



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE GUAYAQUIL**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

*Trabajo de titulación previo a la
obtención del título de Ingeniera en
Biotecnología*

TRABAJO EXPERIMENTAL

**PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS MEDIANTE
FERMENTACIÓN LÍQUIDA A PARTIR DE *Trichoderma* Y *Bacillus* PARA
EL CONTROL DE HONGOS AISLADOS DE PITAHAYA ROJA (*Hylocereus
undatus*)**

AUTORAS:

PAMELA ANNABELL BONIFAZ JÁTIVA

TATIANA NICOLE RUBIO ZURITA

TUTORA:

ANGELA VANESSA PACHECO FLORES DE VALGAZ, MSc.

COTUTOR:

ING. RODRIGO FERNANDO ESPINOZA LOZANO

GUAYAQUIL - ECUADOR

2023

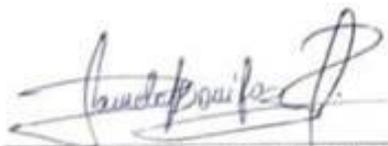
CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Nosotras, Pamela Annabell Bonifaz Játiva con documento de identificación N°0929501278 y Tatiana Nicole Rubio Zurita con documento de identificación N°0930318373; manifestamos que:

Somos las autoras y responsables del presente trabajo; y, autorizamos a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Guayaquil, 7 de septiembre de 2023

Atentamente,



Pamela Annabell Bonifaz Játiva
0929501278



Tatiana Nicole Rubio Zurita
0930318373

CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

Nosotros, Pamela Annabell Bonifaz Játiva con documento de identificación No.

0929501278 y Tatiana Nicole Rubio Zurita con documento de identificación No.

0930318373, expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del trabajo experimental: "Producción de metabolitos secundarios mediante fermentación líquida a partir de *Trichoderma* y *Bacillus* para el control de hongos aislados de pitahaya roja (*Hylocereus undatus*).", el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniera en Biotecnología, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 7 de septiembre de 2023

Atentamente,


Pamela Annabell Bonifaz Játiva
0929501278


Tatiana Nicole Rubio Zurita
0930318373

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Angela Vanessa Pacheco Flores De Valgaz, MSc. con documento de identificación N° 0930726112, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS MEDIANTE FERMENTACIÓN LÍQUIDA A PARTIR DE *Trichoderma* Y *Bacillus* PARA EL CONTROL DE HONGOS AISLADOS DE PITAHAYA ROJA (*Hylocereus undatus*); realizado por Pamela Annabell Bonifaz Játiva con documento de identificación N°0929501278 y por Tatiana Nicole Rubio Zurita con documento de identificación N°0930318373, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 7 de septiembre de 2023

Atentamente,



Angela Pacheco Flores De Valgaz
0930726112

CERTIFICADO DE CO-DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Rodrigo Fernando Espinoza Lozano, con documento de identificación N°0704174689, cotutor del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador, declaro que bajo mi co-tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS MEDIANTE FERMENTACIÓN LÍQUIDA A PARTIR DE *Trichoderma* Y *Bacillus* PARA EL CONTROL DE HONGOS AISLADOS DE PITAHAYA ROJA (*Hylocereus undatus*)**; realizado por Pamela Annabell Bonifaz Játiva con documento de identificación N°0929501278 y por Tatiana Nicole Rubio Zurita con documento de identificación N°0930318373, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 7 de septiembre de 2023

Atentamente,



Rodrigo Fernando Espinoza Lozano
0704174689

Dedicatoria

Quiero dedicar el presente trabajo a Dios, el ser omnipotente que me ha creado con el fin de hacer de mí una persona útil en los ámbitos que me toquen desenvolverse en la vida.

A mis padres que, con su ejemplo, tenacidad, esfuerzo y mucho empeño aportaron en mis valores que me han permitido alcanzar mi objetivo, culminar mis estudios y llegar a ser una profesional preparada para solucionar los retos que se me presenten en el ámbito laboral.

A mí abuelita Isabel Reyes, que con sus oraciones constantes me han permitido llegar al pedestal en el cual me encuentro.

A mis profesores que, con su sabiduría, y entrega generosa lograron hacer de mí una gran persona.

A mis compañeros Tatiana Rubio, Christian Morán y a todos aquellos que me apoyaron con su amistad incondicional, gentileza, y paciencia en el recorrido de este largo camino de mis estudios y así culminar con mi profesión anhelada.

Pamela Bonifaz

Dedicatoria

A Dios por cuidarme siempre y permitirme culminar una meta más en mi vida,

A mi familia a quien les dedico cada uno de mis triunfos,

A mi padre Jorge Rubio por apoyarme en cada uno de mis proyectos de vida y enseñarme que con mucho esfuerzo siempre seré capaz de cumplir mis sueños y metas,

A mi madre Janina Zurita por ser mi inspiración a seguir desde la infancia y brindarme su gran amor incondicional diariamente,

A mis abuelitos que en paz descansen, les agradezco por brindarme una infancia feliz y dedicarme tantas enseñanzas,

A mi hermana y hermano por estar siempre a mi lado sacándome risas y enojos,

A mi novio Andrés Moreta por ser esa luz de mi día, brindándome mucho amor y alentándome en cada meta que me propongo,

A mi mejor amiga Isabel Marcillo por compartir conmigo tantos momentos de felicidad, por escucharme diariamente, y estar a mi lado en los momentos más alegres y difíciles de mi vida,

A mi amiga y compañera de tesis Pamela Bonifaz, quien ha sido mi gran apoyo a lo largo de estos años de carrera, brindando su inmensa amistad, apoyo, y cuidados,

A mis maestros y a mi tutora de tesis Ángela Pacheco por apoyarme en mi crecimiento académico y desarrollo de tesis, para lograr obtener con éxitos mi título profesional,

A mi cotutor del CIBE Fernando Espinoza por su gran paciencia, enseñanzas y ayuda en la realización de este trabajo experimental.

Tatiana Rubio

Agradecimientos

Queremos expresar nuestros mayores agradecimientos a la Universidad Politécnica Salesiana por brindarnos la oportunidad de llevar a cabo este trabajo de investigación. Su respaldo constante y su enfoque en la excelencia académica han sido fundamentales para la realización de este proyecto.

Asimismo, extendemos nuestro reconocimiento al Instituto de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), cuya colaboración ha sido de gran valor para la consecución de este trabajo. El ambiente propicio y el apoyo proporcionado por todos los presentes de esta institución han enriquecido significativamente nuestra experiencia de investigación.

Agradecemos profundamente a nuestros estimados maestros, cuya guía, conocimientos y orientación han sido esenciales para nuestro crecimiento académico. Su dedicación a la educación nos ha dejado una impresión perdurable en nuestra formación.

Agradecemos de manera especial a nuestros tutores de tesis, cuya experiencia y mentoría han sido de inmenso valor. Su dirección experta, consejos y retroalimentación constante han sido un pilar en el buen desarrollo de este trabajo de experimental.

Agradecemos a nuestros compañeros y amigos de la UPS, por acompañarnos a lo largo de estos años de carrera.

A cada una de estas instituciones y personas que han formado parte de este trayecto, les dedicamos nuestro más profundo agradecimiento por su aporte invaluable en el camino hacia la culminación de esta tesis. Su respaldo ha sido crucial para este logro, y estamos profundamente agradecidas por la oportunidad de haber crecido académicamente bajo su compañía.

Resumen

Este estudio evalúa la actividad antimicrobiana de metabolitos secundarios producidos a partir de la fermentación líquida de *Bacillus* y *Trichoderma* frente a once cepas aisladas de síntomas de fruto de pitahaya roja (*Hylocereus undatus*) las cuales fueron identificadas a nivel molecular como; *Fusarium dimerum*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium falciforme*, y *Curvularia cactivora*, mediante diversas herramientas bioinformáticas, siendo estas, Finch TV, Geneious primer, y NCBI. La evaluación *in vitro* de la capacidad antimicrobiana de los metabolitos secundarios producidos por *Bacillus* y *Trichoderma* frente a *Fusarium* spp., y *Curvularia cactivora* se efectuaron mediante el método de difusión de pocillos en agar, donde los porcentajes de inhibición en las cepas aisladas frente a los metabolitos secundarios producidos por *Bacillus* poseen el mayor promedio de inhibición en las cepas de *Curvularia cactivora*, Por medio de un diseño experimental completamente al azar (DCA), se analizaron los datos usando un ANOVA y la comparación de las medias que se realizó por las pruebas de Tukey, dando un 95 % de confianza. Al finalizar este proyecto de investigación contribuye de manera significativa al conocimiento sobre el potencial de los metabolitos secundarios de *Trichoderma* y *Bacillus* como agentes antimicrobianos para el control de hongos en la pitahaya roja.

Palabras clave:

Actividad antimicrobiana, esterilización por filtración, método de difusión, sobrenadante estéril

Abstract

This study evaluates the antimicrobial activity of secondary metabolites produced from the liquid fermentation of *Bacillus* and *Trichoderma* against eleven strains isolated from red pitahaya fruit symptoms (*Hylocereus undatus*), which were identified at the molecular level as; *Fusarium dimerum*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium falciforme*, and *Curvularia cactivora*, using various bioinformatic tools, these being Finch TV, Geneious primer, and NCBI. The in vitro evaluation of the antimicrobial capacity of the secondary metabolites produced by *Bacillus* and *Trichoderma* against *Fusarium* spp., and *Curvularia cactivora* was carried out using the agar well diffusion method, where the percentages of inhibition in the isolated strains against the Secondary metabolites produced by *Bacillus* have the highest average inhibition in *Curvularia cactivora* strains. Through a completely randomized experimental design (DCA), the data were analyzed using an ANOVA and the comparison of the means was carried out by the tests from Tukey, giving 95% confidence. Upon completion, this research project contributes significantly to knowledge about the potential of secondary metabolites from *Trichoderma* and *Bacillus* as antimicrobial agents for the control of fungi in red dragon fruit.

Keywords:

Antimicrobial activity, filtration sterilization, diffusion method, sterile supernatant

Contenido

CAPÍTULO 1	1
ANTECEDENTES	1
1.1. Introducción	1
1.2. Planteamiento del problema	3
1.3. Justificación de la investigación	3
1.4. Objetivos	4
1.4.1. Objetivo general.....	4
1.4.2. Objetivos específicos	4
CAPÍTULO 2	5
2.1. Generalidades de pitahaya roja	5
2.1.1. Pitahaya roja (<i>Hylocereus undatus</i>)	5
2.1.1.1. Características	5
2.1.1.2. Taxonomía	6
2.1.2. Principales patógenos de la pitahaya roja	6
2.1.2.1. <i>Fusarium</i> spp	6
2.1.2.2. <i>Curvularia</i> spp.....	10
2.1.3. Factores fisicoquímicos que incluyen en el crecimiento bacteriano	12
2.1.4. Agroquímicos de la pitahaya roja	12
2.2. Generalidades de <i>Trichoderma</i> spp	13
2.2.1. <i>Trichoderma</i> spp	13
2.2.1.1. Taxonomía	14
2.2.1.2. Descripción de la morfología	14
2.2.2. <i>Trichoderma</i> como controlador biológico	16
2.2.3. Metabolitos secundarios de <i>Trichoderma</i> sp. con actividad antimicrobiana	17
2.2.4. Hongos fitopatógenos sensibles a <i>Trichoderma</i> sp	19
2.2.4.1. <i>Botrytis cinerea</i>	20
2.2.4.2. <i>Rhizoctonia solani</i>	20
2.2.4.3. <i>Fusarium</i> spp	21
2.2.4.4. <i>Sclerotinia</i> spp	21
2.2.5. Mecanismo de acción <i>Trichoderma</i>	22
2.3. Generalidades de <i>Bacillus</i> sp	23
2.3.1. <i>Bacillus</i> sp.....	23
2.3.1.1. Taxonomía	23
2.3.1.2. Morfología	23
2.3.2. <i>Bacillus</i> sp. como controlador biológico	24
2.3.3. Principales mecanismos de acción de <i>Bacillus</i> sp. como controlador biológico.....	24
2.3.3.1. Producción de compuestos antimicrobianos	24
2.3.3.2. Producción de lipopéptidos.....	24
2.3.3.3. Producción de enzimas líticas.....	25
2.3.4. Importancia en las industrias y en la biotecnología	25
2.3.5. Ecología	25
2.3.6. Hongos fitopatógenos sensibles a <i>Bacillus</i> sp.....	26
2.3.6.1. <i>Curvularia</i> spp.....	26
2.3.6.2. <i>Fusarium</i> spp	26
2.3.6.3. <i>Rhizoctonia</i> spp	27
2.3.7. Metabolitos secundarios de <i>Bacillus</i> sp.....	27
2.3.7.1. Lipopéptidos.....	27

2.3.7.2.	Antibióticos	28
2.3.7.3.	Enzimas antifúngicas	28
2.3.8.	Mecanismo de acción <i>Bacillus</i> sp.....	28
CAPÍTULO 3		30
MATERIALES Y MÉTODOS		30
3.1. Materiales y equipos de laboratorio		30
3.1.1.	Material biológico	30
3.1.2.	Medios de cultivo.....	30
3.1.3.	Equipos de laboratorio.....	30
3.1.4.	Materiales de laboratorio	30
3.1.5.	Insumos de laboratorio.....	31
3.2. Métodos		31
3.2.1.	Diseño de la investigación.....	31
3.2.2.	Recursos técnicos.....	31
3.2.3.	Limpieza y preparación de microorganismos	31
3.2.4.	Producción de metabolitos secundarios.....	32
3.2.4.1.	Preparación de la solución de conidios de la C9	32
3.2.4.2.	Fermentación líquida.....	32
3.2.5.	Esterilización por filtración	33
3.2.5.2.	Mezcla de los sobrenadantes estériles (M)	34
3.2.6.	Pruebas antimicrobianas	34
3.2.6.1	Preparación de placas petri para los tratamientos y controles respectivos.....	34
3.2.6.2	Evaluación de las pruebas antimicrobiana	36
3.2.6.3	Recolección y preparación de microorganismos.....	36
3.2.6.4	Identificación molecular de cepas aisladas de síntomas de fruto de pitahaya roja	36
3.2.6.5	Análisis estadísticos.....	37
3.2.6.5.1	Almacenamiento de resultados.....	37
CAPÍTULO 4		38
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		38
4.1. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS CEPAS AISLADAS		38
4.2	Resultados de la evaluación de actividad antimicrobiana	39
4.2.1	Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antimicrobiana del sobrenadante estéril de <i>Bacillus</i> y <i>Trichoderma</i> vs. <i>Fusarium dimerum</i> (PIT1-H2).....	39
4.2.2	Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antimicrobiana del sobrenadante estéril de <i>Bacillus</i> y <i>Trichoderma</i> vs. <i>Fusarium verticillioides</i> (PIT2-6).....	40
4.2.3	Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antimicrobiana del sobrenadante estéril de <i>Bacillus</i> y <i>Trichoderma</i> vs. <i>Fusarium verticillioides</i> (PIT2A-6).....	41
4.2.4	Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antimicrobiana del sobrenadante estéril de <i>Bacillus</i> y <i>Trichoderma</i> vs. <i>Fusarium falciforme</i> (PIT2-H6)	42
4.2.5	Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antimicrobiana del sobrenadante estéril de <i>Bacillus</i> y <i>Trichoderma</i> vs. <i>Fusarium verticillioides</i> (PIT2-H9)	43
4.2.6	Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antimicrobiana del sobrenadante estéril de <i>Bacillus</i> y <i>Trichoderma</i> vs. <i>Fusarium dimerum</i> (PIT5-21)	44
4.2.7	Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antimicrobiana del sobrenadante estéril de <i>Bacillus</i> y <i>Trichoderma</i> vs. <i>Curvularia cactivora</i> (PIT2-8)	45
4.2.8	Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antimicrobiana del sobrenadante estéril de <i>Bacillus</i> y <i>Trichoderma</i> vs. <i>Curvularia cactivora</i> (PIT3-H10).....	46
4.2.9	Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antimicrobiana del sobrenadante estéril de <i>Bacillus</i> y <i>Trichoderma</i> vs. <i>Curvularia cactivora</i> (PIT3-H12)	47
4.2.10	Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antimicrobiana del sobrenadante estéril de <i>Bacillus</i> y <i>Trichoderma</i> vs. <i>Curvularia cactivora</i> (PIT4-H19)	48

4.2.11	Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antimicrobiana del sobrenadante estéril de <i>Bacillus</i> y <i>Trichoderma</i> vs. <i>Curvularia cactivora</i> (PIT5-H25)	49
4.2.12	Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antimicrobiana del sobrenadante estéril de <i>Trichoderma</i> en medio PDB y agua desionizada vs. <i>Curvularia cactivora</i>	50
4.2.13	Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antimicrobiana del sobrenadante estéril de <i>Trichoderma</i> en medio PDB y agua desionizada vs. <i>Fusarium spp</i>	50
4.2.14	Cepas madres y control de <i>Fusarium spp.</i> y <i>Curvularia cactivora</i>	50
4.3	Discusión de resultados obtenidos	51
4.4	Discusión del diseño estadístico	52
CAPÍTULO 5		56
5.1	Conclusiones	56
5.2	Recomendaciones	57
BIBLIOGRAFÍA		57

Índice de tablas

Tabla 1. Taxonomía de la pitahaya roja	6
Tabla 2. Taxonomía del hongo <i>Fusarium</i> spp.	7
Tabla 3. Taxonomía del hongo <i>C. lunata</i>	10
Tabla 4. Taxonomía de <i>T. harzianum</i>	14
Tabla 5. Taxonomía de <i>Bacillus</i> spp.....	23
Tabla 6. Interpretación de tratamientos experimentales.	35
Tabla 7. Interpretación de controles en base a los tratamientos experimentales.	35
Tabla 8. Identificación molecular de la secuenciación de la región ITS1, 5.1 S, ITS2 de cepas aisladas del fruto de pitahaya roja con la base de datos BLAST	38
Tabla 9. Resultados de la actividad antimicrobiana de los tratamientos y controles frente a las cepas aisladas.	51
Tabla 10. Desviación estándar de del porcentaje de inhibición de <i>Bacillus</i> y mezcla.....	53

Índice de figuras

Figura 1. Cepas <i>Fusarium</i> aisladas de sintomatología de patógenos del cultivo de pitahaya roja.	9
Figura 2. <i>C. cactivora</i> aislada de sintomatología de patógenos del cultivo de pitahaya roja	12
Figura 3. Cepa madre de <i>Trichoderma</i> sp. denominada como C9, otorgada por ESPOL (2023).	15
Figura 4. Subcultivo de cepa de <i>Trichoderma</i> sp., denominada como C9.	16
Figura 5. Cajas Petri donde se ubicaron cada uno de los tratamientos con sus controles para la evaluación de las cepas aisladas de síntomas de fruto de la pitahaya roja.....	16
Figura 6. Actividad antimicrobiana (método modificado de difusión de pocillos en agar) del sobrenadante estéril de <i>Bacillus</i> (B) y la mezcla de sobrenadantes estériles de <i>Trichoderma</i> y <i>Bacillus</i> (M) frente a <i>Fusarium dimerum</i> con código de muestra PIT1-H2 (Bonifaz & Rubio, 2023)	39
Figura 7. Actividad antimicrobiana (método modificado de difusión de pocillos en agar) del sobrenadante estéril de <i>Bacillus</i> (B) y la mezcla de sobrenadantes estériles de <i>Trichoderma</i> y <i>Bacillus</i> (M) frente a <i>Fusarium verticillioides</i> con código de muestra PIT2-6.	40
Figura 8. Actividad antimicrobiana (método modificado de difusión de pocillos en agar) del sobrenadante estéril de <i>Bacillus</i> (B) y la mezcla de sobrenadantes estériles de <i>Trichoderma</i> y <i>Bacillus</i> (M) frente a <i>Fusarium verticillioides</i> con código de muestra PIT2A-6.	41
Figura 9. Actividad antimicrobiana (método modificado de difusión de pocillos en agar) del sobrenadante estéril de <i>Bacillus</i> (B) y la mezcla de sobrenadantes estériles de <i>Trichoderma</i> y <i>Bacillus</i> (M) frente a <i>Fusarium falciforme</i> con código de muestra PIT2-H6.....	42
Figura 10. Actividad antimicrobiana (método modificado de difusión de pocillos en agar) del sobrenadante estéril de <i>Bacillus</i> (B) y la mezcla de sobrenadantes estériles de <i>Trichoderma</i> y <i>Bacillus</i> (M) frente a <i>Fusarium verticillioides</i> con código de muestra PIT2-H9.	43
Figura 11. Actividad antimicrobiana (método modificado de difusión de pocillos en agar) del sobrenadante estéril de <i>Bacillus</i> (B) y la mezcla de sobrenadantes estériles de <i>Trichoderma</i> y <i>Bacillus</i> (M) frente a <i>Fusarium dimerum</i> con código de muestra PIT5-21.	44
Figura 12. Actividad antimicrobiana (método modificado de difusión de pocillos en agar) del sobrenadante estéril de <i>Bacillus</i> (B) y la mezcla de sobrenadantes estériles de <i>Trichoderma</i> y <i>Bacillus</i> (M) frente a <i>Curvularia cactivora</i> con código de muestra PIT2-8.	45
Figura 13. Actividad antimicrobiana (método modificado de difusión de pocillos en agar) del sobrenadante estéril de <i>Bacillus</i> (B) y la mezcla de sobrenadantes estériles de <i>Trichoderma</i> y <i>Bacillus</i> (M) frente a <i>Curvularia cactivora</i> con código de muestra PIT3-H10.	46
Figura 14. Actividad antimicrobiana (método modificado de difusión de pocillos en agar) del sobrenadante estéril de <i>Bacillus</i> (B) y la mezcla de sobrenadantes estériles de <i>Trichoderma</i> y <i>Bacillus</i> (M) frente a <i>Curvularia cactivora</i> con código de muestra PIT3-H12.	47
Figura 15. Actividad antimicrobiana (método modificado de difusión de pocillos en agar) del sobrenadante estéril de <i>Bacillus</i> (B) y la mezcla de sobrenadantes estériles de <i>Trichoderma</i> y <i>Bacillus</i> (M) frente a <i>Curvularia cactivora</i> con código de muestra PIT4-H19.	48

Figura 16. Actividad antimicrobiana (método modificado de difusión de pocillos en agar) del sobrenadante estéril de <i>Bacillus</i> (B) y la mezcla de sobrenadantes estériles de <i>Trichoderma</i> y <i>Bacillus</i> (M) frente a <i>Curvularia cactivora</i> con código de muestra PIT5-H25.	49
Figura 17. Histograma de Tukey, ensayo con <i>Bacillus</i>	54
Figura 18. Histograma de Tukey, ensayo de Mix.	55

Capítulo 1

Antecedentes

1.1. Introducción

En la actualidad, los hongos fitopatógenos continúan siendo la causa de una gran variedad de enfermedades pre y poscosecha, evidenciando una marcada incidencia en cultivos de frutas, cereales, y hortalizas, lo que conlleva a una amplia gama de afecciones que generan pérdidas económicas de considerable magnitud (Andrés cadena, 2020).

En el Ecuador las exportaciones de pitahaya han posicionado al país como uno de los principales exportadores a nivel mundial. Específicamente, siendo líder en exportación de la variedad de pitahaya amarilla, mientras que la pitahaya roja ocupa un lugar de prestigio como producto premium (Lisbeth Espinoza, 2022). Es por ello que las pérdidas provocadas por hongos fitopatógenos en pitahaya destinada a la exportación es un tema de considerable relevancia tanto para la industria agrícola como para la economía del país, si bien Ecuador se destaca como productor y exportador de pitahayas, las afectaciones causadas por estos microorganismos pueden tener implicaciones sustanciales en la calidad, cantidad y rentabilidad de las exportaciones. Se estima que las pérdidas de cultivos varían desde el 20% hasta un 50 % en países en desarrollo y del 5 al 25% en países desarrollados (Andrés cadena, 2020).

En los cultivos de pitahaya se han identificado un gran número de hongos caracterizados como causantes del deterioro patológico de estos cultivos, siendo de los más comunes, especies pertenecientes a los géneros: *Fusarium* sp., *Botrytis*. spp., *Curvularia* sp., *Lasiodiplodia* sp., y *Neoscytalidium* sp. (Yumbla-Crespo, 2022).

