

Universidad Católica de Santa María
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y
Biotechnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotechnológica



Evaluación del potencial antagonista de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum*. frente al hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* del cultivo de pitahaya *Hylocereus undatus*. en pampa el Alto-Punta de Bombón, Arequipa

Tesis presentada por la Bachiller:

Revilla Fernández, Arantza Steffi

ORCID: 0009-0006-3845-9150

Para optar el Título profesional de

Ingeniero Biotechnólogo

Asesora:

Mg.Sc.Bardales Álvarez Roxana Margarita

ORCID: 0000-0002-5137-4067

Arequipa- Perú

2024

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

INGENIERIA BIOTECNOLOGICA

TITULACIÓN CON TESIS

DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 08 de Abril del 2024

Dictamen: 007486-C-EPIB-2024

Visto el borrador del expediente 007486, presentado por:

2016701422 - REVILLA FERNANDEZ ARANTZA STEFFI

Titulado:

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTAGONISTA DE BACILLUS SUBTILIS Y TRICHODERMA HARZIANUM. FRENTE AL HONGO FITOPATÓGENO FUSARIUM OXYSPOURUM DEL CULTIVO DE PITAHAYA HYLOCEREUS UNDATUS. EN PAMPA EL ALTO-PUNTA DE BOMBÓN, AREQUIPA

Nuestro dictamen es:

APROBADO

Título Profesional/Título de Segunda Especialidad/Grado Académico a optar:

INGENIERO BIOTECNOLOGO

**42671615 - CARPIO CARPIO JOSE MIGUEL
DICTAMINADOR**



**43085216 - MEDINA CABRERA EDILBERTO VICENTE
DICTAMINADOR**



**45945764 - YUGRA CONDORI MONICA MEYLIN
DICTAMINADOR**



Evaluación del potencial antagonista de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum*. frente al hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* del cultivo de pitahaya *Hylocereus undatus*. en pampa el Alto-Punta de

INFORME DE ORIGINALIDAD

21 %

INDICE DE SIMILITUD

20%

FUENTES DE INTERNET

12%

PUBLICACIONES

12%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

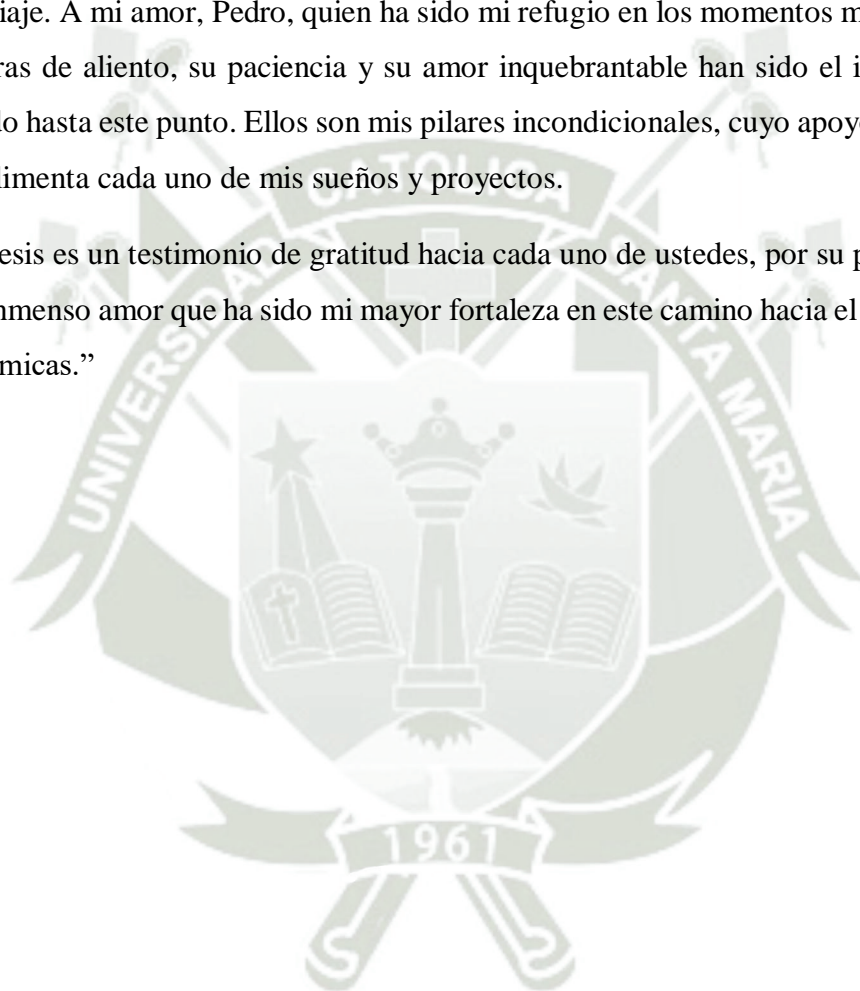
FUENTES PRIMARIAS

1	taxiburgercorp.com Fuente de Internet	1 %
2	www.mdpi.com Fuente de Internet	1 %
3	fdocuments.net Fuente de Internet	<1 %
4	ouci.dntb.gov.ua Fuente de Internet	<1 %
5	www.cienciadigital.org Fuente de Internet	<1 %
6	tesis.ipn.mx Fuente de Internet	<1 %
7	www.researchgate.net Fuente de Internet	<1 %
8	www.scielo.org.mx Fuente de Internet	<1 %

DEDICATORIA

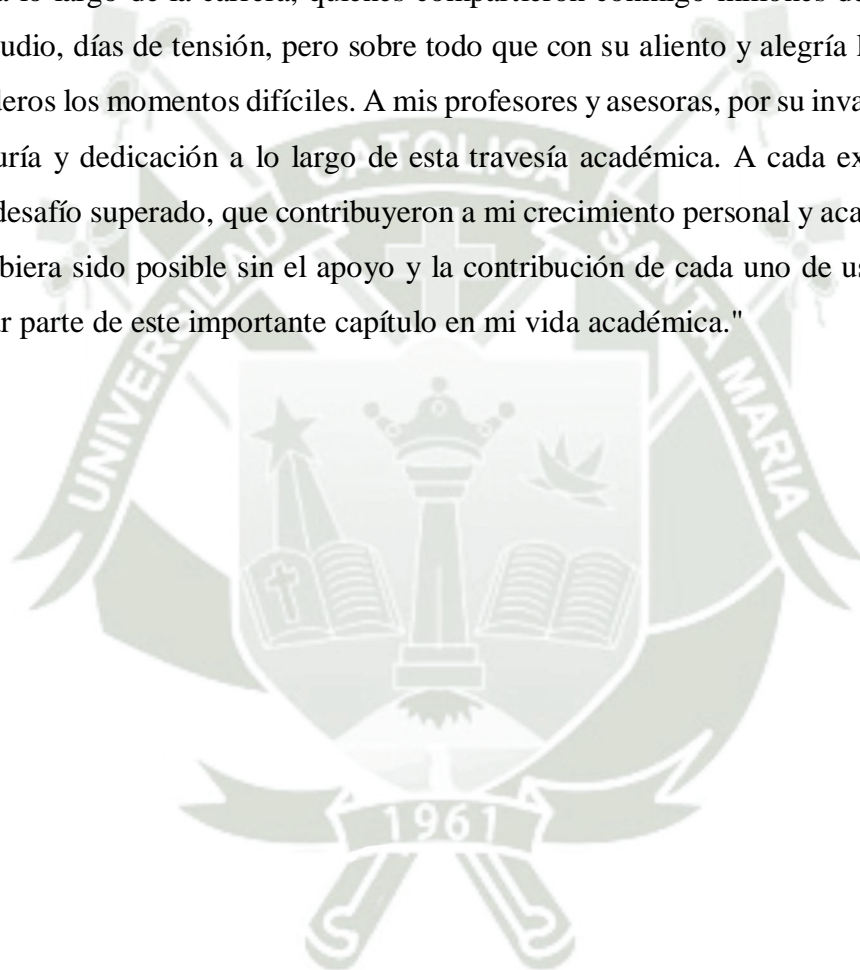
“A mis padres, Augusto y Carolina, quienes han sido faros en mi travesía académica, iluminando con paciencia, amor y sabiduría cada paso que me llevó hacia la culminación de este logro. A Lleshita, mi hermana, compañera de aventuras y confidente en cada paso de este viaje. A mi amor, Pedro, quien ha sido mi refugio en los momentos más desafiantes. Sus palabras de aliento, su paciencia y su amor inquebrantable han sido el impulso que me ha llevado hasta este punto. Ellos son mis pilares incondicionales, cuyo apoyo es el combustible que alimenta cada uno de mis sueños y proyectos.

Esta tesis es un testimonio de gratitud hacia cada uno de ustedes, por su presencia constante y su inmenso amor que ha sido mi mayor fortaleza en este camino hacia el logro de mis metas académicas.”



AGRADECIMIENTO

"En este momento significativo, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a Dios, que ha sido mi luz en este viaje académico. A mi familia por ser mi soporte incondicional, por su amor, comprensión y por alentarme en cada etapa de este proceso. A mis grandes amigos que gané a lo largo de la carrera, quienes compartieron conmigo millones de risas, amanecidas de estudio, días de tensión, pero sobre todo que con su aliento y alegría lograron hacer más llevaderos los momentos difíciles. A mis profesores y asesoras, por su invaluable orientación, sabiduría y dedicación a lo largo de esta travesía académica. A cada experiencia vivida y cada desafío superado, que contribuyeron a mi crecimiento personal y académico. Este logro no hubiera sido posible sin el apoyo y la contribución de cada uno de ustedes. Gracias por formar parte de este importante capítulo en mi vida académica."



RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo evaluar el potencial antagonista de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum* frente al hongo patógeno *Fusarium oxysporum* en el cultivo de pitahaya (*Hylocereus sp.*) de la variedad *Selenicereus undatus* en la parcela M20 el sector paraje de la Pampa El Alto, Punta de Bombón, Arequipa. P

Para ello se realizó la captura de microorganismos a partir de partes vegetales, suelo, y trampas de arroz obteniendo cepas aisladas y caracterizadas tanto macroscópica como microscópicamente. Las cepas se sometieron a cinética microbiana en dos medios de cultivo uno sintético y uno industrial con la finalidad de evaluar su capacidad como medio de uso en producción industrial. Adicionalmente se adquirió cepas comerciales para poder comparar la capacidad antagónica de los biocontroladores nativos versus los comerciales en el porcentaje de inhibición de *Fusarium oxysporum*, la cepa con mayor capacidad antagónica fue finalmente producida y envasada en dos presentaciones: formulación líquida y sustrato sólido. Se logró obtener aislados de cepas nativas de *Fusarium oxysporum*, *Bacillus subtilis*, y *Trichoderma harzianum*. La cinética microbiana mostró mayor crecimiento en los medios industriales soya melaza con una concentración de 7.08×10^8 UFC/mL a las 24 horas para *Bacillus subtilis* y en el medio frijol arroz para *Trichoderma harzianum* con 8.78×10^8 esporas/mL a las 144 horas. Las cepas nativas presentaron mayor porcentaje de inhibición de crecimiento radial, *Trichoderma harzianum* nativo presentó un 76.28% y *Bacillus subtilis* nativo con 40.71% de inhibición. Finalmente se seleccionó a *Trichoderma harzianum* nativo como el biocontrolador a reproducir obteniendo dos productos finales: un producto en formulación líquida de 1L de suspensión contrada con concentración de 2×10^8 esporas/mL y un producto sólido de polvo mojable con 1×10^{10} esporas/g. Se confirmó que las cepas nativas presentan mayor poder antagonista contra *Fusarium oxysporum* frente a las cepas comerciales.

Palabras clave: *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis*, *Fusarium oxysporum*, cepas nativas

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the antagonist potential of *Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum* against the pathogenic fungus *Fusarium spp.* of the cultivation of pitahaya (*Hylocereus sp.*) of the variety *Selenicereus undatus* in plot M20 in the area sector of Pampa El Alto, Punta de Bombon, Arequipa. For this purpose the capture of microorganisms was carried out from plant parts, soil, and rice traps obtaining strains isolated and characterized both macroscopically and microscopically. The strains were subjected to microbial kinetics in two culture media, one synthetic and one industrial, in order to evaluate their capacity as a medium for use in industrial production. Additionally, commercial strains were acquired to compare the antagonistic capacity of the native biocontrollers versus the commercial ones in the percentage of inhibition of *Fusarium oxysporum*, the strain with the greatest antagonistic capacity was finally produced and packaged in two presentations: liquid formulation and solid substrate. It was possible to obtain isolates of native strains of *Fusarium oxysporum*, *Bacillus subtilis*, and *Trichoderma harzianum*. The microbial kinetics showed greater growth in the industrial soybean molasses media with a concentration of 7.08×10^8 CFU/mL at 24 hours for *Bacillus subtilis* and in the rice bean medium for *Trichoderma harzianum* with 8.78×10^8 spores/mL at 144 hours. The native strains presented a higher percentage of radial growth inhibition, native *Trichoderma harzianum* presented 76.28% and native *Bacillus subtilis* with 40.71% inhibition. Finally, native *Trichoderma harzianum* was selected as the biocontroller to reproduce, obtaining two final products: a 1L liquid formulation of concentrate suspension product with a concentration of 2×10^8 spores/mL and a solid product of wet powder with 1×10^{10} spores/g. It was confirmed that native strains have greater antagonistic power against *Fusarium oxysporum* compared to commercial strains.

Keywords: *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis*, *Fusarium oxysporum*, native strains

ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
INDICE DE TABLAS	xi
INTRODUCCIÓN.....	xii
HIPÓTESIS	xiii
OBJETIVOS	xiv
OBJETIVO GENERAL	xiv
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	xiv
1. CAPITULO 1	15
1.1 Pitahaya	15
1.1.1 Manejo agronómico.....	16
1.1.2 Principales enfermedades y patógenos.....	17
1.1.2.1 Control de enfermedades agrícolas	19
1.2 Controladores biológicos.....	19
1.2.1 Principales controladores.....	20
1.2.2 Pruebas para identificar eficacia de controladores biológicos.....	23

2.	CAPITULO II.....	27
2.1	LUGAR DE EJECUCIÓN.....	27
2.2.	MATERIALES.....	28
2.2.1.	Material biológico.....	28
2.2.2.	Insumos	28
2.2.3.	Reactivos químicos	29
2.2.4.	Materiales de laboratorio	29
2.2.5.	Aparatos y equipos	30
2.2.6.	Software	30
2.2.7.	Otros.....	31
2.3.	MÉTODOS.....	31
2.3.1.	Aislamiento e identificación de <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Fusariums spp.</i> nativos del campo de cultivo de Pitahaya (<i>Hylocereus sp.</i>) de la variedad <i>Selenicereus undatus</i> en el sector paraje de la Pampa El Alto, Punta de Bombón, Arequipa.....	31
2.3.2.	Selección el medio de cultivo adecuado para el crecimiento de cepas nativas y cepas comerciales de <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Trichoderma harzianum</i> mediante cinéticas de crecimiento.	34
2.3.3.	Evaluación de la actividad antagonica de 2 cepas frente a <i>Fusarium oxysporum</i>	35
2.3.4.	Preparación de inoculante biológico a base de la cepa seleccionada con mayor actividad antagonica sobre <i>Fusarium oxysporum</i>	37
3.	CAPITULO III	39
3.1	Aislamiento e identificación de <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Fusariums spp.</i> nativos.	39

3.2. Selección el medio de cultivo adecuado para el crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Trichoderma harzianum</i> mediante cinéticas de crecimiento.....	47
3.3. Evaluación de la actividad antagónica frente a <i>Fusarium oxysporum</i>	55
3.4. Preparación de inoculante biológico con la cepa seleccionada.	58
4. CAPITULO IV	62
1.1. CONCLUSIONES	62
1.2. RECOMENDACIONES	64
REFERENCIAS	65
ANEXOS.....	79



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Estructura de <i>Trichoderma harzianum</i> (35)	20
Figura 1.2. Bacteria <i>Bacillus subtilis</i> tomada en TEM (43).....	22
Figura 2.1. Plantación de pitahaya en la Parcela M20 del Sector de la pampa El Alto del distrito de la Punta de Bombón de la provincia de Islay en el Región Arequipa	28
Figura 3.1. Ubicación de parcela M20.	39
Figura 3.2. Sintomatología en pitahaya de la parcela M20.....	40
Figura 3.3. <i>Fusarium oxysporum</i> a partir de trampas de arroz. A) Observación macroscópica . b) Observación microscópica 40X.....	42
Figura 3.4. Pruebas bioquímicas. A) Tinción de Gram Observación microscópica 40X, B) Voges Proskauer, C) Hidrólisis de almidón.	43
Figura 3.5. <i>Aspergillus</i> en muestras de suelo. A) Observación macroscópica . b) Observación microscópica 40X.....	44
Figura 3.6. Trampas de arroz contaminadas con microorganismos.	45
Figura 3.7. <i>Penicillium</i> a partir de trampas de arroz. A) Observación macroscópica . b) Observación microscópica 40X.....	46
Figura 3.8. <i>Trichoderma harzianum</i> a partir de trampas de arroz. A) Observación macroscópica . b) Observación microscópica 40X.....	47
Figura 3.9. Cinética de crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i>	48
Figura 3.10. Cinética de crecimiento de <i>Trichoderma harzianum</i>	52
Figura 3.11. Antagonismo controladores biológicos frente <i>Fusarium oxysporum</i>	56
Figura 3.12. Bioformulados a base de <i>Trichoderma harzianum</i> nativo. En A)Producción en sustrato sólido, B)Formulación polvo mojable, c) Formulación suspensión concentrada...	59

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la Pitahaya (<i>Hylocereus</i> spp.).....	15
Tabla 2.1 . Ubicación del proyecto.	27
Tabla 2.2 <i>Tratamientos para la prueba de antagonismo</i>	36
Tabla 2.3. <i>Escala de Bell</i>	37
Tabla 3.1. Caracterización bioquímica de especies de <i>Bacillus</i>	43
Tabla 3.2. Análisis de varianza para factor horas en la cinética de <i>Bacillus subtilis</i>	48
Tabla 3.3. Análisis de varianza para factor medios de cultivo en la cinética de <i>Bacillus subtilis</i>	49
Tabla 3.4. Comparaciones múltiples para concentración de <i>Bacillus subtilis</i> a través del tiempo para cada medio de cultivo	49
Tabla 3.5. Comparaciones múltiples realizadas cada hora para la concentración de <i>Bacillus subtilis</i> en dos medios de cultivo.	51
Tabla 3.6. Análisis de varianza para factor horas en la cinética de <i>Trichoderma harzianum</i>	52
Tabla 3.7. Análisis de varianza para factor medios de cultivo en la cinética de <i>Trichoderma harzianum</i>	53
Tabla 3.8. Comparaciones múltiples para concentración de <i>Trichoderma harzianum</i> a través del tiempo para cada medio de cultivo.....	53
Tabla 3.9. Comparaciones múltiples realizadas cada hora para la concentración de <i>Trichoderma harzianum</i> en dos medios de cultivo.....	54
Tabla 3.10. Parámetros de la prueba de antagonismo de <i>Fusarium oxysporum</i> frente a controladores biológicos.	57
Tabla 3.11 Características de formulados a base de <i>Trichoderma harzianum</i> nativo	59

INTRODUCCIÓN

La pitahaya (*Hylocereus sp.*) también conocida como futa del dragón presenta más de 20 variedades que se distinguen por el color de su cáscara y la pulpa (1) actualmente viene ganando popularidad global debido a sus propiedades físicas, nutricionales y compuestos bioactivos, pues es considerado un alimento funcional debido a sus beneficios y su valor comercial adicional.

Su origen es América Central específicamente de México siendo también cultivada en regiones subtropicales y tropicales de América Latina (2), teniendo a los países de Vietnam, China, Indonesia, Tailandia y Taiwán como los 5 mayores productores de Pitahaya en el mundo seguidos de Colombia, Ecuador, México, India, Estados Unidos, Perú entre otros (1). A pesar de la pandemia por COVID-19 en el año 2020 la producción global de pitahaya se calculó en más de 2.1 millones de toneladas abarcando un área de 116,836 hectáreas con un crecimiento anual compuesto (CAGR) de 3.5% para el periodo 2016-2020 (3), y actualmente para el periodo comprendido entre los años 2021 y 2026 se espera un CAGR de 3.9% (4).

