, G. (2015). *Pseudomonas fluorescens* Migula, ¿control biológico o patógeno? *Pseudomonas Fluorescens, Biological Control or Pathogen?*, 30(3), 225–234. Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522015000300008#:~:text=P.,v.
- Pierson, E. A., & Weller, D. M. (1994). Use of mixtures of fluorescent pseudomonads to suppress take-all and improve the growth of wheat. In *Phytopathology* (Vol. 84, Issue 9, pp. 940–947). doi.org/10.1094/Phyto-84-940
- Puente, L., Pinto, M. C., Castro, E., & Cortés, M. (2011). *Physalis peruviana* L, the multiple properties of a highly functional fruit: A review. *Food Research International* 44:1733-1740. *Food Research International*, 44, 1733–1740. doi.org/10.1016/j.foodres.2010.09.034
- Rai, M. K., Tiwari, V. V., Irinyi, L., & Kövics, G. J. (2014). Advances in Taxonomy of Genus *Phoma*: Polyphyletic Nature and Role of Phenotypic Traits and Molecular Systematics. *Indian Journal of Microbiology*, 54(2), 123–128. doi.org/10.1007/s12088-013-0442-8

- Reyes, A., Ruiz, E., Yam, C., & Dzul, M. (2011). Selección de *Bacillus* spp. con actividad antagonica in vitro contra *Macrophomina phaseolina* (tassi) goid. en diferentes medios de cultivo. *Fitosanidad*, 15(2), 112–121. Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/2091/209122297007.pdf>