Para abordar esta problemática, es esencial implementar estrategias de manejo poscosecha que minimicen el riesgo de infecciones fúngicas. Esto incluye prácticas adecuadas de recolección, manipulación y almacenamiento de la fruta, así como la implementación de tratamientos efectivos y medidas de control de temperatura, estado de maduración y humedad durante su desarrollo (INIAP, 2018).

Una de las prácticas más recurrentes para el control de fitopatógenos se centra en la utilización de pesticidas químicos, lo que representa un aproximado del 85% del consumo a nivel mundial. No obstante, se ha constatado que dichos agentes químicos acarrear consecuencias perjudiciales tanto para el medio ambiente como para la salud humana al

provocar diversas enfermedades (Viteri Rodríguez, 2020). En consecuencia, resulta imperativo explorar alternativas destinadas al control de enfermedades en plantas.

Debido a las problemáticas expuestas han surgido diferentes alternativas para el control de fitopatógenos, tal como el control biológico, que se define como el empleo de organismos, sus metabolitos o subproductos, que son antagonistas naturales de un patógeno o plaga, con el propósito de reducir y/o eliminar los daños que causan en las plantas (Martínez, 2017).

La producción de metabolitos secundarios por fermentación líquida utilizando microorganismos, como *Trichoderma* y *Bacillus*, ha sido objeto de estudio en la industria agrícola debido a su potencial como agentes de biocontrol para combatir patógenos en cultivos y preservar la calidad durante su almacenamiento o transporte (INIAP, 2020). Estos microorganismos tienen la capacidad de sintetizar una amplia variedad de metabolitos secundarios, como antibióticos, enzimas, fitohormonas y compuestos bioactivos, los cuales pueden influir en el crecimiento, desarrollo y respuesta de las plantas a enfermedades y estrés abiótico (Ana María Mesa-Vanegas, Alexander Marin, 2019).

En su estudio, Poveda y Eugui (2022) describen el uso combinado de *Trichoderma* y bacterias beneficiosas (*Bacillus* y *Pseudomonas*) en el desarrollo de inoculantes microbianos sinérgicos en agricultura sostenible. Estos autores mencionan que la co-cultura de los microorganismos se puede utilizar como una herramienta experimental para incrementar el rendimiento y variedad de metabolitos secundarios, ya que su combinación ofrece un potencial aún mayor como promotores del crecimiento vegetal y agentes de biocontrol

De la misma manera, Tingting Li et al. (2020) en su estudio sobre el co-cultivo de microorganismos en la mejora de producción de metabolitos secundarios antifúngicos destacan a las especies de *Trichoderma* sp. y *Bacillus* sp. como microorganismos importantes en el control biológico y crecimiento vegetal de una gran variedad de cultivos.

Bacillus spp. es una bacteria que presenta un potencial considerable como agente promotor del crecimiento y regulador de enfermedades fitopatógenas. Esto se debe a su capacidad para sintetizar diversos antibióticos, enzimas hidrolíticas, lipoproteínas y una amplia gama de sustancias antagónicas, como la bacilisina, la iturina y la fengicina. La bacilisina actúa dañando las membranas celulares de los microorganismos objetivo causando la lisis y muerte celular. La iturina puede inducir respuestas de defensa en las plantas para promover el crecimiento vegetal y la fengicina posee actividad antimicrobiana. Por consiguiente, este

microorganismo representa una alternativa prometedora para el control de patógenos con una versatilidad ambiental (Knight, 2018).

Las especies del hongo *Trichoderma* spp. son conocidos por su capacidad para producir una variedad de metabolitos antifúngicos y compuestos bioactivos que les permiten competir con otros hongos y patógenos en el suelo, incluidos trichodermin, 6-pentil-2H-pirano-2-ona y viridina, los cuales poseen propiedades inhibitorias contra una amplia gama de hongos fitopatógenos, ya que puede suprimir el crecimiento y la propagación de ciertos patógenos (Tingting Li, 2020).

1.2. Planteamiento del problema

En Ecuador, los productos agrícolas enfrentan una alta susceptibilidad a enfermedades pre y poscosecha, lo que representa una problemática significativa que afecta la calidad y vida útil de estos productos. En particular, la pitahaya, es un cultivo de creciente importancia económica, por lo que su calidad es crucial para su comercialización y exportación. Sin embargo, a medida que este cultivo crece es inevitable que se manifiesten problemas fitosanitarios con mayor recurrencia, representando una amenaza constante para la calidad y el valor comercial de la fruta, lo que resulta en pérdidas económicas significativas.

El propósito primordial de esta investigación radica en la formulación de estrategias innovadoras y sostenibles para el control de enfermedades fúngicas en la pitahaya roja, fortaleciendo la base científica para la producción agrícola y la preservación de la calidad de la pitahaya roja. Además, cabe destacar que este estudio no solo pretende influir en la optimización de la producción de pitahaya roja, sino que también contribuirá en los esfuerzos por garantizar alimentos más seguros para la población ecuatoriana y mercados internacionales. A través de la producción de metabolitos secundarios mediante la utilización de controles biológicos locales como *Bacillus* sp. y *Trichoderma* sp. se plantea la posibilidad tangible de reducir de manera considerable la presencia de residuos de plaguicidas químicos en los frutos, beneficiando la calidad de los productos agrícolas y reduciendo las crecientes inquietudes de una sociedad que busca una alimentación más segura y saludable.

1.3. Justificación de la investigación

El cultivo de pitahaya en el Ecuador, En 2022, se exportaron más de 23 mil toneladas de pitahaya, generando ingresos que superaron los 99 millones de dólares. en el año 2022 el país logró exportar más de 23 mil toneladas de esta fruta, generando ingresos que superaron los 99

millones de dólares. Ante la importancia de proteger esta industria, se están realizando investigaciones de manera continua con el objetivo de explorar nuevas vías para el control de sus dos principales patógenos: *Fusarium* spp. y *Curvularia* spp. Una alternativa en consideración es la utilización de cepas locales de *Bacillus* sp. y *Trichoderma* sp., debido a su capacidad intrínseca para la biosíntesis de diversos metabolitos secundarios, muchos de los cuales pueden poseer algún tipo de actividad biológica, como propiedades antifúngicas, o incluso la habilidad de generar enzimas que podrían ser empleadas como agentes de control biológico.

Además, la producción de metabolitos secundarios mediante fermentación líquida es conocida como una técnica rentable y escalable que permite obtener grandes cantidades de compuestos bioactivos. Al evaluar la eficacia de estos metabolitos en la inhibición de patógenos específicos en cultivos poscosecha de pitahaya roja, se podrían obtener resultados prometedores que podrían aplicarse en prácticas agrícolas para reducir las pérdidas y mejorar la calidad de los productos. Este enfoque también podría contribuir a la implementación de estrategias de control biológico, reduciendo la dependencia de productos químicos sintéticos como fungicidas, herbicidas, pesticidas, fertilizantes, los cuales conllevan implicaciones perjudiciales para la salud humana y el entorno ambiental, al mismo tiempo que promueven la producción sostenible de alimentos en la región de Guayaquil, Ecuador.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Evaluar la actividad antimicrobiana de metabolitos secundarios producidos por *Trichoderma* y *Bacillus* para el control de hongos aislados de pitahaya roja (*Hylocereus undatus*).

1.4.2. Objetivos específicos

- Producir metabolitos secundarios a partir de las cepas de *Trichoderma* sp. y *Bacillus* sp. mediante fermentación líquida.
- Evaluar la actividad antimicrobiana (método modificado de difusión de pocillos en agar) de metabolitos secundarios de *Trichoderma* sp. y *Bacillus* sp. contra *Curvularia cactivora* y *Fusarium* spp.
- Utilizar herramientas bioinformáticas como FinchTv, Geneious primer y NCBI para la identificación de hongos aislados de pitahaya roja.

Capítulo 2

2.1. Generalidades de pitahaya roja

2.1.1. Pitahaya roja (*Hylocereus undatus*)

La pitahaya, conocida científicamente como *Hylocereus undatus*, es una fruta exótica que se origina en América Central y partes de Sudamérica. La llamaron pitahaya debido a su apariencia escamosa; en la actualidad, esta fruta se encuentra dispersa en regiones que incluyen México, Bolivia, Perú, Colombia, Venezuela, Ecuador, Centroamérica y las Antillas, la variedad de pitahaya roja, que se cultiva principalmente en México, Nicaragua y Vietnam, se distingue por tener brácteas en lugar de espinas, y su pulpa puede ser blanca o roja clara, dependiendo de la variante, y contiene pequeñas semillas negras (Montalván, 2022).

2.1.1.1. Características

Se trata de una planta que puede crecer de forma epífita o terrestre y tiene un hábito de crecimiento rastrero con muchas ramificaciones, presenta una longitud que puede variar entre 0,5 y 2 metros, prefiere climas cálidos subhúmedos, pero también puede prosperar en climas secos, tienen una temperatura ideal para su desarrollo está entre 16 y 25 grados Celsius, y no tolera temperaturas frías (Ricalde & Andrade, 2009).

Para cultivar pitahayas con éxito, se requiere una alta exposición a la luz, ya que esto estimula el crecimiento de las yemas florales, aunque puede adaptarse a suelos secos y pedregosos debido a su resistencia, prefiere suelos franco-arenosos, húmedos y bien drenados, necesita un pH ligeramente ácido, en el rango de 5,5 a 6,5, y se beneficia de la presencia de materia orgánica en el suelo; La propagación de la pitahaya se realiza mediante esquejes de tallos que deben tener al menos dos años de edad, estos tallos se cortan a una longitud de unos 25-30 cm y se dejan cicatrizar a la sombra durante 3-7 días (Ricalde & Andrade, 2009). Luego, se siembran en bolsas de vivero de 20x30 cm, es importante desinfectar los cortes con fungicidas y bactericidas antes de la siembra, y el sustrato utilizado debe tener un buen drenaje y ser rico en materia orgánica (Gutiérrez & Montañez, 2020).

La pitahaya roja es un fruto que presentan brácteas y tienen un tamaño que va desde mediano hasta grande, la parte comestible del fruto es el mesocarpio, que consiste en una sustancia mucilaginosa que contiene numerosas semillas pequeñas y blandas (Gutiérrez & Montañez, 2020). En particular, la variedad de pitahaya roja se caracteriza por su piel roja y su pulpa que puede ser tanto blanca como roja, estas especies son originarias de las regiones

tropicales y subtropicales de América (Montalván, 2022).

2.1.1.2. Taxonomía

Tabla 1. Taxonomía de la pitahaya roja

Nombre científico	<i>Hylocereus undatus</i>
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Caryophyllales
Familia	Cactaceae-cactácea
Género	<i>Hylocereus</i>
Especie	<i>H. undatus</i>

Fuente: (Verona-Ruiz et al., 2020)

2.1.2. Principales patógenos de la pitahaya roja

2.1.2.1. *Fusarium* spp.

Son hongos ascomicetos que se encuentran en todo el mundo, tienen un micelio bien desarrollado con divisiones internas y poseen conidióforos que son típicos de su grupo, aunque en ciertas especies el cuerpo principal del hongo consiste en una sola célula se los clasifica como hongos que habitan en ambientes naturales o rurales (Villa-Martínez et al., 2014). Se mencionan como uno de los hongos más comunes que causan síntomas típicos de pudrición en la base de los frutos de la pitahaya, en el caso de la variedad de pitahaya roja, donde se identificó al agente responsable de la pudrición en la parte inferior del fruto (DGSV-CNRF, 2020).

Las enfermedades provocadas por *Fusarium* spp. pueden manifestarse de manera especialmente severa en áreas con climas húmedos en regiones caracterizadas por bajos niveles de humedad, la infección es principalmente originada por el inóculo presente en los restos de cereales infectados que permanecen en el suelo (Salazar et al., 2016). El patógeno tiene la capacidad de penetrar directamente la base de los tallos, generalmente cerca o por debajo de la superficie del suelo, o bien puede ingresar a la planta a través de las raíces; Posteriormente, las esporas del hongo germinan en la zona afectada, lo cual se ve facilitado por condiciones de alta humedad y temperaturas propicias (DGSV-CNRF, 2020).

En ciertas etapas de su crecimiento, estos organismos funcionan como saprófitos y, dependiendo de la especie pueden o no experimentar una fase de reproducción sexual, ciertas especies de *Fusarium* han sido observadas con estados sexuales identificables (Salazar et al., 2016). Cabe señalar que todos los teleomorfos conocidos de las especies de *Fusarium* se encuentran dentro del orden Hypocreales de Ascomycota, varios de estos hongos también tienen la capacidad de producir clamidosporas que son altamente resistentes a la sequedad y a condiciones adversas, lo que les permite sobrevivir en el suelo durante períodos prolongados; Por otro lado, los conidios se forman en estructuras llamadas esporodocios que son acumulaciones de conidióforos (DGSV-CNRF, 2020).

2.1.2.1.1. Taxonomía

Tabla 2. Taxonomía del hongo *Fusarium* spp.

Nombre científico	<i>Fusarium</i> spp.
Filo	Ascomycota
Clase	Sordariomycetes
Orden	Hypocreales
Familia	Nectriaceae
Género	<i>Fusarium</i>

Fuente: (DGSV-CNRF, 2020)

2.1.2.1.2. Morfología

Se visualizan características microscópicas específicas que son distintivas para esta especie la estructura llamada "fiálide" suele ser delgada y tiene forma de botella, pudiendo ser simple o ramificada, corta o larga (Villa-Martínez et al., 2014). Puede ser monofialídica, lo que significa que las esporas emergen de un solo poro en la fiálide, o polifialídica, con varios poros, sin embargo, los "macroconidios" tienen una forma de medialuna, son transparentes y tienen divisiones internas (DGSV-CNRF, 2020).

Los "microconidios" pueden estar ausentes en algunas especies, pero cuando están presentes pueden tener diversas formas como fusiformes, ovales o en forma de clava, y pueden agruparse en cadenas largas o cortas, a veces formando estructuras mucoides llamadas "falsas cabezas", también es característica la presencia de clamidosporas con una doble pared gruesa, que puede ser lisa o rugosa, y pueden encontrarse aisladas o en grupos (DGSV-CNRF, 2020).

En el campo, *Fusarium* spp. puede ser reconocido por la formación de lesiones hundidas

de color negro o marrón en la base de los tallos (Villa-Martínez et al., 2014). Sin embargo, ocasionalmente pueden aparecer manchas de color rojizo en los pecíolos cerca de la parte superior de la planta, y en algunas ocasiones se pueden observar masas de micelio de tonos rosados o blancos que crecen en la base de los esquejes o en la parte superior de la planta (Salazar et al., 2016).

2.1.2.1.3. Metabolitos tóxicos de *Fusarium* spp

Producen sustancias tóxicas propias que intensifican su capacidad patógena entre estas sustancias, como las eniatinas y el ácido fusárico, donde son fitotoxinas, es decir, perjudiciales para las plantas; Por otro lado, existen las micotoxinas, como los tricotecenos y las fumonisinas, estas son dañinas para los animales y pueden tener efectos que van desde ser carcinogénicas, mutagénicas y teratogénicas, hasta ser citotóxicas, neurotóxicas, nefrotóxicas, inmunosupresoras y tener efectos estrogénicos representando un riesgo para la salud pública (Villa-Martínez et al., 2014).

Se han identificado alrededor de 300 micotoxinas, siendo las más significativas las aflatoxinas (AFs), la ocratoxina A (OTA), la patulina (PAT), las fumonisinas (FBs), la zearalenona (ZEA), los tricotecenos y los alcaloides del ergot, estas sustancias son producidas por especies que pertenecen a los géneros *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp. y *Claviceps* spp. (Riera & Paul, 2017).

2.1.2.1.4. Principales especies de patógenos en el género *Fusarium* spp.

Las especies de *Fusarium* spp. presentan algunas variedades que se agrupan en conjuntos de especies, y los patógenos de plantas más significativos pueden clasificarse en categorías principales:

2.1.2.1.4.1. *Fusarium verticillioides*

Este hongo es capaz de ingresar en las plantas a través de diferentes vías y puede infectar las raíces, el tallo y las mazorcas; En el tejido y los granos del maíz, este patógeno produce diversas toxinas que reducen la calidad del cultivo, puesto que, la fumonisina es una de las toxinas más prevalentes producidas por este hongo (Torre-Hernandez et al., 2014).

2.1.2.1.4.2. *Fusarium dimerum*

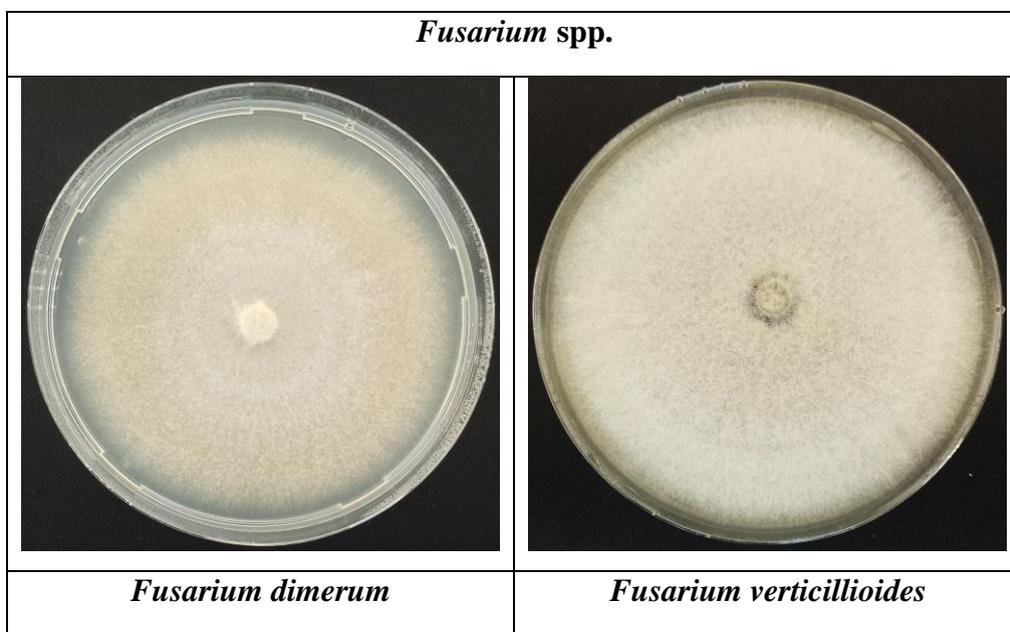
Incluye un total de 12 especies desde una perspectiva filogenética, y estas se caracterizan por ser saprófitos que se encuentran comúnmente tanto en el suelo como en materiales vegetales

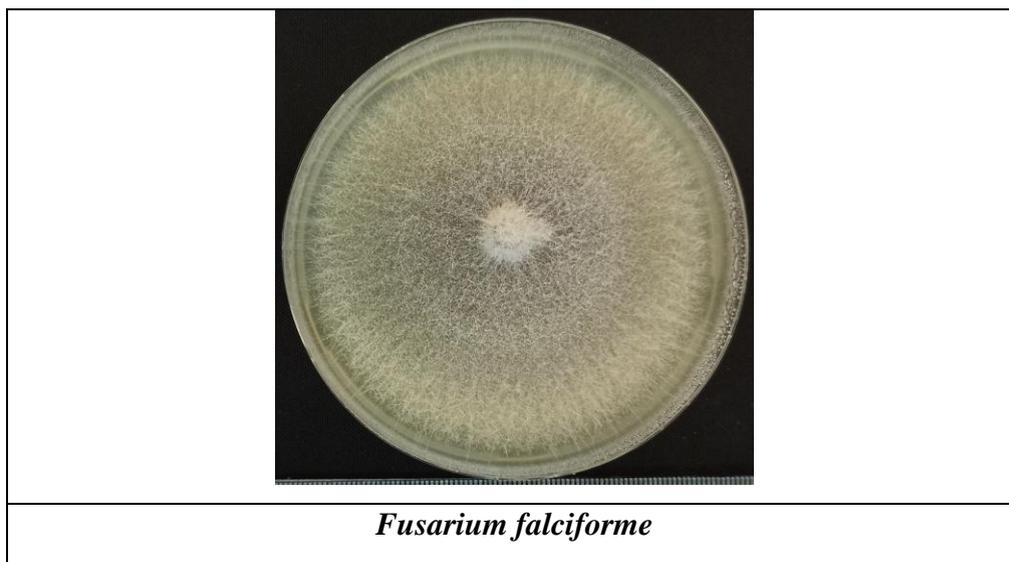
(Luchen et al., 2017). Se destacan por tener una mayor capacidad patógena en comparación con otros microorganismos que causan la descomposición de las raíces (Li et al., 2022).

2.1.2.1.4.3. *Fusarium facilforme*

Los síntomas incluyen decoloración de la raíz o del fruto, así como una textura suave y húmeda, esto puede debilitar la planta y hacer que sea más propensa a caer, se notó la presencia de estructuras micelianas blancas en la parte superior, con un matiz púrpura claro en el centro (Balasubramaniam et al., 2023). Este fenómeno resultó en daños a los bulbos, manifestando síntomas de pudrición bulbosa y necrosis similares a los que se observan en las plantas infectadas en el campo, teniendo un impacto significativo en la producción de las plantas cultivadas, lo cual es motivo de gran preocupación en la agricultura debido a las potenciales pérdidas económicas asociadas (Tirado-Ramírez et al., 2018).

Figura 1. Cepas *Fusarium* aisladas de sintomatología de patógenos del cultivo de pitahaya roja.





2.1.2.2. *Curvularia* spp.

Curvularia es un género extenso de hongos dematiáceos que abarca numerosas especies, principalmente asociadas a gramíneas y al suelo, ciertas de estas especies han provocado epidemias devastadoras en cultivos de importancia alimentaria como arroz, trigo y maíz (Madrid et al., 2019). La mancha foliar de *Curvularia* en el maíz, mayormente ocasionada por el hongo patógeno *C. lunata*, representa una seria amenaza para el rendimiento en la producción de maíz, esta enfermedad se manifiesta mediante la aparición de manchas foliares en las hojas inferiores, sobre todo en plantas jóvenes, se puede decir el caso del maíz que se ha informado que *C. lunata*, *C. pallescens* y *C. maculans* causan pequeñas lesiones necróticas con un área de color claro alrededor, con un diámetro aproximado de 0.5 cm una vez que se desarrollan por completo, dicha enfermedad se encuentra ampliamente distribuida en regiones cálidas y húmedas donde se cultiva maíz, y puede causar daños considerables en los cultivos (DGSV, 2020).

2.1.2.2.1. Taxonomía

Tabla 3. Taxonomía del hongo *C. lunata*.

Nombre científico	<i>Curvularia lunata</i>
Reino	Fungi
Filo	Ascomycota
Clase	Dothideomycetes
Orden	Pleosporales
Familia	Pleosporaceae
Género	<i>Cochliobolus</i>

Especie	<i>Cochliobolus lunatus</i>
----------------	-----------------------------

Fuente: (DGSV-CNRF, 2020)

2.1.2.2.2. Morfología

Desde una perspectiva microscópica, *C. lunata* desarrolla estructuras llamadas hifas vegetativas que están segmentadas y ramificadas, las hifas pueden variar en color de subhialinas a tonos pardos y tienen una superficie que puede ser tanto lisa como rugosa (Madrid et al., 2019). Tienen un ancho que generalmente oscila entre 1.5 y 5 μm , al produce conidioforos que son estructuras con forma de tallo, los cuales miden entre 39 y 430 μm de longitud, 4-9 μm de ancho en la base y 2.5-6 μm de ancho hacia el centro. Estos conidioforos son septados, lo que significa que tienen divisiones internas, y pueden ser simples o tener ramificaciones; A menudo, presentan una base bulbosa y una curvatura en el ápice, y su color varía desde un marrón claro hasta oscuro, también tienen paredes celulares más gruesas en comparación con las hifas vegetativas (DGSV, 2020).

2.1.2.2.3. Metabolitos de *Curvularia* spp.

Las bacterias del grupo de las *Pseudomonas* son ampliamente empleadas como agentes de biocontrol bacterianos debido a su capacidad para producir una diversidad de metabolitos que tienen efectos adversos sobre los patógenos presentes en la rizosfera, en la cual representan un ejemplo destacado de cómo combinan múltiples mecanismos para llevar a cabo un control biológico efectivo; Se ha comprobado que varios factores de virulencia juegan un papel importante en la infección de patógenos que afectan algunos cultivos, incluyendo componentes como la celulosa, una toxina no específica del huésped llamada 5-(hidroximetil)-furan-2-carboxilato de metilo y la melanina (Hernández-Rodríguez et al., 2023).