Además de su uso como colorante natural, la pitahaya se considera nutracéutica, proporcionando beneficios adicionales para la salud (5). Es una fuente rica en nutrientes que contiene compuestos bioactivos, glucosa, betalainas, vitaminas, ácidos orgánicos, fibra soluble, fitoalbúminas y minerales. Las betalainas se emplean como aditivos naturales en la industria alimentaria, poseen propiedades antioxidantes y antiestrés en los seres humanos, por su parte, las betacianinas además de ser una alternativa atractiva natural de pigmentos en la industria, cuentan con capacidad antioxidante que puede contribuir al manejo de trastornos metabólicos, mejoramiento de la resistencia a la insulina, prevenir el daño oxidativo y el envejecimiento prematuro (5).

Asimismo, la cáscara de la pitahaya alberga compuestos bioactivos de valor, como los polisacáridos solubles en agua y los oligosacáridos. Estos últimos presentan propiedades prebióticas al fomentar el crecimiento de bacterias beneficiosas en el intestino, lo cual

repercute en la mejora general de la salud intestinal. Además, la existencia de compuestos fenólicos y metabolitos secundarios, junto con la pectina en la cáscara de la fruta, contribuye a sus cualidades medicinales y nutricionales beneficiosas (6).

Por lo antes mencionado, la Pitahaya es una fruta de alto valor económico y nutricional con oportunidad de desarrollo en el Perú (3). En La Punta de Bombón, Perú, el cultivo de Pitahaya es relativamente nuevo y ha experimentado un aumento en la demanda en el mercado nacional e internacional, sin embargo, este crecimiento ha dado lugar a problemas fitosanitarios, especialmente la pudrición basal causada por el hongo *Fusarium oxysporum*, que afecta tallos y frutos (7). Los intentos de control utilizando insecticidas químicos resultan costosos y no sostenibles a nivel económico, ecológico y social (8).

El uso de estos insecticidas químicos ha llevado a desequilibrios en las comunidades microbianas, provocando enfermedades y reducción en el rendimiento de los frutos. En respuesta a esta preocupación, ha surgido el interés en abordar el problema de manera natural. Los gobiernos, agricultores y consumidores están cada vez más conscientes de los problemas asociados con productos químicos en términos de inocuidad alimentaria, medio ambiente y biodiversidad (9) por lo que las exigencias del mercado se han vuelto más estrictas en términos de exigir productos de calidad libres de contaminantes que puedan afectar la salud de la población (10).

Para abordar este problema y contribuir al desarrollo de soluciones ecológicas, se ha iniciado un proyecto de investigación en el sector Paraje de la Pampa el Alto, Punta de Bombón, Arequipa. Este proyecto tiene como objetivo evaluar el potencial antagonista de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum* contra el hongo patógeno *Fusarium oxysporum* en el cultivo de Pitahaya (*Hylocereus sp.*) de la variedad *Selenicereus undatus*. El objetivo final es desarrollar tecnologías ecológicas que mejoren la calidad de los frutos de pitahaya.

HIPÓTESIS

Dado que los biocontroladores son capaces de activar respuestas inmunitarias basales en plantas junto con un alto nivel de inhibición micelial de fitopatógenos, es probable que los microorganismos *Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum* inhiban el crecimiento del

patógeno *Fusarium oxysporum* del cultivo de pitahaya (*Hylocereus sp.*) de la variedad *Selenicereus undatus*.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el potencial antagonista de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum*. frente al hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* del cultivo de pitahaya *Hylocereus undatus*. en pampa el Alto-Punta de Bombón, Arequipa

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Aislar e identificar *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum* y *Fusarium oxysporum* nativos del campo de cultivo de Pitahaya (*Hylocereus sp.*) de la variedad *Selenicereus undatus* en Pampa El Alto, Punta de Bombón, Arequipa.
2. Seleccionar el medio de cultivo adecuado para el crecimiento de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum* mediante cinéticas de crecimiento.
3. Evaluar la actividad antagonista de 2 cepas frente a *Fusarium oxysporum*.
4. Proponer la preparación de un inoculante biológico a base de la cepa seleccionada con mayor actividad antagonista contra *Fusarium oxysporum*.

1. CAPITULO 1 MARCO TEORICO

1.1 Pitahaya

La Pitahaya o *Hylocereus undatus* es un es un fruto tropical perteneciente a la familia de las epífitas cactáceas (11). Su clasificación taxonómica se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la Pitahaya (*Hylocereus* spp.)

Nombre Científico	<i>Hylocereus</i> spp.
Reino	Plantae
División	Magnoliophita
Clase	Magnoliopsida
Orden	Caryophyllale
Familia	Cactaceae - cactácea
Tribu	<i>Hylocereeae</i>
Género	<i>Hylocereus</i>
Especie	H. extensus (Salm- Dyck ex De Candolle) H. setaceus (Salm-Dyck ex De Candolle) H. tricae (Hunt) H. minutiflorus Br. and R. H. megalanthus (Schum. ex Vaupel) H. stenopterus (Weber) Br. and R. H. calcaratus (Weber) Br. and R. H. undatus (Haw.) Br. and R. H. escuintlensis (Kimn.) H. ocamponis (Salm-Dyck) Br. and R. H. guatemalensis (Eich.) Br. and R. H. purpusii H. costaricensis (Weber) Br. and R. H. trigonus (Haw.) Safford H. triangularis (L.) Br. and R H. monacanthus (11)

Presenta diversos nombres comerciales como pitaya o fruta del dragón y se encuentra ampliamente distribuida en América central y América del sur. La pitahaya se caracteriza por presentar un aspecto de piel escamosa, pulpa de sabor dulce y la tonalidad del fruto es capaz de variar a blanco, amarillo, púrpura y rojo brillante (12).

Además, se ha registrado que dicha fruta presenta un alto valor nutricional, especialmente en ácido ascórbico que en la especie roja se llega a encontrar entre 4 – 25 % (p/p), también presenta capacidad antioxidante, entre sus compuestos activos tenemos la betalainas, betaninas y betacianinas (13). En cuanto a la producción, en estado silvestre se le suele encontrar en regiones tropicales y subtropicales, mayormente en México, Colombia, Brasil, Ecuador, Perú, entre otros (14). Es cultivada en algunos países como China, Taiwán, Australia, Estados Unidos y Malasia (15). Según el Instituto Nacional de Estadísticas e Informática menciona que se exportó 2 TN por US\$ 9 mil, eso representa un incremento de 125 % con respecto al 2020.

1.1.1 Manejo agronómico

En cuanto al manejo agronómico, la pitahaya es comúnmente cultivada en regiones tropicales y subtropicales, sin embargo, debido a la explotación comercial, han sido cultivadas en campos abiertos bajo elevada radiación solar. En cuanto al clima, se requiere de un ambiente cálido tropical con una exposición considerable a la luz directa (16), el suelo de cultivo debe ser ligeramente ácido (17). Para asegurar un excelente cultivo se debe hacer un pretratamiento al suelo con abundante materia orgánica, y mantener un pH entre 6 y 7.

Es importante tener en cuenta las diferentes especies comerciales de pitahaya, entre las más comunes está la *Hylocereus undatus*, que se caracteriza por tener una pulpa blanca y *Hylocereus costaricensis* y *Hylocereus polyrhizus* que se caracteriza por tener una pulpa roja, va a depender de las exigencias del mercado y las condiciones climáticas para elegir la especie adecuada a cultivar (11).

La propagación de este fruto se da mediante semillas y esquejes la propagación por esquejes suele ser más común y produce plantas más uniformes. Los esquejes deben tener al menos 30 centímetros de longitud y se deben dejar secar durante unos días antes de plantarlos en el suelo o en un medio de cultivo adecuado (18)(19) .

La pitahaya tiene una demanda de agua moderada. Durante la etapa de crecimiento activo, se debe proporcionar riego regular para mantener el suelo ligeramente húmedo al menos durante los primeros meses. Sin embargo, es importante evitar el encharcamiento, ya que el exceso de agua puede dañar considerablemente a las raíces (20).

En cuanto al control de enfermedades es necesario mantener el campo de cultivo libre de malezas para evitar la competencia por nutrientes y agua. A su vez, las plagas comunes que presenta este cultivo son la antracnosis, mildiú veloso y los ácaros (21).

1.1.2 Principales enfermedades y patógenos

Dentro de las principales enfermedades que padece la pitahaya tenemos a los siguientes géneros de hongos patógenos *Neoscytalidium*, *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Phytophthora*, *Botrytis*, *Fusarium* entre otros (22). La mayoría de estos hongos provocan pudrición y marchitez de la planta como es el caso de *Fusarium* y *Phytophthora*, además de manchas oscuras en el caso de *Alternaria* y *Colletotrichum* (11). Estas son solo algunas de las enfermedades comunes que pueden afectar a la pitahaya. Es importante mantener una adecuada gestión agronómica, incluyendo prácticas de saneamiento, control de plagas y enfermedades, así como el uso de variedades resistentes, para minimizar los impactos de estos patógenos (23) .

Fusarium

El hongo *Fusarium* es un fitopatógeno que provoca un crecimiento anómalo en diversos cultivos, entre los más afectados son pepino, tomate y frutos como

pitahaya y plátano (24)(25). La especie patógena principal es *Fusarium oxysporum*, presenta una morfología filamentosa compuesta de higas largas y delgadas que a su vez forman un micelio interconectado. En un medio de cultivo las colonias suelen presentar un crecimiento rápido con una tonalidad blanca o crema en los primeros días hasta tornarse a tonalidades rosadas o marrones. Este hongo se reproduce mediante conidios y clamidosporas, provocando la formación de cadenas de esporas en el extremo de las hifas. Tiene la capacidad de sobrevivir en el suelo durante prolongados periodos de tiempo en forma de clamidosporas. Presenta una característica de especificidad de hospedero, lo que la vuelve perjudicial solo para algunas especies de plantas, en este caso a la pitahaya. Dentro de su mecanismo de acción se sabe que el hongo penetra en las raíces de las plantas huésped a través de heridas o mediante la colonización directa de los tejidos. Una vez dentro de la planta, *Fusarium oxysporum* produce toxinas y enzimas que dañan los tejidos y obstruyen los vasos de la xilema, interfiriendo con el transporte de agua y nutrientes (26)(27)(28).

Phytophthora

Estos oomycetes, que se asemejan a hongos, desencadenan la pudrición de la raíz y el cuello en las pitahayas. Su acción implica la invasión de las estructuras radiculares y del cuello de la planta, provocando la descomposición de estos tejidos. Esto, a su vez, reduce la capacidad de la pitahaya para absorber nutrientes y agua, lo que se refleja en síntomas como marchitez, amarilleo de las hojas y, en última instancia, la muerte de la planta (2).

Alternaria

Los hongos del género *Alternaria* generan manchas en las hojas de las pitahayas. Estas manchas aparecen en forma de lesiones marrones o negras que pueden propagarse por toda la superficie de las hojas. A medida que avanza la infección, las hojas afectadas pueden secarse y desprenderse, lo que afecta la

capacidad de la planta para realizar la fotosíntesis y, en consecuencia, su crecimiento y producción de frutas de calidad (29).

Xanthomonas

Las bacterias del género *Xanthomonas* causan enfermedades bacterianas en las pitahayas, manifestándose en forma de manchas en las hojas y pudrición en la fruta. Estas bacterias ingresan en los tejidos de la planta a través de heridas o aberturas naturales, lo que provoca lesiones y daños en las hojas y la fruta. Este deterioro puede afectar negativamente la calidad de la fruta y reducir el rendimiento general de la planta (30).

1.1.2.1 Control de enfermedades agrícolas

Para tener un control de enfermedades en la pitahaya se precisa de la implementación de diversas estrategias para reducir la incidencia y severidad de enfermedades. Se recomienda prácticas de saneamiento en el área de cultivo, como la eliminación de material vegetal infectado y la utilización de herramientas limpias y desinfectadas. Se debe tener un control en el manejo de riego, ya que las enfermedades por hongos relacionadas con exceso de humedad en el área de cultivo son muy frecuentes. Por último, el control de la fertilización asegura una nutrición adecuada en plantas ya que esto permitirá a la planta a hacerle frente de mejor manera frente a enfermedades (31).

1.2 Controladores biológicos

La utilización de controladores biológicos ha emergido como una estrategia prometedora en la agricultura sostenible para el control de patógenos y plagas. Los controladores biológicos son organismos que son utilizados para mitigar la presencia de plagas o enfermedades en cultivos en ambientes naturales. Son importantes ya que se presentan como alternativas sostenibles y respetuosas con el medio ambiente, en

comparación con los agentes químicos que actúan como pesticidas. Existen diferentes tipos de controladores biológicos como los organismos predadores como aves insectívoras que se alimentan de organismos considerados plagas. Los parasitoides, que tienen la característica de infectar a otros organismos, en su mayoría insectos causando su muerte. Por ejemplo, las avispas parasitoides. Los microorganismos benéficos que incluyen hongos y bacterias, entre ellos *Trichoderma* y *Bacillus* respectivamente, que son capaces de infectar y matar plagas (32).

1.2.1 Principales controladores

Trichoderma

Trichoderma es un hongo saprófito y entomopatógeno perteneciente a la familia de hongos *Hypocreaceae* y a la clase de los euascomycetes, ha demostrado ser un agente prometedor en el control biológico de enfermedades de plantas en la agricultura. A nivel macroscópico, las colonias de *Trichoderma* presentan una apariencia algodonosa, con una variedad de colores que incluyen blanco, amarillo, verde y verde azulado. A nivel microscópico, se observan conidios unicelulares, elipsoides o en forma de lágrima, que se forman en cadenas o en conidióforos en forma de pincel. Estas características macro y microscópicas permiten la identificación y diferenciación de las especies y cepas de *Trichoderma* (33,34).

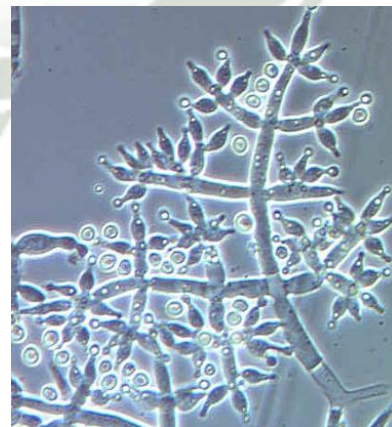


Figura 1.1. Estructura de *Trichoderma harzianum* (35).

Las propiedades de *Trichoderma* son diversas y han sido objeto de numerosos estudios. Entre las propiedades destacadas se encuentran su capacidad competitiva, producción de enzimas antagónicas y estimulación del crecimiento de la planta (36). *Trichoderma* compite eficientemente con otros hongos patógenos por nutrientes y espacio, lo que limita el crecimiento y la dispersión de los patógenos en el ambiente. Además, este género de hongos produce enzimas tales como quitinasas, proteasas y celulasas, las cuales degradan la pared celular de los fitopatógenos, debilitándolos y conduciendo a su eventual muerte (37). Asimismo, se ha demostrado que *Trichoderma* puede solubilizar nutrientes y sintetizar hormonas vegetales, promoviendo así el crecimiento y desarrollo de las plantas huésped (38).

La eficacia de *Trichoderma* en el control de enfermedades de plantas se ha estudiado en diversos fitopatógenos. Este género de hongos ha mostrado actividad antagónica contra hongos fitopatógenos como *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Botrytis*, *Pythium* y *Phytophthora*. Además, se ha observado que ciertos aislados de *Trichoderma* exhiben actividad antagónica contra nematodos fitoparásitos. Estos hallazgos respaldan el potencial de *Trichoderma* como agente de control biológico en diferentes sistemas de cultivo (39).

El mecanismo de acción de *Trichoderma* implica múltiples estrategias. La rápida colonización de los sustratos permite a *Trichoderma* competir con los fitopatógenos por recursos esenciales, limitando su establecimiento y desarrollo. La producción de enzimas antagónicas, como las quitinasas, proteasas y celulasas, permite la degradación de la pared celular de los fitopatógenos, causando su debilitamiento y eventual muerte. Además, se ha sugerido que *Trichoderma* induce resistencia sistémica en las plantas huésped, activando su sistema de defensa y brindándoles una mayor resistencia contra los ataques patogénicos (40,41).

Bacillus subtilis

Bacillus subtilis es una bacteria grampositiva con forma de bastón bajo microscopio, se destaca por su capacidad para sobrevivir en diferentes condiciones

ambientales y colonizar los sustratos, incluyendo el suelo y los tejidos vegetales. A nivel microscópico, se observa la presencia de esporas, que son estructuras de resistencia que permiten la supervivencia de *Bacillus subtilis* en condiciones adversas.

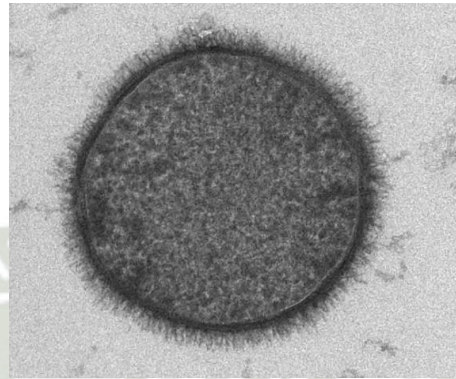


Figura 1.2. Bacteria *Bacillus subtilis* tomada en TEM (43).

Esta bacteria presenta una serie de propiedades beneficiosas que la hacen valiosa en el control biológico de enfermedades de plantas. *Bacillus subtilis* produce una variedad de compuestos antimicrobianos, como péptidos antimicrobianos, enzimas y sideróforos, que actúan directamente contra fitopatógenos. Además, produce enzimas como quitinasas, glucanasas y proteasas, que tienen la capacidad de degradar los componentes de la pared celular de los fitopatógenos, debilitándolos y llevándolos a su eliminación (44–46).

La efectividad de *Bacillus subtilis* como agente de control biológico se ha demostrado en varios fitopatógenos. Esta bacteria ha mostrado actividad antagónica contra hongos fitopatógenos como *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Botrytis* y *Phytophthora*. Además, ha demostrado ser eficaz contra bacterias patógenas como *Xanthomonas* y *Pseudomonas* (47). Estos hallazgos respaldan el potencial de *Bacillus subtilis* como una herramienta eficiente en el manejo de enfermedades de plantas.

El mecanismo de acción de *Bacillus subtilis* implica diferentes estrategias. La colonización rápida de los sustratos por parte de esta bacteria permite la competencia con los fitopatógenos por nutrientes y espacio, limitando su crecimiento y

establecimiento. Además, la producción de compuestos antimicrobianos y enzimas degradativas contribuye a la inhibición y eliminación de los fitopatógenos. Se ha observado que *Bacillus subtilis* también induce respuestas de defensa en las plantas huésped, activando su sistema de defensa y aumentando su resistencia contra enfermedades (48,49) .

La identificación de esta bacteria a nivel macroscópico se observa que forma colonias circulares, lisas y de color blanco-crema en medios de cultivo adecuados. Además, es importante destacar que *Bacillus subtilis* presenta una morfología de células en forma de bastón, con una disposición en cadenas o pares. Estas características macroscópicas y microscópicas proporcionan una primera indicación de la posible presencia de *Bacillus subtilis* en una muestra (50,51) .

En cuanto a las pruebas bioquímicas para una identificación precisa están las siguientes (50,51) :

- Prueba de la catalasa: *Bacillus subtilis* produce la enzima catalasa, que descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. La presencia de burbujas de oxígeno indica un resultado positivo para la catalasa.
- Prueba de la oxidasa: *Bacillus subtilis* es negativo para la enzima oxidasa, lo que significa que no produce cambios de color en un reactivo oxidasa.
- Prueba de hidrólisis de almidón: La prueba de hidrólisis de almidón se basa en la actividad enzimática de la amilasa, producida por *Bacillus subtilis*. La amilasa tiene la capacidad de romper los enlaces glucosídicos del almidón, lo que resulta en la liberación de azúcares más simples, como la maltosa y la glucosa. Esta hidrólisis del almidón es detectable mediante una serie de pasos bien definidos.

1.2.2 **Pruebas para identificar eficacia de controladores biológicos**

Pruebas de inhibición de crecimiento:

Las pruebas de inhibición de crecimiento se utilizan para evaluar la capacidad del controlador biológico para restringir o detener el crecimiento

del patógeno objetivo. Estas pruebas implican la siembra conjunta del controlador biológico y el patógeno en un medio de cultivo adecuado. Se analiza y compara el crecimiento del patógeno en presencia y ausencia del controlador biológico, determinando su efecto inhibitorio mediante parámetros como la velocidad de crecimiento, la formación de colonias o la producción de biomasa (52).