- Silva, A. (2018). *Acción in vitro de Trichoderma spp. y Bacillus spp. como controladores biológicos conjuntos contra Fusarium oxysporum en uvilla (Physalis peruviana), ecotipo colombiano, en la sierra norte y centro del Ecuador*. Recuperado de [http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/14680/Disertación Final - Alexander Silva segunda corrección.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/14680/Disertación%20Final%20-%20Alexander%20Silva%20segunda%20corrección.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Silva Tamayo, L. (2006). *Diagnóstico de la problemática actual de enfermedades en el cultivo de la uchuva physalis peruviana L., en el departamento de Antioquia*. [Tesis de grado]. Pontificia Universidad Javeriana. Recuperado de <http://hdl.handle.net/10554/8256>
- Slama, H. Ben, Cherif-Silini, H., Bouket, A. C., Qader, M., Silini, A., Yahiaoui, B., Alenezi, F. N., Luptakova, L., Triki, M. A., Vallat, A., Oszako, T., Rateb, M. E., & Belbahri, L. (2019). Screening for fusarium antagonistic bacteria from contrasting niches designated the endophyte bacillus halotolerans plant warden against fusarium. *Frontiers in Microbiology*, 10(JAN), 1–24. doi.org/10.3389/fmicb.2018.03236
- Soria, L. (2020). *Evaluación in vitro e in planta de la acción conjunta biocontroladora de cepas de Pseudomonas spp. y Trichoderma spp. frente a Fusarium oxysporum YC-3 en plántulas de uvilla (Physalis peruviana L.)*. [Tesis de grado]. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Recuperado de <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/18040/Trabajo%20de%20titulaci%C3%B3n%20%2818%29.