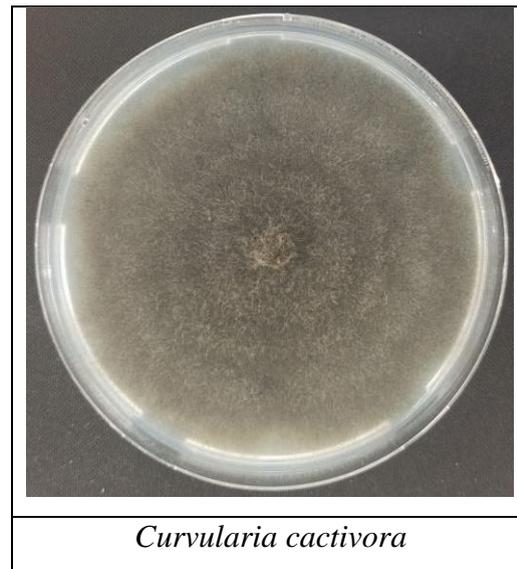
En un estudio realizado en otro tipo de plantas cultivadas en condiciones de invernadero, se evaluó la capacidad de la bacteria *Bacillus subtilis* como agente de biocontrol contra *Curvularia eragrostidis*, el patógeno causante de la mancha foliar, los resultados mostraron que esta bacteria fue capaz de inhibir en un 75 % el crecimiento micelial de *C. eragrostidis* y redujo la germinación de sus esporas en un impresionante 96.2 % (DGSV, 2020).

2.1.2.2.4. *Curvularia cactivora*

C. cactivora es un tipo de hongo fitopatógeno que pertenece al género *Curvularia*, esta especie específica ha sido identificada como un patógeno que provoca daños en los frutos de la

pitahaya roja (*Hylocereus undatus*) y se caracteriza por producir una cantidad significativa de conidios distoseptados de color negro, en general con células terminales más claras y células intermedias agrandadas, lo que contribuye a su curvatura característica (Yasmina Marin, 2020).

Figura 2. *C. cactivora* aislada de sintomatología de patógenos del cultivo de pitahaya roja.



2.1.3. Factores fisicoquímicos que incluyen en el crecimiento bacteriano

Dentro del ámbito de los cultivos de pitahaya, los factores fisicoquímicos desempeñan un papel esencial en la modulación del crecimiento bacteriano (Cruz, 2015). La temperatura, la humedad, la composición del suelo y otros aspectos de naturaleza fisicoquímica interactúan de manera intrincada para influir en la proliferación y actividad de las bacterias presentes en el entorno de cultivo. La temperatura adecuada y la humedad óptima proporcionan un ambiente propicio para la multiplicación bacteriana, mientras que la composición del suelo, incluyendo la disponibilidad de nutrientes y pH, impacta directamente en las poblaciones bacterianas presentes en el sustrato radicular (Liliana Caycedo Lozano, 2020).

El análisis minucioso de estos factores permite desarrollar estrategias de manejo que no solo favorezcan el crecimiento saludable de la pitahaya, sino que también regulen de manera eficaz el microbiota asociado, contribuyendo a la productividad y sostenibilidad del cultivo (Diéguez-Santana, 2020).

2.1.4. Agroquímicos de la pitahaya roja

Los agroquímicos son compuestos químicos utilizados en la agricultura para favorecer el crecimiento y la producción de cultivos. Estos agentes químicos abarcan una amplia gama de

productos, entre ellos fungicidas, herbicidas, pesticidas, fertilizantes y otros componentes específicamente formulados con el propósito de elevar tanto la calidad como la cantidad de los cultivos agrícolas (Castillo, 2020).

En la producción de la pitahaya roja, el empleo de agroquímicos es una práctica convencional empleada para el control de fitopatógenos. Sin embargo, es imperativo considerar los posibles impactos negativos asociados el uso de ciertos agroquímicos como, por ejemplo; los pesticidas organofosforados, los pesticidas carbamatos, los fungicidas a base de cobre (Guarda, 2020).

Si los agroquímicos no se aplican y gestionan adecuadamente, estos pueden dejar residuos en los frutos de la pitahaya roja, lo que no solo plantea preocupaciones para la salud de los consumidores, sino que también puede afectar la comercialización y exportación del producto; Además, la exposición crónica a los agroquímicos puede tener efectos adversos en la salud de los agricultores y trabajadores agrícolas, así como pone en peligro la biodiversidad acuática y afectando negativamente a otros organismos (Diéguez-Santana, 2020). Provocando efectos adversos que incluyen dolores de cabeza, náuseas, vómitos, malestares estomacales y diarreas, la gravedad de estos efectos sobre la salud está intrínsecamente relacionada con diversas variables, como el tipo específico de agroquímico utilizado y su nivel de toxicidad, la cantidad o dosis de exposición, la frecuencia de aplicación y la adopción de medidas de protección personal por parte de quienes manipulan estos productos (Jiménez-Quintero CA, 2017).

2.2. Generalidades de *Trichoderma* spp.

2.2.1. *Trichoderma* spp.

El género *Trichoderma* hongo filamentoso frecuente en el suelo, que se encuentra en una variedad de hábitats naturales como suelos forestales, agrícolas y desérticos; Esta diversidad genética ha llevado a la identificación de numerosas especies y cepas con distintas características y aplicaciones beneficiosas (González et al., 2019). Especialmente en aquellos que contienen material orgánico o restos vegetales que están en descomposición (Prieto et al., 2012). Puesto que, la capacidad de antagonizar a estos hongos, *Trichoderma* es ampliamente utilizada como control biológico en la agricultura moderna (González et al., 2019).

Además de su relevancia en la agricultura, *Trichoderma* también tiene aplicaciones industriales donde sus enzimas son ampliamente utilizadas en la industria bioquímica para la producción de biocombustibles, alimentos y productos farmacéuticos (Prieto et al., 2012).

2.2.1.1. Taxonomía

Tabla 4. Taxonomía de *T. harzianum*.

Nombre científico:	<i>Trichoderma harzianum</i>
Reino:	Fungi
División:	Ascomycota
Subdivisión:	Pezizomycotina
Clase:	Sordariomycetes
Orden:	Hypocreales
Familia:	Hypocreaceae
Género:	<i>Trichoderma</i>
Especie:	<i>T. harzianum</i>

Fuente: (Benedicto Martínez, 2015)

2.2.1.2. Descripción de la morfología

El hongo *Trichoderma* presenta colonias en sus diversos aislamientos que se desarrollan de forma extremadamente rápida, ya que es un hongo que se encuentra de manera natural en hábitats como el suelo y puede actuar como saprófito o parásito; Entre las especies más notables se encuentran *T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii* y *T. hamatum* (Martínez et al., 2015). El éxito de las cepas de *Trichoderma* como agentes de control biológico se atribuye a su alta capacidad reproductiva, su habilidad para sobrevivir en condiciones ambientales adversas y su eficiencia en la utilización de nutrientes (González et al., 2019).

Además, posee la capacidad de modificar la rizósfera y exhibe una fuerte agresividad contra los hongos fitopatógenos, ya que también es capaz de promover el crecimiento de las plantas y activar sus mecanismos de defensa; Su agente de control biológico se debe a su capacidad reproductiva, supervivencia en condiciones adversas, eficiencia en la utilización de nutrientes, modificación de la rizosfera, resistencia frente a hongos fitopatógenos y capacidad para estimular el crecimiento y defensa de las plantas (González et al., 2019).

Cada especie se caracteriza por tener un crecimiento micelial rápido y producir abundantes esporas, lo que facilita su colonización en diversos sustratos y en el suelo (Martínez et al., 2015). Según Rifai en 1969, las colonias presentan inicialmente un color blanco que luego

se vuelve verde oscuro debido a la abundante formación de esporas; En un medio como el Papa Dextrosa Agar (PDA) las velocidades de crecimiento se determinan en los medios de cultivo de agar con bajo contenido de nutrientes (SNA) y agar de papa y dextrosa (PDA), se observa en los cultivos bajo el microscopio, se pueden distinguir agregados de conidios y pigmentos específicos en el sustrato, que son características distintivas de algunas especies (Martínez et al., 2015).

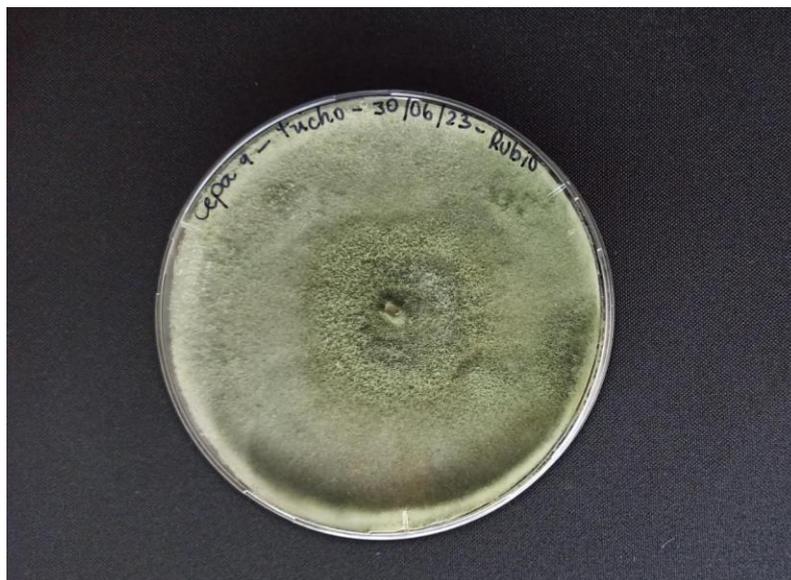
Los conidióforos de *Trichoderma* presentan una forma cónica cuando son observados bajo el microscopio, estos conidióforos generan una gran cantidad de conidios asexuales unicelulares, los cuales pueden ser de color verde o hialinos, con una superficie lisa o apenas rugosa; Estos conidios pueden tener diversas formas, como subglobosos, cilíndricos u oblongos, con un diámetro promedio de 3 a 5 μm ; Se originan a partir de células conidiógenas y fiálides, que se encuentran ubicadas en los extremos de los conidióforos, los conidióforos son hialinos altamente ramificados y no dispuestos en verticilos (Martínez et al., 2015).

Adicionalmente, este hongo tiene la capacidad de producir clamidosporas (unicelulares), las cuales son esféricas y se encuentran en sustratos naturales, estas clamidosporas pueden ser intercalares y, en ocasiones, se forman en los extremos de las hifas, con un diámetro menor a 15 μm y un color verde, estas esporas pueden perdurar a lo largo del tiempo, lo que las convierte en estructuras de supervivencia significativas (García-Núñez et al., 2017).

Figura 3. Cepa madre de *Trichoderma* sp. denominada como C9, otorgada por ESPOL (2023).



Figura 4. Subcultivo de cepa de *Trichoderma* sp., denominada como C9.



2.2.2. *Trichoderma* como controlador biológico

El biocontrol de patógenos es una de las características sobresalientes de *Trichoderma*; Este hongo tiene la capacidad de combatir y suprimir diversos patógenos que afectan a las plantas, incluyendo otros hongos, bacterias y nematodos, su efectividad radica en la producción de enzimas y metabolitos antimicrobianos que inhiben el crecimiento de estos agentes dañinos (Vanegas et al., 2020). Además de su actividad antagónica actúa como promotor del crecimiento de las plantas al colonizar las raíces, también favorece el desarrollo de raíces sanas, mejora la absorción de nutrientes y fortalece la resistencia de las plantas ante el estrés abiótico (García-Núñez et al., 2017). Otro aspecto relevante es su aplicación en el control de enfermedades del suelo ha demostrado ser eficaz en el control biológico de diversas enfermedades, como la podredumbre de las raíces, pudrición de la corona y marchitez vascular, su capacidad para colonizar el suelo y competir con los patógenos contribuye a reducir la incidencia de enfermedades en los cultivos (Vanegas et al., 2020).

Las cepas de *Trichoderma* tienen la capacidad de ejercer el biocontrol de hongos fitopatógenos de dos formas: indirectamente, compitiendo por recursos y modificando el entorno, estimulando el crecimiento de las plantas y sus mecanismos de defensa, o mediante la producción de compuestos antimicrobianos, también pueden llevar a cabo el biocontrol directamente a través del micoparasitismo, estos mecanismos pueden actuar en conjunto y desempeñan un papel fundamental en las interacciones entre plantas y microorganismos (Vanegas et al., 2020). Las características de *Trichoderma*, tales como su capacidad fungicida,

antibiótica, nematocida e insecticida, así como su capacidad para colonizar diversos hábitats, han sido clave para comprender la producción de metabolitos secundarios poderosos y su función específica como agentes descomponedores del suelo, es importante preservar *Trichoderma* para garantizar la viabilidad y la integridad morfológica, fisiológica y genética de un cultivo, asegurando así su utilidad en la producción del hongo o de sus metabolitos, manteniendo intactas las características particulares de la cepa original (García-Núñez et al., 2017).

2.2.3. Metabolitos secundarios de *Trichoderma* sp. con actividad antimicrobiana

Trichoderma, un tipo de hongo, tiene diversas aplicaciones en la biotecnología agrícola su función más destacada consiste en frenar el desarrollo, la producción de esporas y la germinación de esporas de hongos perjudiciales, enfocándose en investigar el potencial biológico de diferentes especies de *Trichoderma* y cómo formularlas para inhibir microorganismos, esto hace que estas prácticas sean más efectivas en una amplia gama de condiciones ambientales, tipos de plagas y sistemas de cultivo (Vanegas et al., 2020).

Numerosas variedades de *Trichoderma* generan metabolitos secundarios tienen la capacidad de restringir el crecimiento de otros microorganismos sin necesidad de un contacto físico directo, estos compuestos restrictivos se consideran en términos generales como 'antibióticos', y cumplen una función importante en la regulación de patógenos en las plantas (García, Valenzuela-Quintanar, Troncoso-Rojas, González-Mendoza, & Tiznado-Hernández, 2022).

Según la investigación de Dennis y Webster, se ha relacionado la acción antibiótica de *Trichoderma* sp. con compuestos no volátiles, que incluyen uno identificado como trichodermina, junto con otros metabolitos de naturaleza peptídica (García, Valenzuela-Quintanar, Troncoso-Rojas, González-Mendoza, & Tiznado-Hernández, 2022). Asimismo, se ha observado que la actividad antibiótica de algunos aislamientos de *Trichoderma* se debe también a la producción de compuestos volátiles y que posiblemente esté relacionado con su función de agente biocontrol (Vanegas et al., 2020). Los antibióticos en forma de gases tienen un efecto fundamentalmente fungistático, debilitando al patógeno y volviéndolo más susceptible a la acción de los antibióticos no volátiles, lo que se conoce como 'hiperparasitismo' de origen enzimático (García, Valenzuela-Quintanar, Troncoso-Rojas, González-Mendoza, & Tiznado-Hernández, 2022).

En la actualidad, hay una tendencia a emplear estos organismos en el control biológico

contra diversos patógenos del suelo debido a su capacidad para producir una gran cantidad de metabolitos secundarios; además, también influyen en la producción de energía y el crecimiento celular en todos los organismos, ya que comparten moléculas clave en las reacciones fundamentales de crecimiento y reproducción (Vanegas et al., 2020).

Los metabolitos secundarios se dividen en grupos característicos como policétidos, terpenos, terpenoides, pirógenos, fenoles y alcaloides derivados de compuestos indólicos y péptidos no ribosómicos que generalmente reflejan su origen y proceso de creación, dado que estos hongos se encuentran comúnmente en el suelo y en las raíces de las plantas, varios de sus metabolitos secundarios se han aislado caracterizado y estudiado extensamente debido a su capacidad antimicrobiana, estos compuestos pueden ser aumentados en su producción o mezclados con cepas adecuadas de biocontrol, con el objetivo de crear nuevas mezclas que puedan ser más efectivas en su acción antimicrobiana contra fitopatógenos en plantas y en la preservación de frutos después de la cosecha (Vanegas et al., 2020).

Es importante destacar que la expresión de los metabolitos secundarios puede ser evidenciada a través de la producción de pigmentos solubles, los cuales también pueden ser distintivos para cada especie, aunque la tonalidad de estos pigmentos apenas muestra variación en las especies de *Trichoderma*. La mayoría de las cepas muestran un color blanco que luego cambia a tonos verdes o amarillos cuando se produce una esporulación densa. En particular, algunas cepas asociadas con *Longibrachiatum* suelen exhibir pigmentos de un llamativo tono amarillo verdoso. Sin embargo, los pigmentos de tonalidades amarillas apagadas que varían hacia diversos tonos de verde y gris son comunes en muchas especies, pero no resultan muy distintivos (Ana María Mesa-Vanegas, 2019).

No obstante, la producción de estas sustancias está condicionada por la especie e incluso por la cepa del hongo, y no todas las variedades serán capaces de sintetizar el conjunto completo de estas sustancias en un entorno de laboratorio, ya que pueden requerir estímulos específicos para activar su producción, la comparación de los genes entre diferentes especies de *Trichoderma* ha revelado que los genes relacionados con las propiedades antifúngicas forman parte de amplios grupos de genes biosintéticos (Vanegas et al., 2020).

Donde estos grupos incluyen enzimas como las péptido sintetasas no ribosomales, las policétido sintetasas, el terpeno sintetasas/ciclasas, así como enzimas accesorias como citocromo P450, oxidorreductasas, metiltransferasas, entre otras; En algunos casos, también se han

identificados genes relacionados con transportadores y factores de transcripción (García, Valenzuela-Quintanar, Troncoso-Rojas, González-Mendoza, & Tiznado-Hernández, 2022). Los péptidos no ribosomales son el resultado de la unión de dos o más aminoácidos por parte de las péptido sintetetasas no ribosomales (NRPS), fuera del ribosoma, seguido en muchos casos de modificaciones secundarias. Los grupos principales de péptidos no ribosomales (NRP) producidos por *Trichoderma* sp. incluyen peptaibióticos, epiditiodioxopiperazinas (ETP) y sideróforos (Vanegas et al., 2020).

- Este variado grupo de metabolitos secundarios, producidos tanto por bacterias como por hongos, engloba una amplia gama de compuestos, entre ellos se encuentran sustancias con propiedades antibióticas, como las tetraciclinas y los macrólidos, así como micotoxinas como la aflatoxina, el ácido fusárico y la fumonisina (García, Valenzuela-Quintanar, Troncoso-Rojas, González-Mendoza, & Tiznado-Hernández, 2022).
- La síntesis de estos compuestos policétidos parte de unidades simples como el acetil-CoA y el malonil-CoA mediante un proceso conocido como policetidilación, aunque los genomas de *Trichoderma* cuentan con una abundancia de genes relacionados con la síntesis de policétidos, ha habido una limitada investigación sobre la biosíntesis y genética de estos compuestos en estos hongos (García, Valenzuela-Quintanar, Troncoso-Rojas, González-Mendoza, & Tiznado-Hernández, 2022).
- Como la unidad fundamental del isopreno se origina comúnmente a partir de la ruta del mevalonato en la mayoría de los seres vivos. En el caso de *Trichoderma*, se ha evidenciado que esta ruta involucra la acción de una enzima llamada hidroximetilglutaril-CoA reductasa (HMGR) codificada por el gen hmgR. HMGR actúa como la primera etapa en la vía del mevalonato, catalizando la conversión de hidroximetilglutaril-CoA en mevalonato (García, Valenzuela-Quintanar, Troncoso-Rojas, González-Mendoza, & Tiznado-Hernández, 2022).

2.2.4. Hongos fitopatógenos sensibles a *Trichoderma* sp.

En la agricultura, nos encontramos con diversos desafíos provocados por microorganismos patógenos que pueden causar daños tanto a las plantas como a sus frutos, estos microorganismos tienen un impacto negativo en el crecimiento y en la capacidad para absorber nutrientes (Barroso Albarracín, y otros, 2013). No obstante, en la lucha contra estos problemas fitosanitarios, la agricultura emplea hongos beneficiosos como agentes de control biológico; Un ejemplo de estos hongos beneficiosos es *Trichoderma*, que actúa de manera natural como agente de biocontrol al competir con los hongos patógenos por recursos y al producir enzimas que

pueden degradar las estructuras celulares de estos fitopatógenos (Mora, 2012). Finalmente, este proceso ayuda a disminuir la frecuencia y gravedad de las enfermedades de las plantas causadas por hongos (Mora, 2012).

En el caso específico de la pitahaya, se enfrenta a ciertos problemas fitosanitarios en condiciones climáticas normales; No obstante, se ha observado que *Trichoderma* ha demostrado ser eficaz contra una amplia gama de hongos fitopatógenos, incluyendo:

2.2.4.1. *Botrytis cinerea*

Este microorganismo es responsable de la podredumbre gris una enfermedad que afecta de manera frecuente a los cultivos de hortalizas tanto en invernaderos como en campos al aire libre en la región costera del mediterráneo, se trata de un hongo que se alimenta de materia orgánica en descomposición y, ocasionalmente, se convierte en un parásito no deseado, causando daños significativos y pérdidas económicas. Además, puede afectar a frutas y hortalizas durante su almacenamiento y transporte si no se manejan adecuadamente (J. Roselló, 2005).

Este hongo es particularmente dependiente de los nutrientes, y esto se debe a su naturaleza necrotrófica, las esporas de este hongo requieren nutrientes para iniciar su germinación y desarrollo antes de penetrar en el sustrato, estos nutrientes suelen encontrarse en las lesiones o heridas presentes en las frutas; En estas áreas, se produce una competencia microbiana que actúa para inhibir el crecimiento de los patógenos (Calle, 2019).

Trichoderma se destaca por su rápido crecimiento micelial y su alta producción de esporas, lo que le permite colonizar diversos sustratos y el suelo con eficacia. Además, esta especie de *Trichoderma* produce enzimas como celulasa, proteasa y quitinasa, que contribuyen a la resistencia de la planta huésped y reducen la liberación de sustancias de las raíces de las plantas (Calle, 2019).

2.2.4.2. *Rhizoctonia solani*

En la naturaleza, *R. solani* se reproduce de manera asexual y se encuentra en forma de micelio vegetativo, este micelio forma estructuras de resistencia llamadas esclerocios; Este fitopatógeno está presente en la mayoría de los suelos debido a su amplio rango de hospedantes (Hernandez et al., 2016). Sobrevive en los restos de plantas y también como esclerocios. *R. solani* causa una enfermedad conocida como rhizoctoniasis o cáncer de raíces y tallos, así como

costra negra cuando se presenta en la superficie de los tubérculos (Acosta et al., 2010).

La rhizoctoniasis es una enfermedad persistente, adaptable y versátil, capaz de causar daños significativos en el tejido vegetal que infecta, se han identificado varios géneros de hongos como posibles agentes de control biológico contra diversos fitopatógenos del suelo (Acosta et al., 2010). Sin embargo, *Trichoderma* sp. desempeña un papel importante en el parasitismo, ya que ha demostrado una eficiente capacidad para parasitar los esclerocios de *R. solani*, además de controlar la enfermedad, *Trichoderma* sp. promueve significativamente el crecimiento de las plantas (Hoyos-Carvajal et al., 2008). Finalmente se indican el potencial de *Trichoderma* sp. como un microorganismo biocontrolador efectivo para combatir *R. solani* (Acosta et al., 2010).

2.2.4.3. *Fusarium* spp.

El organismo presenta estructuras llamadas esporodoquios en los que se agrupan las microconidias también genera macroconidias y posee estructuras de resistencia conocidas como clamidiosporas, que pueden permanecer en el suelo durante varios años, esto provoca un deterioro prematuro de la planta debido al marchitamiento, que también está relacionado con la obstrucción de los vasos conductores; Algunos de los primeros síntomas incluyen pequeñas manchas de color que varían entre el amarillo y el marrón (Meza et al., 2008).

En condiciones favorables, estas manchas pueden dar lugar a una pudrición blanda, que comienza cerca de la superficie del suelo; Los cultivos que se establecen en suelos ácidos, arenosos, con bajo pH y escasez de nitrógeno son particularmente susceptibles a esta enfermedad (Mora, 2012). Por último, el género *Trichoderma* tiene características beneficiosas para el control de enfermedades en las plantas causadas por el patógeno fúngico *Fusarium*, Este hongo actúa a través de una combinación de competencia por nutrientes, producción de sustancias que inhiben el crecimiento de hongos, enzimas que descomponen estructuras fúngicas y micoparasitismo; Además, produce compuestos que estimulan el crecimiento de las plantas (Meza et al., 2008).