Pruebas de antagonismo directo:

Las pruebas de antagonismo directo evalúan la capacidad del controlador biológico para competir directamente con el patógeno. Se realizan mediante la siembra conjunta del controlador biológico y el patógeno en un medio de cultivo o en condiciones específicas. La interacción entre ambos organismos se observa y analiza, considerando aspectos como el desplazamiento del patógeno, la inhibición de su crecimiento o la producción de metabolitos antagónicos por parte del controlador biológico (53).

En caso de una prueba de antagonismo directo entre *Trichoderma* y *Fusarium* el medio de cultivo debe cumplir con las necesidades de los microorganismos, se puede utilizar medio agar Sabouraud o agar papa dextrosa (PDA) generalmente alrededor de 25-30 °C. Se realiza una inoculación central en la superficie del medio de cultivo de *Trichoderma*, en la misma placa, a cierta distancia del centro, coloca una cantidad similar micelio de *Fusarium*. Durante el período de incubación, se deberá registrar y evaluar la aparición de colonias además de cualquier signo de antagonismo. La capacidad de *Trichoderma* para actuar como antagonista de *Fusarium* se basa en diversos mecanismos biológicos. *Trichoderma* compete con *Fusarium* por recursos como nutrientes y espacio y produce enzimas y metabolitos secundarios antifúngicos que pueden dañar la estructura celular de *Fusarium* y afectar sus procesos metabólicos. En algunos casos, *Trichoderma* actúa

como micoparásito, penetrando y degradando las células de *Fusarium*. También puede inducir la resistencia sistémica en las plantas hospederas y producir sideróforos que privan a *Fusarium* de hierro, un nutriente esencial. Además, su rápido crecimiento y colonización limitan el espacio disponible para *Fusarium*. En conjunto, estos mecanismos hacen que *Trichoderma* sea un antagonista eficaz y un candidato prometedor como controlador biológico en la protección de cultivos contra infecciones de *Fusarium* (54)

Pruebas de biocontrol en condiciones de campo

Las pruebas de biocontrol en condiciones de campo son esenciales para evaluar la eficacia del controlador biológico en un entorno real. Se seleccionan áreas o parcelas específicas donde se aplica el controlador biológico según las recomendaciones de dosis y método de aplicación. Se comparan las tasas de incidencia o severidad de la enfermedad o plaga en las parcelas tratadas y no tratadas, obteniendo datos sobre la eficacia del controlador biológico en la supresión de la enfermedad o plaga objetivo (55,56).

Ensayo para evaluar rendimiento:

Para una prueba como esta en campo afectado por *Fusarium* inicialmente se debe producir suficiente material biológico (*Trichoderma*), este controlador biológico debe de ser distribuido uniformemente en el campo mediante diferentes métodos, según la cepa y la disponibilidad. Se debe realizar un seguimiento constante de la infección de *Fusarium* en las plantas del campo de cultivo. Esto incluye observaciones visuales y muestreos regulares. Bajo un análisis sistemático Se debe analizar y comparar el rendimiento de *Trichoderma* en la reducción de la infección por *Fusarium* en comparación con el área de control (57).

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Cultivo con Trichoderma + Fusarium}}{\text{Cultivo sin Trichoderma sin fusarium}} \times 100$$

Ecuación (1)

En donde:

Cultivo con *Trichoderma*+*Fusarium*: Representa la producción (cosecha) obtenida en el área de cultivo donde se aplicó *Trichoderma* y se evaluó el antagonismo frente a *Fusarium*.

Cultivo con Sin *Trichoderma* sin *Fusarium*: representa la producción obtenida en un área de control que no recibió tratamiento con *Trichoderma* ni fue expuesta a *Fusarium*.

El resultado se expresa en porcentaje, lo que permite cuantificar el impacto relativo del antagonismo entre *Trichoderma* y *Fusarium* en el rendimiento del cultivo.

Pruebas de persistencia y establecimiento

Las pruebas de persistencia y establecimiento se centran en evaluar la capacidad del controlador biológico para mantenerse y establecerse en el ambiente agrícola durante un período prolongado. Se aplican métodos de muestreo y análisis para determinar la presencia y viabilidad del controlador biológico en suelos, tejidos vegetales u otros sustratos relevantes. Estos análisis pueden incluir técnicas de cultivo (57).

2. CAPITULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 LUGAR DE EJECUCIÓN

La investigación se realizó sobre el cultivo de Pitahaya instalado en la Parcela M20 del Sector de la pampa El Alto del distrito de la Punta de Bombón de la provincia de Islay en la Región Arequipa.

Tabla 2.1 . Ubicación del proyecto.

Datos Generales	Localización 1
Distrito	Punta de Bombón
Provincia	Islay
Departamento	Arequipa
Latitud	17° 10' 26.5'' Sur
Longitud	71° 44' 27.0'' Oeste
Altitud	188 msnm

Fuente propia.



Figura 2.1. Plantación de pitahaya en la Parcela M20 del Sector de la pampa El Alto del distrito de la Punta de Bombón de la provincia de Islay en el Región Arequipa. *Fuente propia.*

El procesamiento microbiológico se realizó en las instalaciones y laboratorio de la empresa Industria Biotecnológica del Sur ubicada en Urb. Villa el Prado A12 Yanahuara.

2.2. MATERIALES

2.2.1. Material biológico

- Partes vegetales de pitahaya (*Hylocereus undatus*).
- *Fusarium spp.*
- *Trichoderma harzianum*
- *Bacillus subtilis*

2.2.2. Insumos

- Agua destilada
- Arroz
- Algodón
- Gasas
- Vasos de plástico

- Bolsas de polipropileno
- Gasa
- Ligas
- Bolsas de polipropileno
- Harina de arroz
- Harina de soya
- Harina de garbanzo
- Melaza

2.2.3. Reactivos químicos

- Etanol al 70%
- Agar Papa Dextrosa (PDA)
- Agar Sabouraud
- Caldo agar papa dextrosa (PDA)
- Almidón soluble
- Peptona bacteriológica
- Glucosa
- Fosfato de potasio dihidratado
- Lugol
- Solución KOH 40%
- Alfa naftol 5%
- Agua oxigenada
- Solución de hipoclorito de sodio al 1%
- Kit de tinción de Gram
- Tween 20

2.2.4. Materiales de laboratorio

- Matraces 250 mL
- Beakers de 250 mL
- Pipetas 1 mL
- Pipetas de 5 mL

- Pipetas de 10 mL
- Propipeta
- Espátula
- Bagueta
- Piceta
- Placas Petri 90 mm de diámetro
- Tubos de ensayo
- Mechero bunsen
- Asa de Kohl
- Bisturí N°8 y 10
- Espátula
- Porta objeto
- Cubre Objeto
- Cámara newbauer
- Tamiz N°60 y 80

2.2.5. Aparatos y equipos

- Balanza analítica Ohaus. Scout Pro
- Microscopio binocular Labortech
- Autoclave 18L Kyntel
- Estufa Kert LAB
- Cocinilla eléctrica
- Computadora

2.2.6. Software

- Google Earth
- Statgraphics Centurion XVII (StatPoint INC. , Warrenton, Virginia, EEUU)
- Microsoft Office Excel Professional Plus 2021 (Microsoft Corporation, Redmon, Whashington, EEUU)

- Microsoft Office Word Professional Plus 2021 (Microsoft Corporation, Redmon, Whashington, EEUU)

2.2.7. Otros

- Lampa
- Cuchillo
- Botas de goma
- Mandil de laboratorio

2.3. MÉTODOS

2.3.1. Aislamiento e identificación de *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum* y *Fusariums spp.* nativos del campo de cultivo de Pitahaya (*Hylocereus sp.*) de la variedad *Selenicereus undatus* en el sector paraje de la Pampa El Alto, Punta de Bombón, Arequipa..

Obtención de muestras biológicas

Para la obtención de los microorganismos se consideró el aislamiento a partir de muestras de suelo, partes vegetales y trampas de arroz.

El muestreo de suelo se realizó en base a lo establecido por el Laboratorio de análisis de muestreo de suelos del Instituto Nacional de Innovación Agraria – INIA, para ello se realizó un croquis del terreno y se anotaron características resaltantes del mismo. Se tomaron 20 puntos de muestreo distribuidos en zigzag, en cada punto se realizó un corte en forma de “V” de 20 cm de profundidad con ayuda de la pala y se recolectó de uno de los bordes un kilogramo de suelo el cual fue dispuesto en bolsas rotuladas. Las muestras fueron trasladadas en una

conservadora para mantener sus condiciones, posteriormente en laboratorio se homogeneizó las muestras y se tomó tres submuestras de 1 kg para luego realizar el análisis microbiológico.

En el caso de muestreo de partes vegetales se tomó hojas y raíces para su observación en laboratorio, en el caso de raíces se recolectó aún incluso sin sintomatología visible obteniendo un total de 10 submuestras.

La captura mediante trampas de arroz se realizó cocinando 1 kg de arroz con adición de 20 mL de melaza diluida al 5% y agua, finalizada la cocción se esterilizó en autoclave el arroz para obtener un sustrato estéril. En vasos previamente desinfectados se colocó el arroz cocido llenando solo 1/3 del volumen para luego cubrir con malla y sostener con ligas.

Se obtuvo 20 trampas de arroz que se distribuyeron aleatoriamente en el campo de cultivo, para lo cual se retiró la cubierta vegetal y se hizo un agujero de aproximadamente 5 a 10 cm de profundidad, se colocó la trampa y se esperó 7 días para su recolección.

Aislamiento de microorganismos

Para las muestras de suelo, se tamizó la muestra por tamices número 60 y 80 mesh con aberturas correspondientes a 250 μm y 180 μm , con la finalidad de separar material grueso como vegetales, meso y macrofauna presente. Se pesó 5 gramos del tamizado y se mezcló con 45 mL de solución salina por 5 minutos agitando vigorosamente, a continuación, en 5 tubos conteniendo 9 mL de solución salina al 0.9% de cloruro de sodio se inoculó 1 mL en forma de diluciones seriadas hasta la obtención de la concentración de 1:100000 o 10^{-5} . (58). Las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} se sembraron en agar Sabouraud para determinación de hongos y las diluciones 10^{-4} y 10^{-5} se sembraron en agar nutritivo y puestas en incubación a 37°C para aislamiento de bacterias.

En el caso de las trampas de arroz, para bacterias se realizó diluciones seriadas para aislamiento de bacterias y en el caso de hongos se realizó siembra directa por punción según la coloración observada en las trampas.

Para el caso de bacterias luego de 48 se observaron las características morfológicas de las colonias y se realizó la purificación mediante la técnica de siembra por agotamiento. En el caso de hongos se realizó repiques sucesivos hasta obtención de colonias puras(58).

Identificación de microorganismos

Para identificación de las especies de *Bacillus subtilis*, se empleó la clave de identificación de Gordon, Haynes y Pang (1973) (59) realizando identificación morfológica, seguida de tinción de Gram, prueba de catalasa, siembra en medio Voges Proskauer, método del frasco de vela para crecimiento aerobio/anaerobio y finalmente la prueba de hidrólisis de almidón (60).

La tinción de Gram se realizó colocando una gota de agua destilada sobre un portaobjetos limpio y seco, se realizó un frotis con el microorganismo y se realizó la fijación por calor suave sobre el mechero. Se aplicó cristal violeta por 1 minuto seguido de un enjuague suave con agua destilada, a continuación, se aplicó solución de Lugol por 1 minuto y se lavó con agua destilada, se decoloró con alcohol por 15 segundos y se aclaró con agua destilada, por último, se procedió a la tinción con safranina durante aproximadamente un minuto y se enjuagó nuevamente con agua destilada dejando secar la muestra al aire. Posteriormente, las muestras se examinaron bajo microscopio a un aumento de 100x.

Las colonias Gram positivas continuaron la identificación bioquímica. Para la prueba de catalasa, con el asa de siembra se colocó una colonia pura sobre un portaobjeto y luego se adicionó una gota de solución de peróxido de hidrógeno al 3%. La siembra en el medio Voges Proskauer se realizó en tubos, luego de 48 horas de crecimiento se adicionó 0.2 mL de solución de KOH al 40% y 0.6 mL

de alfa naftol al 5%, se agitó y se dejó en reposo por 15 minutos para propiciar el desarrollo de color en el medio.

Para la observación del crecimiento aerobio y anaerobio se empleó dos frascos de vidrio en los cuales se colocó las placas con agar nutritivo previamente inoculadas, en el frasco para crecimiento aerobio las placas fueron dispuestas apiladas y el frasco con la boca abierta se colocó en incubadora, en el segundo frasco de crecimiento anaerobio las placas inoculadas en agar nutritivo se colocaron boca abajo apiladas una sobre otra, encima de ellas se colocó una vela pequeña y se selló el frasco para que mediante la acción de la vela se consuma el oxígeno de la atmósfera (60,61).

Respecto al medio de hidrólisis de almidón se empleó medio nutritivo al cual una vez disuelto se adicionó almidón soluble en concentración al 2% (p/v), una vez homogeneizado el medio se procedió a colocar en tubos de ensayo. Luego de 48 horas de la siembra se adicionó 2 gotas de solución de yodo al 3% sobre el medio y se dejó reposar por 5 minutos (62).

Para la identificación de *Fusarium* y *Trichoderma* se empleó la clave simplificada de identificación de hongos de Williams-Woodwards de la Universidad de Georgia (2001)(63), complementado con la clave de Leslie & Summerell (2006) para *Fusarium* (64) y la clave de Kubicek & Harman (1998) para *Trichoderma* (65). Se realizó impresión en cinta sin tinción y con tinción de azul de lactofenol.

2.3.2. Selección el medio de cultivo adecuado para el crecimiento de cepas nativas y cepas comerciales de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum* mediante cinéticas de crecimiento.

Para la cinética de *Bacillus subtilis* se empleó caldo nutritivo como medio sintético y un medio industrial denominado caldo soya-melaza el cual está compuesto por harina de soya 2 % (p/v) y 5 % (p/v) de melaza.

De la placa de cultivo con el microorganismo aislado se procedió a tomar con un asa una muestra pequeña de colonia la cual fue resuspendida en un eppendorf con 2.5 mL, a continuación, se procedió a contar en cámara de newbauer la concentración del microorganismo para con ello obtener un inóculo de concentración conocida que fue incorporado a los matraces conteniendo los medios de cultivo mencionados.

La cinética fue realizada por triplicado por cada medio y cada cepa, se midió la concentración bacteriana tomando una alícuota de 1 mL cada hora por un periodo de 12 horas empezado a tiempo cero al momento de la inoculación. Las lecturas se realizaron en cámara de newbauer y se realizaron las curvas de crecimiento respectivas.

Para la cinética de *Trichoderma harzianum* se empleó dos medios de cultivo uno de ellos correspondiente a caldo papa dextrosa y el otro medio industrial arroz-frijol en concentraciones de 3 g/L de harina de arroz y 2.9 g/L de harina de frijol. Se preparó un inóculo de concentración conocida y fue sembrado a los matraces con medio de cultivo, las toma de alícuotas se realizó cada 12 horas por 5 días, las alícuotas se diluyeron con 9 mL de tween 20 al 0.1 % y se realizó su conteo en cámara.

Todo el procedimiento se realizó por triplicado en un diseño completamente aleatorizado (DCA). La selección del mejor medio de crecimiento fue evaluada mediante un análisis de varianza factorial de medidas repetidas.

2.3.3. Evaluación de la actividad antagónica de 2 cepas frente a *Fusarium oxysporum*.

Para la prueba de antagonismo en placas de agar PDA se sembró por punción *Trichoderma harzianum* y *Fusarium oxysporum* en placas independientes para obtener cultivos madre, al cabo de 72 horas, en placas de agar papa dextrosa (PDA) se inició el antagonismo sembrando discos del cultivo

madre en extremos opuestos de la placa dejando en incubación a 25°C por 14 días registrando cada 24 horas el radio de crecimiento de cada hongo. Simultáneamente se realizó placas control solo con *Trichoderma* y sólo con *Fusarium*.

Para el caso del antagonismo de *Bacillus subtilis* frente a *Fusarium oxysporum*, de la placa madre de *Fusarium* de 72 horas de crecimiento se sembró por punción en un extremo de una placa con medio PDA. *Bacillus subtilis* fue sembrado en medio líquido 24 horas antes realizando la inoculación mediante siembra en línea al lado opuesto de la placa. Se tuvo como control una placa sembrada con *Fusarium oxysporum* y una placa sembrada con agua en lugar de *Bacillus subtilis*. Las placas se dejaron incubando a 30°C por 14 días registrando el radio de crecimiento de *Fusarium* y su comportamiento diariamente.

Los tratamientos efectuados para la prueba de antagonismo se muestran en la Tabla 2.2, el estudio se realizó en un diseño completamente aleatorizado (DCA) por triplicado. Para las las placas control se realizó la medición del diámetro de crecimiento cada 24 horas por 7 días calculando con ello la velocidad de crecimiento (cm/días) mediante pendiente de ecuación lineal.

Tabla 2.2 *Tratamientos para la prueba de antagonismo*

Clave	Tratamiento
C1	Placa con <i>Fusarium oxysporum</i>
C2	Placa con <i>Trichoderma harzianum</i> nativo
C3	Placa con <i>Trichoderma harzianum</i> comercial
F-TN	Antagonismo <i>Fusarium oxysporum</i> vs. <i>Trichoderma harzianum</i> nativo
F-TC	Antagonismo <i>Fusarium oxysporum</i> vs. <i>Trichoderma harzianum</i> comercial
F-BN	Antagonismo <i>Fusarium oxysporum</i> vs. <i>Bacillus subtilis</i> nativo
F-BC	Antagonismo <i>Fusarium oxysporum</i> vs. <i>Bacillus subtilis</i> comercial

Se realizó comparaciones cualitativas en base a la escala de Bell et. al (1982) (Tabla2.3) y evaluación cuantitativa del efecto antagónico a los 14 días de crecimiento en placa para lo cual se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR), según la ecuación 2.

Tabla 2.3. *Escala de Bell*

Clave	Características
I	Crecimiento de <i>Trichoderma sp.</i> que cubrió toda la superficie del medio y redujo el crecimiento micelial del patógeno
II	Crecimiento de <i>Trichoderma sp.</i> que cubrió al menos 2/3 partes del medio.
III	<i>Trichoderma sp</i> y fitopatógeno crecieron ½ y ½ la superficie del medio, uno no se sobrepuso al otro.
IV	Hongo patógeno creció al menos 2/3 partes del medio y resistió a la invasión de <i>Trichoderma sp.</i>
V	Crecimiento del patógeno que cubrió toda la superficie del medio.

Fuente: Bell et al, 1982.

$$PICR = \frac{(Mc - Ma)}{Mc} \times 100$$

Mc

Ecuación (2)

Donde

PICR: porcentaje de inhibición del crecimiento radial

Ma: Micelio del fitopatógeno en antagonismo.

Mc: Micelio de Hongo fitopatógeno en placa control.

2.3.4. Preparación de inoculante biológico a base de la cepa seleccionada con mayor actividad antagónica sobre *Fusarium oxysporum*

La cepa de *Trichoderma harzianum* nativa, que mostró mayor capacidad de inhibición de *Fusarium oxysporum*, se empleó para la

producción masiva. Para ello se partió del medio líquido arroz-frijol con adición de cloranfenicol inoculando una concentración de 1×10^6 esporas/mL de *Trichoderma harzianum*.

En bolsas de polipropileno se pesa 800 g de arroz con 200 mL de agua destilada se sella con dos dobleces y grapas para luego ser homogeneizado y autoclavado a 121°C por 45 minutos, culminado el tiempo se retiran las bolsas y se homogeneizan con guantes resistentes al calor. Las bolsas se dejan toda la noche para favorecer su enfriamiento y ser posteriormente inoculadas con 30 mL de medio arroz-frijol de 5 días de crecimiento, se dejan en la cámara de crecimiento en oscuridad por 24 horas y luego se deja por 5 días para su esporulación. Culminado el tiempo se pasa a bandejas de secado por 5 días para finalmente cosechar las conidias.

Con las esporas obtenidas se realizó dos formulados uno en presentación sólida y otro en líquido a los cuales se les evaluó parámetros de control de calidad de concentración, viabilidad y pureza.

3. CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1 Aislamiento e identificación de *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum* y *Fusariums spp. nativos*.

EL aislamiento de microorganismos se realizó en el campo de cultivo de Pitahaya (*Hylocereus sp.*) de la variedad *Selenicereus undatus* en la parcela M20 del sector paraje de la Pampa El Alto, distrito de la Punta de Bombón, de la provincia de Islay en la Región Arequipa, con coordenadas geográficas de latitud -17.1740174 y longitud -71.7408206 ubicado a 1200 metros de la carretera Panamericana de la Punta de Bombón- Camaná.

Figura 3.1

La parcela corresponde al Centro de investigación agropecuaria Revilla's y se encuentra vinculado con la Asociación de Productores Agraria para Exportación 30 de Octubre.



Figura 3.1. Ubicación de parcela M20. Fuente: Google Earth.

En campo se observó el cultivo en buenas condiciones, no se observó la presencia de signos visibles de enfermedad por hongos pero si en algunos tallos se observó

sintomatología indicativa de la presencia de *Fusarium* (Figura 3.2), color café en la base del tallo cerca a la raíz que al acto es blanca, y al limpiar muestra interior amarillo rosado.



Figura 3.2. Sintomatología en pitahaya de la parcela M20.

Esta sintomatología concuerda con lo mencionado en la Guía técnica del cultivo de Pitahaya emitida por el Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), 2020, en Pitahaya la presencia inicial de *Fusarium* se observa con pequeñas manchas de color amarillo que pueden tener tamaños menores a 10 mm de diámetro, en las pencas estas manchas viran a color marrón con el tiempo y en los tallos la lesión avanza desde el suelo en dirección ascendente. Adicionalmente se encontraron manchas redondas color anaranjado oscuro con zonas cloróticas en mitad de los tallos característico de antracnosis causada por *Colletotrichum* y puntas de hojas color amarillo parduzco con interior blando característico de infección por *Erwinia sp.*

De los tallos colectados se logró aislar *Fusarium*, observando colonias aterciopeladas de color rosado morado con reverso amarillo – mostaza, desde un punto de vista morfológico la cepa aislada presentó conidióforos largos, macroconidias hialinas semicurvas con 3 a 4 septos, y microconidias elipsoides (Figura 3.3). Se puede diferenciar a *F. Oxysporum* de *F. solani* debido a su fiálide la cual en *F. solani* es mucho más larga. En investigaciones realizadas sobre el fruto de *Selenicereus megalanthus* se identificó 2 especies de *Fusarium*, siendo *F. oxysporum* y *F. fujikuroi* (7), además en Murcia, se reportó 24 hongos fitopatógenos en pitahaya amarilla destacando en el fruto

la presencia de *Fusarium sp.* y de *Colletotrichum sp.* (66). Como se ha mencionado *Fusarium* se desarrolla preferentemente en tallo o fruto con sintomatología que comienza con una mancha amarilla en el tallo, cerca del punto donde el fruto se une a la penca, lo que le da una apariencia madura antes de tiempo. Esta infección progresa hacia el centro del fruto causando deterioro parcial que puede afectar hasta la mitad de su superficie, con el tiempo se nota una pudrición blanda o seca de color marrón característico en la parte inferior del fruto (67). Un informe realizado en agosto del 2022 por la Universidad Nacional Agraria la Molina mencionó que en esquejes de Pitahaya variedad roja de la parcela M20 se identificó la presencia de *Fusarium sp.*, además de otros microorganismos. El control cultural llega a ser una práctica de suma importancia e implica retirar el material enfermo, sin embargo, si no se realiza la desinfección de las herramientas empleadas se puede dar la diseminación a distancia, en caso los frutos se desechen al suelo o caigan por sí mismos *Fusarium* puede continuar su crecimiento en el material en descomposición o caso contrario desarrollar clamidiosporas que le permitirán permanecer en suelo por años hasta encontrar condiciones favorables (68). La identificación temprana a partir de signos, síntomas es importante, pero más aún lo es un análisis microbiológico preventivo puesto que permite anticiparse al desarrollo de enfermedad identificando patógenos aun en forma de esporas. Esto es realmente importante puesto que para que la enfermedad progrese se requiere de los tres componentes clave de la enfermedad que son: hospedero, microorganismo y condiciones, lo cual indicaría que al estar *Fusarium* presente en suelo u otras partes vegetales aun sin signos ni síntomas visibles este será capaz de desarrollar y generar posible enfermedad bajo las condiciones ambientales propicias; por ello su control preventivo es significativo en el manejo de la pitahaya en la parcela M20.

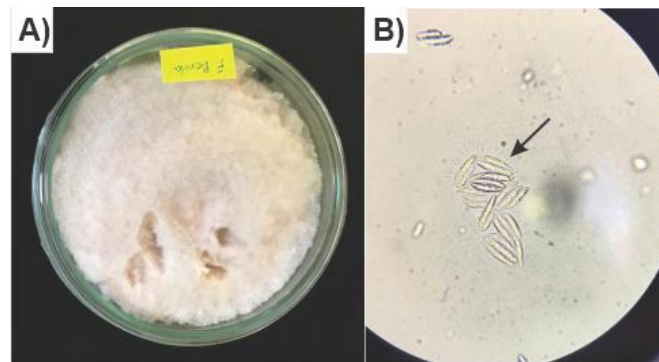


Figura 3.3. *Fusarium oxysporum* a partir de trampas de arroz. A) Observación macroscópica. B) Observación microscópica 40X.

En los aislamientos en suelo, se observó que la presencia de bacterias fue baja, sin embargo, se logró aislados de muestras de rizosfera, esto debido a que como menciona Lynch, 1990, la concentración de bacterias es mayor en la zona de la rizosfera debido a la presencia de nutrientes que rodean las raíces (69). De las colonias aisladas se seleccionó aquellas que a tinción de Gram mostraron la presencia de bacilos Gram positivos en cadenas cortas seleccionando 5 cepas las cuales fueron sometidas a pruebas bioquímicas (Figura 3.4) llegando a identificar a tres especies: *Bacillus subtilis*, *Bacillus brevis*, y *Bacillus pumilus* (Tabla 3.1). *Bacillus subtilis* dio como resultado esporas centrales sin deformación del bacilo, catalasa positivo (efervescencia), Voges Proskauer positivo (rosado), anaerobiosis negativo (ausencia de crecimiento), hidrolisis de almidón positivo es decir en reacción con Lugol no desarrolló color morado.

Bacillus en condiciones adversas se mantiene en estado vegetativo e induce esporulación (70), por tanto, es probable que debido a la características del suelo de la parcela M20 tales como textura arenosa, baja capacidad de retención de agua y baja cantidad de materia orgánica los *Bacillus* aislados se encuentren en forma de esporas lo cual les confiere resistencia ante condiciones adversas.

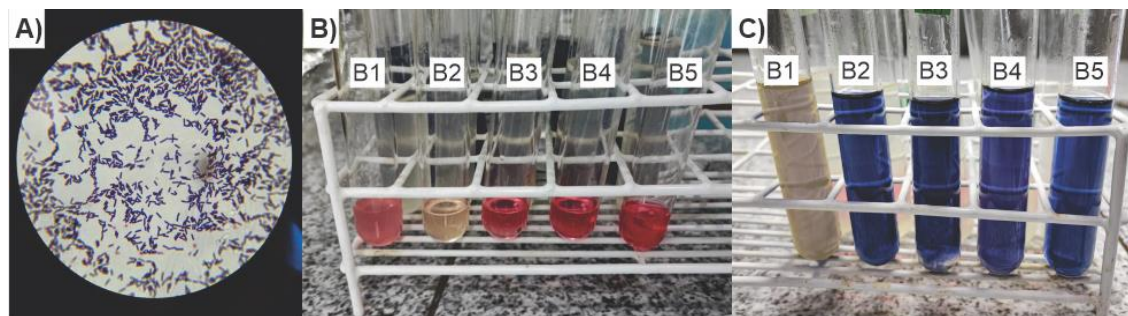


Figura 3.4. Pruebas bioquímicas. A) Tinción de Gram Observación microscópica 40X, B) Voges Proskauer, C) Hidrólisis de almidón.

Tabla 3.1. Caracterización bioquímica de especies de *Bacillus*

Prueba	B1	B2	B3	B4	B5
Tinción Gram	+	+	+	+	+
Esporas centrales ⁽¹⁾	+	-	+	+	+
Catalasa	+	-	-	+	+
Voges Proskauer	+	-	+	+	+
Anaerobiosis	-	-	-	-	-
Hidrolisis de almidón	+	-	-	-	-
Género y especie	<i>B. subtilis</i>	<i>B. brevis</i>	<i>Bacillus sp</i>	<i>B. pumilus</i>	<i>B. pumilus</i>

(1) Esporas centrales que no deforman bacilos

Para hongos se logró obtener crecimiento de *Aspergillus spp.* en placa identificados por sus características macroscópicas y microscópicas. *Aspergillus* mostró colonias algodonosas pulverulentas de color blanco que cambiaron a color a negro al cabo del tercer día llegando a ocupar todo el volumen de la placa enmascarando de esta manera la presencia de otros hongos en placa, su microscopía evidenció la presencia de micelio hialino, con cabezas esféricas y fiálides ubicadas en 360° y conidias abundantes (Figura 3.5), dichas características facilitaron su identificación mediante la clave simplificada de identificación de hongos de la Universidad de Georgia, definiendo al hongo como *Aspergillus Niger* (63).

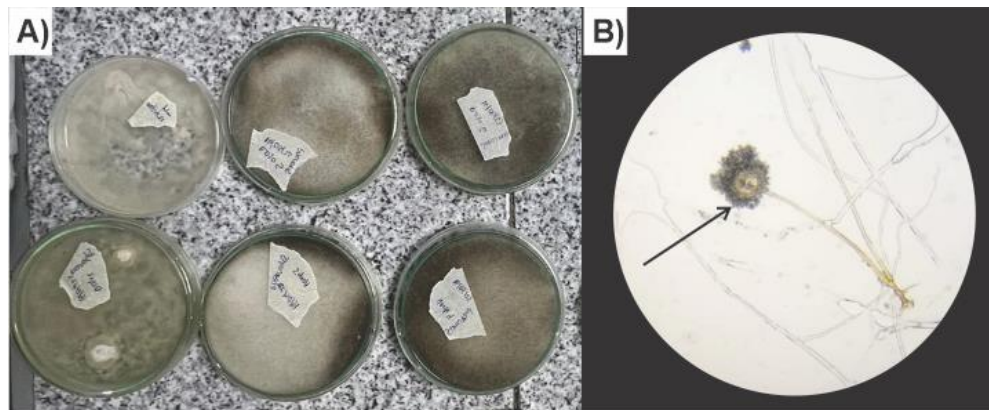


Figura 3.5. *Aspergillus* en muestras de suelo. A) Observación macroscópica . b) Observación microscópica 40X. Fuente propia.

Las características macroscópicas mostradas corresponden con lo reportado por Aristizábal (2022), el cual detalla que las colonias de *Aspergillus* aisladas de suelo presentan en un 68% colonias pulverulentas, finas y algodonosas en medios como Agar extracto de malta (MEA), Agar papa dextrosa (PDA) y Sabouraud, en algunos otros medios como Czapek-extracto de levadura (CYA) las colonias pueden presentar textura algodonosa laxa o densa (71).

Así mismo, Vásquez, 2020; en observación por microcultivo reportó que *Aspergillus* presenta esporulación rápida iniciando a los 5 minutos de su siembra, llegando a desarrollar estructuras incluso a las 24 horas de su inoculación. Es por ello que cuando está presente *Aspergillus* dificulta el aislamiento de otros hongos del suelo puesto que desarrolla a mayor velocidad que otros géneros, esta situación sumada a las características propias de la parcela M20 tales como: textura arenosa, baja capacidad de retención de agua, pobre cantidad de materia orgánica, entre otras no favorecieron el desarrollo de microorganismos.

Específicamente se ha reportado por medio de un análisis de caracterización de suelos que la parcela M20 tiene una textura arenosa y en capas más profundas arena franca; el estudio microecológico en suelos áridos realizado por Jhoncon & Gutierrez-Correa, 1982, confirma lo antes mencionado, pues se afirma que en condiciones bajas

de humedad el número de UFC de bacterias disminuye y se tiende a incrementar la presencia de hongos pero en forma de esporas, es por ello que el muestreo de suelos no permitió aislar los géneros deseados para el presente estudio (72).

Otras características importantes por mencionar de la parcela M20 es la concentración de materia orgánica que se encuentra en valores de 0.2 % a 0.33 % siendo clasificado como extremadamente pobre y la conductividad eléctrica se encuentra entre 5.90 y 8.74 dS/m correspondiendo a suelos salinos; estas condiciones extremas son toleradas por el cultivo de pitahaya el cual en presencia de sales no se ve afectada la longitud de brotes ni crecimiento de raíces (73).

La captura de microorganismos por medio de trampas de arroz permitió capturar de manera más eficiente a aquellos que en suelo se encuentran en bajas concentraciones o en forma de reposo observando en la matriz de las trampas la presencia de colonias de color rosadas, verdes, amarillas y cremas identificadas con flechas de color rojo, verde, naranja y el resto confundidas con el color del arroz (Figura 3.6), dichas colonias fueron sembradas para favorecer el aislamiento y la identificación de microorganismos.



Figura 3.6. Trampas de arroz contaminadas con microorganismos.

Respecto a hongos se lograron aislados de *Penicillium sp.*, *Fusarium sp.* y *Trichoderma sp.* El crecimiento de *Penicillium* en medio de cultivo Sabouraud presentó colonias aterciopeladas con micelio blanco radial de color verde oscuro, surcos radiales y reverso de color amarillo con presencia de pliegues; al microscopio con aumento 40 X se observó conidias esféricas, en columnas largas monoverticiliadas (Figura 3.7) estas características corresponderían con la especie *Penicillium glabrum* reportada por

Fatemeh (74) y corroborada siguiendo la clave determinativa del género *Penicillium* de Gomez (75), el género *Penicillium* es un género diverso distribuido en todo el mundo se encuentra principalmente en suelo, aire y materia en descomposición, sus especies desempeñan funciones importantes como descomponedores de materiales orgánicos y suelen causar pudriciones destructivas en la industria alimentaria, donde producen una amplia gama de micotoxinas, en específico *P. glabrum* no se reporta como fitopatógeno durante el cultivo lo cual conllevaría a considerarlo como un hongo beneficioso en la descomposición de materia orgánica del suelo, sin embargo, en post cosecha (76) las esporas de *P. glabrum* podrían inocular el fruto y generar pérdidas.



Figura 3.7. *Penicillium* a partir de trampas de arroz. A) Observación macroscópica . B) Observación microscópica 40X.

Así mismo, se aisló *Trichoderma* a partir de las trampas de arroz, la colonia aislada fue de textura polvosa a algodonosa de color verde oscuro y reverso crema, sus características morfológicas fueron conidióforos ramificados, con fiálides laterales ampuliformes y conidios globosos (Figura 3.8). Estas características concuerdan con *Trichoderma harzianum*, identificado según la clave mostrada por Kubicek & Harman, 2002 (65), se detalla también que esta especie es de conidiación densa y crecimiento rápido, usualmente presente en suelos y materia en descomposición rara vez asociada a enfermedades en plantas vivas, es por ello que debido a la baja cantidad de materia

orgánica en la parcela M20 fue necesario el empleo de trampas de arroz para favorecer el crecimiento de *Trichoderma harzianum*.

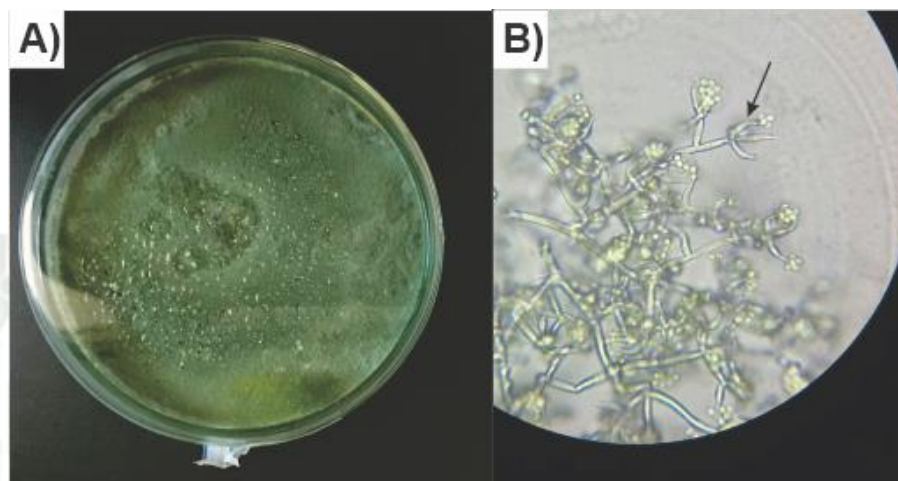


Figura 3.8. *Trichoderma harzianum* a partir de trampas de arroz.

A) Observación macroscópica. B) Observación microscópica 40X.

3.2. Selección el medio de cultivo adecuado para el crecimiento de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum* mediante cinéticas de crecimiento.

Se realizó la cinética crecimiento de *Bacillus subtilis* nativo aislado del campo de Pitahaya de la parcela M20, se trabajó con dos medios de crecimiento: caldo nutritivo como medio sintético y soya melaza como medio industrial. Se realizó un inóculo de concentración 1×10^6 UFC/mL y se cuantificó cada hora la concentración microbiana por un lapso de 12 horas, luego el conteo se espació a las 14, 15, 24 y 48 horas, con ello se realizó las curvas de crecimiento respectivas para cada medio empleado (Figura 3.9), se observó que el crecimiento en caldo nutritivo alcanzó la fase de crecimiento exponencial a partir de la hora 6 con una concentración de 8.73×10^7 UFC/mL llegando a un valor máximo de crecimiento de 1.65×10^8 UFC/mL a la hora 12, la fase estacionaria se mantuvo hasta la hora 14 e inmediatamente se ingresó a la fase de muerte celular; en medio soya melaza el inicio de la fase de crecimiento exponencial fue más lento iniciándose a partir de la octava hora de crecimiento llegando a inicial su fase estacionaria a partir de las 24 horas con una concentración de 7.08×10^8 UFC/mL, la

concentración alcanzada en medio soya melaza fue superior a la obtenida en el medio sintético comercial. La identificación de fases mencionada es corroborada con las diferencias de concentraciones mostradas en la Tabla 3.4.

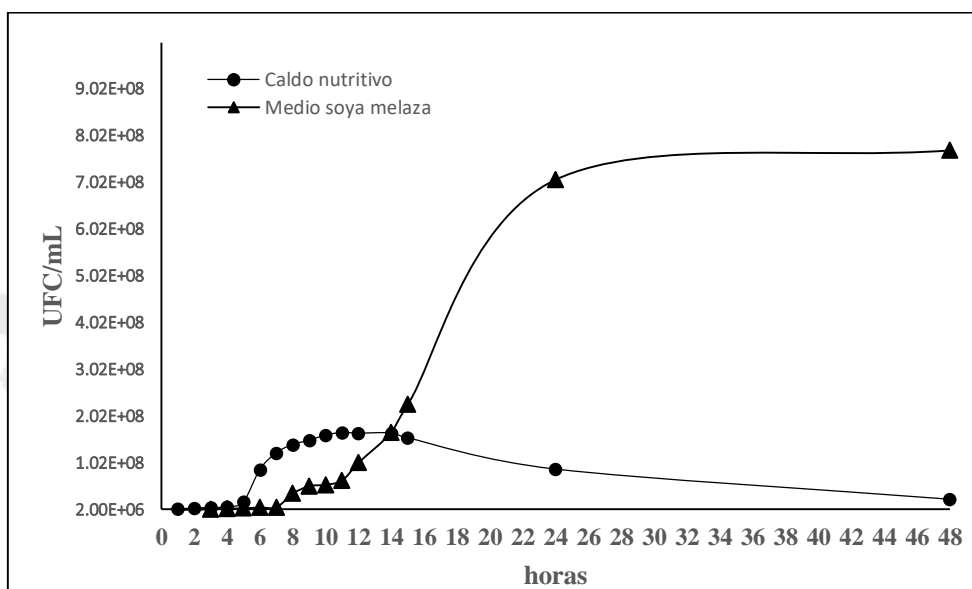


Figura 3.9. Cinética de crecimiento de *Bacillus subtilis*.