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Sosa, A. I., Pazos, V., Borges, G., González, M., & Ponce, E. (2011). del método de conservación en papel de filtro en dos cepas de *Bacillus subtilis* Cohn mediante la actividad antagonica frente a *Rhizoctonia solani* Kühn. *Fitosanidad*, 15(1), 45–49. Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1562-30092011000100007&script=sci_arttext&tlng=en%5Cnhttp://scielo.sld.cu/pdf/fit/v15n1/fit07111.pdf
- Tejera, V., Heydrich, M., & Rojas, M. (2012). Antagonismo de *Bacillus* spp. frente a hongos fitopatogénicos del cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *SciELO*, 27(2), 2. Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522012000200008
- Urrea, R., Cabezas, L., Sierra, R., Cárdenas, M., Restrepo, S., & Jiménez, P. (2011). Selection of antagonistic bacteria isolated from the *Physalis peruviana* rhizosphere against *Fusarium oxysporum*. *Journal of Applied Microbiology*, 111(3), 707–716. doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05092.x
- Valencia-Cantero, E., Villegas-Moreno, J., Sánchez-Yáñez, J. M., Peña-Cabriales, J., & Farías-Rodríguez, R. (2005). Inhibición de *Fusarium oxysporum* por cepas mutantes de *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 incapaces de producir sideróforos. *TERRA Latinoamericana*, 23(1), 81–88. Recuperado de <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/573/57323111.pdf>
- Vera, J. (2021). *Evaluación in planta de la efectividad de cepas de Trichoderma spp. y Bacillus spp. como controladores biológicos de Fusarium oxysporum en uvilla (Physalis peruviana L.)*. [Tesis de grado]. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Recuperado de