2.2.4.4. *Sclerotinia* spp.

Es un organismo que ataca a las plantas y tiene la capacidad de formar estructuras de supervivencia llamadas esclerocios, estas esporas pueden germinar cuando las condiciones son adecuadas, dando lugar a nuevas infecciones que causan importantes pérdidas en diversos cultivos de flores y verduras (Jenny & German, 1999).

Por otro lado, la especie *Trichoderma* es común en varios tipos de suelos, especialmente en aquellos que son ácidos y ricos en materia orgánica, este tipo de hongo se caracteriza por su rápido crecimiento y una producción abundante de esporas, lo que facilita su colonización en el suelo y otros sustratos (Stazzonelli et al., 2014). La acción beneficiosa de *Trichoderma* se debe a su capacidad de competir con otros hongos por espacio y nutrientes, así como a su capacidad para producir antibióticos y enzimas que pueden atacar a varios hongos patógenos (Osorio-Nila et al., 2005).

Es importante tener en cuenta que la eficacia de *Trichoderma* puede variar según las condiciones ambientales y la especie específica del hongo fitopatógeno. Además, la elección y aplicación adecuada de las cepas de *Trichoderma* y las prácticas de manejo son esenciales para lograr resultados óptimos en el control biológico de enfermedades.

2.2.5. Mecanismo de acción *Trichoderma*

En relación a la capacidad de *Trichoderma* para controlar la proliferación de hongos fitopatógenos, se han identificado varios mecanismos que regulan el crecimiento de estos hongos dañinos (Infante et al., 2009). Los principales métodos incluyen la competencia por recursos como espacio y nutrientes, donde el micoparasitismo y la producción de sustancias antibióticas actúan directamente contra los hongos fitopatógenos (Vanegas et al., 2020).

El hongo *Trichoderma*, en particular, utiliza el micoparasitismo como uno de sus mecanismos antagónicos, puesto que, las especies de *Trichoderma* se orientan químicamente hacia sus hospedantes adhiriéndose a las estructuras fúngicas y, a menudo penetrándolas después de enrollarse alrededor de ellas; A medida que avanza el proceso parasítico, se observa la degradación de las paredes celulares del hongo hospedante, debilitándolo significativamente (Infante et al., 2009).

El micoparasitismo es un mecanismo altamente efectivo en *Trichoderma* sp., ya que estas especies producen una variedad de enzimas, como celulasas, glucanasas, lipasas, proteasas y quitinasas que van a descomponer las paredes celulares de las hifas del hospedante, facilitando la entrada de estructuras especializadas e hifas de *Trichoderma*, que absorben nutrientes del interior del hongo fitopatógeno (Infante et al., 2009). En última instancia, este proceso culmina con la pérdida del contenido citoplasmático de la célula hospedante, dejando el citoplasma restante alrededor de las hifas invasoras provocando la disgregación de la célula hospedante y reduciendo significativamente su capacidad patogénica (Vanegas et al., 2020).

2.3. Generalidades de *Bacillus* sp.

2.3.1. *Bacillus* sp.

El *Bacillus* es una bacteria que está ampliamente distribuida en la naturaleza, que puede desarrollarse tanto en ambientes aerobios como anaerobios; Su característica más distintiva es la esporulación, un proceso en el cual forman endosporas cuando se enfrentan a condiciones ambientales desfavorables, como escasez de nutrientes o la presencia de compuestos químicos, estas endosporas son extremadamente resistentes al calor y a la radiación, permitiéndoles sobrevivir en condiciones adversas hasta que encuentren nuevamente un ambiente favorable y óptimo para su crecimiento y eclosión (Maria Fernanda Villareal, 2018).

2.3.1.1. Taxonomía

Tabla 5. Taxonomía de *Bacillus* spp.

Reino	Bacteria
Filo	Firmicutes
Clase	Bacilli
Orden	Bacillales
Familia	Bacillaceae
Genero	<i>Bacillus</i>

Fuente: (Martinko, 2010)

2.3.1.2. Morfología

2.3.1.2.1. Forma y tamaño celular

Las bacterias del género *Bacillus* sp. tienen una forma celular bacilar, lo que significa que su estructura es cilíndrica y alargada, similar a un bastoncillo o varilla, debido a su pared celular compuesta por teichoic y ácido teicurónico. Normalmente, presentan un tamaño que varía entre 1 y 5 micrómetros de longitud y 0.5 a 1 micrómetro de ancho, aunque es importante tener en cuenta que este tamaño puede variar según la especie específica (Lozada, 2010).

2.3.1.2.2. Tinción de gram de *Bacillus* sp.

Las bacterias pertenecientes al género *Bacillus* sp. son grampositivas, lo que implica que, durante la tinción de Gram, se visualizarán en tonos azules o violetas bajo el microscopio, esta coloración está estrechamente relacionada con la estructura de su envoltura celular que está compuesta por varias capas de peptidoglucano, lo que proporciona una caracterización distintiva y natural de estas bacterias (Carlos Perez Ruiz, 2018).

2.3.1.2.3. Morfología en medio de cultivo

En medios de cultivo, una característica común de la bacteria es su forma irregular y su color crema. La apariencia de sus bordes puede variar entre lobulada y ondulada, mientras que su elevación puede ser planoconvexa, lo que está influenciado por la disponibilidad de nutrientes. Cuando los nutrientes son escasos, el bacilo tiene un grosor menor, lo que aumenta su área de contacto y le permite extenderse por todo el medio para abarcar más espacio, de esta manera, aprovecha la oportunidad de absorber una mayor cantidad de nutrientes (Zuñiga, 2010).

2.3.2. *Bacillus* sp. como controlador biológico

Bacterias del género *Bacillus* sp. son utilizadas como agentes de control biológico en la agricultura para combatir plagas y enfermedades de plantas. Su mecanismo de acción se fundamenta en la producción de compuestos antimicrobianos, enzimas líticas como quitinasas y proteasas, y metabolitos secundarios con potencial tóxico contra patógenos y plagas, esta habilidad de la bacteria comenzó cuando se descubrió la actividad insecticida de las proteínas Cry producidas por *B. thuringiensis* y así varias especies del género *Bacillus* son objeto de amplios estudios con el objetivo de reducir la incidencia de enfermedades de gran importancia en la agricultura (Luz Adriana Pedraza, 2019).

2.3.3. Principales mecanismos de acción de *Bacillus* sp. como controlador biológico.

2.3.3.1. Producción de compuestos antimicrobianos

Es uno de los principales mecanismos que utiliza la bacteria para combatir enfermedades en plantas son péptidos antimicrobianos (AMP), pequeñas moléculas proteicas con actividad bactericida y fúngica, lo cual actúan directamente sobre la membrana celular de los patógenos provocando su muerte algunos de los compuestos antimicrobianos producidos por *Bacillus* sp. son el N-acetilriptomina, ácido isovalérico producidos por *B. pumilus* 4-etoxibenzoato de etilo y ácido fenilacético por *B. licheniformis* (Omaish Alqahtani, 2023).

2.3.3.2 Producción de lipopéptidos

Los lipopéptidos son compuestos cruciales para inhibir el crecimiento de agentes fitopatógenos, están compuestos por un péptido cíclico unido a una cadena de ácido graso β -hidroxilo o β -amino, se sabe que estos compuestos interactúan con la membrana citoplasmática de células bacterianas, induciendo la formación de poros y generando un desequilibrio osmótico, lo que finalmente causa la muerte celular de microorganismos fitopatógenos. Además, esta acción altera procesos celulares como el metabolismo energético, en cultivos líquidos de

bacterias del género *Bacillus* sp. (específicamente *B. subtilis*), se han identificado diversas isoformas de lipopéptidos, lo que demuestra que estos microorganismos tienen un gran potencial para producir compuestos inhibitorios de crecimiento con actividad antimicrobiana (Helene Cawoy, 2015).

2.3.3.3. Producción de enzimas líticas

Algunas especies de *Bacillus* tienen la capacidad de generar y producir enzimas las principales son las proteasas y quitinasas, que tienen capacidad degradadora de polisacáridos que forman la pared celular de ciertos patógenos, como hongos y bacterias, debilitándolos y evitando su proliferación (Simon Caulier, 2019). Las quitinasas son enzimas que descomponen los enlaces b-1,4-glucosídicos presentes en la quitina, un polisacárido que forma parte de la pared celular de los hongos, al mismo tiempo, ciertas bacterias de *Bacillus* sp. pueden producir quitosanasas, que catalizan la degradación hidrolítica de enlaces glucosídicos b-1,4 en el quitosano, otro polisacárido presente en la pared celular de algunos hongos. Al utilizar estas bacterias como control biológico, es posible prevenir la infección de las plantas, ya que las quitinasas y quitosanasas producidas por *Bacillus* sp. actúan sobre los componentes estructurales de las paredes celulares fúngicas y pueden debilitar o eliminar los hongos patógenos (Dragana Miljakovic, 2020).

2.3.4. Importancia en las industrias y en la biotecnología

Debido a su habilidad para sintetizar diversas enzimas y metabolitos secundarios, las bacterias del género *Bacillus* han sido objeto de numerosos estudios en diversas industrias y en el campo de la biotecnología, estas investigaciones han llevado a aplicaciones y usos variados, como la producción de la enzima subtilisina, ampliamente utilizada en la industria de detergentes debido a su excepcional capacidad de limpieza (Xiaopei Zhang, 2020).

2.3.5. Ecología

La bacteria *Bacillus* sp. se encuentra comúnmente en suelos, agua y varios entornos naturales; Aunque se distribuye de manera natural en diferentes ambientes, su principal ubicación es en los suelos, los cuales constituyen uno de los reservorios más significativos para las bacterias del género *Bacillus* sp. Estas bacterias cilíndricas son saprófitas, lo que significa que dependen de los nutrientes y materiales orgánicos presentes en el suelo, convirtiéndolo en una matriz de gran importancia para la diversidad microbiana; En el suelo, se puede observar un recuento cultivable exponencial que varía en el intervalo de log3 a log6 por gramo (Rogers,

2020).

2.3.6. Hongos fitopatógenos sensibles a *Bacillus* sp.

Una de las alternativas en cuanto a la solución de problemas fitopatógenos y enfermedades que afectan a plantas importantes y generales es la utilización de microorganismos como controles biológicos, entre uno de los principales es la aplicación del hongo de género *Bacillus* sp. que ha ganado popularidad por sus capacidades aplicativas como agente de control biológico en contra de muchos fitopatógenos que afectan a diversas plantas (García, Valdez, & Vasquez, 2022).

2.3.6.1. *Curvularia* spp.

Entre los hongos fitopatógenos que demuestran sensibilidad a las especies de *Bacillus* sp. se encuentra *Curvularia* spp., en la cual esta relación se basa en la manifestación de agentes biocontroladores, donde opera a través de diversos mecanismos de acción, entre estos, destacan la generación de antibióticos y enzimas capaces de descomponer la estructura de la pared celular de los hongos patógenos, además, existe una competencia por los nutrientes disponibles y el espacio necesario para el desarrollo, lo que gradualmente detiene el crecimiento de *Curvularia* spp., en experimentos *in vitro* que emplean medios ricos en quitina, se observan áreas de inhibición, indicativas de la producción de quitinasas, esta capacidad puede inhibir el crecimiento de un fitopatógeno que carezca de actividad quitinolítica (Xie et al., 2020).

2.3.6.2. *Fusarium* spp.

El *Fusarium* spp. es conocido por desencadenar numerosas enfermedades en una variedad de plantas, incluida la pudrición de frutos, la podredumbre de raíces y la marchitez vascular, este género de hongos patógenos, muestra susceptibilidad ante la presencia del *Bacillus* sp., un actor beneficioso en este escenario *Bacillus* sp. no solo interfiere con el desarrollo del hongo patógeno *Fusarium* spp. mediante la producción de antibióticos y metabolitos que restringen su crecimiento, sino que también desempeña un papel más amplio, además de su acción antagónica directa, *Bacillus* sp. opera en paralelo para reforzar la resistencia de las plantas frente a la presencia de patógenos huéspedes, esta interacción fortuita no solo contribuye al control biológico de *Fusarium*, sino que también promueve la salud y la capacidad defensiva de las plantas contra una amplia gama de amenazas (Mardanová et al., 2016).

2.3.6.3. *Rhizoctonia* spp.

El género *Rhizoctonia* spp. comprende una variedad muy amplia de hongos fitopatógenos causantes de ciertas enfermedades en plantas una de las más comunes suelen ser la pudrición de raíces, en donde afecta todo el sistema radicular causando debilitamiento en la planta interfiriendo en la capacidad de absorber agua y nutrientes, también causa manchas foliares en las hojas afectando la fotosíntesis y en general la salud de la planta, por otro lado casusa así mismo quemadura de las raíces donde genera oscurecimiento en las puntas de las raíces y se necrosan afectando en la capacidad de que se pueda nutrir la planta (Lawson, 2023). *Bacillus* sp. tiene habilidades probadas de control biológico, el cual puede ser efectivo en cuanto a la lucha de este patógeno causante de enfermedades en las plantas, es considerado una solución sostenible para enfrentarse a los desafíos planteados por *Rhizoctonia* spp. u otro tipo de patógenos, el hongo *Bacillus* sp., produce respuestas de defensa en las plantas huéspedes, fortaleciendo la capacidad de resistir a las infecciones, pudiendo así reducir en mayor oportunidad y cantidad el uso de químicos y/o agroquímicos (Pedraza-Herrera et al., 2019).

2.3.7. Metabolitos secundarios de *Bacillus* sp.

La bacteria *Bacillus* sp. es una bacteria con estudios muy amplios reconocida por su capacidad de producir metabolitos secundarios con propiedades bioactivas aplicadas en el campo de la agricultura para combatir patógenos que afectan a diversas plantas y cultivos, estos compuestos son elaborados la bacteria debido a su respuesta con el entorno en el que se encuentre o se someta y la producción de metabolitos secundarios ha captado la atención en diversas áreas de investigación como en la agricultura hasta en la medicina y biotecnología (Sarti, 2019).

2.3.7.1. Lipopéptidos

Los lipopéptidos son producidos por los *Bacillus* sp. siendo uno de los metabolitos secundarios más fascinantes, promoviendo un papel fundamental en la salud de las plantas y actuando como un control biológico ante patógenos que enferman a las plantas (Travez & Karina, 2018). La surfactina es un ejemplo de compuesto producido por *Bacillus* sp. actuando como agente antifúngico y antibacteriano, alterando las membranas celulares de los patógenos, induciendo su muerte, además de ser un antimicrobiano, las surfactinas también inducen una respuesta de activación de defensa de las plantas (Ruiz, y otros, 2020).

2.3.7.2. Antibióticos

La exploración de la producción de antibióticos a partir de cepas de *Bacillus* sp. surge como una búsqueda de estrategias efectivas en el control biológico con aplicaciones en fitopatógenos, estos compuestos, que son generados de manera natural por las bacterias *Bacillus* sp., representan un potencial prometedor para la gestión de enfermedades en plantas, los antibióticos, como uno de los metabolitos secundarios, desempeñan un papel fundamental al exhibir funciones antimicrobianas específicas dirigidas contra patógenos vegetales, entre los antibióticos producidos por *Bacillus* sp. se encuentran la bacitracina y la subtilisina, que muestran una eficacia sobresaliente en términos de actividad antifúngica para combatir fitopatógenos, ya que interfieren con las funciones esenciales de las células patógenas (Kaspar et al., 2019).

2.3.7.3. Enzimas antifúngicas

Las enzimas antifúngicas constituyen una clase importante en cuanto a los metabolitos secundarios producidos por algunas especies de *Bacillus* sp., estas enzimas son generadas en respuesta por la interacción microbiana, y son un mecanismo fundamental de defensa de las plantas en contra patógenos fúngicos, una de las enzimas secretadas está la quitinasas y la glucanasas, que tienen propiedades muy notables para poder combatir y debilitar a los hongos patógenos causantes de enfermedades de plantas (Gomaa, 2012).

2.3.8. Mecanismo de acción *Bacillus* sp.

Se despliegan diferentes mecanismos de acción que son muy efectivos para combatir hongos fitopatógenos que amenazan la salud de las plantas y de sus frutos, los mecanismos de acción se centran en la inhibición y el debilitamiento de los patógenos impidiendo su desarrollo y crecimiento, uno de los mecanismos de acción que desarrolla el *Bacillus* sp. es la producción de antibióticos y metabolitos antifúngicos, interfiriendo con los procesos vitales de los fitopatógenos que limita la capacidad de establecer infecciones y desarrollar enfermedades de las plantas (Ku, y otros, 2021).

Otro de los mecanismos de acción que utiliza la bacteria *Bacillus* sp. ante la presencia de fitopatógenos que inducen enfermedades en plantas es la competencia por nutrientes y espacio el cual este mecanismo es crucial en donde la bacteria utiliza la habilidad para ocupar nichos en el entorno donde también se encuentran los hongos fitopatógenos que buscan colonizar y desarrollarse, la competencia por el espacio, se crea un ambiente desfavorable para

los hongos patógenos por lo que la bacteria *Bacillus* sp. utiliza todos los recursos necesarios y disponibles, por lo que cualquier otro microorganismo no benéfico se vería afectado por no tener fuente de nutrientes ya que habrían sido consumidos (Ntushelo, Ledwaba, Rauwane, Adebo, & Berka, 2019).

Otro mecanismo clave para combatir a los hongos fitopatógenos, es la producción de enzimas antifúngicas, secretadas como la quitinasas y glucanasas que tienen la capacidad de degradar componentes estructurales de las paredes celulares, debilitando la integridad y reduciendo la resistencia de los patógenos facilitando el control de las defensas de las plantas, así mismo otro mecanismo de acción es la de promover la resistencia sistémica de las plantas, promoviendo las defensas, como la producción de fitoalexinas, que son proteínas microbianas, lo cual en respuesta fortalece las capacidades de las plantas en responder a los patógenos de manera rápida y efectiva, tratando de reducir el daño que es causado por la infección (Wang & Zhao, 2018).

Capítulo 3

Materiales y métodos

3.1. Materiales y equipos de laboratorio

3.1.1. Material biológico

- Muestra de cepa 9 de *trichoderma* sp.
- Muestra de *Bacillus* sp.
- Aislados fúngicos de pitahaya roja

3.1.2. Medios de cultivo

- Agar papa dextrosa (PDA)
- Caldo de papa dextrosa (PDB)
- Agua desionizada
- Medio de sales, levadura y dextrosa

3.1.3. Equipos de laboratorio

- Cámara de flujo laminar
- Autoclave
- Microscopio óptico
- Incubadora
- Balanza de analítica
- Cámara Neubauer
- Vórtex
- McFarland

3.1.4. Materiales de laboratorio

- Puntas de micro pipetas
- Cajas de Petri de plástico
- Tubos falcon (15-50ml)
- Pinzas de laboratorio
- Vaso de precipitación
- Probeta graduada
- Matraz aforado
- Bisturí

- Sacabocados
- Plástico film
- Filtros de papel
- Filtro jeringa (0.2 μm)
- Mechero

3.1.5. Insumos de laboratorio

- Alcohol al 70 %
- Agua destilada estéril

3.2. Métodos

3.2.1. Diseño de la investigación

En este reciente estudio de tipo investigativo, se diseñó un experimento para evaluar la actividad antimicrobiana de metabolitos secundarios producidos por *Trichoderma* sp. y *Bacillus* sp. frente a cepas de hongos aisladas de sintomatología de la pitahaya roja. En una siguiente etapa, se llevó a cabo la evaluación *in vitro* de la capacidad antimicrobiana del sobrenadante estéril de *Trichoderma* sp. y *Bacillus* sp., seguida de la identificación molecular de los hongos (Pedraza, 2022).

3.2.2. Recursos técnicos

La investigación que dio origen a esta tesis se llevó a cabo en la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), específicamente en los laboratorios del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), dentro del Área de Fitopatología.

3.2.3. Limpieza y preparación de microorganismos

Este proceso experimental se dividió en varias etapas. Inicialmente, se aseguró la asepsia del entorno de trabajo mediante la limpieza de la cabina de flujo laminar con etanol al 70% y la activación de la luz UV durante 10 minutos. Luego, se abrió la llave de paso y se encendió la cámara de flujo. Para garantizar condiciones estériles, se encendió un mechero y se flameó un bisturí.

Para preparar la cepa madre (origen) de *Trichoderma* sp., identificada como C9 y proporcionada por el laboratorio, antes de llevar a cabo la fermentación líquida, se realizó un subcultivo para revitalizar la cepa y garantizar su viabilidad. Para ello, se sembró la cepa C9 de

Trichoderma sp. en dos cajas petri con medio. Las cajas petri se sellaron herméticamente con plástico Parafilm y se colocaron en la incubadora a una temperatura constante de 27°C durante un período de 7 días.

3.2.4. Producción de metabolitos secundarios

3.2.4.1. Preparación de la solución de conidios de la C9

Dentro del proceso de subcultivo de *Trichoderma* sp. obtenido de la cepa C9, se ejecutó el siguiente procedimiento con el objetivo de obtener una solución acuosa de conidios (Pedraza, 2022). Luego de 9 días desde el subcultivo inicial de la cepa C9, se procedió a efectuar un lavado de las esporas utilizando agua autoclavada para generar una solución de *Trichoderma* C9. Posteriormente, se prepararon tres diluciones seriadas de esta solución en tubos Falcon de 15 ml, con concentraciones de 1×10^{-1} , 1×10^{-2} y 1×10^{-3} , respectivamente, hasta alcanzar un volumen final de 10 mL. Por último, las disoluciones obtenidas fueron analizadas en el microscopio utilizando la cámara de Neubauer para realizar el conteo de conidios. En esta etapa se inyectaron 20 μ l de la disolución 10^{-3} en el retículo superior de la cámara mediante un procedimiento de capilaridad, mientras que en el retículo inferior se dispusieron 20 μ l de la disolución 10^{-2} . Finalmente se consigue una concentración de $3,17 \times 10^7$ esporas/mL y 1×10^9 esporas/mL en la cámara de Neubauer (Anexo 1)

3.2.4.2. Fermentación líquida

En el contexto de mi investigación, la fermentación líquida (FEL) es una etapa crucial que se distingue por emplear nutrientes en solución, lo que nos brinda un mayor control sobre los parámetros del cultivo, esto es esencial porque nos permite ajustar y optimizar las condiciones de crecimiento de los microorganismos (Arango, 2012). Dándonos la facilidad para recuperar los metabolitos producidos durante el proceso, esta característica simplifica enormemente la manipulación y la reproducibilidad de los resultados, siendo un enfoque en el desarrollo de bioprocesos con un enfoque en la producción de productos naturales (Pineda-Insuasti et al., 2016).

3.2.4.2.1. Fermentación líquida de *Trichoderma* sp. en medio caldo de papa dextrosa (PDB)

Se realizó la fermentación líquida de *Trichoderma* sp. utilizando tres matraces Erlenmeyer de 250 ml, en los cuales se añadieron 100 ml de caldo de papa dextrosa (PDB) autoclavada, cada matraz se inoculó con 1 ml de la solución de conidios previamente elaborada.

La fermentación se llevó a cabo durante 5 días con agitación, en condiciones favorables para el proceso, a una temperatura ambiente de aproximadamente 25°C y un cambio de coloración a un amarillo ámbar.

3.2.4.2.2. Fermentación líquida de *Trichoderma* sp. en medio agua desionizada

- Luego de finalizar la fermentación líquida de *Trichoderma* sp. en el medio PDB con agitación durante 5 días, procedimos a realizar la primera fase de filtración empleando papel filtro (Anexo 2B) donde también muestra un cambio de coloración a un amarillo ámbar. Este procedimiento tiene como objetivo separar los micelios de la solución de *Trichoderma* sp. en el medio PDB, que llamamos sobrenadante, donde se encuentran presentes los metabolitos secundarios (Anexo 2A).

- Una vez realizado la separación de los micelios se someten a otra fermentación en agua desionizada durante 5 días con agitación, bajo condiciones óptimas y a una temperatura ambiente de alrededor de 25°C.