Para confirmar estadísticamente el crecimiento de *Bacillus subtilis* los datos de concentración fueron procesados mediante el análisis factorial de medidas repetidas, teniendo como factor inter-sujeto el tiempo medido en horas y como factor entre-sujetos los medios de cultivo empleados; el test de esfericidad fue significativo ($W=0.001$) lo cual indicó que se debe emplear el factor de corrección de Greenhouse-geiss de 0.128 para el análisis de varianza (Tabla 3.2). En el análisis de varianza inter sujeto se observó una diferencia significativa en el factor horas [$F(1.920, 5.760)= 860.56, p=0.001$] lo cual confirmó que la concentración de *Bacillus subtilis* a través del tiempo fue cambiando evidenciando un crecimiento bacteriano en ambos casos.

Tabla 3.2. Análisis de varianza para factor horas en la cinética de *Bacillus subtilis*

Origen	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	Valor-F	Valor-p
Horas	1.134×10^{18}	1.920	5.909×10^{17}	860.56	0.001
Horas*medio	1.172×10^{18}	1.920	6.104×10^{17}	889.04	0.001
Error(HORAS)	3.955×10^{15}	5.760	6.866×10^{14}		

Por su parte, el análisis de varianza para el factor entre sujetos (medio de cultivo) se muestra en la Tabla 3.3, en la cual se observa que existió diferencias estadísticamente significativas entre el crecimiento mostrado por *Bacillus subtilis* en caldo nutritivo y caldo soya melaza [F(1,3)= 414.63, p=0.001].

Tabla 3.3. Análisis de varianza para factor medios de cultivo en la cinética de *Bacillus subtilis*

Origen	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	Valor-F	Valor-p
Medios	4.019×10^{16}	1	4.194×10^{16}	414.63	0.001
Error Medios)	3.035×10^{14}	3	1.012×10^{14}		

La prueba post hoc empleada fue la de Bonferroni y los resultados se muestran en la Tabla 3.4, en ella se muestra el crecimiento contante de *Bacillus subtilis* en ambos medios de cultivo llegando a entrar en fase estacionaria a las 12 horas para medio caldo nutritivo ya partir de las 24 horas para caldo soya melaza.

Tabla 3.4. Comparaciones múltiples para concentración de *Bacillus subtilis* a través del tiempo para cada medio de cultivo

	<i>Caldo nutritivo</i>	<i>Medio soya melaza</i>
1	3.13×10^6 UFC/ml (a)	1.5×10^6 UFC/ml (a)
2	4.77×10^6 UFC/ml (b)	1.93×10^6 UFC/ml (b)

3	6.25×10^6 UFC/ml (c)	2.78×10^6 UFC/ml (c)
4	7.17×10^6 UFC/ml (d)	3.75×10^6 UFC/ml (d)
5	1.87×10^7 UFC/ml (e)	4.88×10^6 UFC/ml (e)
6	8.73×10^7 UFC/ml (f)	6.4×10^6 UFC/ml (f)
7	1.23×10^7 UFC/ml (g)	7.2×10^6 UFC/ml (g)
8	1.41×10^8 UFC/ml (h)	3.65×10^6 UFC/ml (h)
9	1.49×10^8 UFC/ml (i)	5.23×10^7 UFC/ml (i)
10	1.61×10^8 UFC/ml (j)	5.5×10^7 UFC/ml (j)
11	1.63×10^8 UFC/ml (k)	6.45×10^7 UFC/ml (k)
12	1.65×10^8 UFC/ml (l)	1.03×10^8 UFC/ml (l)
14	1.65×10^8 UFC/ml (l)	1.67×10^8 UFC/ml (m)
15	1.55×10^8 UFC/ml (m)	2.28×10^8 UFC/ml (n)
24	8.8×10^7 UFC/ml (n)	7.7×10^8 UFC/ml (o)
48	2.38×10^7 UFC/ml (o)	7.7×10^8 UFC/ml (o)

En las comparaciones realizadas para identificar en que medio se dio mayor crecimiento a cada hora evaluada, se observó que a pesar que en ambos casos se inoculó la concentración de 1×10^6 UFC/mL el medio sintético de caldo de cultivo permitió mayor desarrollo hasta la hora 14 en la cual ambos medios alcanzan la misma concentración 1.6×10^8 UFC/mL, es a partir de esa hora en la que *Bacillus subtilis* entra en fase de muerte celular y disminuye su concentración; sin embargo, esto no sucede en el medio industrial de soya melaza en el que el crecimiento continúa y supera al medio sintético llegando a obtenerse hasta 7.7×10^8 UFC/mL (Tabla 3.5).

Se puede afirmar, por tanto, que *Bacillus subtilis* tiene un adecuado crecimiento en el medio industrial soy amenaza permitiendo alcanzar concentraciones de hasta 7×10^8 UFC/mL y manteniendo la fase estacionaria por mayor tiempo esto puede deberse a la composición propia del medio industrial puesto que el medio líquido soya melaza

presentaba un sedimento no disuelto lo cual podría ser asimilado progresivamente por las bacterias en desarrollo sin llegar a su agotamiento.

Tabla 3.5. Comparaciones múltiples realizadas cada hora para la concentración de *Bacillus subtilis* en dos medios de cultivo.

	<i>Horas</i>							
	1	2	3	4	5	6	7	8
CN	3.13E6 (a)	4.77E6 (a)	6.25E6 (a)	7.17E6 (a)	1.87E7 (a)	8.73E7 (a)	1.23E8 (a)	1.41E8 (a)
SM	1.5E6 (b)	1.93E6 (b)	2.78E6 (b)	3.75E6 (b)	4.88E6 (b)	6.4E6 (b)	7.2E6 (b)	3.65E7 (b)
	<i>Horas</i>							
	9	10	11	12	14	15	24	48
CN	1.49E8 (a)	1.61E8 (a)	1.66E8 (a)	1.65E8 (a)	1.65E8 (a)	1.55E8 (a)	1.41E8 (a)	1.49E8 (a)
SM	5.23E7 (b)	5.5E7 (b)	6.45E7 (b)	1.03E8 (b)	1.67E8 (a)	2.28E8 (b)	3.65E7 (b)	5.23E7 (b)

Donde: CN: caldo nutritivo, SM caldo soya melaza.

Investigaciones realizadas por Ramos, 2021, reportan que *Bacillus subtilis* tiene un crecimiento paralelo en medios el LB y soya, alcanzando la fase estacionaria a las 8 horas en medio soya con una concentración de 1×10^6 UFC/mL generando 0.5 más bacterias y 0.8 veces más esporas que el medio sintético (77), así mismo, los ensayos de Sarmiento, 2012, en los medios mencionados confirman que el crecimiento y esporulación de *B. subtilis* fue mayor en el medio soya (78), con lo cual se acepta el medio formulado a base de harina de soya como fuente de nitrógeno asimilable que favorece el crecimiento y esporulación de cultivos de *B. subtilis*. Esta mejora en los rendimientos pueden deberse a la capacidad del almidón para hidrolizarse lentamente a glucosa en cultivos líquidos (79), en específico la harina de soya pueden mejorar la producción de esporas, ya que es rica en nutrientes nitrogenados y posee un 43.83 % de aminoácidos necesarios para el crecimiento y esporulación, en medios optimizados con productos industriales para *Bacillus subtilis* Chen, 2009 fue capaz de obtener una concentración de 1×10^{10} UFC/mL al cabo de 36 horas de incubación en medio conteniendo harina de soya (80).

La cinética de *Trichoderma harzianum* se realizó en medio sintético papa dextrosa y medio industrial arroz frijol, la evaluación de la concentración de esporas se

realizó cada 24 horas por 11 días (Figura 3.10), se observó que existió crecimiento en ambos medios de cultivo siendo mayor en el medio industrial y alcanzando la fase estacionaria a las 144 horas, en el medio sintético papa dextrosa la fase estacionaria se alcanzó a los 168 días.

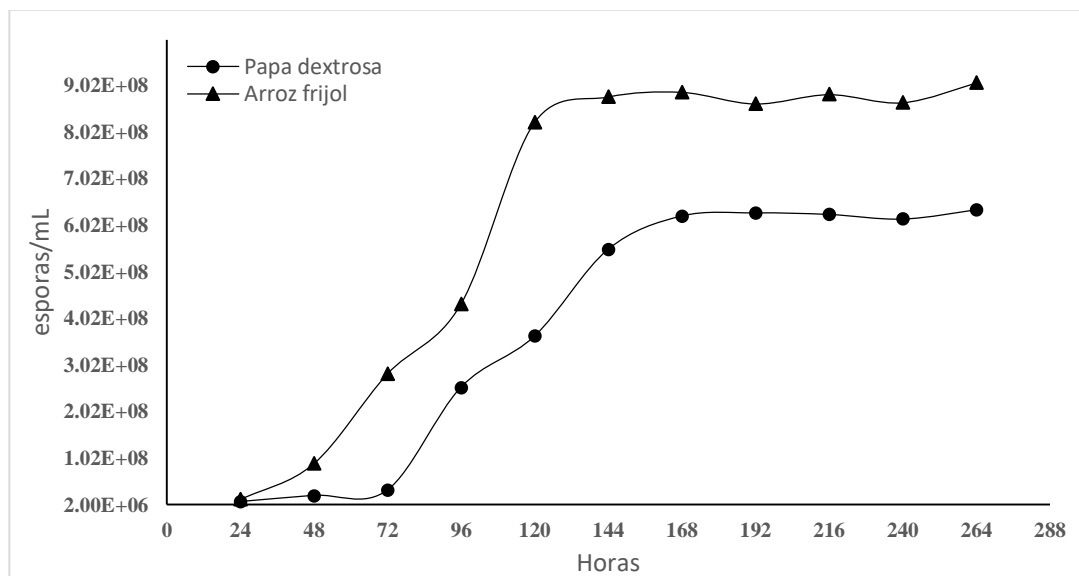


Figura 3.10. Cinética de crecimiento de *Trichoderma harzianum*. Fuente propia.

El análisis factorial de medidas repetidas confirmó estadísticamente el crecimiento de *Trichoderma harzianum* en ambos medios de cultivo, la prueba de esfericidad requerida para el procedimiento de análisis de datos fue significativa ($W=0.001$) requiriéndose el uso del factor de corrección de Greenhouse-geisser de 0.178 para el análisis de varianza (Tabla 3.6).

En el análisis de varianza inter sujeto se observó una diferencia significativa en el factor horas [$F(1.920, 5.760)= 860.56, p=0.001$] lo cual confirmó que existe un crecimiento de *Trichoderma harzianum* a través del tiempo.

Tabla 3.6. Análisis de varianza para factor horas en la cinética de *Trichoderma harzianum*

Origen	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	Valor-F	Valor-p
--------	-------------------	----	------------------	---------	---------

Horas	4.574×10^{18}	1.776	2.576×10^{18}	1477.82	0.001
Horas medio	1.748×10^{17}	1.776	9.847×10^{16}	56.50	0.001
Error(HORAS)	9.28×10^{15}	5.327	1.743×10^{15}		

Así mismo, el análisis de varianza para el factor entre sujetos (medio de cultivo) evidenció que existió diferencias estadísticamente significativas [F(1,3)= 1252.63, p=0.001] entre el crecimiento mostrado por *Trichoderma harzianum* en los dos medios empleados, es decir el crecimiento fue distinto en medio papa dextrosa que frijol arroz (Tabla 3.7). Mediante las pruebas post hoc se identificó que durante toda la cinética se obtuvo un mayor crecimiento con el medio industrial arroz frijol obteniendo una concentración de 8.78×10^8 esporas/mL a las 144 horas correspondientes al sexto día de crecimiento. Se puede concluir que *Trichoderma harzianum* desarrolla favorablemente en medio arroz frijol alcanzando concentraciones de hasta 8×10^8 esporas/mL superior a la máxima concentración alcanzada por el medio papa dextrosa en el cual sólo se llegó a concentraciones de 6×10^8 esporas/mL, estas diferencias permiten seleccionar el medio industrial como apto para el desarrollo del bio controlador puesto que permite su uso en producción a mayor escala por el menor costo que representa su composición.

Tabla 3.7. Análisis de varianza para factor medios de cultivo en la cinética de *Trichoderma harzianum*

Origen	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	Valor-F	Valor-p
Medios	7.205×10^{17}	1	7.205×10^{17}	1252.63	0.001
Error(Medios)	1.725×10^{15}	3	5.752×10^{14}		

Tabla 3.8. Comparaciones múltiples para concentración de *Trichoderma harzianum* a través del tiempo para cada medio de cultivo

PDA	Arroz frijol
-----	--------------

24	7.63 x10 ⁶ esporas/mL(a)	1.28 x10 ⁷ esporas/mL (a)
48	2.1 x10 ⁷ esporas/mL (b)	8.97 x10 ⁷ esporas/mL (b)
72	3.23 x10 ⁷ esporas/mL (c)	2.83 x10 ⁸ esporas/mL (c)
96	2.53 x10 ⁸ esporas/mL (d)	4.33 x10 ⁸ esporas/mL (d)
120	3.63 x10 ⁸ esporas/mL (e)	8.23 x10 ⁸ esporas/mL (e)
144	5.5 x10 ⁸ esporas/mL (f)	8.78 x10 ⁸ esporas/mL (f)
168	6.22 x10 ⁸ esporas/mL (g)	8.88 x10 ⁸ esporas/mL (g)
192	6.28 x10 ⁸ esporas/mL (h)	8.63 x10 ⁸ esporas/mL (h)
216	6.25 x10 ⁸ esporas/mL (i)	8.83 x10 ⁸ esporas/mL (i)
240	6.15 x10 ⁸ esporas/mL (j)	8.65 x10 ⁸ esporas/mL (j)
264	6.35 x10 ⁸ esporas/mL (k)	9.08 x10 ⁸ esporas/mL (k)

Tabla 3.9. Comparaciones múltiples realizadas cada hora para la concentración de *Trichoderma harzianum* en dos medios de cultivo.

	Horas					
	24	48	72	96	120	144
PDA	7.63 x10 ⁶ (b)	2.1 x10 ⁷ (b)	3.23 x10 ⁷ (b)	2.53 x10 ⁸ (b)	3.63 x10 ⁸ (b)	5.5 x10 ⁸ (b)
Arroz frijol	1.28 x10 ⁷ (a)	8.97 x10 ⁷ (a)	2.83 x10 ⁸ (a)	4.33 x10 ⁸ (a)	8.23 x10 ⁸ (a)	8.78 x10 ⁸ (a)
	Horas					
	168	192	216	240	264	
PDA	6.22 x10 ⁸ (b)	6.28 x10 ⁸ (b)	6.25 x10 ⁸ (b)	6.15 x10 ⁸ (b)	6.35 x10 ⁸ (a)	
Arroz frijol	8.88 x10 ⁸ (a)	8.63 x10 ⁸ (a)	8.83 x10 ⁸ (a)	8.65 x10 ⁸ (a)	9.08 x10 ⁸ (b)	

La investigación realizada por Cárdenas, 2010, evaluó medios de fermentación líquida con diferentes combinaciones de harina de arroz, harina de frijol y melaza identificando que los medios con menor concentración de nutrientes favorecieron el crecimiento y la esporulación de *Trichoderma* (81), esto concuerda además con lo mencionado por Gao, 2007 (82) el cual refiere que a menos concentración de nutrientes se acelera el inicio de esporulación debido al estrés generado en la cepa, así mismo se favorece la conidio génesis en medios sin melaza pues esta actúa como un inhibidor, por

ello en la presente investigación la esporulación fue mayor en concentración y en menor tiempo en el medio industrial compuesto por las harinas arroz-frijol pues representan una fuente de proteína con capacidad de ser hidrolizada por las celulasas, glucosidasas, amilasas, entre otras enzimas de *Trichoderma* (83).

La cinética realizada para ambas cepas permite identificar el momento en el cual se alcanza la mayor producción de biomasa, este tiempo es considerado como el ideal para su cosecha y empleo en formulados biológicos (84). Asimismo, el inicio de la fase estacionaria es un indicativo de agotamiento de la fuente de carbono con lo cual en medios industriales se pueden realizar evaluaciones sobre los componentes que favorezcan el crecimiento y retarden la fase estacionaria. En ambas cinéticas tanto para *Bacillus subtilis* como para *Trichoderma harzianum* se logró un mayor crecimiento en los medios industriales llegando así a reemplazar componentes de origen sintético a menor escala por componentes hechos usados en medios industriales con un menor costo económico.

3.3. Evaluación de la actividad antagonica frente a *Fusarium oxysporum*.

Para realizar la evaluación de la capacidad antagonica frente a *Fusarium oxysporum* se contó con cepas comerciales obtenidas a partir de productos ofrecidos por proveedores nacionales de biocontroladores. Se realizó el aislamiento de las cepas de cada formulado comercial observando una elevada contaminación tanto para *Trichoderma* comercial como para *Bacillus* comercial, por lo que fue necesario realizar varios repiques para poder obtener cepas puras. Esta situación es realmente alarmante puesto que al no contar con un adecuado control de calidad se corre el riesgo de generar productos contaminados los cuales al ser incorporados al campo podrían no sólo favorecer la introducción de cepas controladoras sino también de patógenos, por ello se recomienda emplear productos de empresas registradas ante la autoridad nacional SENASA que cuenten con el registro de productos biológicos de uso agrícola (PBUA) lo cual asegura no sólo una buena calidad sino también un producto con la concentración requerida y con un ensayo de eficacia respaldado por experimentación controlada en campo.

Con las cepas aisladas se realizó la evaluación de efecto antagónico mediante enfrentamiento, en la Figura 3.11 se muestra el resultado de los crecimientos al cabo de 14 días de crecimiento, es importante resaltar que los enfrentamientos se realizaron por triplicado y fueron monitoreados diariamente. Se observó que existió un mayor control con las cepas nativas versus las cepas comerciales esto probablemente por la exposición natural de las cepas aisladas de la parcela M20 frente al patógeno instalado en el cultivo de Pitahaya lo cual le hace tener una mayor especificidad frente a las cepas comerciales, dichas cepas al provenir de un producto que no se encontraba en óptimas condiciones de calidad conllevaría a disminuir la efectividad de la cepa comercializada.

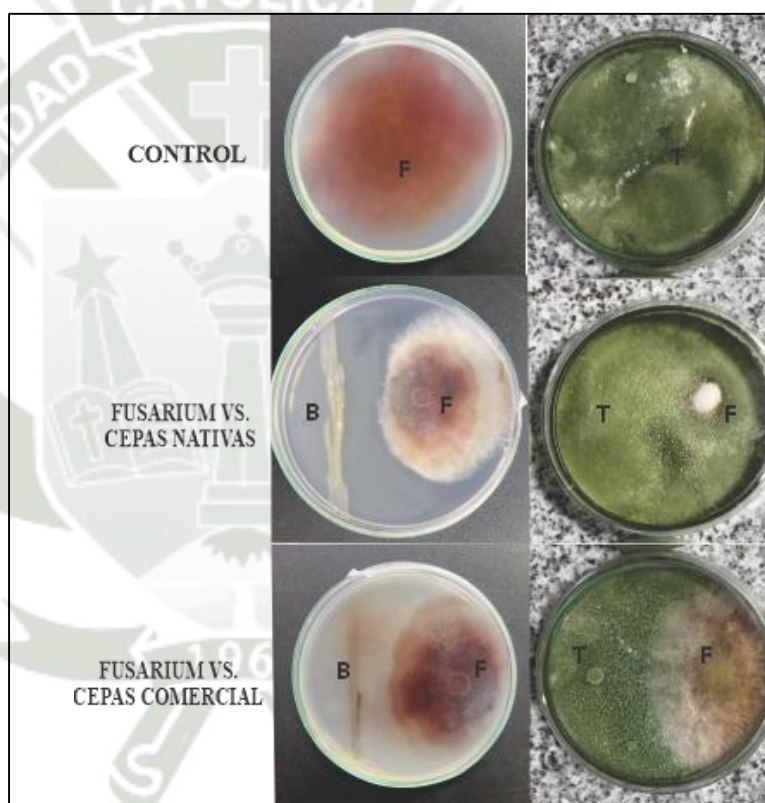


Figura 3.11. Antagonismo controladores biológicos frente *Fusarium oxysporum*

En la tabla 3.10 se muestran los parámetros cuantificados de la prueba de antagonismo, se observó que *Trichoderma harzianum* nativo presentó mayor velocidad de crecimiento con 1.4071 cm/día, seguido de *Trichoderma* comercial con 0.99 cm/día y finalmente de *Fusarium Oxysporum* con 0.36 cm/día; respecto al porcentaje de

inhibición de crecimiento radial (PICR) el tratamiento *T. harzianum* nativo fue el que presentó un mayor porcentaje de inhibición de *Fusarium oxysporum* con un 76.28% y un tipo de antagonismo de clase I es decir que *T. harzianum* nativo cubrió toda la superficie del medio y redujo el crecimiento del patógeno no dejándolo desarrollar. En el caso de los antagonismos de *F.oxysporum* vs. *T. harzianum* comercial el antagonismo fue de clase II y para los antagonismos de *F.oxysporum* vs *Bacillus* tanto en la cepa nativa como comercial el antagonismo fue de clase III, esta clasificación está basada en lo indicado por Bell, y se refiere a una medida cualitativa de crecimiento radial sobre placa.