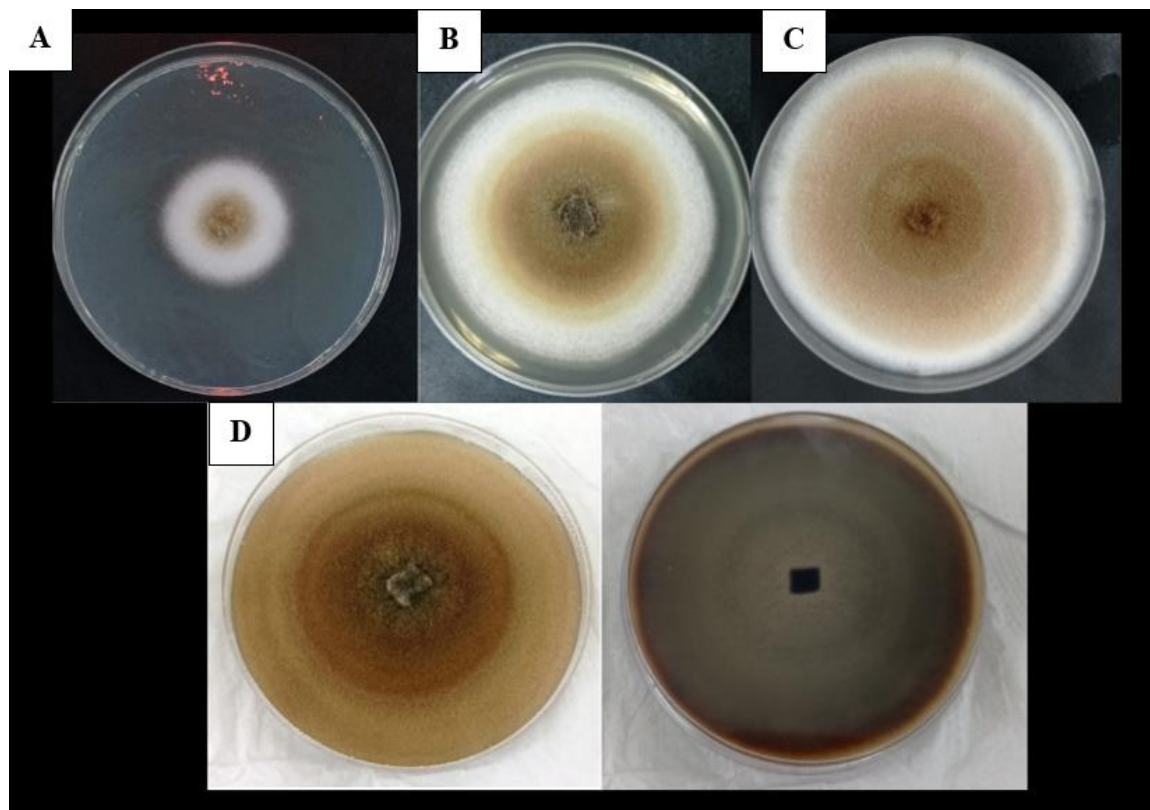
<http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/18704/Trabajo%20final%20Johana%20Vera.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I., & De los Santos-Villalobos, S. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 36(1), 95–130. doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5
- Yépez, P. J. (2020). *Evaluación de un consorcio microbiano en la germinación de semillas de rosas híbridas*. [Tesis de grado]. Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Recuperado de <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/22683>
- Zaim, S., Bekkar, A. A., & Belabid, L. (2018). Efficacy of *Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum* combination on chickpea Fusarium wilt caused by *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 51(3–4), 217–226. doi.org/10.1080/03235408.2018.1447896
- Zapata J; Saldarriaga C; Londoño M; Díaz C. (2002). *Manejo del cultivo de la Uchuva en Colombia*. Recuperado de https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/12833/42403_46286.pdf?sequence=1&isAllowed=y

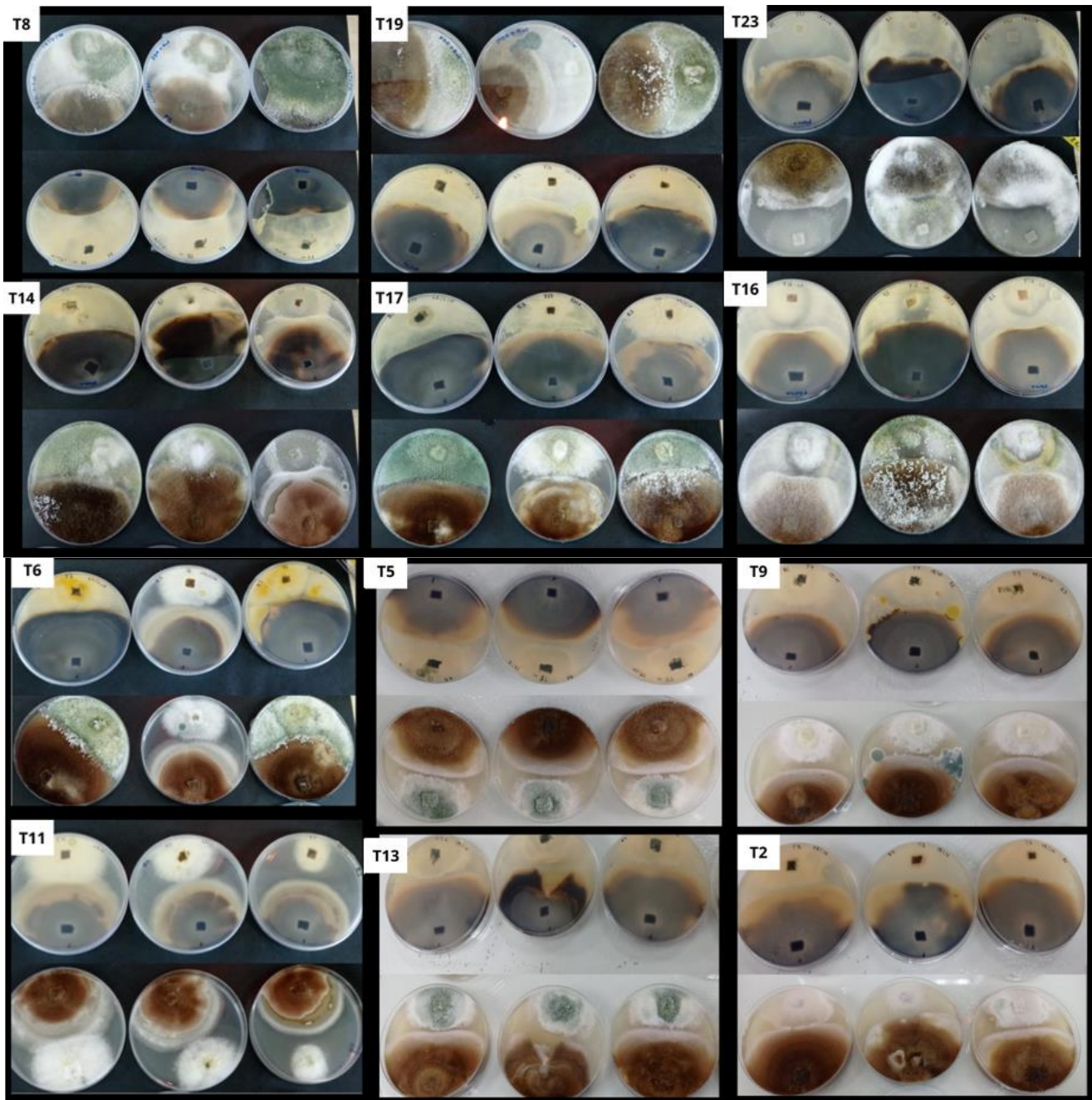
11.ANEXOS



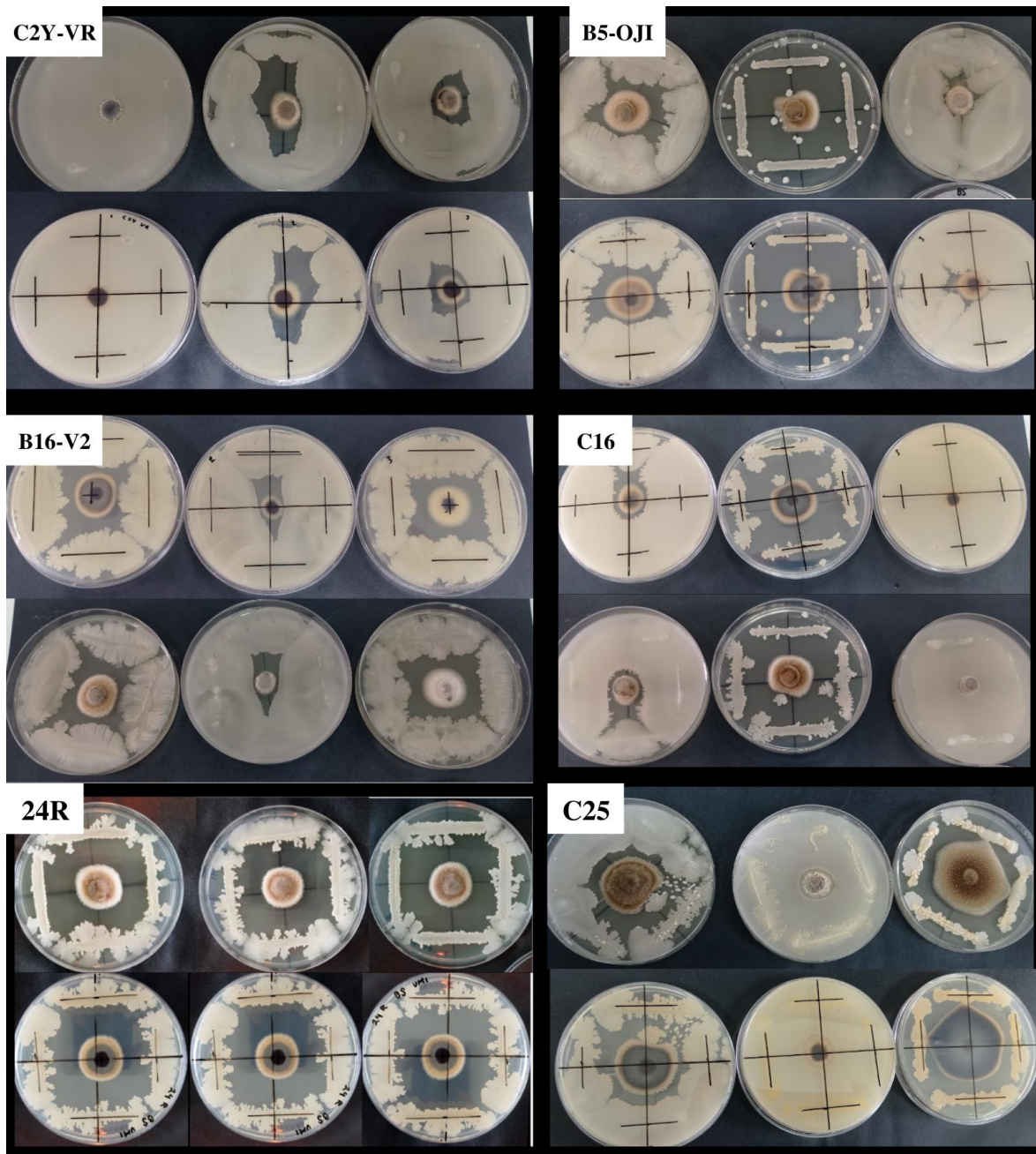
Anexo 1. **A)** Picnidios de *Phoma* en OMA a los 21 días de crecimiento. **B)** Picnidios (10x). **C)** Esporas liberadas por un picnidio (40x). **D)** Clamidosporas en OMA.