3.2.4.2.3. Fermentación líquida de *Bacillus* sp.

En la preparación del medio de cultivo para *Bacillus* sp., se empleó un matraz de 1000 ml conteniendo un medio comercial suministrado por el CIBE, el cual estaba compuesto por sales, dextrosa y levadura que se utilizó para la escala de McFarland. En este proceso, se tomaron 10 ml del mencionado medio comercial para *Bacillus*, a lo que se le añadió el inóculo de la bacteria hasta alcanzar la escala de 1×10^8 McFarland, resultando en un volumen final de 990 ml en el matraz. Posteriormente, los 10 ml restantes del medio junto con el inóculo se reintrodujeron en el matraz original de 1000 ml que contenía una solución salina. Llevando así, a la fermentación líquida durante un período de 24 horas, con agitación continua y una temperatura ambiente de 30°C.

3.2.5. Esterilización por filtración

La técnica de filtración mediante filtro frío de jeringa se emplea con el propósito de separar partículas sólidas o impurezas de un líquido, donde estos filtros utilizados en este procedimiento constan de dos capas de filtración (Anexo 2C). Siendo la primera capa que se compone en una superposición de prefiltros de polipropileno con tamaños de poro de 10 μm y 5 μm . La segunda capa, que representa la etapa final de la filtración, corresponde a la membrana seleccionada y se posiciona por debajo de la superposición de los prefiltros para llevar a cabo la

separación eficiente de las partículas del líquido (Rivera et al., 2022). Con el fin de simplificar el proceso de filtración y evitar una posible saturación rápida de los filtros, se procede a centrifugar previamente todas las muestras a utilizar, que incluyen el sobrenadante de *Trichoderma* en PDB, el sobrenadante de *Trichoderma* en agua desionizada y el sobrenadante de *Bacillus*.

Luego de la centrifugación de cada uno de los sobrenadantes, se procedió a realizar la filtración por medio de un filtro jeringa donde se utiliza una jeringa de 5ml y filtros de 0,22µm, se filtraron todos los sobrenadantes mencionados con sus respectivos controles en condiciones estériles dentro de la cámara de flujo laminar del área de microbiología. Finalmente, se almacenaron 20ml de cada uno de los sobrenadantes estériles a 6°C y una vez completada la filtración con el filtro jeringa, los sobrenadantes se denominaron como "sobrenadante estéril de *Trichoderma*" y "sobrenadante estéril de *Bacillus*".

3.2.5.2. Mezcla de los sobrenadantes estériles (M)

Para la obtención de uno de nuestros tratamientos, se realizó una mezcla equitativa entre el sobrenadante estéril de *Trichoderma* en PDB y el sobrenadante estéril de *Bacillus*, en una proporción de 50/50. Esta mezcla se designó como "M" (Anexo 2D).

3.2.6. Pruebas antimicrobianas

3.2.6.1 Preparación de placas petri para los tratamientos y controles respectivos

Preparación de las cajas Petri con PDA para cada una de las cepas aisladas de síntomas de frutos de pitahaya que fueron una totalidad de 99 cajas Petri (11 cepas, 4 tratamientos y 4 controles). Con la finalidad de que cada caja de Petri se dividiera en cuatro pocillos para cada tratamiento y control, como la indica la figura a continuación.

Figura 5. Cajas Petri donde se ubicaron cada uno de los tratamientos con sus controles para la evaluación de las cepas aisladas de síntomas de fruto de la pitahaya roja

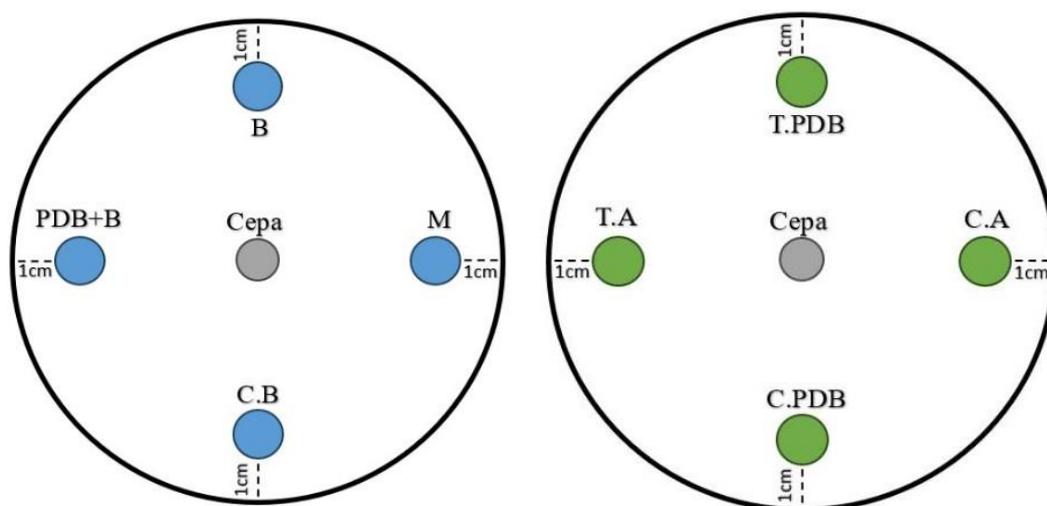


Tabla 6. Interpretación de tratamientos experimentales.

Tratamientos		Interpretación
N.-	Símbolo	
T1	T. PDB	Sobrenadante estéril de <i>Trichoderma</i> en PDB
T2	T. A	Sobrenadante estéril de <i>Trichoderma</i> en agua desionizada
T3	B	Sobrenadante estéril de <i>Bacillus</i>
T4	M	Mezcla de sobrenadante estéril de <i>Trichoderma</i> en PDB y Sobrenadante estéril de <i>Bacillus</i>

Nota: Para un mayor entendimiento para el lector se explica cada uno de los tratamientos y sus controles en las tablas., con las denominaciones correspondientes (anexo 5).

Tabla 7. Interpretación de controles en base a los tratamientos experimentales.

Controles de tratamientos		
N.-	Símbolo	Interpretación
Ctrl.1	C. PDB	Control de medio PDB
Ctrl.2	T. A	Control de agua
Ctrl.3	C.B	Control de medio <i>Bacillus</i>
Ctrl.4	PDB+B	Control mezcla de medio PDB y medio <i>Bacillus</i> .

Nota: Para un mayor entendimiento para el lector se explica cada uno de los tratamientos y sus controles en las tablas., con las denominaciones correspondientes (anexo 5).

3.2.6.2 Evaluación de las pruebas antimicrobiana

Se realizaron pruebas in vitro utilizando el método modificado de difusión en pocillos en medio PDA, donde cada pocillo presenta una concentración de 90 ul. El propósito de este estudio fue analizar, en modelos in vitro, por la eficacia, por lo que estos métodos cualitativos se destacan por su sencilla estandarización y son apropiados para los microorganismos, ya que no tienen altos requisitos y se reproducen rápidamente, con la finalidad de determinar la compatibilidad y el crecimiento de estos (Edwin et al., 2007). Luego de un período de 5 días se evaluaron pruebas cualitativas de la capacidad antimicrobiana de cada uno de los tratamientos y controles, en donde se tomaron medidas de la distancia(mm) entre el halo de inhibición del aislado y los pocillos que contenían el sobrenadante estéril de *Trichoderma* en PDB, sobrenadante estéril de *Trichoderma* en agua desionizada, sobrenadante estéril de *Bacillus*, mezcla de sobrenadante estéril de *Trichoderma* en PDB y sobrenadante estéril de *Bacillus*, con sus respectivas replicas, siendo estas 4 réplicas por cepa (Anexo 2D).

3.2.6.3 Recolección y preparación de microorganismos:

1. Aislamiento y Secuenciación de Microorganismos:

Se realizó el aislamiento de las secuencias, las mismas que fueron otorgadas por el CIBE, para poder modificarlas en el programa Finch TV y seleccionar la región de interés con mejor calidad, con el fin de eliminar las áreas de la región que se encuentran en los extremos de la cadena, iniciales y finales, ya que, son las menos optimas de la secuencia (Almonacid Suárez, 2018). Luego, para cada muestra de aislamiento, se creó una secuencia consenso, alineando las secuencias ITS1 e ITS4 en Geneious Prime, una vez obtenidas estas secuencias consenso dadas por el programa, se llevó a cabo una búsqueda para la identificación de las cepas aisladas, utilizando el algoritmo Blastn para la clasificación de cada hongo en una especie determinada que se basó en los porcentajes de similitud de la secuencia consenso con los reportes en la plataforma del NCBI, consiguiendo la identificación de las cepas aisladas de síntomas de la pitahaya roja.

3.2.6.4 Identificación molecular de cepas aisladas de síntomas de fruto de pitahaya roja

El ADN se extrajo del micelio fúngico, obtenido de cultivos puros en medio PDA, siguiendo el protocolo Cenis (Cenis, 1992). Para la secuenciación se amplificó la región ITS 1, 5.8S, ITS 2 mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando los cebadores

universales ITS-1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'). Se extrajo el ADN del micelio del hongo, obtenido de cultivos puros en medio Potato Dextrose Agar (PDA), siguiendo el protocolo Cenis (Cenis, 1992). La región ITS 1, 5.8S, ITS 2 se amplificó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando los cebadores universales ITS-1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5' -TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990).

El volumen de la reacción final fue de 25 µl; que contiene la siguiente mezcla en la concentración final: solución tampón 1X, dNTP 0,2 mM, Mg2Cl 1,5 mM, 0,4 µM de cada cebador, 0,5 U Taq polimerasa por reacción y 2 µl de ADN molde (10-50 ng). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con una desnaturalización inicial de 95°C por 10 min, seguida de 30 ciclos en serie de desnaturalización a 95°C por 1 min, hibridación a 55°C por 1 min y extensión a 72°C por 90 s, con un ciclo final a 72°C durante 10 min para extensión (Kumar & Shukla, 2005). Los productos de la PCR se visualizaron en gel de agarosa al 2%. Los productos de la PCR se visualizaron en gel de agarosa al 2%.

3.2.6.5 Análisis estadísticos:

Se dispusieron cuatro tratamientos utilizando los sobrenadantes y cuatro tratamientos controles los cuales son los medios de cultivo donde se realizó la fermentación líquida con cuatro repeticiones cada uno, para el diseño del experimento se utilizó un diseño completamente al azar (DCA), se analizaron los datos usando un ANOVA (Anexo 5.) y la comparación de las medias se realizó utilización Tukey (Anexo 4.) con un 95 % de confianza(Anexo 3.)

3.2.6.5.1 Almacenamiento de resultados:

Los resultados se registraron y se almacenaron adecuadamente para su posterior análisis. Finalmente, esta metodología refleja el proceso de la investigación con un énfasis en la evaluación de la actividad antimicrobiana de los metabolitos secundarios producidos por *Bacillus* sp. y *Trichoderma* sp. frente a las cepas aisladas de síntomas de la pitahaya roja.

Capítulo 4

Resultados y discusión

4.1. Identificación molecular de las cepas aisladas

Tabla 8. Identificación molecular de la secuenciación de la región ITS1, 5.1 S, ITS2 de cepas aisladas del fruto de pitahaya roja con la base de datos BLAST

Código	Cepa	Color	N° de identificación en Gen Bank	Porcentaje de identidad
PIT1-H2	<i>Fusarium</i>	Anverso: Blanco	EU926267.1	98.87%
	<i>dimerum</i>	Reverso: Amarillo		
PIT2-6	<i>Fusarium</i>	Anverso: Blanco	MK790046.1	92.90%
	<i>verticillioides</i>	Reverso: Amarillo		
PIT2A-6	<i>Fusarium</i>	Anverso: Blanco	MK790046.1	92.90%
	<i>verticillioides</i>	Reverso: Amarillo		
PIT2-H6	<i>Fusarium</i>	Anverso: Blanco	MG189935.1	99.81%
	<i>falciforme</i>	Reverso: Blanco		
PIT2-H9	<i>Fusarium</i>	Anverso: Blanco	MK790046.1	92.90%
	<i>verticillioides</i>	Reverso: Blanco		
PIT5-21	<i>Fusarium</i>	Anverso: Blanco	EU926267.1	98.57%
	<i>dimerum</i>	Reverso: Amarillo		
PIT2-8	<i>Curvularia</i>	Anverso: Negro	KJ909775.1	95.56%
	<i>cactivora</i>	Reverso: Negro		
PIT3-H10	<i>Curvularia</i>	Anverso: Gris	MN688803.1	99.81%
	<i>cactivora</i>	Reverso: Negro		
PIT3-H12	<i>Curvularia</i>	Anverso: Negro	MN688803.1	99.81%
	<i>cactivora</i>	Reverso: Negro		
PIT4-H19	<i>Curvularia</i>	Anverso: Gris	MN688803.1	99.81%
	<i>cactivora</i>	Reverso: Negro		
PIT5-H25	<i>Curvularia</i>	Anverso: Negro	MN688803.1	99.81%
	<i>cactivora</i>	Reverso: Negro		

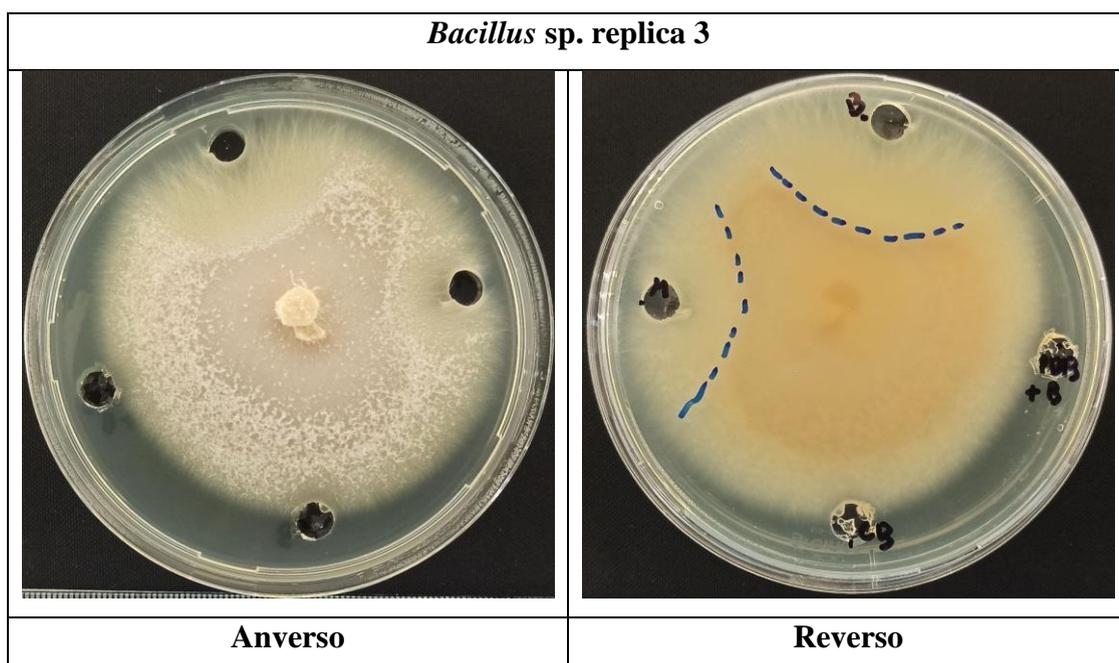
Según Crespo, (2022) señala que, en la identificación morfológica, se deben considerar dos parámetros específicos: el e-value, que debe aproximarse a un valor de 0,0, y la similitud genética, que debe oscilar entre el 90 al 100%. Aunque los niveles de similitud genética son

significativos, y a pesar de que la región ITS se utiliza comúnmente como un marcador de ADN para la identificación de hongos, el uso estándar de estos cebadores durante la PCR puede introducir sesgos, lo que puede llevar a errores en las secuencias y, como resultado, a una clasificación errónea de las especies en las categorías de basidiomicetos y ascomicetos, dependiendo de los iniciadores utilizados. Por lo tanto, se recomienda utilizar otros indicadores para comparar los resultados obtenidos. Según lo mencionado, se puede confirmar que todos los aislados muestran una similitud genética superior al 92,90% y un valor E de 0,0 en la región ITS.

4.2 Resultados de la evaluación de actividad antimicrobiana

4.2.1 Evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana del sobrenadante estéril de *Bacillus* y *Trichoderma* vs. *Fusarium dimerum* (PIT1-H2)

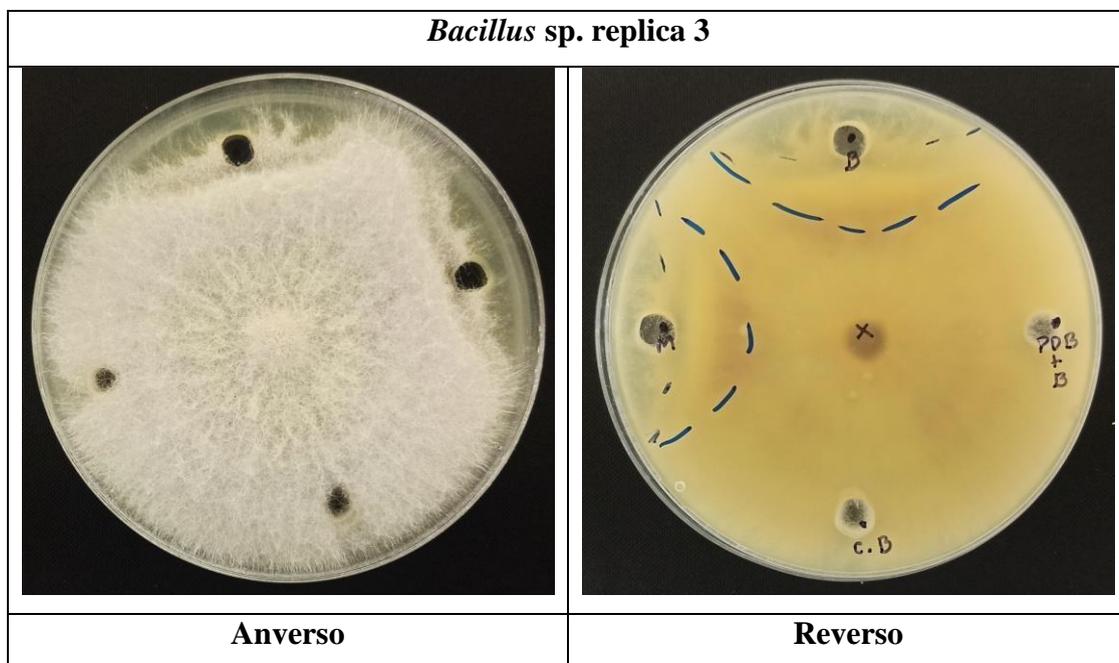
Figura 6. Actividad antimicrobiana (método modificado de difusión de pocillos en agar) del sobrenadante estéril de *Bacillus* (B) y la mezcla de sobrenadantes estériles de *Trichoderma* y *Bacillus* (M) frente a *Fusarium dimerum* con código de muestra PIT1-H2



La medida del diámetro del halo de inhibición en cada una de las cuatro replicas indica que el halo del hongo *Fusarium dimerum* con código de muestra PIT1-H2 se encontró por encima de los pocillos con sobrenadante estéril que contienen los metabolitos secundarios producidos por *Bacillus* sp. (B) y la mezcla de sobrenadantes estériles de *Trichoderma* y *Bacillus* (M). Sin embargo, a pesar de la ausencia de manifestación de actividad antimicrobiana por parte de los metabolitos secundarios ante la cepa *Fusarium dimerum*, se constató un efecto que incidió en su crecimiento o proceso evolutivo, tal como se visualiza en el reverso de la réplica.

4.2.2 Evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana del sobrenadante estéril de *Bacillus* y *Trichoderma* vs. *Fusarium verticillioides* (PIT2-6)

Figura 7. Actividad antimicrobiana (método modificado de difusión de pocillos en agar) del sobrenadante estéril de *Bacillus* (B) y la mezcla de sobrenadantes estériles de *Trichoderma* y *Bacillus* (M) frente a *Fusarium verticillioides* con código de muestra PIT2-6.

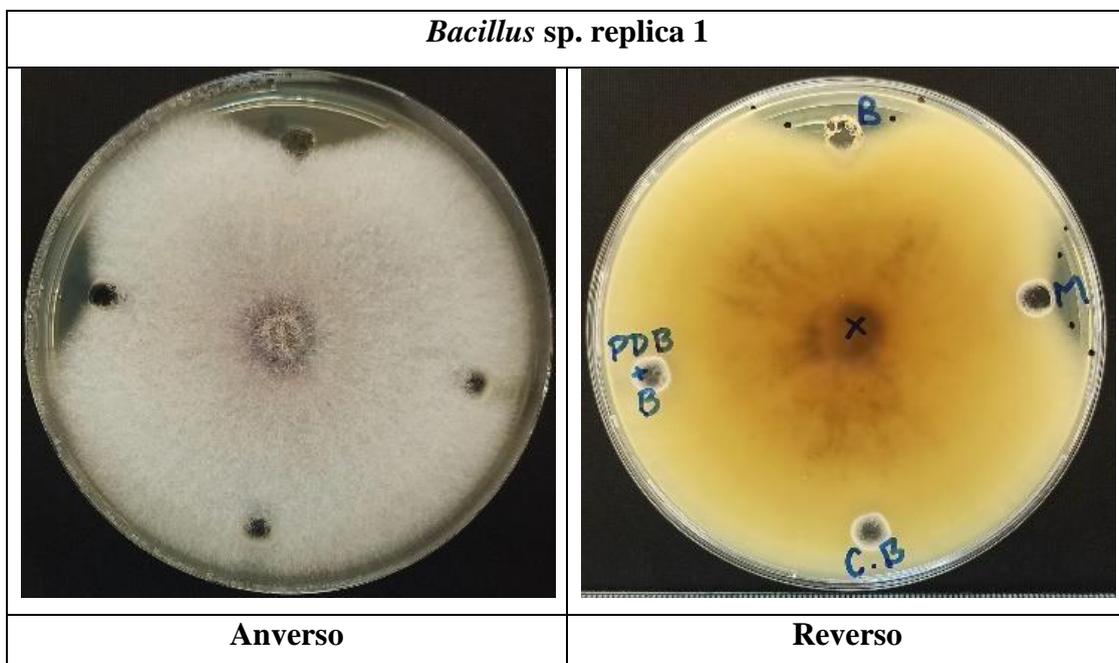


La medida del diámetro del halo de inhibición en las réplicas indica que el halo del hongo *Fusarium verticillioides* con código de muestra PIT2-6 se expandió hasta cercar los bordes de los pocillos que contenían el filtrado de los metabolitos secundarios producidos por *Bacillus* sp. (B) y la combinación de metabolitos secundarios de *Trichoderma* sp. y *Bacillus* sp. (M). Lo que indica que, aunque en menor medida, la actividad antimicrobiana de los metabolitos secundarios

producidos ejerció una acción inhibitoria sobre el crecimiento del hongo *Fusarium verticillioides*.

4.2.3 Evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana del sobrenadante estéril de *Bacillus* y *Trichoderma* vs. *Fusarium verticillioides* (PIT2A-6)

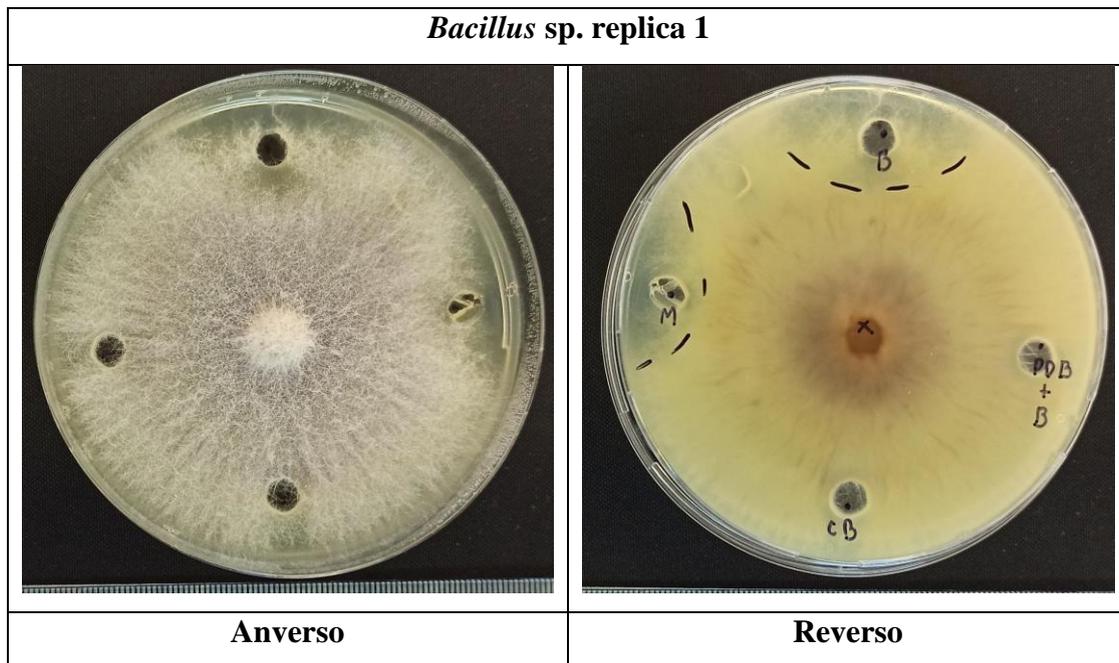
Figura 8. Actividad antimicrobiana (método modificado de difusión de pocillos en agar) del sobrenadante estéril de *Bacillus* (B) y la mezcla de sobrenadantes estériles de *Trichoderma* y *Bacillus* (M) frente a *Fusarium verticillioides* con código de muestra PIT2A-6.