Tabla 3.10. Parámetros de la prueba de antagonismo de *Fusarium oxysporum* frente a controladores biológicos.

Tratamiento	Nombre	Velocidad de crecimiento (cm/d)	PICR	Clase de antagonismo
C1	<i>Fusarium oxysporum</i>	0.36		
C2	<i>Trichoderma harzianum</i> nativo	1.41		
C3	<i>Trichoderma</i> comercial	0.99		
F-TN	<i>F.oxysporum</i> vs. <i>T. harzianum</i> nativo		76.28% ^a	I
F-TC	<i>F.oxysporum</i> vs. <i>T. harzianum</i> comercial		18.97% ^c	II
F-BN	<i>F.oxysporum</i> vs. <i>B.Subtilis</i> nativo		40.71% ^b	III
F-BC	<i>F.oxysporum</i> vs. <i>B.Subtilis</i> comercial		28.85% ^d	III

Donde: PICR= porcentaje de inhibición de crecimiento radial. Fuente propia.

Morales et.al (2020) evalúa la velocidad de crecimiento de diversos hongos identificando que para la cepa del *Trichoderma* aislada la velocidad de crecimiento fue de 1.86+/-0.22 cm/día y para *Fusarium* 0.47+/-0.006 cm/día (85) evidenciando que *Trichoderma* tiene una mayor capacidad de reproducción lo que le permite colonizar de manera rápida el suelo y competir por el espacio frente a patógenos. Otros estudios confirman la superioridad de *Trichoderma* frente a *Fusarium* (86) el cual es capaz de reducir la tasa de crecimiento de patógenos siendo un indicador de capacidad biocontroladora.

Diversos autores reportan porcentajes de inhibición de crecimiento radial de *Fusarium* en promedio del 50 % (87,88) con el antagonismo de clase 2. Por su parte Suárez et al, 2008, en ensayo realizado con 12 cepas de *T. harzianum* obtuvo porcentajes de inhibición entre 60 y 70% esto debido a que contó con aislamientos de cepas nativas, esto confirma que las cepas obtenidas de un campo de cultivo afectado estarán adaptadas para responder con mayor eficacia para el control de los patógenos presentes (89).

En el caso de *Trichoderma* la secreción de enzimas hidrolíticas (83) pueden contribuir en los mecanismos de bio control de dicha especie pues le permite asimilar nutrientes con mayor facilidad que los patógenos y competir con ellos por alimento permitiendo de esta manera un crecimiento más rápido y una mayor área colonizada, así mismo *Trichoderma* es capaz de producir antibióticos responsables de inhibir el desarrollo de patógenos (86).

Por su parte, *B. subtilis* es capaz de controlar diversos fitopatógenos en especial *Fusarium sp.* debido a su la competencia por la rizosfera (90), producción de lipopéptidos enzimas (91) y antibiosis (92). Adicionalmente, la aplicación de *B. subtilis* en presencia o ausencia de *F. oxysporum* mejora la fisiología vegetal de las plántulas, incluida la clorofila total, los carotenoides totales, los niveles de enzimas antioxidantes (catalasa y peroxidasa) y el contenido total de prolina (93).

3.4. Preparación de inoculante biológico con la cepa seleccionada.

La preparación de los productos finales a base de *Trichoderma harzianum* nativo se realizó en las instalaciones de la empresa Industria biotecnológica del Sur debido a que cuentan con la autorización de SENASA para producir, formular, envasar y distribuir productos biológicos, luego del proceso de producción masiva en sustrato arroz se realizó la preparación de dos inoculantes biológicos destinados a uso comercial (Figura 3.12) (Tabla 3.11).

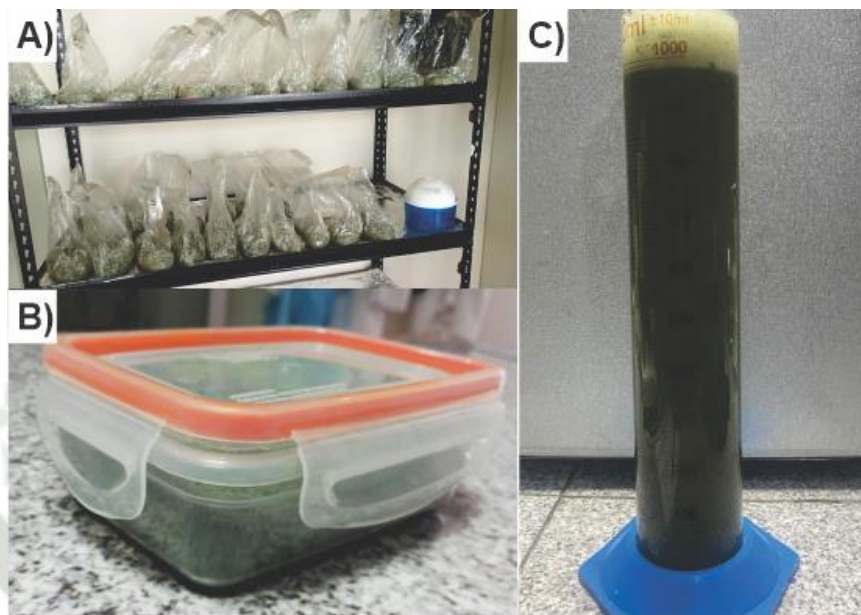


Figura 3.12. Bioformulados a base de *Trichoderma harzianum* nativo.

En A) Producción en sustrato sólido, B) Formulación polvo mojable, C) Formulación suspensión concentrada.

Tabla 3.11 Características de formulados a base de *Trichoderma harzianum* nativo

	Formulación 1	Formulación 2
Tipo de formulación	Polvo mojable (WP)	Suspensión concentrada (SC)
Estado	Sólido	Líquido
Concentración	1×10^8 esporas/g	1×10^8 esporas/mL
Viabilidad	97%	97%
Pureza	100%	100%

Se obtuvo dos formulaciones, una en formulación sólida de tipo polvo mojable (PM) con una concentración de 1×10^8 esporas/g y una formulación en líquido de tipo suspensión concentrada (SC) con una concentración de 1×10^8 esporas/mL. En formulaciones de plaguicidas comerciales existen las formulaciones comunes en líquido y sólido y las formulaciones especiales; dentro de las formulaciones líquidas se tiene a líquidos solubles, concentrados emulsionables, concentrados suspendidos, micro emulsiones, emulsiones concentradas en agua, suspoemulsiones y líquidos ultrabajo volumen cada una de ellas con sus características propias, en esta investigación se desarrolló la fórmula de suspensión concentrada por ser un líquido con principio activo sólido más sustancias auxiliares y componentes especiales (95), no cae dentro de la categoría líquido soluble puesto que se emplean esporas de *Trichoderma* como principio activo mas no una sustancia química hidrosoluble y es en base agua, por ello la formulación empleada de suspensión concentrada es adecuada puesto que el empleo de un dispersante permite la suspensión homogénea de las esporas en el medio acuoso manteniendo su estabilidad, las ventajas de la formulación líquida recaen en evitar polvos aspirables, evitar sedimentos solubles que taponen sistemas de riego tecnificado, evitar sedimentación que afecte la dosificación, facilitar aplicación por drones o avión y optimizar la eficacia del principio activo (94).

Por su parte la formulación de polvo mojable difiere de la de polvo soluble puesto que para tener la clasificación de polvo soluble el principio activo deberá ser soluble y en conjunto formar una solución verdadera, en este caso el polvo mojable a base de *Trichoderma* es comúnmente utilizado por su facilidad en formulación y estabilidad al almacenamiento, sin embargo presenta desventajas como difícil dosificación, requiere agitación, puede afectar los accesorios del sistema tecnificado y se tiene exposición al polvillo al momento de la preparación.

En revisión bibliográfica en textos en idioma inglés y español se registraron 164 artículos referentes a la formulación de polvo mojable o polvo humectable y 211 para la formulación de suspensión concentrada, siendo un número mucho menor para otro tipo de formulaciones. Por ello, estas dos formulaciones son las más adecuadas para el desarrollo de un producto comercial de *Trichoderma* siendo su empleo en formulación sólida o líquida según los fines

convenientes, por ejemplo, en cultivos tecnificados o en grandes áreas destinadas para exportación se recomienda el uso de la formulación en líquido como suspensión concentrada y en producciones pequeñas o tradicionales es viable el uso de formulación en polvo mojable.

Ambas formulaciones han sido desarrolladas a nivel comercial sin embargo no se dio su evaluación en campo debido a la normativa vigente emitida por el ministerio de agricultura y Riego (MINAGRI), en el cual según DS 001-2015- MINAGRI (94) que aprueba el reglamento del Sistema Nacional de Plaguicidas de uso Agrícola para realizar ensayos en campo se requiere de ensayos de eficacia realizados bajo protocolo aprobado por SENASA y ejecutados por un ingeniero agrónomo inscrito en el padrón de experimentadores de ensayo habilitados por SENASA, de realizarse ensayos de eficacia sin permiso por la autoridad competente recae en una infracción de tipo grave y de realizarse otros ensayos previos sin permiso experimental son infracciones muy grave; por lo consiguiente, es importante mencionar que se tienen ambos formulados los cuales serán validados siguiendo la normativa vigente en cumplimiento con las normas peruanas no siendo posible realizar pruebas propias en campo.

4. CAPITULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1.1. CONCLUSIONES

PRIMERA

Se aislaron cepas nativas de la parcela M20 del Sector de la pampa El Alto del distrito de la Punta de Bombón de la provincia de Islay en el Región Arequipa; *Fusarium oxysporum* fue aislado a partir de tallo afectado, *Bacillus subtilis* a partir de suelo específicamente de la rizosfera, *Trichoderma harzianum* fue aislado mediante trampas de arroz. Adicionalmente se observó la presencia de *Aspergillus niger* y *Penicillium glabrum*.

SEGUNDA

Para la cinética de crecimiento de los biocontroladores se trabajó en ambos casos con dos medios uno sintético y un medio industrial. Para *Bacillus subtilis* nativo se obtuvo un mayor desarrollo en medio soya melaza alcanzando una concentración de 7.08×10^8 UFC/mL a las 24 horas a diferencia del caldo nutritivo donde solo se alcanzó 1.65×10^8 UFC/mL a las 12 horas. *Trichoderma harzianum* tuvo buen crecimiento en los dos medios evaluados mostrando mayor desarrollo de en medio arroz frijol con 8.78×10^8 esporas/mL a las 144 horas y caldo papa dextrosa alcanzó 6.22×10^8 esporas/mL al cabo de 168 horas. Se evidencia que los medios industriales representan una alternativa económica y viable para el cultivo de los biocontroladores.

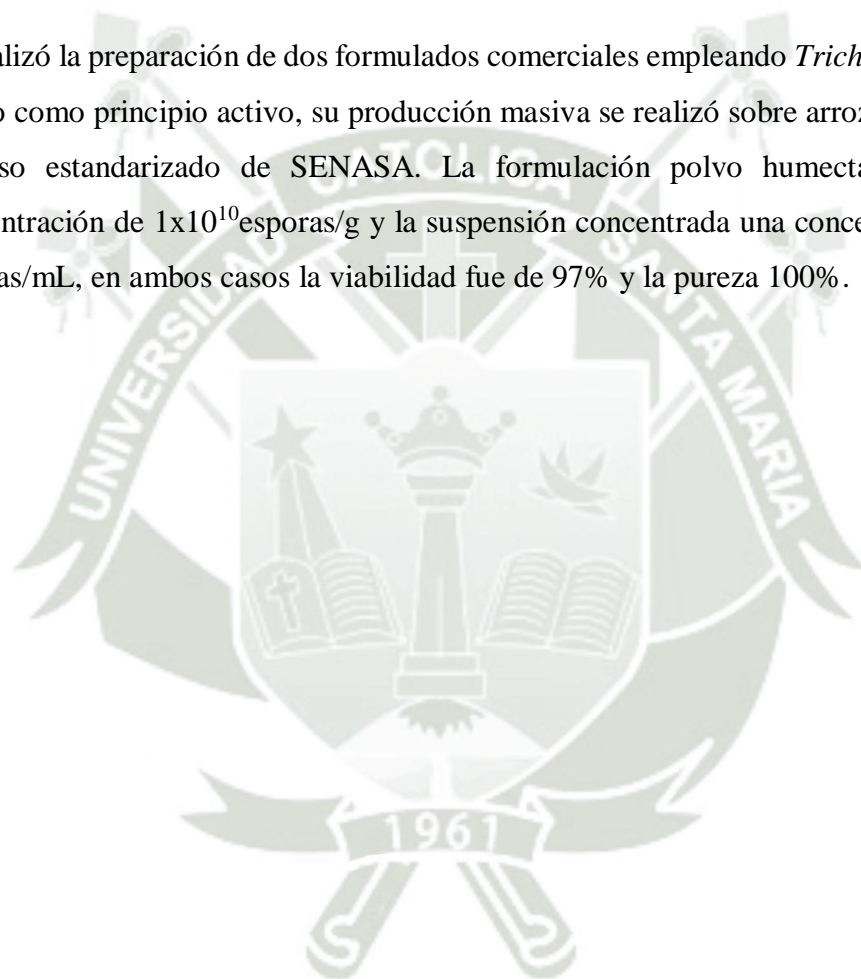
TERCERA

Se realizó la evaluación del porcentaje de inhibición de crecimiento radial de *Fusarium oxysporum* por acción de *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* tanto de las cepas nativas como de cepas comerciales. Identificando que *Trichoderma harzianum* nativo

presentó elevada capacidad de inhibición con un 76.28%, seguido de *Bacillus subtilis* nativo con 40.71%, luego por *Bacillus subtilis* comercial con 28.85% y finalmente por *Trichoderma harzianum* comercial con 18.97%, esto probablemente debido a que las cepas nativas se encontraban adaptadas y activas en comparación con las cepas comerciales que provenían de productos contaminados y de baja calidad.

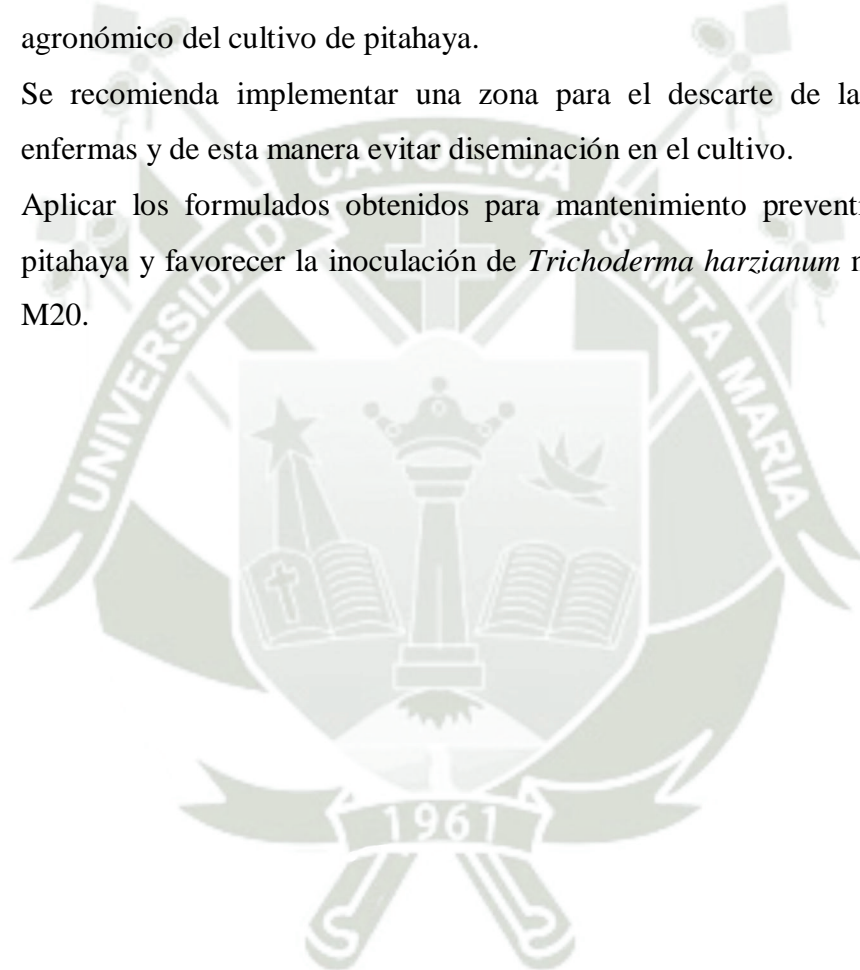
CUARTA

Se realizó la preparación de dos formulados comerciales empleando *Trichoderma harzianum* nativo como principio activo, su producción masiva se realizó sobre arroz y en bolsas según proceso estandarizado de SENASA. La formulación polvo humectable presentó una concentración de 1×10^{10} esporas/g y la suspensión concentrada una concentración de 2×10^8 esporas/mL, en ambos casos la viabilidad fue de 97% y la pureza 100%.



1.2. RECOMENDACIONES

- Realizar el diagnóstico fitopatológico completo del cultivo incluyendo la identificación de bacterias en partes vegetales puesto que se observaron lesiones en tallos.
- Actualizar el análisis de suelo de la parcela M20, para poder mejorar el manejo agronómico del cultivo de pitahaya.
- Se recomienda implementar una zona para el descarte de las partes vegetales enfermas y de esta manera evitar diseminación en el cultivo.
- Aplicar los formulados obtenidos para mantenimiento preventivo del cultivo de pitahaya y favorecer la inoculación de *Trichoderma harzianum* nativa en la parcela M20.