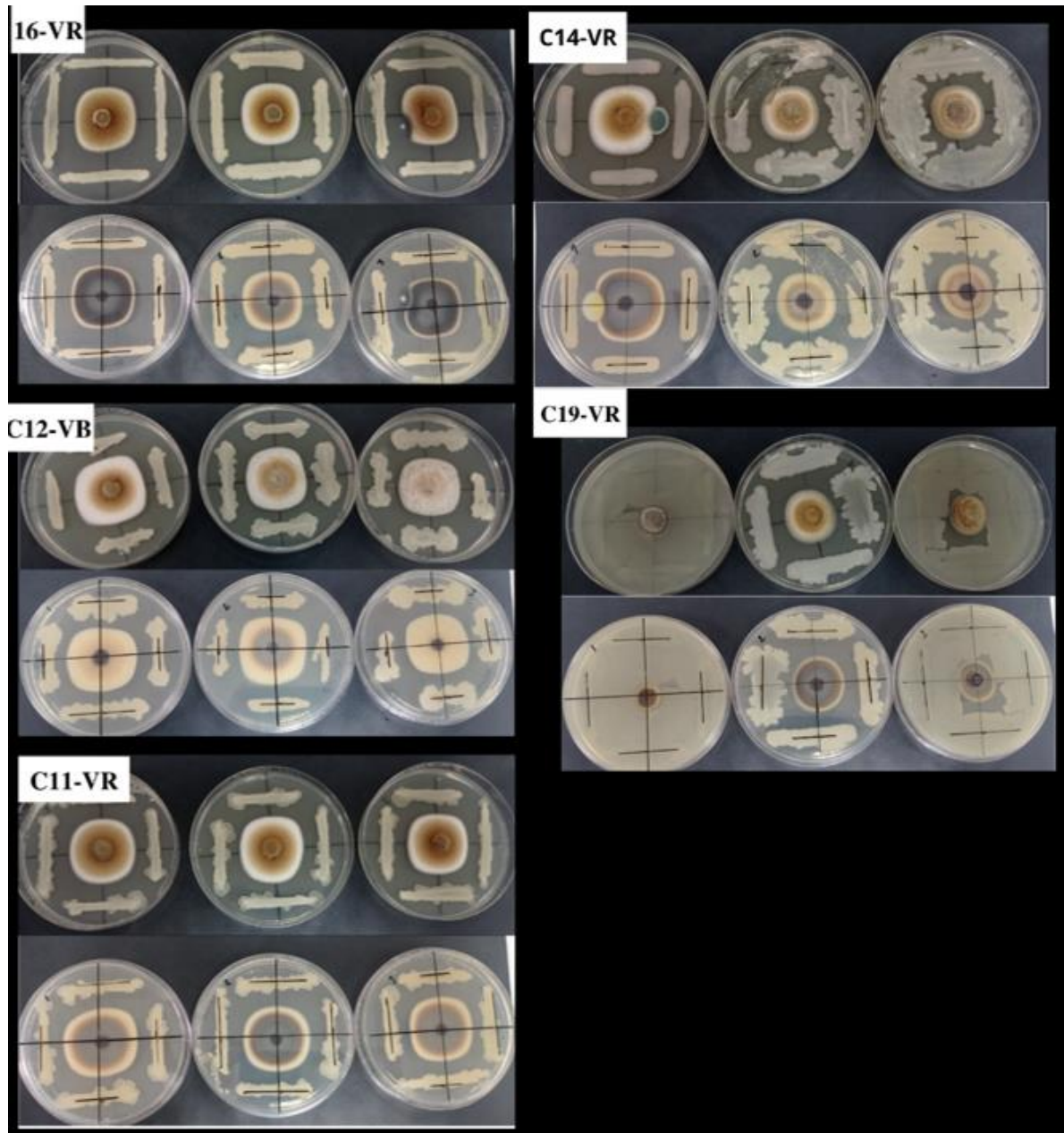
Anexo 2. Crecimiento de *Phoma exigua* en agar PDA. A) 7 días de incubación. B) 10 días de incubación. C) 15 días de incubación. D) Anverso y reverso de la colonia del patógeno a los 21 días de incubación.



Anexo 3. Selección de los enfrentamientos del patógeno *Phoma exigua* frente a las cepas de *Trichoderma* spp. (T8, T19, T23, T14, T17, T16, T6, T5, T9, T11, T13, T2, codificaciones internas del laboratorio).