La medida del diámetro del halo de inhibición en cada una de las réplicas indica que el halo del hongo *Fusarium verticillioides* con código de muestra PIT2A-6 se expandió hasta cercar los bordes de los pocillos que contenían el sobrenadante estéril de *Bacillus* (B) y la mezcla de sobrenadantes estériles de *Trichoderma* y *Bacillus* (M). Lo que indica que, aunque en menor medida, la actividad antimicrobiana de los metabolitos secundarios producidos ejerció una acción inhibitoria sobre el crecimiento del hongo *Fusarium verticillioides*.

4.2.4 Evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana del sobrenadante estéril de *Bacillus* y *Trichoderma* vs. *Fusarium falciforme* (PIT2-H6)

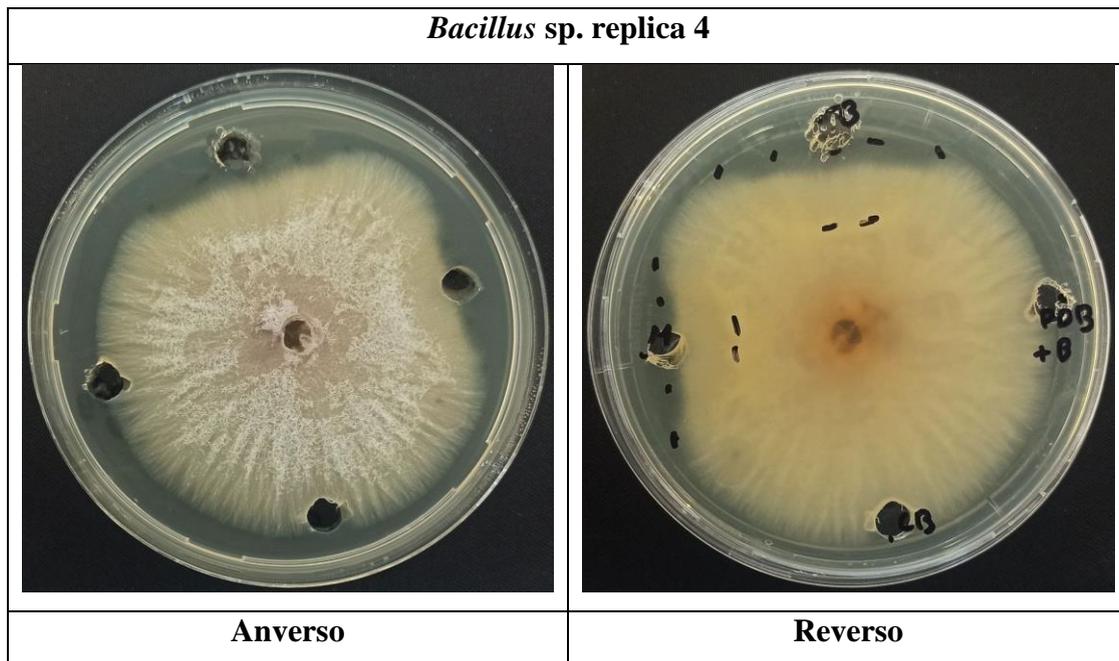
Figura 9. Actividad antimicrobiana (método modificado de difusión de pocillos en agar) del sobrenadante estéril de *Bacillus* (B) y la mezcla de sobrenadantes estériles de *Trichoderma* y *Bacillus* (M) frente a *Fusarium falciforme* con código de muestra PIT2-H6.



La medida del diámetro del halo de inhibición en cada una de las cuatro replicas indica que el halo del hongo *Fusarium falciforme* con código de muestra PIT2-H6 se encontró por encima de los pocillos con sobrenadante estéril que contienen los metabolitos secundarios producidos por *Bacillus* sp. (B) y la mezcla de sobrenadantes estériles de *Trichoderma* sp. y *Bacillus* sp. (M). Sin embargo, a pesar de la ausencia de manifestación de actividad antimicrobiana por parte de los metabolitos secundarios ante la cepa *Fusarium falciforme*, se constató un efecto que incidió en su crecimiento o proceso evolutivo.

4.2.5 Evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana del sobrenadante estéril de *Bacillus* y *Trichoderma* vs. *Fusarium verticillioides* (PIT2-H9)

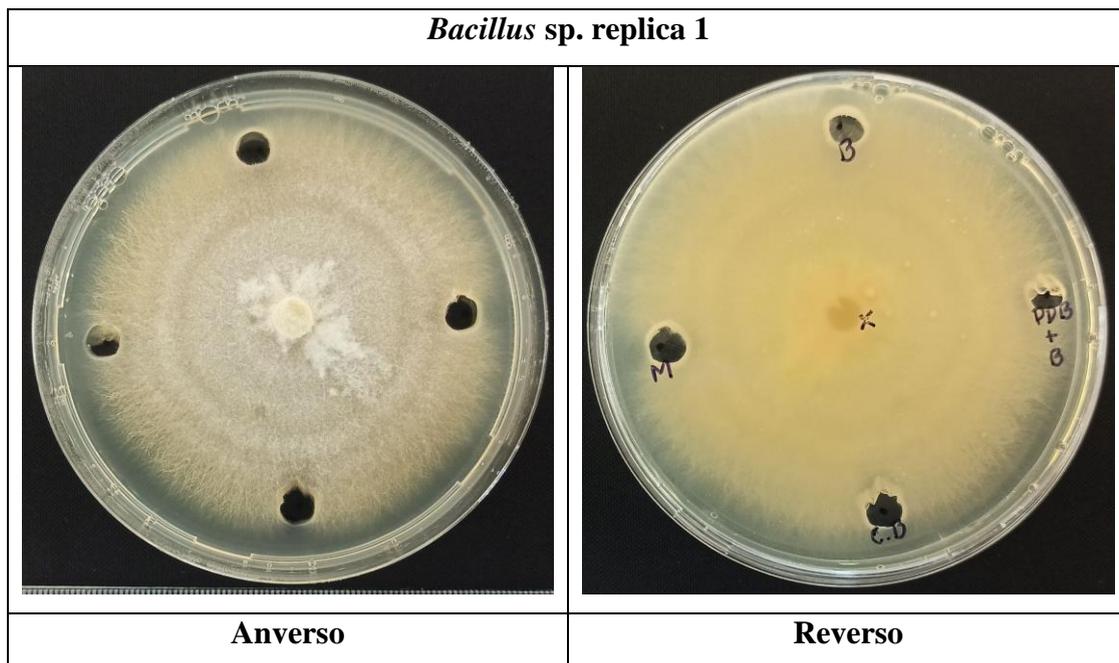
Figura 10. Actividad antimicrobiana (método modificado de difusión de pocillos en agar) del sobrenadante estéril de *Bacillus* (B) y la mezcla de sobrenadantes estériles de *Trichoderma* y *Bacillus* (M) frente a *Fusarium verticillioides* con código de muestra PIT2-H9.



La medida del diámetro del halo de inhibición en cada una de las réplicas indica que el halo del hongo *Fusarium verticillioides* con código de muestra PIT2-H9 se expandió hasta cercar los bordes de los pocillos que contenían el sobrenadante estéril que contienen los metabolitos secundarios producidos por *Bacillus* sp. (B) y la mezcla de sobrenadantes estériles de *Trichoderma* sp. y *Bacillus* sp. (M). Lo que indica que, aunque en menor medida, los metabolitos secundarios producidos ejercieron una acción inhibitoria sobre el crecimiento del hongo *Fusarium verticillioides*.

4.2.6 Evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana del sobrenadante estéril de *Bacillus* y *Trichoderma* vs. *Fusarium dimerum* (PIT5-21)

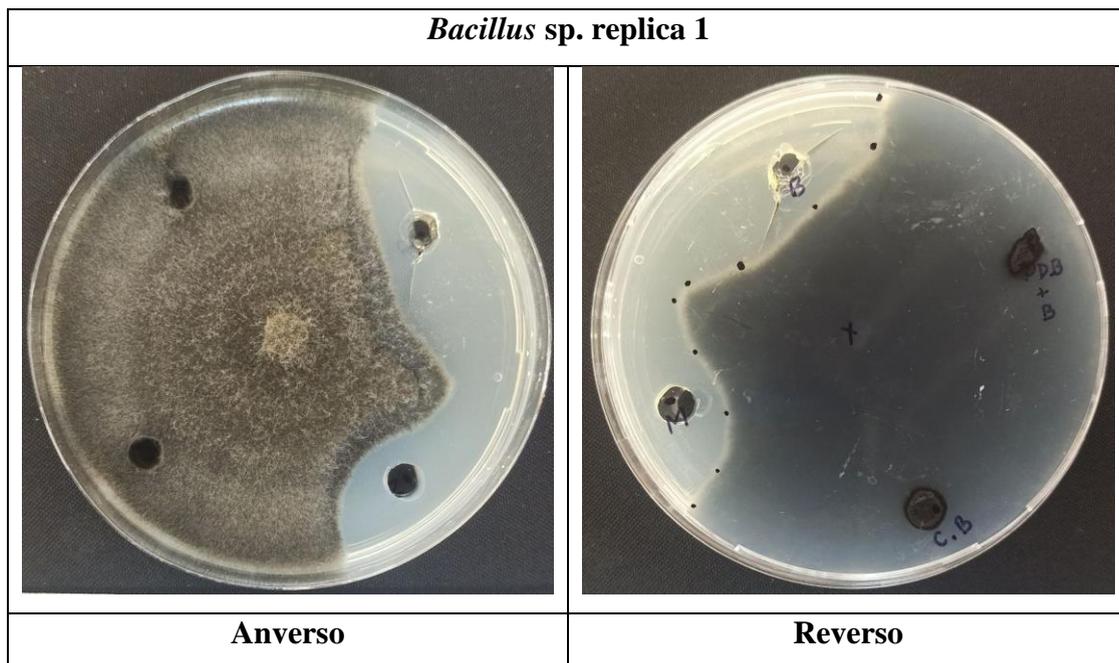
Figura 11. Actividad antimicrobiana (método modificado de difusión de pocillos en agar) del sobrenadante estéril de *Bacillus* (B) y la mezcla de sobrenadantes estériles de *Trichoderma* y *Bacillus* (M) frente a *Fusarium dimerum* con código de muestra PIT5-21.



La medida del diámetro del halo de inhibición en cada una de las cuatro replicas indica que el halo del hongo *Fusarium dimerum* con código de muestra PIT5-21 se encontró por encima de los pocillos con sobrenadante estéril que contienen los metabolitos secundarios producidos por *Bacillus* sp. (B) y la mezcla de sobrenadantes estériles de *Trichoderma* sp. y *Bacillus* sp. (M). Lo que sugiere que los metabolitos secundarios de *Trichoderma* sp. y *Bacillus* sp. no fueron efectivos para inhibir el crecimiento del hongo *Fusarium dimerum*.

4.2.7 Evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana del sobrenadante estéril de *Bacillus* y *Trichoderma* vs. *Curvularia cactivora* (PIT2-8)

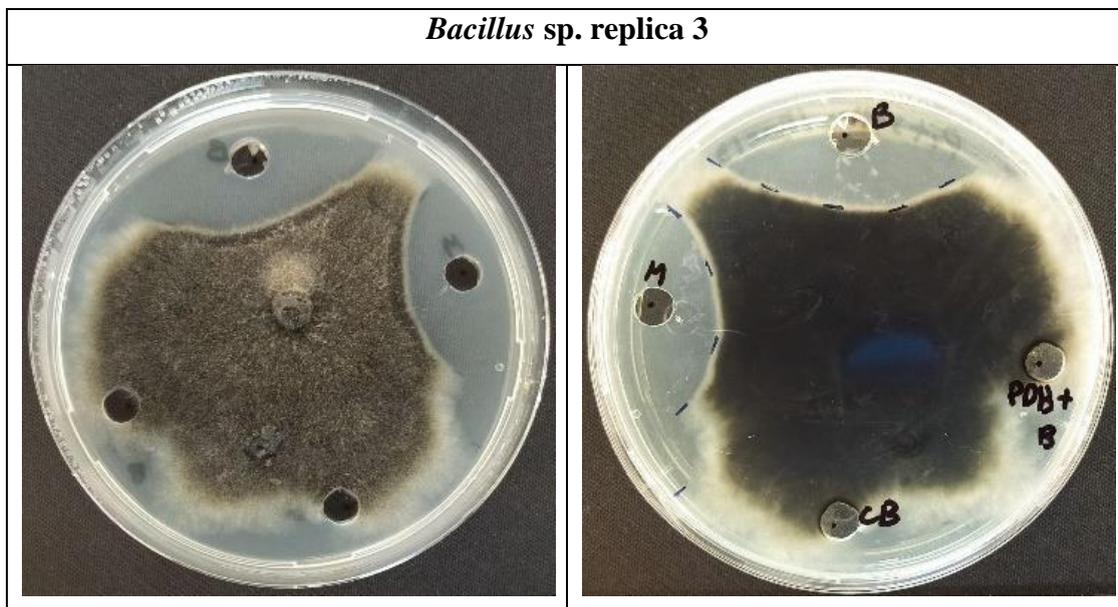
Figura 12. Actividad antimicrobiana (método modificado de difusión de pocillos en agar) del sobrenadante estéril de *Bacillus* (B) y la mezcla de sobrenadantes estériles de *Trichoderma* y *Bacillus* (M) frente a *Curvularia cactivora* con código de muestra PIT2-8.



La medida del diámetro del halo de inhibición en cada una de las cuatro replicas indica que el sobrenadante estéril que contienen los metabolitos secundarios producidos por *Bacillus* sp. (B) y la mezcla de sobrenadantes estériles de *Trichoderma* sp. y *Bacillus* sp. (M) causaron una inhibición significativamente alta en el crecimiento del hongo *Curvularia cactivora*. Lo que sugiere que los metabolitos secundarios producidos poseen un efecto potente en la supresión del crecimiento de dicho hongo.

4.2.8 Evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana del sobrenadante estéril de *Bacillus* y *Trichoderma* vs. *Curvularia cactivora* (PIT3-H10)

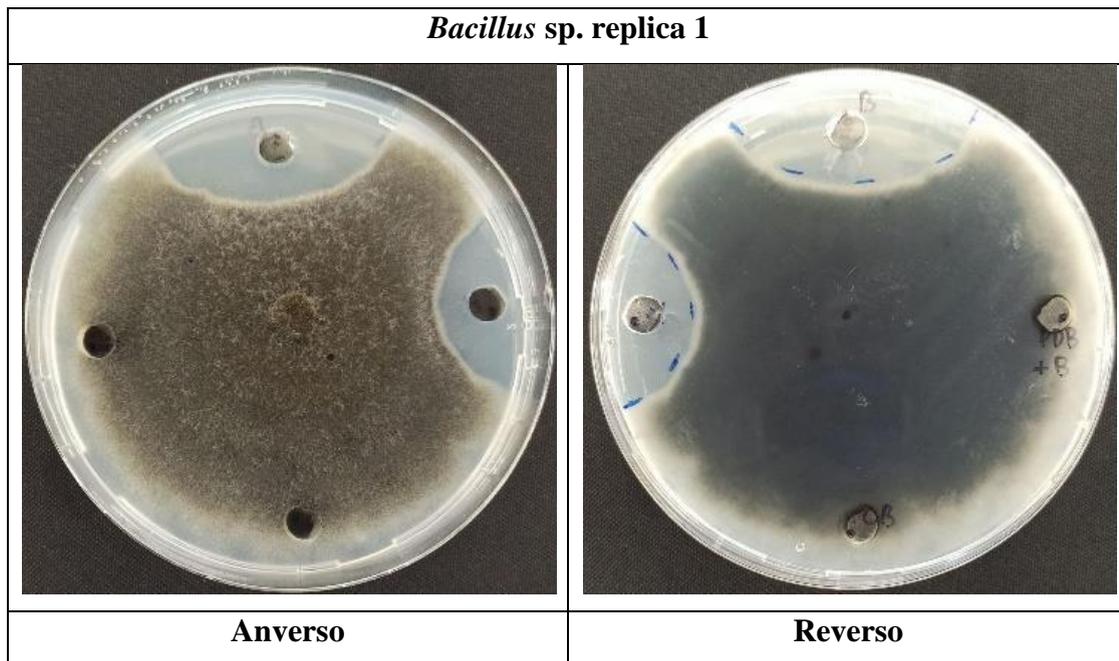
Figura 13. Actividad antimicrobiana (método modificado de difusión de pocillos en agar) del sobrenadante estéril de *Bacillus* (B) y la mezcla de sobrenadantes estériles de *Trichoderma* y *Bacillus* (M) frente a *Curvularia cactivora* con código de muestra PIT3-H10.



La medida del diámetro del halo de inhibición en cada una de las cuatro replicas indica que el sobrenadante estéril que contienen los metabolitos secundarios producidos por *Bacillus* sp. (B) y la mezcla de sobrenadantes estériles de *Trichoderma* sp. y *Bacillus* sp. (M) causaron una inhibición significativamente alta en el crecimiento del hongo *Curvularia cactivora*. Lo que sugiere que los metabolitos secundarios producidos poseen un efecto potente en la supresión del crecimiento de dicho hongo.

4.2.9 Evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana del sobrenadante estéril de *Bacillus* y *Trichoderma* vs. *Curvularia cactivora* (PIT3-H12)

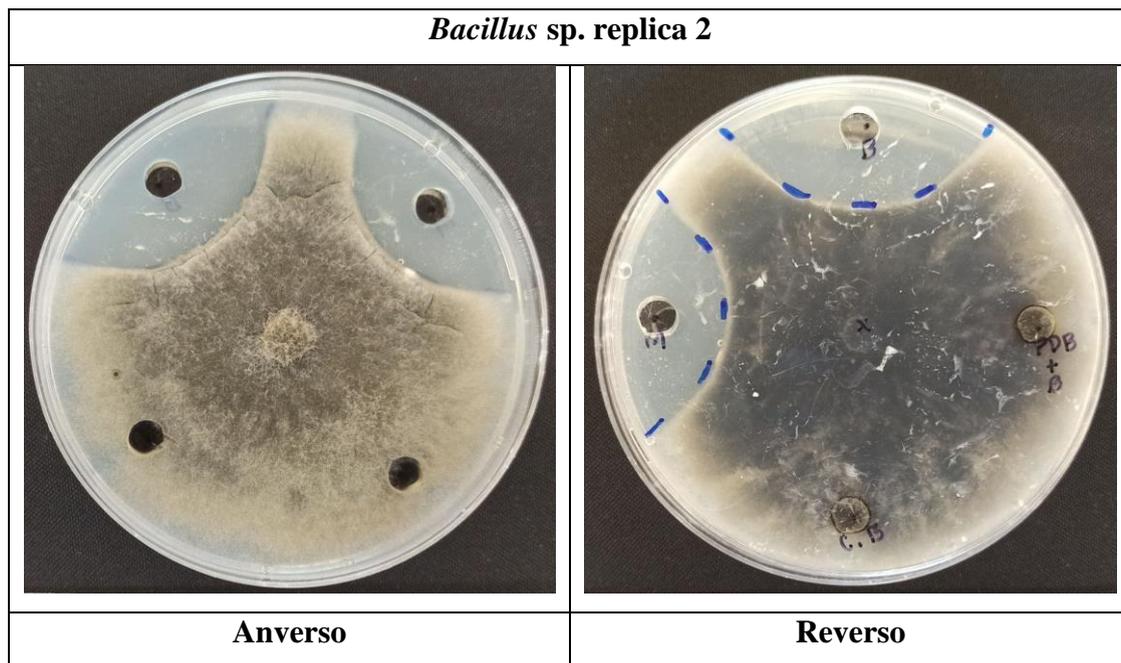
Figura 14. Actividad antimicrobiana (método modificado de difusión de pocillos en agar) del sobrenadante estéril de *Bacillus* (B) y la mezcla de sobrenadantes estériles de *Trichoderma* y *Bacillus* (M) frente a *Curvularia cactivora* con código de muestra PIT3-H12.



La medida del diámetro del halo de inhibición en cada una de las réplicas indica que los metabolitos secundarios producidos por *Bacillus* sp. (B) y la combinación de metabolitos secundarios de *Trichoderma* sp. y *Bacillus* sp. (M) causaron una inhibición significativamente alta en el crecimiento del hongo *Curvularia cactivora*. Esto sugiere que los metabolitos secundarios producidos poseen un efecto potente en la supresión del crecimiento de dicho hongo.

4.2.10 Evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana del sobrenadante estéril de *Bacillus* y *Trichoderma* vs. *Curvularia cactivora* (PIT4-H19)

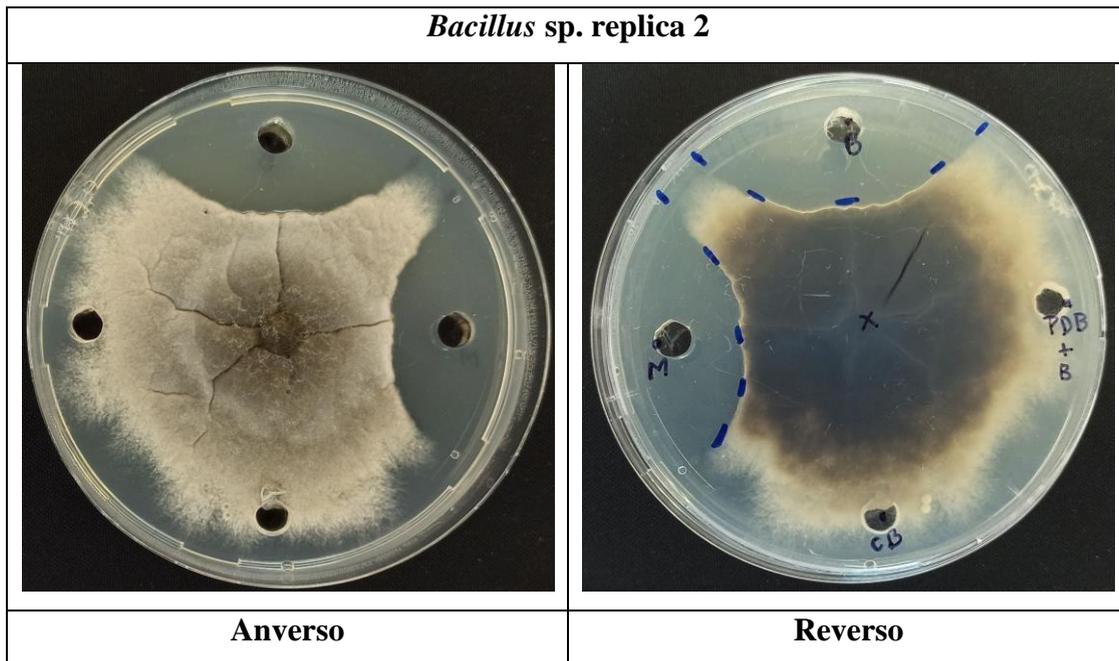
Figura 15. Actividad antimicrobiana (método modificado de difusión de pocillos en agar) del sobrenadante estéril de *Bacillus* (B) y la mezcla de sobrenadantes estériles de *Trichoderma* y *Bacillus* (M) frente a *Curvularia cactivora* con código de muestra PIT4-H19.