REFERENCIAS

1. Tendencias del Mercado de Pitahaya, Retos y Oportunidades. Sierra Exportadora. 2021.
2. Valencia-Botín AJ, Kokubu H, Ortíz-Hernández YD. A brief overview on pitahaya (*Hylocereus spp.*) diseases. *Australasian Plant Pathology*. 2013 Jul;42(4):437–40.
3. Sierra Exportadora. Análisis de mercado de la Pitahaya 2015-2020 . Lima; 2021.
4. <https://www.mordorintelligence.com>. MERCADO DE LA FRUTA DEL DRAGÓN: CRECIMIENTO, TENDENCIAS, IMPACTO DE COVID-19 Y PRONÓSTICOS (2023 - 2028). 2022.
5. Montalvo EO, Prieto AC, De Jesús E, Rivera R. La pitahaya (*Hylocereus spp.*) como alimento funcional: fuente de nutrientes y fitoquímicos. *milenaria.umich.mx* [Internet]. [cited 2023 Aug 21]; Available from: <http://www.milenaria.umich.mx/ojs/index.php/milenaria/article/view/342>
6. González KE. Cáscara de pitahaya (*Hylocereus undatus*) como fuente de compuestos bioactivos en una galleta: fibra dietaria, propiedades antioxidantes y bioaccesibilidad. 2023 [cited 2023 Aug 21]; Available from: <http://eprints.uanl.mx/25434/1/1080328813.pdf>
7. Salazar-González C, Serna-Cock L, Gómez-López E. Caracterización molecular de *Fusarium* asociado a pudrición basal del fruto en pitahaya (*Selenicereus megalanthus*). *Agronomía Mesoamericana* [Internet]. 2016 Jun 20 [cited 2023 Aug 21];27(2):277–85. Available from: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1659-13212016000200277&lng=en&nrm=iso&tlng=es
8. Verona-Ruiz A, Urcia-Cerna J, Paucar-Menacho LM. Pitahaya (*Hylocereus spp.*): Cultivo, características fisicoquímicas, composición nutricional y compuestos bioactivos. *Scientia Agropecuaria* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2023 Aug 21];11(3):439–53. Available from:

http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2077-99172020000300439&lng=es&nrm=iso&tlng=es

9. Castillo BB, Carlos Abraham Mejía Dueñas. Castillo, B. B., & Dueñas, C. A. M. (2023). Exposición a plaguicidas en Latinoamérica: Revisión Bibliográfica. *Revista de Ciencias Forenses de Honduras*. 2023;9(1):14–25.
10. Ambrus Á, Doan VVN, Szenczi-Cseh J, Szemánné-Dobrik H, Vásárhelyi A. Quality Control of Pesticide Residue Measurements and Evaluation of Their Results. *Molecules* 2023, Vol 28, Page 954 [Internet]. 2023 Jan 18 [cited 2023 Aug 21];28(3):954. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/28/3/954/htm>
11. Verona-Ruiz, Anggie, Urcia-Cerna, Juan, & Paucar-Menacho, Luz María. Pitahaya (*Hylocereus spp.*): Cultivo, características fisicoquímicas, composición nutricional y compuestos bioactivos. *Scientia Agropecuaria*. 2020, 11, 439-453. <https://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2020.03.16>
12. Yolanda Donají Ortiz-Hernández, José Alfredo Carrillo-Salaza. Pitahaya (*Hylocereus spp.*): a short review [Internet]. Available from: www.ufpi.br/comunicata
13. Verona-Ruiz A, Urcia-Cerna J, Luz ;, Paucar-Menacho M. Pitahaya (*Hylocereus spp.*): Cultivo, características fisicoquímicas, composición nutricional y compuestos bioactivos Pitahaya (*Hylocereus spp.*): Culture, physicochemical characteristics, nutritional composition, and bioactive compounds. 2020 [cited 2023 Jul 1]; Available from: <http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/scientiaagrop>
14. Alam Patwary MM, Rahman MH, Barua H, Sarkar S, Alam MS. Study on the Growth and Development of two Dragon Fruit (*Hylocereus undatus*) Genotypes. 2013.
15. Dey D, Hemachandran H, Kumar T, Doss GP, Priyadarshini R, Siva R. Accumulation of betacyanin in *Hylocereus undatus* rind: Pigment stability analysis

- and its role in xanthine oxidase inhibition. 2021 [cited 2023 Jul 1]; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.phyflu.2021.100197>
16. Esquivel P, Araya Quesada Y. Características del fruto de la pitahaya (*Hylocereus sp.*) y su potencial de uso en la industria alimentaria Pitahaya (*Hylocereus sp.*): fruit characteristics and its potential use in the food industry. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos* [Internet]. 2012 [cited 2023 Jul 1];3(1):113–29. Available from: <http://www.rvcta.org>
 17. García-Cruz L, Valle-Guadarrama S, Guerra-Ramírez D, Teresa Martínez-Damián M, Zuleta-Prada H. Cultivation, quality attributes, postharvest behavior, bioactive compounds, and uses of *Stenocereus*: A review . *Sci Hortic* [Internet]. 2022 [cited 2023 Jul 1];304:304–4238. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111336>
 18. Estrada-Luna AA, de Jesús Martínez-Hernández J, Esthela Torres-Torres M, Chablé-Moreno F. In vitro micropropagation of the ornamental prickly pear cactus *Opuntia lanigera* Salm–Dyck and effects of sprayed GA3 after transplantation to ex vitro conditions. [cited 2023 Jul 1]; Available from: <http://www.elsevier.com/copyright>
 19. Hartmann HT, Kester DE. *Propagación de plantas. Principios y prácticas*. 1981 [cited 2023 Jul 1]; Available from: <https://bibliotecadigital.infor.cl/handle/20.500.12220/1509>
 20. Alexandra E, Bautista S, Rene J, Roa V, Alfonso J, Ortega T. Estimación de la huella hídrica para un cultivo de pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus*). *Publicaciones e Investigación* [Internet]. 2015 Oct 22 [cited 2023 Jul 1];9:135–46. Available from: <https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/publicaciones-e-investigacion/article/view/1439/1878>
 21. Ortiz Hernández YD, Acevedo Ortiz MA, Lugo Espinosa G. Las chicanas y pitahayas en la diversificación productiva. ¿Alimentos alternativos complementarios, o defoliables y trepadoras fuera de control? 2021 Nov 8;

22. Hong CF, Gazis Romina, Grulla Jonathan H, Zhang Shouan. Prevalencia y epidemias de tallos de neoscytalidium y chancro de frutas en pitahaya (*Hylocereus* spp.) en el sur de Florida [Internet]. 2020 [cited 2023 Jul 1]. Available from: <https://ezproxy.ucsm.edu.pe:2058/record/display.uri?eid=2-s2.0-85084271243&origin=resultslist&sort=plf-f&src=s&st1=Main+diseases+and+pathogens+of+pitahaya&st2=&sid=6d41fbc98a3f92cd38ff35c3921c6be2&sot=b&sdt=b&sl=54&s=TITLE-ABS-KEY%28Main+diseases+and+pathogens+of+pitahaya%29&relpos=0&citeCnt=5&searchTerm=>
23. Alberto J. Valencia Botín, Pablo Cruz Hernández, Adolfo Rodríguez Canto. Avances en la etiología y manejo de la pudrición blanda de tallos de Pitahaya, *Hylocereus Undatus* H. (Cactaceae). 2003;
24. Pegg KG, Coates LM, O'Neill WT, Turner DW. The Epidemiology of *Fusarium* Wilt of Banana. Vol. 10, Frontiers in Plant Science. Frontiers Media S.A.; 2019.
25. Srinivas C, Nirmala Devi D, Narasimha Murthy K, Dhananjaya Mohan C, Lakshmeesha TR, Singh B, et al. *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici causal agent of vascular wilt disease of tomato: Biology to diversity-A review. 2019 [cited 2023 Jul 1]; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.06.002>
26. Manoj Kaushal, Ram Prasad. Microbial Biotechnology in Crop Protection. Microbial Biotechnology in Crop Protection. 2021;
27. Liu J, Qin D, Huang W, Wang X, Li Y, Zhang R. Biocontrol ability and action mechanism of *Bacillus amyloliquefaciens* Baf1 against *Fusarium incarnatum* causing fruit rot in postharvest muskmelon (cv. Yugu) fruit. LWT-Food Science and Technology [Internet]. 2023 [cited 2023 Jul 1];181:114714. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114714>
28. Hwang SH, Maung CEH, Noh JS, Baek WS, Cho JY, Kim KY. Efficiency and mechanisms of action of pelletized compost loaded with *Bacillus velezensis* CE 100 for controlling tomato *Fusarium* wilt. Biological Control. 2022 Dec 1;176.

29. Vilaplana R, Páez D, Valencia-Chamorro S. Control of black rot caused by *Alternaria alternata* in yellow pitahaya (*Selenicereus megalanthus*) through hot water dips. LWT. 2017 Sep 1;82:162–9.
30. Tan G, Food PTDRJ of A and, 2014 undefined. Disease control of *Ralstonia solanacaerum* in tomato and *Xanthomonas campestris* in pitaya using bacteriophage. CiteseerGH Tan, PSH TonyDirect Research Journal of Agriculture and Food Science, 2014•Citeseer [Internet]. 2014 [cited 2023 Sep 9];2(10):147–55. Available from: <https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=431bd1b53960692b3379d9533a06394073edde6a>
31. Molina L, Rajchenberg M, de Errasti A, Vogel B, Coetzee MPA, Aime MC, et al. Sapwood mycobiome varies across host, plant compartment and environments in Nothofagus forests from Northern Patagonia. Mol Ecol [Internet]. 2022 [cited 2023 Jul 1]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36345145/>
32. Daihana Sanchez A, Ousset MJ, Sosa C. Biological control of *Phytophthora collar* rot of pear using regional *Trichoderma* strains with multiple mechanisms. 2019 [cited 2023 Jul 1]; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.05.012>
33. Worrall EA, Hamid A, Mody KT, Mitter N, Pappu HR. Nanotechnology for Plant Disease Management. Agronomy 2018, Vol 8, Page 285 [Internet]. 2018 Nov 28 [cited 2023 Jul 1];8(12):285. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4395/8/12/285/htm>
34. Fazeli-Nasab B, Shahraki-Mojahed L, Piri R, Sobhanizadeh A. *Trichoderma*: Improving growth and tolerance to biotic and abiotic stresses in plants. 2022 [cited 2023 Jul 1]; Available from: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91595-3.00004-5>
35. Mycology and Nematology Genetic Diversity and Biology – Unites States Department of Agriculture. 2023.

36. Id Alexander Vargas-Hoyos, Elizabeth Gilchrist-Ramelli². Producción de enzimas hidrolíticas y actividad antagonica de *Trichoderma asperellum* sobre dos cepas de *Fusarium* aisladas de cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum*). Revista Mexicana de Micología. 2015;42: 9-16.
37. Hernández-Melchor DJ, Ferrera-Cerrato R, Alarcón A, Hernández-Melchor DJ, Ferrera-Cerrato R, Alarcón A. *Trichoderma*: IMPORTANCIA AGRÍCOLA, BIOTECNOLÓGICA, Y SISTEMAS DE FERMENTACIÓN PARA PRODUCIR BIOMASA Y ENZIMAS DE INTERÉS INDUSTRIAL. Chilean journal of agricultural & animal sciences [Internet]. 2019 [cited 2023 Jul 1];35(1):98–112. Available from: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0719-38902019000100098&lng=es&nrm=iso&tlng=es
38. Manuel Rey, Jesús Delgado-Jarana, Ana M Rincón, M Carmen Limón, Tahía Benítez². Mejora de cepas de *Trichoderma* para su empleo como biofungicidas. 2000;
39. Tapwal Ashwani, Singh Upender, Teixeira Da Silva Jaime A., Singh Gurpreet, Garg Shipra, Rajesh Kumar. In vitro antagonism of *Trichoderma viride* against five phytopathogens Conservation of *Pinus gerardiana* through mycorrhizal biotechnology View project Studies on ecological and ethno mycological aspects of wild mushrooms of Meghalaya View project In Vitro Antagonism of *Trichoderma viride* against Five Phytopathogens. 2011 [cited 2023 Jul 1]; Available from: <http://www.minitab.com>
40. Cotes AM. AISLAMIENTO, SELECCIÓN Y MECANISMOS DE ACCIÓN DE *Trichoderma koningiopsis* CAPÍTULO 1.
41. Bell DK. In Vitro Antagonism of *Trichoderma* species Against Six Fungal Plant Pathogens . Phytopathology. 1982;72(4):379.
42. María Samaniego-Fernández L, Harouna M, Corbea O, Rondón-Castillo AJ, Placeres-Espinosa I. Aislamiento, identificación y evaluación de cepas autóctonas de *Trichoderma* spp. antagonistas de patógenos del suelo “Isolation, identification, and

- evaluation of indigenous strains of *Trichoderma spp.* as antagonistic fungi of soil pathogens” [Internet]. Available from: <http://opn.to/a/4herH>
43. Brock T, Madigan M, Martinko J, Parker J. Brock biology of microorganisms. 2003 [cited 2023 Sep 9]; Available from: <https://lib.ugent.be/catalog/rug01:000745286>
 44. Pastor MD, Lorda GS, Balatti A. Protease obtention using *Bacillus subtilis* 3411 and amaranth seed meal medium at different aeration rates. Brazilian Journal of Microbiology [Internet]. 2001 [cited 2023 Jul 1];32(1):6–9. Available from: <https://www.scielo.br/j/bjm/a/Qt6nSftbTcXQRTWN5XVJkMQ/?lang=en>
 45. Earl AM, Losick R, Kolter R. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. Trends Microbiol [Internet]. 2008 Jun 1 [cited 2023 Jul 1];16(6):269–75. Available from: <http://www.cell.com/article/S0966842X08000887/fulltext>
 46. Kovács ÁT. *Bacillus subtilis*. Trends Microbiol [Internet]. 2019 Aug 1 [cited 2023 Jul 1];27(8):724–5. Available from: <http://www.cell.com/article/S0966842X19300721/fulltext>
 47. Sánchez Pila FE. Importance of *Bacillus subtilis* lipopeptides in the biological control of diseases in crops of high economic value [Internet]. Available from: <http://www.revistabionatura.com>
 48. Méndez-Úbeda JM, Hernández MSF, Páramo-Aguilera LA. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *BACILLUS subtilis* Y EVALUACIÓN DEL ANTAGONISMO IN VITRO FRENTE HONGOS FITOPATÓGENOS. Nexo [Internet]. 2017 [cited 2023 Jul 1];30(2):96–110. Available from: <https://revistasnicaragua.cnu.edu.ni/index.php/nexo/article/view/4734>
 49. Zeriouh H. Mecanismos de acción y determinantes bacterianos implicados en la actividad de biocontrol de *bacillus*. 2012 [cited 2023 Jul 1]; Available from: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=257283&info=resumen&idioma=SPA>
 50. Claudia Álvarez-López, Walter Osorio-Vega, María Claudia Díez-Gómez4, Mauricio Marín-Montoya. Caracterización bioquímica de microorganismos

- rizosféricos de plantas de vainilla con potencial como biofertilizantes. 2014 [cited 2023 Jul 1]; Available from:
https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1659-13212014000200002
51. Calvo P, Zúñiga D. Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus spp.* aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). *Ecología Aplicada* [Internet]. 2010 [cited 2023 Jul 1];9(1):31–9. Available from:
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-22162010000100004&lng=es&nrm=iso&tlng=en
52. Karina Astorga-Quirós, Karla Meneses-Montero, Claudia Zúñiga-Vega, Jaime Brenes-Madriz, William Rivera-Méndez. Evaluation of antagonism of *Trichoderma sp.* and *Bacillus subtilis* against three garlic pathogens. 2013 [cited 2023 Jul 1]; Available from: <https://www.scielo.sa.cr/pdf/tem/v27n2/a08v27n2.pdf>
53. Corrales Ramírez MSC LC, Sánchez Leal MSC LC, Cuervo Andrade PhD JL, Joya JA, Márquez K. Efecto biocontrolador de *Bacillus spp.*, frente a *Fusarium sp.*, bajo condiciones de invernadero en plantas de tomillo (*Thymus vulgaris L.*). *NOVA* [Internet]. 2012 Jun 30 [cited 2023 Jul 1];10(17):64. Available from:
<https://revistas.unicolmayor.edu.co/index.php/nova/article/view/193/387>
54. Jambhulkar P, Raja M, Singh B, Katoch S, Protection SKC, 2022 undefined. Potential native *Trichoderma* strains against *Fusarium verticillioides* causing post flowering stalk rot in winter maize. Elsevier [Internet]. [cited 2023 Sep 9]; Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0261219421003082>
55. Biocontrol de la “Escoba de Bruja” del Mango, con *Trichoderma spp.*, en Condiciones de Campo [Internet]. [cited 2023 Jul 1]. Available from:
https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092013000100001
56. Manuel Villalobos Arámbula Secretario Ing Víctor Suárez Carrera V, Arturo Macosay Córdova M, Fernández Rivera S, Santiago José Argüello Campos I, Ángel

Rodríguez Del Bosque L, Zamarripa Colmenero A, et al. BIOCONTROL DE *Trichoderma* spp. CONTRA EL COMPLEJO DE HONGOS CAUSANTES DE LA MARCHITEZ DEL GARBANZO. [cited 2023 Jul 1]; Available from: <https://eventosagrodesonora.mx>.

57. Khan N, Khan H, Khushnood R, Materials MB... and B, 2023 undefined. Self-healing of recycled aggregate fungi concrete using *Fusarium oxysporum* and *Trichoderma longibrachiatum*. Elsevier [Internet]. [cited 2023 Sep 9]; Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0950061823016240>
58. Stanier RY, Villanueva JR, Guerrero R. Microbiología. Metodos de la microbiologia. 2012;
59. the genus bacillus hand book - Google Académico [Internet]. [cited 2023 May 15]. Available from: https://scholar.google.com/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=the+genus+bacillus+h+and+book&btnG=
60. Rosenblatt JE. Anaerobic Bacteria. Laboratory Procedures in Clinical Microbiology [Internet]. 1985 [cited 2023 Nov 28];315–78. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4612-5070-8_5
61. 6.3E: Special Culture Techniques - Biology LibreTexts [Internet]. [cited 2023 Nov 28]. Available from: [https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Microbiology_\(Boundless\)/06%3A_Culturing_Microorganisms/6.03%3A_Culturing_Bacteria/6.3E%3A_Special_Culture_Techniques](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Microbiology_(Boundless)/06%3A_Culturing_Microorganisms/6.03%3A_Culturing_Bacteria/6.3E%3A_Special_Culture_Techniques)
62. CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS DEGRADADORAS DE CELULOSA... - Google Académico [Internet]. [cited 2023 May 15]. Available from: https://scholar.google.com/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=CARACTERIZACI%C3%93N+DE+BACTERIAS+DEGRADADORAS+DE+CELULOSA+Y+ALMID%C3%93N+&btnG=

63. Williams-Woodward J. SIMPLIFIED FUNGI IDENTIFICATION KEY.
64. Leslie JF, Summerell BA. The *Fusarium* Laboratory Manual. The *Fusarium* Laboratory Manual [Internet]. 2007 Dec 13 [cited 2023 Nov 28];1–388. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9780470278376>
65. *Trichoderma* And *Gliocladium*. Volume 1. *Trichoderma* And *Gliocladium* Volume 1. 2002 Apr 12;
66. Murcia N, Rojas-Triviño A, Orozco M. 8. Enfermedades limitantes en el cultivo de Pitahaya Amarilla. In: Tecnología para el manejo de pitahaya amarilla, *Selenicereus megalanthus*. 2013. p. 78–87.
67. Varón, F. 2006. Enfermedades de la pitahaya y su... - Google Académico [Internet]. [cited 2023 Nov 24]. Available from: https://scholar.google.com/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=Var%C3%B3n%2C+F.+2006.+Enfermedades+de+la+pitahaya+y+su+manejo.+Rev.+Asiava+73%3A19-21.&btnG=
68. *megalanthus* Ralf Bauer H. Manejo fitosanitario del cultivo de la pitahaya Medidas para la temporada invernal. [cited 2023 Nov 24]; Available from: <http://www.comunicacion.amc.edu.mx/comunicacion/noticias/images/cyd-040809-pitahaya3-g.jpg>
69. Prashar P, Kapoor N, Sachdeva S. Rhizosphere: Its structure, bacterial diversity and significance. *Rev Environ Sci Biotechnol*. 2014 Mar;13(1):63–77.
70. Petersohn A, Brigulla M, Haas S, Hoheisel JD, Völker U, Heckler M. Global analysis of the general stress response of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* [Internet]. 2001 [cited 2023 Nov 24];183(19):5617–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11544224/>
71. Aristizábal Quintero M. Caracterización morfológica y molecular de *Aspergillus* sección Fumigati, obtenidos del cepario del Grupo Biología Celular y Molecular CIB. Medellín; 2022.

72. Jhoncon J, Gutiérrez-Correa M. Estudio microecológico en suelos de las lomas de Lachay. Microhongos. Lima; 1982 Jan.
73. Bárcenas-Abogado P, Tijerina-Chávez L, Martínez-Garza A, Becerril-Román AE, Larqué-Saavedra A, Colinas De León MT. RESPUESTA DE TRES MATERIALES DEL GENERO *Hylocereus* A LA SALINIDAD SULFATICO-CLORHIDRICA
Response of Three *Hylocereus* Materials Exposed to Chloride-Sulfate Salinity.
74. Mahmoudian F, sharifirad A, Yakhchali B, Ansari S, Fatemi SS ali. Production of Mycophenolic Acid by a Newly Isolated Indigenous *Penicillium glabrum*. *Curr Microbiol* [Internet]. 2021 Jun 1 [cited 2023 Nov 20];78(6):2420–8. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00284-021-02509-6>
75. clave determinativa de las especies del género *Penicillium* - Buscar con Google [Internet]. [cited 2023 Nov 20]. Available from: https://www.google.com/search?q=clave+determinativa+de+las+especies+del+g%C3%A9nero+Penicillium&source=lmns&bih=647&biw=1235&rlz=1C1GCEA_enPE944PE944&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwiE-b7H59aCAxVBkZUCHb4TAV8Q_AUoAHoECAEQAA
76. Bardas GA, Tzelepis GD, Lotos L, Karaoglanidis GS. First Report of *Penicillium glabrum* Causing Fruit Rot of Pomegranate (*Punica granatum*) in Greece. <https://doi.org/101094/PDIS-93-12-1347A> [Internet]. 2009 Nov 5 [cited 2023 Nov 21];93(12). Available from: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-93-12-1347A>
77. Ramos F. Cultivo de *Bacillus subtilis* cepa 105 en bioreactor y su actividad antagonista contra *Sclerotinia sclerotiorum*. Instituto Politécnico Nacional; 2014.
78. Sarmiento L. Producción de *Bacillus subtilis* cepa 105 en reactor y evaluación de su actividad antagónica a *Sclerotinia sclerotiorum* [Tesis de licenciatura]. Instituto tecnológico superior de Alamo Temapache; 2010.