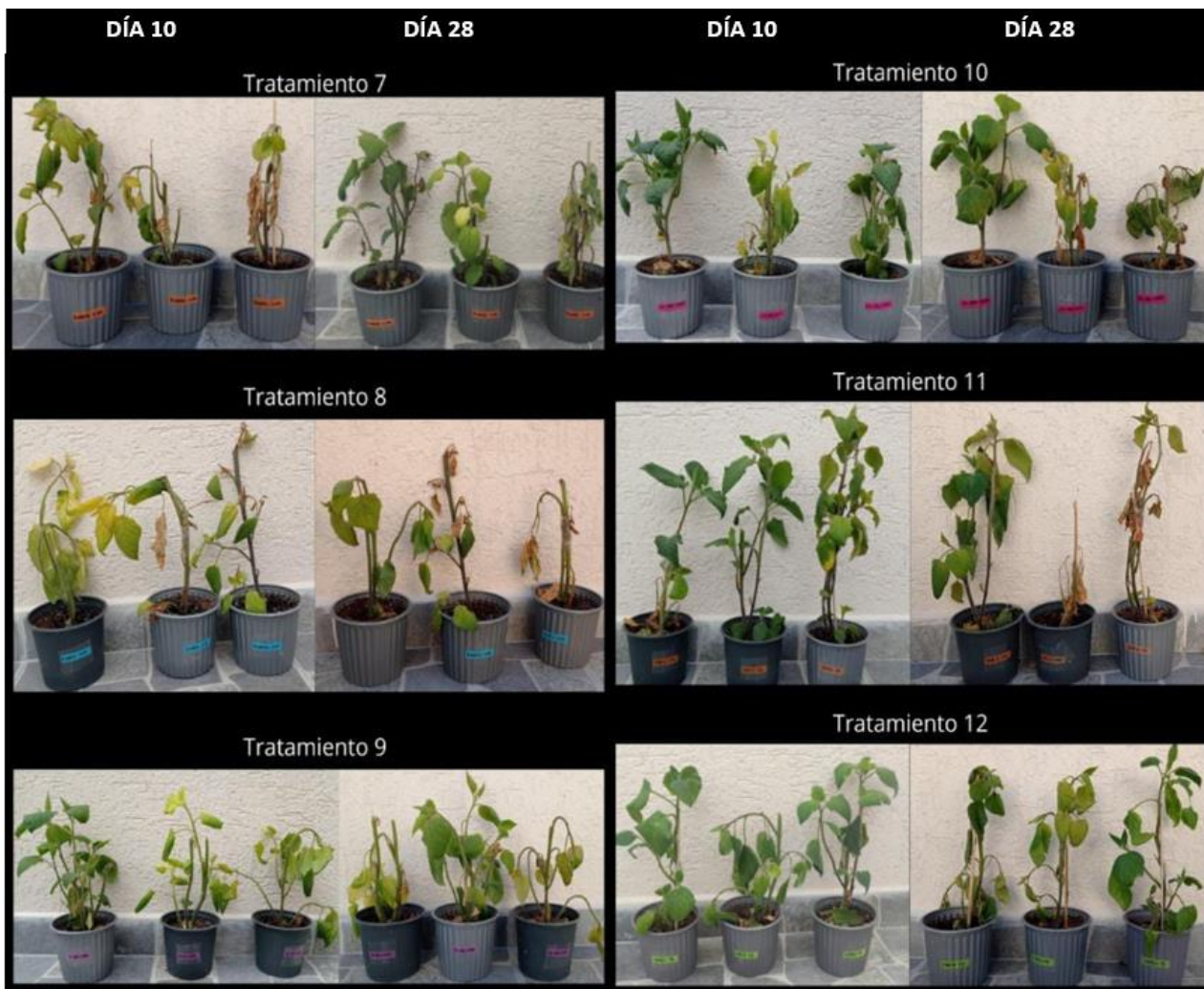


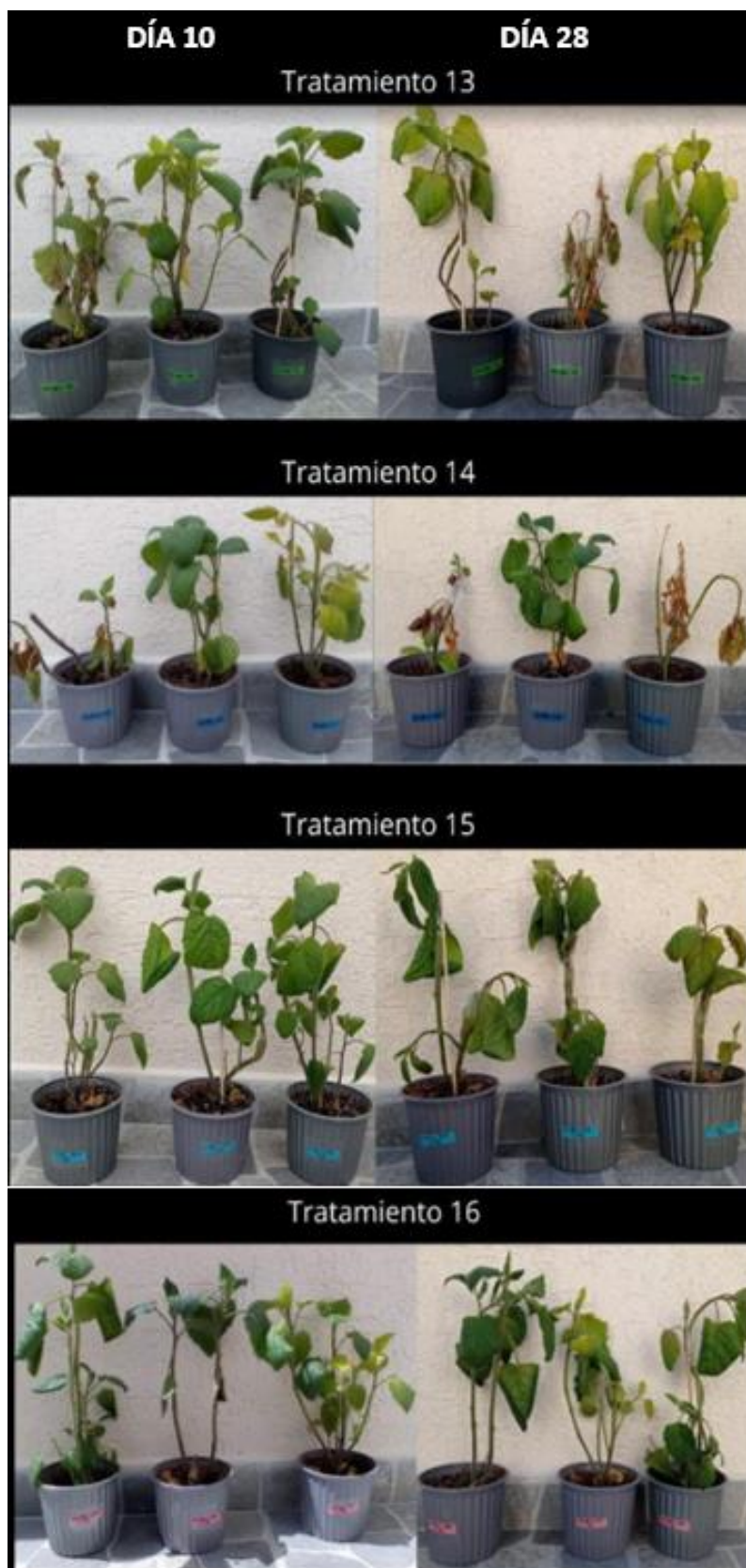
Anexo 4. Selección de los enfrentamientos del patógeno *Phoma exigua* frente a las cepas de *Bacillus subtilis* (C2Y-VR, B5-OJI, B16-V2, C16, 24R y C25 son codificaciones internas del laboratorio).