La medida del diámetro del halo de inhibición en cada una de las réplicas indica que los metabolitos secundarios producidos por *Bacillus* sp. (B) y la combinación de metabolitos secundarios de *Trichoderma* sp. y *Bacillus* sp. (M) causaron una inhibición significativamente alta en el crecimiento del hongo *Curvularia cactivora*. Esto sugiere que los metabolitos secundarios producidos poseen un efecto potente en la supresión del crecimiento de dicho hongo.

4.2.11 Evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana del sobrenadante estéril de *Bacillus* y *Trichoderma* vs. *Curvularia cactivora* (PIT5-H25)

Figura 16. Actividad antimicrobiana (método modificado de difusión de pocillos en agar) del sobrenadante estéril de *Bacillus* (B) y la mezcla de sobrenadantes estériles de *Trichoderma* y *Bacillus* (M) frente a *Curvularia cactivora* con código de muestra PIT5-H25.



La medida del diámetro del halo de inhibición en cada una de las réplicas indica que los metabolitos secundarios producidos por *Bacillus* sp. (B) y la combinación de metabolitos secundarios de *Trichoderma* sp. y *Bacillus* sp. (M) causaron una inhibición significativamente alta en el crecimiento del hongo *Curvularia cactivora*. Esto sugiere que los metabolitos secundarios producidos poseen un efecto potente en la supresión del crecimiento de dicho hongo.

4.2.12 Evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana del sobrenadante estéril de *Trichoderma* en medio PDB y agua desionizada vs. *Curvularia cactivora*

La medida del diámetro del halo de inhibición en cada una de las cuatro replicas indica que el halo del hongo *Curvularia cactivora* con código de muestra PIT2-8, PIT3-H10, PIT3-H12, PIT4-H19, PIT5-H25 se encontró por encima de los pocillos con sobrenadante estéril que contienen los metabolitos secundarios producidos por *Trichoderma* sp. en medio PDB y agua desionizada. Esto sugiere que los metabolitos secundarios de *Trichoderma* sp. no fueron efectivos para inhibir el crecimiento del hongo *Curvularia cactivora*

4.2.13 Evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana del sobrenadante estéril de *Trichoderma* en medio PDB y agua desionizada vs. *Fusarium* spp.

La medida del diámetro del halo de inhibición en cada una de las réplicas indica que el halo del hongo *Fusarium* spp. con código de muestra PIT1-H2, PIT2-6, PIT2A-6, PIT2-H6, PIT2-H9, PIT5-21 se encontró por encima de los pocillos con sobrenadante estéril que contienen los metabolitos secundarios producidos por *Trichoderma* sp. en medio PDB y agua desionizada. Esto sugiere que los metabolitos secundarios de *Trichoderma* sp. no fueron efectivos para inhibir el crecimiento del hongo *Fusarium dimerum* (Anexo 7).

4.2.14 Cepas madres y control de *Fusarium* spp. y *Curvularia cactivora*

En el Anexo 8 se presentan las estructuras macroscópicas de las cepas madre de *Fusarium* spp. y *Curvularia cactivora*, las cuales fueron aisladas y se obtuvieron de la sintomatología del patógeno en frutos del cultivo de pitahaya roja. Estas cepas se cultivaron en medio de agar papa dextrosa y fueron proporcionadas por el Centro de Investigaciones Biotecnológicas. Además, se muestran los subcultivos de cada una de las cepas expuestas, los cuales fueron realizados en agar papa dextrosa como control del patógeno. Esto se realizó con el fin de evaluar la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes estériles de *Bacillus* y *Trichoderma*, atribuyendo una referencia comparativa de los resultados obtenidos en relación con los hongos aislados.

4.3 Discusión de resultados obtenidos

En la tabla 9 se muestra la lectura de los halos de inhibición de las cepas aisladas, en donde podemos observar e interpretar la posible eficacia de cada uno de los tratamientos.

Tabla 9. Resultados de la actividad antimicrobiana de los tratamientos y controles frente a las cepas aisladas.

Cepas aisladas	Tratamientos y controles							
	T1	T2	T3	T4	Ctrl.1	Ctrl.2	Ctrl.3	Ctrl.4
Código	T. PDB	T. A	B	M	C. PDB	C. A	C. B	PDB+B
PIT1-H2	-	-	-	-	-	-	-	-
PIT2-6	-	-	14,4166	12,6667	-	-	-	-
PIT2A-6	-	-	11,4375	6,5	-	-	-	-
PIT2-H6	-	-	-	-	-	-	-	-
PIT2-H9	-	-	13,125	8,6667	-	-	-	-
PIT5-21	-	-	-	-	-	-	-	-
PIT2-8	-	-	16,0833	11,9167	-	-	-	-
PIT3-H10	-	-	14,875	14,125	-	-	-	-
PIT3-H12	-	-	15,8125	11,3125	-	-	-	-
PIT4-H19	-	-	16,375	14,5625	-	-	-	-
PIT5-H25	-	-	18,8125	16,5	-	-	-	-

Halo de inhibición: Promedio de halo de inhibición (mm), - sin inhibición

Los tratamientos que mostraron actividad antimicrobiana frente a los hongos aislados de pitahaya roja, fueron los tratamientos 3 y 4, correspondientes al sobrenadante estéril de *Bacillus* (B) y la mezcla de sobrenadantes estériles(M). Mientras que en los tratamientos 1 y 2, correspondientes al sobrenadante estéril de *Trichoderma* en PDB (T. PDB) y al sobrenadante estéril de *Trichoderma* en agua desionizada (T. A), no presentaron actividad antimicrobiana frente a las diversas cepas aisladas de pitahaya roja.

Esta ausencia de actividad antimicrobiana en las evaluaciones con *Trichoderma* sp. podría atribuirse a dos posibles factores. En primer lugar, es factible que el tiempo de incubación empleado en la fermentación líquida de *Trichoderma* no haya sido lo suficientemente prolongado como para permitir la generación de metabolitos secundarios con propiedades

antimicrobianas significativas. En segundo lugar, el tipo de especie de *Trichoderma* utilizada en el proceso podría haber sido un factor determinante en la ausencia o disminución de actividad antimicrobiana, frente a las diferentes cepas aisladas de patógenos.

Como menciona Chávez, (2006) en su estudio sobre la producción de *Trichoderma* sp. en donde el tiempo de incubación que ellos emplearon en la fermentación líquida de *Trichoderma* fue de 8 días, mientras que en nuestro trabajo experimental se optó por un período de incubación más corto, específicamente de 5 días.

Los valores que se exponen son el promedio del halo de inhibición (mm), presentes en diferentes cepas aisladas de sintomatología de patógenos del fruto de la pitahaya roja, en donde podemos destacar a la cepa del hongo *Curvularia cactivora* con código (PIT5-H25), ya que esta cepa presentó el promedio de halo de inhibición más elevado de los tratamientos 3 y 4, registrando promedios de 18,8125mm y 16,5mm, respectivamente. Esto sugiere que estos tratamientos son efectivos como agentes antimicrobianos en el control del hongo *Curvularia cactivora*.

Según Heydrich, (2012) en su estudio de sobre antagonismo de *Bacillus* spp. frente a hongos fitopatógenos del cultivo del arroz, comprobaron la capacidad de inhibición de miembros del género *Bacillus* sobre especies del género *Curvularia*.

Por otro lado, la cepa *Fusarium verticillioides* identificada con el código (PIT2A-6) presentó los promedios de inhibición más bajos en ambos tratamientos. En el tratamiento 3, el promedio fue de 11,4375 mm, mientras que en el tratamiento 4, se registró un promedio aún menor de 6,5 mm.

Estos resultados se difieren con las afirmaciones de Ariza Yesid y Sánchez Ligia, (2012) quienes postularon que la cepa de *Bacillus* sp. es altamente eficaz como control biológico, frente a *Fusarium* sp. manteniendo tasas de inhibición que oscilan entre el 70 al 100%. Por lo tanto, podríamos inferir que la efectividad de los sobrenadantes estériles de *Bacillus* sp. en nuestras evaluaciones podría estar vinculada a la concentración empleada en cada tratamiento.

4.4 Discusión del diseño estadístico

Los ensayos se realizaron un total de 11 cajas de Petri utilizadas en cada repetición por cuadruplicado, para cada evaluación *in vitro* de bacteria-hongo. Estos experimentos se desarrollaron bajo condiciones controladas con el objetivo de examinar la actividad

antimicrobiana de los sobrenadantes filtrados. Para este propósito, se aplicaron cuatro tratamientos distintos: dos sobrenadantes filtrados estériles de *Trichoderma* sp., un sobrenadante filtrado estéril de *Bacillus* sp. y una mezcla del sobrenadante estéril de *Trichoderma* sp en medio PDB y *Bacillus* sp. Estos tratamientos se sometieron a pruebas frente a un total de 11 patógenos, y se incluyeron 4 controles, cada uno correspondiente a uno de los tratamientos mencionados anteriormente.

En el análisis de los datos, se empleó el software Infostat versión 2017, utilizando un enfoque de análisis de varianza (ANOVA). Las diferencias entre las medias se evaluaron mediante la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). Finalmente, se presenta una discusión detallada de los resultados obtenidos en estas pruebas, destacando las observaciones significativas y sus implicaciones en relación con la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes filtrados y su efecto en la inhibición de los patógenos estudiados.

En la tabla 10 se muestran los promedios de halos de inhibición de *Bacillus* y de la mezcla aplicados ante los patógenos como control biológico, estos datos se tomaron en cuenta para poder analizar una variación en el ensayo. Se realizó una prueba de normalidad para determinar el análisis estadístico que será empleado, el cual la prueba resultó ser paramétrica lo que se aplicaría un análisis ANOVA de una varianza. El análisis de ANOVA permite verificar una variabilidad significativa entre las medias de las muestras obtenidas, en donde se realizó un análisis de varianza por cada control. Se puede analizar que la media más significativa en el análisis es el de 18,8125 que corresponde a la media en *Bacillus* con la cepa 8, detallando que este control es muy eficiente en cuando a la inhibición del hongo fitopatógeno. De igual manera con el ANOVA, en la muestra de la mezcla con la cepa 8 también tiene un valor significativo, permitiendo visualizar una eficacia ante la inhibición de patógenos con un valor de 16,5, siendo el más alto.

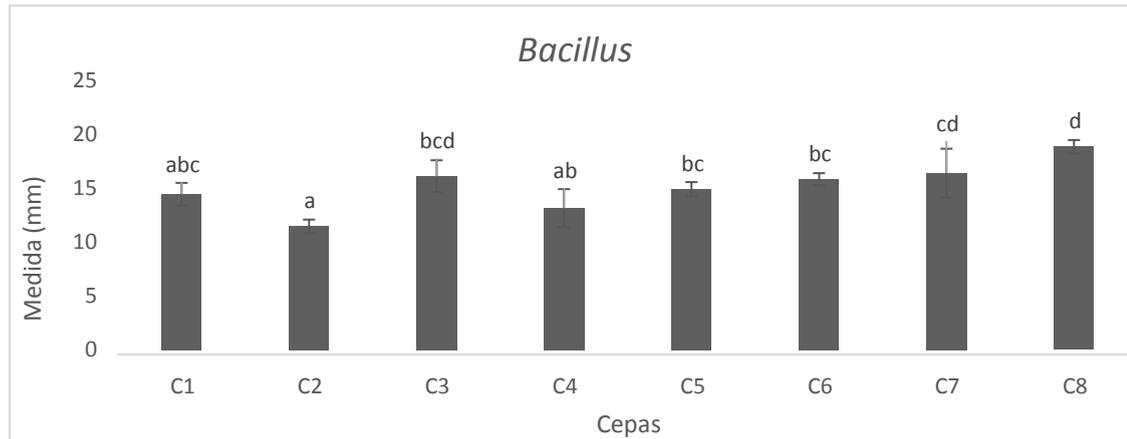
Tabla 10. Desviación estándar de del porcentaje de inhibición de *Bacillus* y mezcla.

Cepa	BACILLUS	Desve	Mezcla	
C1	14,4166667	1,04748376	12,6666667	0,82495791
C2	11,4375	0,625	6,5	0,93541435
C3	16,0833333	1,47667043	11,9166667	0,82495791
C4	13,125	1,76186454	8,66666667	0,96465308
C5	14,875	0,66143783	14,125	1,88745861
C6	15,8125	0,55433895	11,3125	1,32876823
C7	16,375	2,25924029	14,5625	0,875

C8 | 18,8125 0,625 16,5 1,5411035

Con este análisis el valor de la probabilidad $P = 0,001$ lo que es menor que 0,05.

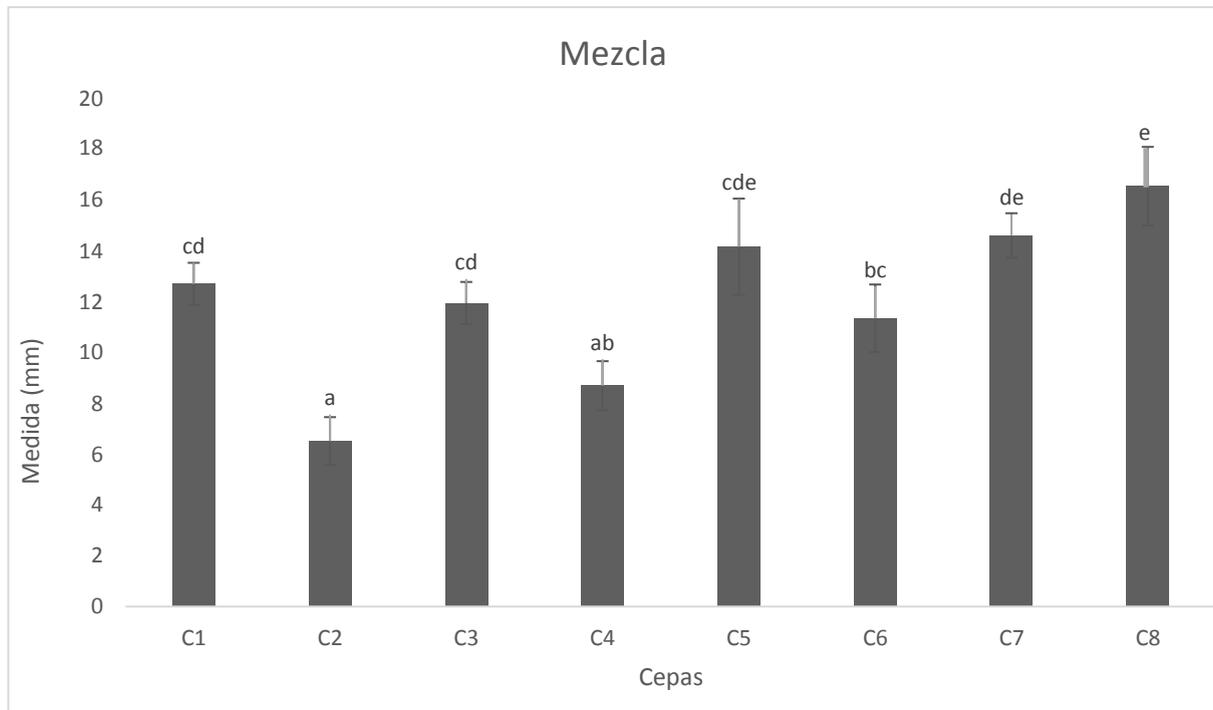
Figura 17. Histograma de Tukey, ensayo con *Bacillus*.



Para la verificación de las variaciones entre medias se tomó en cuenta el análisis de Tukey que permite verificar la variación más significativa entre las medias de las variables, donde se compararan las cepas ante la medida en mm del halo de inhibición. Donde con una comparación entre variables se puede ver una relación muy variada entre los datos, permitiendo visualizar la de mayor medida en mm es la de la cepa 8, siendo el control de mayor eficacia, mientras que la de menor significancia en variación es la cepa 2 que tiene un halo de inhibición menor, pudiendo comparar con el resultado de varianza del cual se puede asegurar que en *Bacillus* ante la cepa 8 es muy eficaz.

Se analizó de igual manera la prueba de Tukey para la mezcla, en donde se evaluará así mismo la medida en mm del halo de inhibición con la cepa de hongo patógeno, evidenciando que la prueba es eficaz como aplicativo de control biológico. En la Figura 18 se puede apreciar cómo se exponen las variaciones de las medias entre las muestras pudiendo visualizar una de mayor variación que es la de mezcla contra la cepa 8.

Figura 18. Histograma de Tukey, ensayo de Mezcla.



Capítulo 5

Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

En esta investigación tuvo lugar la identificación molecular de las cepas aisladas de fruto de pitahaya roja con el uso de herramientas bioinformáticas como FinchTv, Geneious primer y NCBI permitiendo una caracterización precisa de las cepas aisladas, lo que es fundamental para comprender la diversidad de patógenos que afectan a la pitahaya roja y desarrollar estrategias de control específicas.

En este ensayo se realizó una evaluación exhaustiva de la actividad antimicrobiana de metabolitos secundarios producidos por cepas de *Trichoderma* y *Bacillus*, dándole un enfoque central a su capacidad para controlar hongos aislados de pitahaya roja (*Hylocereus undatus*) mediante fermentación líquida utilizando métodos que permitieron la obtención de una cantidad significativa de metabolitos, lo que respalda la viabilidad de este enfoque como una estrategia potencial para la producción de agentes antimicrobianos naturales.

Por último, la actividad antimicrobiana utilizó el método de difusión de pocillos en agar, revelando resultados prometedores en cuanto a la capacidad de los metabolitos secundarios de *Trichoderma* y *Bacillus* para inhibir el crecimiento de *Curvularia cactivora* y *Fusarium* spp. Estos hallazgos sugieren que estos metabolitos podrían desempeñar un papel importante en el control de hongos patógenos específicos en la pitahaya roja.

Finalmente, esta investigación contribuye significativamente al conocimiento sobre el potencial de los metabolitos secundarios de *Trichoderma* y *Bacillus* como agentes antimicrobianos para el control de hongos en la pitahaya roja. Además, la identificación precisa de los hongos aislados proporciona una base sólida para futuras investigaciones y estrategias de manejo de enfermedades en esta importante fruta tropical.

5.2 Recomendaciones

- Realizar pruebas de patogenicidad para la identificación de las cepas aisladas de fruto de pitahaya roja.
- Aumentar las concentraciones de cada uno de los sobrenadantes estériles.
- Probar la experimentación en diferentes tipos de especies de *Trichoderma*

Bibliografía

- Ana María Mesa-Vanegas, A. M.-O. (2019). Metabolitos secundarios en *Trichoderma* spp. y sus aplicaciones biotecnológicas agrícolas. *scielo.org.co*, 1-13.
- Andrés Cadena, K. M. (2020). Evaluación de la expresión de los genes involucrados en la biosíntesis de lipopéptidos antimicrobianos en *Bacillus megaterium* mediante RT-qPCR. *dspace.ups.edu.ec*, 91.
- Ariza Yesid, S. L. (2012). Determinación de metabolitos secundarios a partir de *Bacillus subtilis* efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. *scielo.org.co*.
- Barroso Albarracín, J. B., Carreras Egaña, A., Valderrama Rodríguez, R., Chaki, M., Begara Morales, J. C., Mercado Blanco, J., . . . Carballo Codón, A. (2013). cepa de *Trichoderma* otil para el tratamiento y/o prevención de infecciones provocadas por hongos pertenecientes al genero *Verticillium*. Sevilla, España: Universidad de Jaén, Campus las Lagunillas.
- Calle, P. M. (2019). *Control biológico del moho gris (Botrytis cinerea) en cultivos de fresa (Fragaria vesca L.) mediante hongos filamentosos antagonistas*. Cuenca, Ecuador: Universidad Politécnica Salesiana .
- Castillo, G. F. (2020). Efecto de los Agroquímicos en Salud Pública y Medio Ambiente. Agroquímicos En Salud Pública y Medio Ambiente. *Mendeley*.
- CRESPO, J. B. (2022). Aislamiento, caracterización e identificación de hongos filamentosos asociados con síntomas de cáncer en plantaciones de pitahaya (*Hylocereus* spp.). *dspace.esPOCH.edu.ec*.
- Cruz, J. A. (2015). Pitahaya (*Hylocereus* spp.) a fitogenetic resource with an history. *scielo*.
- DGSV, D. G. (2020). *Curvularia lunata*. Tecámac, Estado: SaderSenasica.
- DGSV-CNRF. (2020). *Podredumbre de raíces por Fusarium spp (Hypocreales: Nectriaceae) en maíz*. Tecámac, Estado de México: Sader-Senasica. Dirección General de Sanidad Vegetal-Centro Nacional de Sanidad Vegetal-Centro Nacional de.
- Diéguez-Santana, K. (2020). Evaluación del impacto ambiental del cultivo de la pitahaya.

ica.gov.co.

- Diéguez-Santana, K. (2020). Evaluación del impacto ambiental del cultivo de la pitahaya, Cantón Palora, Ecuador. *redalyc.org*.
- García, E. D., Valenzuela-Quintanar, A. I., Troncoso-Rojas, R., González-Mendoza, D., & Tiznado-Hernández, M. E. (2022). *Metabolitos Bioactivos De Trichoderma Para El Control De Hongos Postcosecha En Frutas Y Hortalizas*. California : Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo Instituto de Ciencias Agrícolas,.
- García, M. P. (2006). Producción de trichoderma sp. y evaluación de su efecto en cultivo de crisantemo (*dendranthema grandiflora*). *javeriana.edu.co*.
- García, P. P., Valdez, D. R., & Vasquez, J. H. (2022). *Control biológico de los hongos fitopatógenos Alternaria y Fusarium con Bacillus subtilis y Bacillus pumilus in vitro e in vivo en plantas de jitomate*. Recuperado el Agosto de 2023, de <https://hdl.handle.net/11117/8485>
- Guarda, P. M. (2020). Avaliação da contaminação por pesticidas nos sedimento do rio formoso no estado do tocantins. *Revista Interdisciplinar da Universidade Federal do Tocantins* .
- Heydrich, M. (2012). Antagonismo de *Bacillus* spp. frente a hongos fitopatógenos del cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *scielo.sld.cu*.
- INIAP. (2018). Evaluación de las Características Físico-químicas de Pitahaya Amarilla. *iniap.gob.ec*.
- J. Roselló, F. S. (Octubre de 2005). *Trichoderma harzianum* Rifai frente a *Botrytis cinerea* Pers.: estudios ecofisiológicos "in vitro". *Phytoheneroteca*, pág. 172.
- Jiménez-Quintero CA, P.-E. A. (2017). Riesgos en la salud de agricultores por uso y manejo de plaguicidas. *www.scielo.org.co*.
- Knight, C. B. (2018). The first report of antifungal lipopeptide production by a *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* strain. *ElSevier*, 40-46.
- Ku, Y., Yang, N., Pu, P., Mei, X., Cao, L., Yang, X., & Cao, C. (2021). *Biocontrol Mechanism of Bacillus subtilis C3 Against Bulb Rot Disease in Fritillaria taipaiensis P.Y.Li* (Vol. 12). *Frontiers in Microbiology*. doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.756329>
- Lawson, L. (2023). *Pudrición de la raíz por Rhizoctonia: Los síntomas y cómo controlarlos*. Recuperado el Agosto de 2023, de <https://www.pthorticulture.com/es/centro-de-formacion/pudricion-de-la-raiz-por-rhizoctonia-los-sintomas-y-como-controlarlos/>
- Liliana Caycedo Lozano, L. C. (2020). Las bacterias, su nutrición y crecimiento. *scielo.org.co*.
- Lisbeth Espinoza, S. B. (18 de marzo de 2022). *espol.edu.ec*. Obtenido de *espol.edu.ec*.
- Martínez, H. O. (2017). Control biológico de fitopatógenos mediante aislados de *Trichoderma* spp. *Agro Productividad*.
- Montalván, D. M. (2022). Efecto de la temperatura y tiempo de almacenamiento en la calidad