79. Shi F, Zhu Y. Application of statistically-based experimental designs in medium optimization for spore production of *Bacillus subtilis* from distillery effluent. *BioControl* [Internet]. 2007 Dec [cited 2023 Nov 28];52(6):845–53. Available from: https://www.researchgate.net/publication/225323733_Application_of_statistically-based_experimental_designs_in_medium_optimization_for_spore_production_of_Bacillus_subtilis_from_distillery_effluent
80. Chen ZM, Li Q, Liu HM, Yu N, Xie TJ, Yang MY, et al. Greater enhancement of *Bacillus subtilis* spore yields in submerged cultures by optimization of medium composition through statistical experimental designs. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010 Feb;85(5):1353–60.
81. Cárdenas J. Caracterización microbiológica y producción de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* en cultivo artesanal. Pontificia Universidad Javeriana; 2010.
82. Gao L, Sun MH, Liu XZ, Che YS. Effects of carbon concentration and carbon to nitrogen ratio on the growth and sporulation of several biocontrol fungi. *Mycol Res* [Internet]. 2007 Jan [cited 2023 Nov 28];111(Pt 1):87–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17158041/>
83. Gottschalk LMF, Oliveira RA, Bon EP da S. Cellulases, xylanases, β -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. *Biochem Eng J*. 2010 Aug 15;51(1–2):72–8.
84. Yáñez-Mendizábal V, Viñas I, Usall J, Torres R, Solsona C, Teixidó N. Production of the postharvest biocontrol agent *Bacillus subtilis* CPA-8 using low cost commercial products and by-products. *Biological Control*. 2012 Mar;60(3):280–9.
85. Morales-Mora LA, Andrade-Hoyos P, Valencia-de Ita MA, Romero-Arenas O, Silva-Rojas HV, Contreras-Paredes CA, et al. Caracterización de hongos asociados al cultivo de fresa y efecto antagonista in vitro de *Trichoderma harzianum*. *Revista mexicana de fitopatología* [Internet]. 2020 Aug 25 [cited 2023 Nov 28];38(3):434–49. Available from:

- http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092020000300108&lng=es&nrm=iso&tlng=es
86. Andrade-Hoyos P, Silva-Rojas HV, Romero-Arenas O. Endophytic *Trichoderma* Species Isolated from *Persea americana* and *Cinnamomum verum* Roots Reduce Symptoms Caused by *Phytophthora cinnamomi* in Avocado. *Plants* 2020, Vol 9, Page 1220 [Internet]. 2020 Sep 17 [cited 2023 Nov 28];9(9):1220. Available from: <https://www.mdpi.com/2223-7747/9/9/1220/htm>
 87. Michel-Aceves AC, Hernández-Morales J, Toledo-Aguilar R, Sabino López JE, Romero-Rosales T. CAPACIDAD ANTAGÓNICA DE *Trichoderma spp.* NATIVA CONTRA *Phytophthora parasitica* Y *Fusarium oxysporum* AISLADOS DE CULTIVOS DE JAMAICA. *Revista fitotecnia mexicana* [Internet]. 2019 [cited 2023 Nov 28];42(3):235–41. Available from: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802019000300235&lng=es&nrm=iso&tlng=es
 88. Singh J, kumar V, Srivastava S, Kumar A, Singh VP. In vitro Evaluation of *Trichoderma* Species Against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Causing Tomato Wilt . *Plant Pathol J (Faisalabad)*. 2018 Apr 15;17(2):59–64.
 89. Suarez Meza CL, Fernandez Barbosa RJ, Valero NO, Gomez Carrillo RM, Paez Redondo AR. Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., asociado a la marchitez en maracuya. *Rev colomb biotecnol*. 2008;35–43.
 90. Compant S, Duffy B, Nowak J, Clément C, Barka EA. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2005 Sep [cited 2023 Nov 28];71(9):4951–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16151072/>
 91. Adriana Y, Durango H, Hernando D, Bedoya L. Evaluación de la producción de lipopéptidos a partir del consorcio de *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus subtilis* para el control biológico de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) presente en

- el follaje del banano en la zona del Urabá antioqueño. 2023 [cited 2023 Nov 28]; Available from: <https://bibliotecadigital.udea.edu.co/handle/10495/33546>
92. Wisanggeni GA, Suryanti S, Joko T. The Potential of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* RJ09 as a Biological Control Agent Against Leaf Spot Diseases on Clove. *Jurnal Fitopatologi Indonesia* [Internet]. 2023 Jul 24 [cited 2023 Nov 28];19(3):118–26. Available from: <https://journal.ipb.ac.id/index.php/jfiti/article/view/45218>
93. Jassim NS, Ati MA. Efficacy of *Bacillus subtilis* (Ehrenberg1835) Cohn1872, in suppressing *Fusarium oxysporum* Schlecht. emend. Snyder & Hansen, the causal agent of root rot of date palm offshoots (*Phoenix dactylifera* L.) in Iraq. *Acta Agric Slov* [Internet]. 2022 Oct 20 [cited 2023 Nov 28];118(3):1-10–1–10. Available from: <https://journals.uni-lj.si/aas/article/view/13108>
94. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales.UNLP. Formulaciones de plaguicidas. 2006.
95. COMITE REGIONAL DE SANIDAD VEGETAL DEL CONO SUR. TIPOS DE FORMULACIONES PARA EL REGISTRO DE PRODUCTOS FITOSANITARIOS. Argentina; 2000 Dec.

ANEXOS

Anexo 1. Cinética crecimiento Bacillus.

caldo nutritivo												
	1			2			3			4		
	CN1	CN2	CN3	CN1	CN2	CN3	CN1	CN2	CN3	CN1	CN2	CN3
1	10	7	12	20	15	21	27	24	35	29	25	34
2	7	16	20	18	19	17	24	21	22	31	30	35
3	12	14	15	17	14	18	25	23	24	25	25	33
4	11	17	10	19	23	24	20	26	25	28	30	27
5	13	14	10	15	22	24	28	29	22	24	23	31
dilucion												
UFC/ml	2.65E+06	3.40E+06	3.35E+06	4.45E+06	4.65E+06	5.20E+06	6.20E+06	6.15E+06	6.40E+06	6.85E+06	6.65E+06	8.00E+06
	5			6			7			8		
	CN1	CN2	CN3	CN1	CN2	CN3	CN1	CN2	CN3	CN1	CN2	CN3
1	79	64	80	42	32	30	54	36	45	74	45	57
2	83	79	81	42	41	39	54	50	50	72	45	64
3	62	70	72	36	36	40	44	47	49	60	48	51
4	70	73	81	23	33	21	37	46	51	54	48	52
5	75	68	86	43	34	32	49	67	57	62	44	68
dilucion				0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
UFC/ml	1.85E+07	1.77E+07	2.00E+07	9.30E+07	8.80E+07	8.10E+07	1.19E+08	1.23E+08	1.26E+08	1.61E+08	1.15E+08	1.46E+08
	9			10			11			12		
	CN1	CN2	CN3	CN1	CN2	CN3	CN1	CN2	CN3	CN1	CN2	CN3
1	66	65	50	74	65	67	66	65	70	62	66	62
2	60	68	52	72	65	64	70	68	62	69	78	58
3	62	43	51	60	68	71	62	63	71	63	65	68
4	61	43	60	54	58	62	61	63	60	62	66	74
5	73	63	79	62	54	68	73	63	79	70	58	67
dilucion	0.10	0.10	0.10	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
UFC/ml	1.61E+08	1.41E+08	1.46E+08	1.61E+08	1.55E+08	1.66E+08	1.66E+08	1.61E+08	1.71E+08	1.63E+08	1.67E+08	1.65E+08
	14			15			24			48		
	CN1	CN2	CN3	CN1	CN2	CN3	CN1	CN2	CN3	CN1	CN2	CN3
1	60	64	65	62	59	55	32	45	30	85	109	94
2	66	62	68	64	62	68	33	33	28	91	88	80
3	63	69	67	60	67	70	45	29	35	91	111	90
4	69	74	66	56	61	52	28	41	44	100	118	72
5	66	66	66	69	60	63	30	36	39	92	123	81
dilucion	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1			
UFC/ml	1.62E+08	1.68E+08	1.66E+08	1.56E+08	1.55E+08	1.54E+08	8.40E+07	9.20E+07	8.80E+07	2.30E+07	2.75E+07	2.09E+07
MEDIO SOYA MELAZA												
	1		2		3		4					
	CN1	CN2	CN1	CN2	CN1	CN2	CN1	CN2				
1	6	7	8	8	12	10	16	15				
2	7	8	9	9	8	13	11	12				
3	5	6	8	8	15	16	16	15				
4	4	5	4	7	9	9	12	18				
5	6	6	9	7	10	9	19	16				
dilucion												
UFC/ml	1.40E+06	1.60E+06	1.90E+06	1.95E+06	2.70E+06	2.85E+06	3.70E+06	3.80E+06				
	5		6		7		8					
	CN1	CN2	CN1	CN2	CN1	CN2	CN1	CN2				
1	25	18	22	21	32	30	14	12				
2	22	17	35	23	29	30	16	10				
3	20	25	24	25	33	28	19	8				
4	15	20	30	18	29	26	20	15				
5	14	19	26	32	22	29	13	19				
dilucion												
UFC/ml	4.80E+06	4.95E+06	6.85E+06	5.95E+06	7.25E+06	7.15E+06	4.10E+07	3.20E+07				
	9		10		11		12					
	CN1	CN2	CN1	CN2	CN1	CN2	CN1	CN2				
1	15	17	18	30	23	25	35	35				
2	19	24	22	19	26	31	41	44				
3	22	27	25	17	30	26	30	52				
4	21	20	19	25	25	23	49	49				
5	25	19	23	22	24	25	39	36				
dilucion	0.10	0.10	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1				
UFC/ml	5.10E+07	5.35E+07	5.35E+07	5.65E+07	6.40E+07	6.50E+07	9.70E+07	1.08E+08				
	14		15		24		48					
	CN1	CN2	CN1	CN2	CN1	CN2	CN1	CN2				
1	52	69	9	11	22	31	38	36				
2	55	79	4	8	28	30	32	32				
3	68	80	12	12	31	25	26	29				
4	80	52	8	10	30	28	31	30				
5	69	65	8	9	26	32	30	24				
dilucion	0.1	0.1	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01				
UFC/ml	1.62E+08	1.73E+08	2.05E+08	2.50E+08	6.85E+08	7.30E+08	7.85E+08	7.55E+08				

Anexo 2. Cinética de crecimiento *Trichoderma*.

caldo nutritivo												
	24			48			72			96		
	PDA1	PDA2	PDA3	PDA1	PDA2	PDA3	PDA1	PDA2	PDA3	PDA1	PDA2	PDA3
1	35	29	42	45	109	94	11	15	18	8	11	9
2	24	39	36	74	88	80	12	16	11	12	9	9
3	20	35	29	61	111	100	19	9	12	9	8	12
4	19	30	38	60	118	72	13	11	9	12	7	13
5	22	30	30	42	123	81	10	17	11	11	13	9
dilucion							0.1	0.1	0.1	0.01	0.01	0.01
UFC/ml	6.00E+06	8.15E+06	8.75E+06	1.41E+07	2.75E+07	2.14E+07	3.25E+07	3.40E+07	3.05E+07	2.60E+08	2.40E+08	2.60E+08
	120			144			168			192		
	PDA1	PDA2	PDA3	PDA1	PDA2	PDA3	PDA1	PDA2	PDA3	PDA1	PDA2	PDA3
1	15	16	12	25	20	25	23	22	32	25	23	28
2	15	17	15	25	29	19	29	21	20	27	28	28
3	18	15	16	18	26	23	32	30	21	27	23	21
4	12	12	12	19	19	20	22	21	22	21	25	22
5	11	15	17	22	19	21	20	29	29	25	27	27
dilucion	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
UFC/ml	3.55E+08	3.75E+08	3.60E+08	5.45E+08	5.65E+08	5.40E+08	6.30E+08	6.15E+08	6.20E+08	6.25E+08	6.30E+08	6.30E+08
	216			240			264			288		
	PDA1	PDA2	PDA3	PDA1	PDA2	PDA3	PDA1	PDA2	PDA3	PDA1	PDA2	PDA3
1	26	27	27	28	29	26	23	28	27	21	25	20
2	29	21	28	22	25	23	26	20	27	21	29	25
3	22	28	24	21	24	21	27	24	21	22	20	23
4	23	25	26	23	23	27	28	28	29	26	21	25
5	26	21	22	26	21	30	27	20	26	23	23	24
dilucion	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
UFC/ml	6.30E+08	6.10E+08	6.35E+08	6.00E+08	6.10E+08	6.35E+08	6.55E+08	6.00E+08	6.50E+08	5.65E+08	5.90E+08	5.85E+08

MEDIO SOYA MELAZA								
	24		48		72		96	
	AF	AF	AF	AF	AF	AF	AF	AF
1	30	66	398	316	9	10	16	15
2	38	45	402	352	12	13	21	20
3	36	63	352	298	11	16	16	15
4	46	69	389	308	13	9	17	18
5	42	75	410	364	11	9	19	16
dilucion					0.01	0.01	0.01	0.01
UFC/ml	9.60E+06	1.59E+07	9.76E+07	8.19E+07	2.80E+08	2.85E+08	4.45E+08	4.20E+08
	120		144		168		192	
	CN1	CN2	CN1	CN2	CN1	CN2	CN1	CN2
1	31	38	35	39	40	39	38	38
2	41	30	33	31	35	32	31	38
3	31	32	35	33	31	35	30	34
4	32	33	36	36	34	39	35	32
5	31	30	39	34	39	31	37	32
dilucion	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
UFC/ml	8.30E+08	8.15E+08	8.90E+08	8.65E+08	8.95E+08	8.80E+08	8.55E+08	8.70E+08
	216		240		264		288	
	CN1	CN2	CN1	CN2	CN1	CN2	CN1	CN2
1	38	40	39	40	40	39	38	39
2	36	30	34	37	40	33	34	30
3	39	32	30	37	39	34	36	35
4	39	30	31	31	30	32	33	32
5	34	35	36	31	37	39	37	37
dilucion	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
UFC/ml	9.30E+08	8.35E+08	8.50E+08	8.80E+08	9.30E+08	8.85E+08	8.90E+08	8.65E+08

Anexo 3. Resultados de análisis de suelos.

ANÁLISIS DE SUELOS : CARACTERIZACIÓN

Solicitante : SANTIAGO LAURENTE MAMANI
 Departamento : AREQUIPA
 Distrito :
 Referencia : H.R. 54311-087C-16

Provincia : ISLAY
 Predio :
 Fecha : 31/05/16

Fact.: 35943

Número de Muestra	Claves	pH (1:1)	C.E (1:1) dS/m	CaCO ₃ %	M.O. %	P ppm	K ppm	Análisis Mecánico			Clase Textural	CIC	Cationes Cambiables					Suma de Cationes	Suma de Bases	% Sat. De Bases
								Arena %	Limo %	Arcilla %			Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	Na ⁺	Al ³⁺ + H ⁺			
7462	Primera Capa de Tierra	6.07	5.90	0.00	0.20	5.8	636	93	5	2	A	8.80	6.02	1.23	1.17	0.37	0.00	8.80	8.80	100
7463	Tercera Capa de Tierra	8.59	8.74	1.00	0.33	2.7	808	79	13	8	A,Fr.	17.92	8.18	3.97	1.48	4.30	0.00	17.92	17.92	100

A = Arena ; A.Fr. = Arena Franca ; Fr.A. = Franco Arenoso ; Fr. = Franco ; Fr.L. = Franco Limoso ; L = Limoso ; Fr.Ar.A. = Franco Arcillo Arenoso ; Fr.Ar. = Franco Arcilloso ; Fr.Ar.L. = Franco Arcillo Limoso ; Ar.A. = Arcillo Arenoso ; Ar.L. = Arcillo Limoso ; Ar. = Arcilloso

Dr. Sady Garcia Bendezú
Jefe del Laboratorio

Anexo 4. Parcela M20 con Pitahayas en el sector paraje de la Pampa El Alto, Punta de Bombón, Arequipa.



Anexo 5. Muestreo realizado en la parcela M20.



Anexo 6. Síntomas en muestras vegetales recolectadas de la parcela M20.



Anexo 7. Preparación de trampas de arroz.



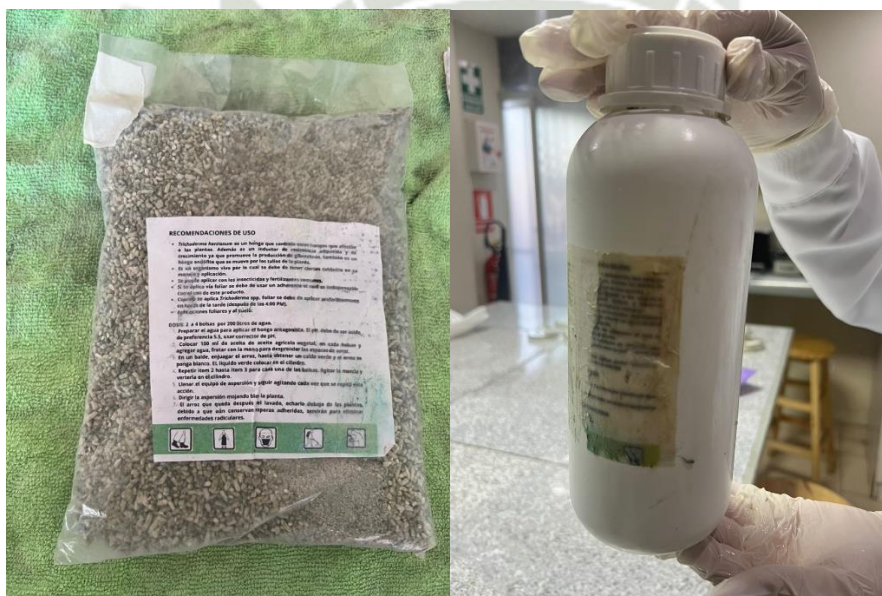
Anexo 8. Trampas de arroz con microorganismos.



Anexo 9. Medios de cultivo para cinética microbiana.



Anexo 10. Productos comerciales *Trichoderma* y *Bacillus subtilis*.



Anexo 11. Composición de medio de cultivo Rojo de metilo Voges Proskauer (MRVP).

MEDIO MRVP

Composición medio MRVP	g/L
Peptona	7.0
Glucosa	5.0
Fosfato de potasio dihidratado	5.0

pH 6.9+/-0.2

Suspender 17 g del polvo en 1 litro de agua purificada. Reposar 5 minutos. Calentar con agitación frecuente y llevar a ebullición para disolución total. Distribuir en tubos y esterilizar en autoclave a 118- 121°C durante 15 minutos.

Lectura de Medio Voges: Prueba del Voges Proskauer: añadir 0,6 mL de alfa naftol al 5% en alcohol etílico y 0.2 mL de hidróxido de potasio al 40% a 2.5 mL de cultivo. Agitar vigorosamente el tubo, y dejar a temperatura ambiente durante 10-15 minutos. Observar el color de la superficie del medio.

En algunas cepas positivas para la prueba VP, puede no desarrollar el color rojo en la superficie mediante el revelado por la metodología descrita anteriormente. En estos casos, se recomienda calentar el medio de cultivo para favorecer el desarrollo de color rojo.

Prueba de Voges Proskauer:

- Resultado positivo: desarrollo de un color rojo en pocos minutos después de una completa agitación del tubo.
- Resultado negativo: ausencia de color rojo.