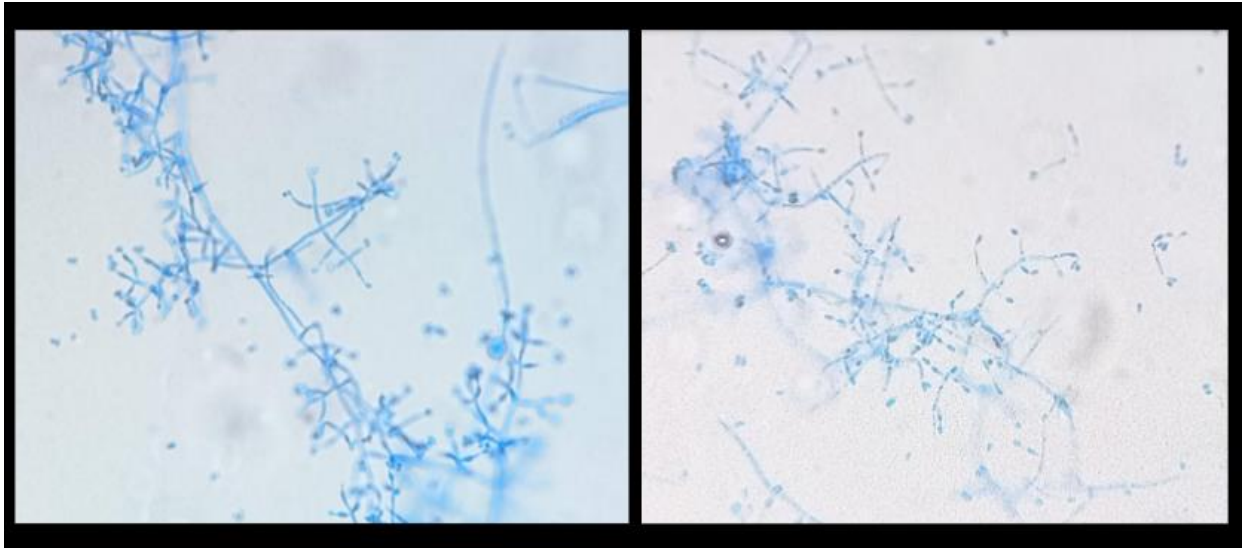
Anexo 5. Selección de los enfrentamientos del patógeno *Phoma exigua* frente a las cepas de *Pseudomonas* spp. (16-VR, C14-VR, C12-VB, C19-VR y C11-VR son codificaciones internas del laboratorio).



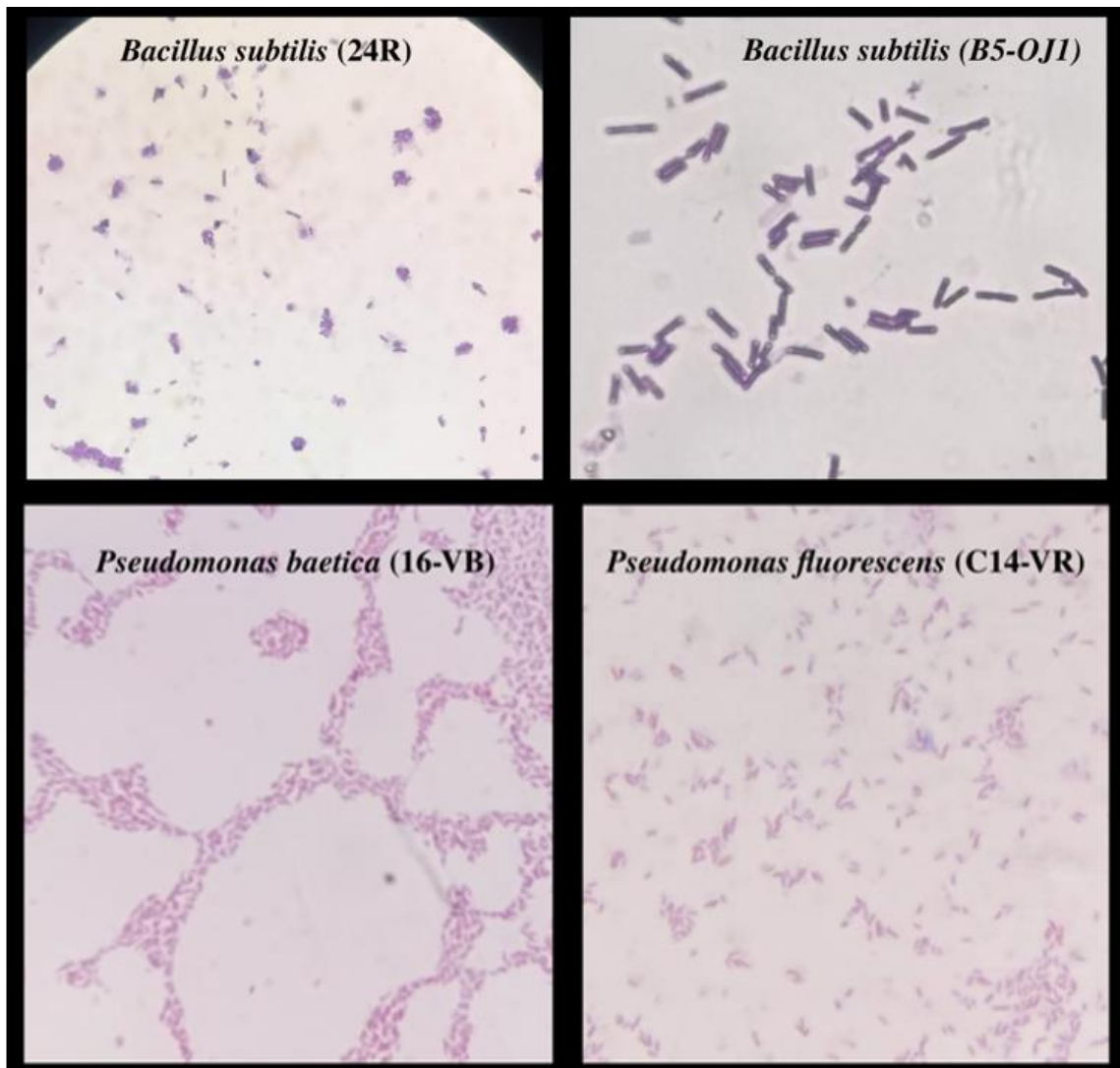




Anexo 6. Tratamiento 1 al 16 en consorcio sobre plantas de uvilla a los 10 y 28 días después de la inoculación. Incluye control positivo (tratamiento 1) y negativo (tratamiento 2).



Anexo 7. De izquierda a derecha *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma atroviride* (40x) con tinción de azul de lactofenol.



Anexo 8. Identificación microscópica de *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas* spp, (40x) con tinción Gram.