- del polen de pitahaya roja (*Hylocereus sp.*), Cantón La Joya De Los Sachas, Provincia De Orellana. Orellana, Ecuador: Escuela Superior Politécnica del Chimborazo Sede Orellana .
- Ntushelo, K., Ledwaba, L. K., Rauwane, M. E., Adebo, O. A., & Berka, P. (2019). *The Mode of Action of Bacillus Species against Fusarium graminearum, Tools for Investigation, and Future Prospects* (Vol. 11). National Library of Medicine. doi:10.3390/toxins11100606
- Ruiz, V. V., Galvez, G. T., Villa, E. D., Isela, F., Santoyo, G., & Santos-Villalobos, S. d. (2020). *Lipopéptidos producidos por agentes de control biológico del género Bacillus: revisión de herramientas analíticas utilizadas para su estudio* (Vol. 11). doi:https://doi.org/10.29312/remexca.v11i2.2191
- Sarti, G. C. (2019). *Metabolitos con actividad antifúngica producidos por el Género Bacillus* (Vol. 5). (U. d. Sociales, Ed.) Recuperado el Agosto de 2023, de <http://dspace.uces.edu.ar:8180/xmlui/handle/123456789/5377>
- Tingting Li, J. T. (2020). Co-culture of *Trichoderma atroviride* SG3403 and *Bacillus subtilis* 22 improves the production of antifungal secondary metabolites. *ELSEVIER*, 8.
- Travez, C., & Karina, M. (2018). *Evaluación del efecto de lipopéptidos antifúngicos producidos por Bacillus Subtilis Ctpx S2-1, en la inducción de expresión de genes de crecimiento y resistencia de Lupinus Mutabilis*. (Q. U. Americas, Ed.) Recuperado el Agosto de 2023, de <http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/10259>
- Viteri Rodríguez, J. A. (2020). Análisis epidemiológico de la toxicidad asociada a la utilización de plaguicidas en la parroquia Benítez. Dilemas Contemporáneos: Educación, Política y Valores. *Mendeley*.
- Wang, X., & Zhao, D.-L. (2018). *Application and Mechanisms of Bacillus subtilis in Biological Control of Plant Disease*. doi:10.1007/978-981-10-8402-7_9
- Yasmina Marin, M. H.-R. (2020). Multi-locus phylogeny of the genus *Curvularia* and description of ten new species. *Mycological Progress*, 559–588.
- Yumbla-Crespo, J. (2022). *dspace.esPOCH.edu.ec*. Obtenido de dspace.esPOCH.edu.ec.
- Jorge Poveda y Daniel Eugui. (2022). Combined use of *Trichoderma* and beneficial bacteria (mainly *Bacillus* and *Pseudomonas*): Development of microbial synergistic bio-inoculants in sustainable agriculture. *ELSEVIER*, 19.
- Benedicto Martínez, Danay Infante, Belkis Peteira. (2015). Taxonomía polifásica y variabilidad en el género *Trichoderma*. *Protección Vegetal*, 30(2224-4697), 2015. <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v30s1/rpv004s15.pdf>
- González, B. R., Arizmendi, G. D., & Velasco, R. G. (2019). *Trichoderma*: su potencial en el desarrollo sostenible de la agricultura. *Biotecnología Vegetal*, 19(4), 237-248. <http://scielo.sld.cu/pdf/bvg/v19n4/2074-8647-bvg-19-04-237.pdf>
- Prieto, S., Rodríguez, M. A. P., Silva, R. M., De La Varga, A. L., López, Ó., González, Á. P.,

- Vázquez, E. S., Gutiérrez, S., & Luelmo, P. A. C. (2012). Control biológico de hongos fitopatógenos de alubia con «Trichoderma». *Tierras de Castilla y León: Agricultura*, 195(195), 70-75. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4020918>
- García-Núñez, H. G., Martínez-Campos, Á. R., Hermosa-Prieto, M. R., Monte-Vázquez, E., Aguilar-Ortigoza, C. J., & González-Esquivel, C. E. (2017). Caracterización morfológica y molecular de cepas nativas de trichoderma y su potencial de biocontrol sobre *Phytophthora infestans*. *Revista mexicana de fitopatología*, 35(1). <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1605-4>
- Vanegas, A. M. M., Marin, A., & Osorno, J. L. (2020). Metabolitos secundarios en trichoderma Spp. y sus aplicaciones biotecnológicas agrícolas. *Actualidades Biológicas*, 41(111), 1-13. <https://doi.org/10.17533/udea.acbi.v41n111a02>
- García-Núñez, H. G., Martínez-Campos, Á. R., Hermosa-Prieto, M. R., Monte-Vázquez, E., Aguilar-Ortigoza, C. J., & González-Esquivel, C. E. (2017a). Caracterización morfológica y molecular de cepas nativas de Trichoderma y su potencial de biocontrol sobre *Phytophthora infestans*. *Revista mexicana de fitopatología*, 35(No.1), 0185-3309. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1605-4>
- Carlos Perez Ruiz, C. M. (2018). Morfología del Bacillus subtilis en Crecimiento Fractal No Lineal. Recuperado el 21 de Julio de 2023, de <https://vinculacion.dgire.unam.mx/vinculacion-1/Memoria-Congreso-2013/trabajos-ciencias-biologicas/biologia/10.pdf>
- Dragana Miljakovic, J. M.-T. (2020). La importancia de Bacillus spp. en Supresión de Enfermedades y Promoción del Crecimiento de Cultivos de Campo y Hortalizas. *Microorganismos*. doi:10.3390/microorganisms8071037
- Helene Cawoy, D. D. (2015). Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by Bacillus subtilis/amyloliquefaciens. *microbial biotechnology*. doi:<https://doi.org/10.1111/1751-7915.12238>
- Lozada, J. P. (2010). AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE Bacillus spp COMO FIJADORES BIOLÓGICOS DE NITROGENO Y SOLUBILIZADORES DE FOSFATOS EN DOS MUESTRAS DE BIOFERTILIZANTES COMERCIALES. Bogota. Recuperado el 21 de Julio de 2023
- Luz Adriana Pedraza, C. E.-V. (2019). MECANISMOS DE ACCIÓN DE Bacillus spp. (Bacillaceae) CONTRA MICROORGANISMOS FITOPÁTOGENOS DURANTE SU INTERACCIÓN CON PLANTAS. Recuperado el 21 de Julio de 2023, de <http://www.scielo.org.co/pdf/abc/v25n1/0120-548X-abc-25-01-112.pdf>
- Maria Fernanda Villareal, E. D. (2018). El género Bacillus como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Texcoco*. Recuperado el 2023, de <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>
- Martinko, M. M. (2010). *Brock Biology of Microorganisms* (11th ed. ed.). Prentice Hall. Recuperado el 21 de Julio de 2023, de ISBN 0-13-144329-1

- Omaish Alqahtani, P. S. (2023). Production of antibacterial compounds using *Bacillus* spp. isolated from thermal springs in Saudi Arabia. *Saudi Pharmaceutical Journal*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jsps.2023.05.015>
- Rogers, K. (7 de Mayo de 2020). *Bacillus*-bacteria. *Encyclopedia Britannica*. Recuperado el 21 de Julio de 2023, de <https://www.britannica.com/science/bacillus-bacteria>
- Simon Caulier, C. N. (2019). Overview of the Antimicrobial Compounds Produced by Members of the *Bacillus subtilis* Group. *Frontiers*. doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00302>
- Xiaopei Zhang, A. A.-D. (2020). Applications of *Bacillus subtilis* Spores in Biotechnology and Advanced Materials. *Journals asm* . doi:<https://doi.org/10.1128/AEM.01096-20>
- Acosta, C. R. B., Velandia, C. a. M., Rivero, L. F. V., Álvarez, M. I. G., Grijalba, E., May, A. S., García, A. D., Rodríguez, M. X. G., Cala, E. L. S., Jaramillo, S., Ángel, J. E., & Prado, A. M. C. (2010). *Trichoderma koningiopsis* Th003 alternativa biológica para el control de *Rhizoctonia solani* en el cultivo de papa. In *Corporacion Colombiana de Investigacion Agropecuaria - Corpoica eBooks*. <https://doi.org/10.21930/978-958-740-076-2>
- Gutiérrez, K. a. V., & Montañez, R. N. L. (2020). Guía Técnica del cultivo de pitahaya (*Hylocereus megalanthus*) en la región Amazonas. Instituto Nacional De Innovación Agraria.
- Hernandez, E., Castillo, F. D. H., Herrera, R. R., Fuentes, S. E. V., Drouaillet, B. E., & Santillán, J. a. L. (2016). Actividad antagonica de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia solani* in vitro. *Investigación Y Ciencia: De La Universidad Autónoma De Aguascalientes*, 24(67), 5–11. <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/6137740.pdf>
- Hoyos-Carvajal, L., Chaparro, P., Abramsky, M., Chet, I., & Orduz, S. (2008). Evaluación de aislamientos de *Trichoderma* spp. contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* bajo condiciones in vitro y de invernadero. *Journal of Science and Research*, 26(3), 451–458.
- Infante, D., Martínez, B., González, N., & Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista De Protección Vegetal*, 24(1), 14–21. <http://revistas.censa.edu.cu/index.php/RPV/article/download/542/670>
- Jenny, V., & German, A. (1999). Control biológico de la pudrición basal del tallo en Crisantemo (*Dendranthema grandiflorum*) ocasionada por *Sclerotinia sclerotiorum* con algunos aislamientos de *Trichoderma* sp. y *Gliocladium* sp. *DOAJ* (DOAJ: Directory of Open Access Journals). <https://doaj.org/article/c7cbe1683c274199a61f1142bff31736>
- Meza, C. L. S., Barbosa, R. J. F., Valero, N. V., Carrillo, R. M. G., & Redondo, A. R. P. (2008). Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., asociado a la marchitez en maracuyá. *DOAJ* (DOAJ: Directory of Open Access Journals). <https://doaj.org/article/1a1d74917d1c4fc3a8c7415a7711a31f>
- NIAP. (2020). Control Biológico: Una herramienta para una agricultura sustentable, un punto de vista de sus beneficios en Ecuador. *Journal scielo*.

- Ana María Mesa-Vanegas, Alexander Marin,. (2019). Metabolitos secundarios en *Trichoderma* spp. y sus aplicaciones biotecnológicas agrícolas.
- Mora, D. P. D. (2012). Manejo fitosanitario del cultivo de la pitahaya *Hylocereus megalanthus* (K. Schum. ex Vaupel) Ralf Bauer. :medidas para la temporada invernal. Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), 00.09.42.12.C. <https://repository.agrosavia.co/handle/20.500.12324/2283>
- Osorio-Nila, M. A., Vázquez-García, L. M., Salgado-Siclán, M. L., & González-Esquivel, C. E. (2005). EFECTO DE DOS ENMIENDAS ORGÁNICAS Y *Trichoderma* spp. PARA CONTROLAR *Sclerotinia* spp. EN LECHUGA. *Revista Chapingo. Serie: Horticultura*, XI(2), 203–208. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2004.08.040>
- Ricalde, M. F., & Andrade, J. L. (2009). La pitahaya, una delicia tropical. *CIENCIA(Revista Mexicana De Ciencia)*, 60(3), 36–43.
- Riera, A., & Paul, M. (2017). Evaluación in vitro de la capacidad antagonista de *Trichoderma* spp. frente a *Fusarium* spp. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/14419/1/UPS-CT007088.pdf>
- Salazar, C., Serna-Cock, L., & Gómez-López, E. D. (2016). Caracterización molecular de *Fusarium* asociado a pudrición basal del fruto en pitahaya (*Selenicereus megalanthus*). *Agronomía Mesoamericana*. <https://doi.org/10.15517/am.v27i2.21269>
- Stazzonelli, E. A., Yasem, M. G., & Ploper, L. D. (2014). Inhibición de *Sclerotinia sclerotiorum* por metabolitos volátiles y no volátiles producidos por especies nativas del genero *Trichoderma*. *Revista Agronómica Del Noroeste Argentino*, 34(2), 2314-369X. https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/11336/31457/2/CONICET_Digital_Nro.ae4e5809-ec4a-426b-98e2-8f00109886f8_A.pdf
- Vanegas, A. M. M., Marin, A., & Osorno, J. C. (2020). Metabolitos secundarios en *Trichoderma* spp. y sus aplicaciones biotecnológicas agrícolas. *Actualidades Biologicas*, 41(111), 1–13. <https://doi.org/10.17533/udea.acbi.v41n111a02>
- Verona-Ruiz, A., Urcia-Cerna, J., & Paucar-Menacho, L. M. (2020). Pitahaya (*Hylocereus* spp.): Culture, physicochemical characteristics, nutritional composition, and bioactive compounds. *Scientia Agropecuaria*, 11(3), 439–453. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2020.03.16>
- Villa-Martínez, A., Pérez-Leal, R., Morales-Morales, H. A., Basurto-Sotelo, M., Soto-Parra, J. M., & Martínez-Escudero, E. (2014). Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agronómica*, 64(2), 194–205. <https://doi.org/10.15446/acag.v64n2.43358>
- Balasubramaniam, J., Goh, K. S., Sani, S. F., Alam, M. W., Ismail, N., Gleason, M. L., & Rosli, Dpto. Inmunología, M. y. (2023). *Mikros testak.org*. Obtenido de http://insilico.ehu.es/camara_contaje/neubauer_improved.php

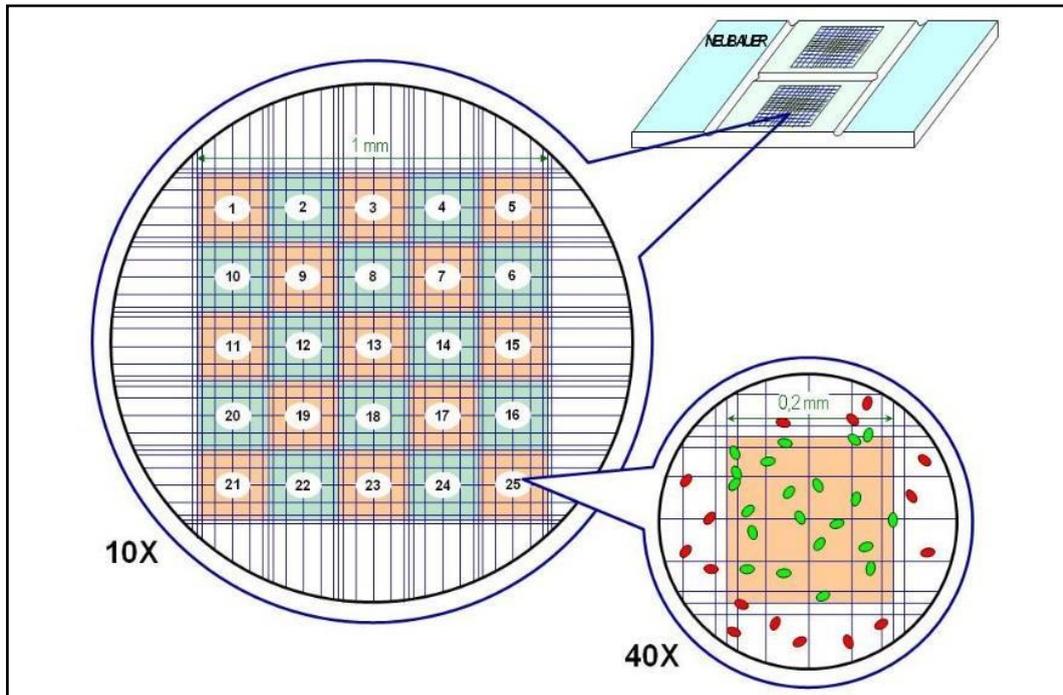
- H. (2023). *Fusarium falciforme* and *F. oxysporum* causing postharvest fruit rot of watermelon (*Citrullus lanatus*) in Malaysia: A first report. *Crop Protection*, 163, 106115. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2022.106115>
- De La Torre-Hernandez, M. E., Sánchez-Rangel, D., Galeana-Sánchez, E., & La Parra, J. P. (2014). Fumonisin – Síntesis y función en la interacción *Fusarium verticillioides*-maíz. *TIP*, 17(1), 77–91. [https://doi.org/10.1016/s1405-888x\(14\)70321-3](https://doi.org/10.1016/s1405-888x(14)70321-3)
- Gutiérrez, K. a. V., & Montañez, R. N. L. (2020). Guía Técnica del cultivo de pitahaya (*Hylocereus megalanthus*) en la región Amazonas. Instituto Nacional De Innovación Agraria. <http://repositorio.inia.gob.pe/bitstream/20.500.12955/1052/6/Gu%c3%ada%20T%c3%a9cnica%20del%20cultivo%20de%20pitahaya%20%28Hylocereus%20megalanthus%29%20en%20la%20regi%c3%b3n%20Amazonas.pdf>
- Hernandez, E., Castillo, F. D. H., Herrera, R. R., Fuentes, S. E. V., Drouaillet, B. E., & Santillán, J. a. L. (2016). Actividad antagónica de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia solani* in vitro. *Investigación Y Ciencia: De La Universidad Autónoma De Aguascalientes*, 24(67), 5–11. <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/6137740.pdf>
- Hernández-Rodríguez, A., León-Plasencia, D., Rives, N., La Osa, A. D., Almaguer-Chávez, M., Acebo-Guerrero, Y., & Vedado, I. (2023). IDENTIFICACIÓN DE AISLAMIENTOS AUTÓCTONOS DE PSEUDOMONAS FLUORESCENTES CON ACTIVIDAD ANTAGÓNICA ANTE *Curvularia* spp. *Revista Protección Vegetal*, 25(3), 1010–2752.
- Hoyos-Carvajal, L., Chaparro, P., Abramsky, M., Chet, I., & Orduz, S. (2008). Evaluación de aislamientos de *Trichoderma* spp. contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* bajo condiciones in vitro y de invernadero. *Journal of Science and Research*, 26(3), 451–458.
- Infante, D., Martínez, B., González, N., & Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista De Protección Vegetal*, 24(1), 14–21. <http://revistas.censa.edu.cu/index.php/RPV/article/download/542/670>
- Jenny, V., & German, A. (1999). Control biológico de la pudrición basal del tallo en Crisantemo (*Dendranthema grandiflorum*) ocasionada por *Sclerotinia sclerotiorum* con algunos aislamientos de *Trichoderma* sp. y *Gliocladium* sp. *DOAJ* (DOAJ: Directory of Open Access Journals). <https://doaj.org/article/c7cbe1683c274199a61f1142bff31736>
- Li, J., Ling, F., Liu, D., Liu, X., Pan, Y., He, J., & Zhang, J. (2022). ROS Regulate NCF2, Key Metabolic Enzymes and MDA Levels to Affect the Growth of *Fusarium solani*. *Agriculture*, 12(11), 1840. <https://doi.org/10.3390/agriculture12111840>
- Luchen, C. C., Chimwamurombe, P., & Hale, L. (2017). Isolation and Characterization of Fungi Associated with Disease Symptoms on *Ziziphus mucronata* Leaves and *Phaseolus vulgaris* Pods in Windhoek, Namibia. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 11(2), 963–968. <https://doi.org/10.22207/jpam.11.2.37>
- Madrid, H., Cárcamo, C., & Tapia, C. (2019). *Curvularia spicifera*. *Revista Chilena De Infectología*, 36(5), 646–647. <https://doi.org/10.4067/S0716>

- Manganyi, M. C., Regnier, T., Kumar, A., Bezuidenhout, C. C., & Ateba, C. N. (2018). Phylogenetic analysis and diversity of novel endophytic fungi isolated from medicinal plant *Sceletium tortuosum*. *Phytochemistry Letters*, 27, 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2018.06.004>
- Meza, C. L. S., Barbosa, R. J. F., Valero, N. V., Carrillo, R. M. G., & Redondo, A. R. P. (2008). Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., asociado a la marchitez en maracuyá. *DOAJ* (DOAJ: Directory of Open Access Journals). <https://doaj.org/article/1a1d74917d1c4fc3a8c7415a7711a31f>
- Mora, D. P. D. (2012). Manejo fitosanitario del cultivo de la pitahaya *Hylocereus megalanthus* (K. Schum. ex Vaupel) Ralf Bauer. :medidas para la temporada invernal. Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), 00.09.42.12.C. <https://repository.agrosavia.co/handle/20.500.12324/2283>
- Osorio-Nila, M. A., Vázquez-García, L. M., Salgado-Siclán, M. L., & González-Esquivel, C. E. (2005). EFECTO DE DOS ENMIENDAS ORGÁNICAS Y *Trichoderma* spp. PARA CONTROLAR *Sclerotinia* spp. EN LECHUGA. *Revista Chapingo. Serie: Horticultura*, XI(2), 203–208. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2004.08.040>
- Ricalde, M. F., & Andrade, J. L. (2009). La pitahaya, una delicia tropical. *CIENCIA(Revista Mexicana De Ciencia)*, 60(3), 36–43.
- Riera, A., & Paul, M. (2017). Evaluación in vitro de la capacidad antagonista de *Trichoderma* spp. frente a *Fusarium* spp. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/14419/1/UPS-CT007088.pdf>
- Salazar, C., Serna-Cock, L., & Gómez-López, E. D. (2016). Caracterización molecular de *Fusarium* asociado a pudrición basal del fruto en pitahaya (*Selenicereus megalanthus*). *Agronomía Mesoamericana*. <https://doi.org/10.15517/am.v27i2.21269>
- Stazonelli, E. A., Yasem, M. G., & Ploper, L. D. (2014). Inhibición de *Sclerotinia sclerotiorum* por metabolitos volátiles y no volátiles producidos por especies nativas del género *Trichoderma*. *Revista Agronómica Del Noroeste Argentino*, 34(2), 2314-369X. https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/11336/31457/2/CONICET_Digital_Nro.ae4e5809-ec4a-426b-98e2-8f00109886f8_A.pdf
- Tan, Y. P., Crous, P. W., & Shivas, R. G. (2018). Cryptic species of *Curvularia* in the culture collection of the Queensland Plant Pathology Herbarium. *MycKeys*, 35, 1–25. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.35.25665>
- Tirado-Ramírez, M. A., Orona, C. a. L., De Jesús Velázquez Alcaraz, T., Díaz-Valdés, T., Velarde-Félix, S., Martínez-Campos, Á. R., & Retes-Manjarrez, J. E. (2018). First Report of Onion Basal Rot Caused by *Fusarium falciforme* in Mexico. *Plant Disease*, 102(12), 2646. <https://doi.org/10.1094/pdis-05-18-0757-pdn>
- Vanegas, A. M. M., Marin, A., & Osorno, J. C. (2020). Metabolitos secundarios en *Trichoderma* spp. y sus aplicaciones biotecnológicas agrícolas. *Actualidades Biológicas*, 41(111), 1–13. <https://doi.org/10.17533/udea.acbi.v41n111a02>
- Verona-Ruiz, A., Urcia-Cerna, J., & Paucar-Menacho, L. M. (2020). Pitahaya (*Hylocereus* spp.): Culture, physicochemical characteristics, nutritional composition, and bioactive

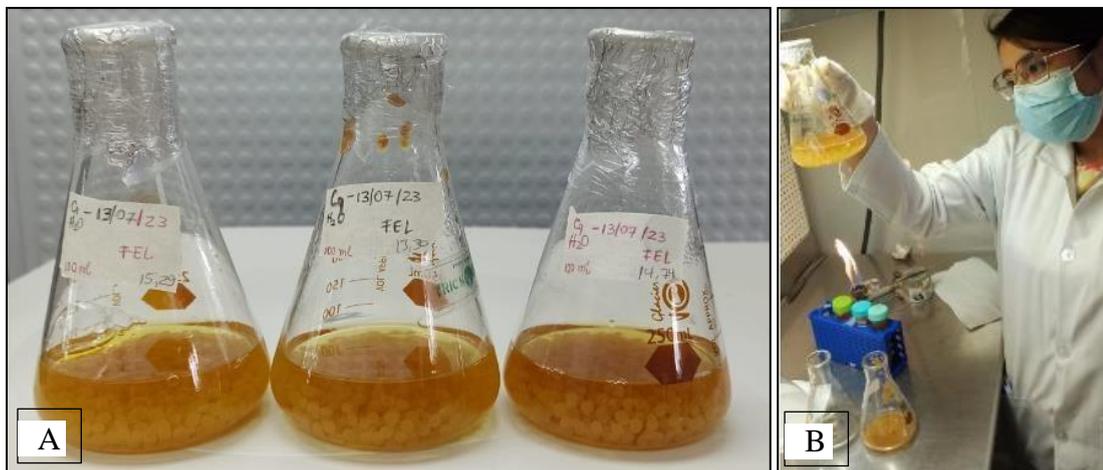
- Villa-Martínez, A., Pérez-Leal, R., Morales-Morales, H. A., Basurto-Sotelo, M., Soto-Parra, J. M., & Martínez-Escudero, E. (2014). Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agronómica*, 64(2), 194–205. <https://doi.org/10.15446/acag.v64n2.43358>
- Zuñiga, P. C. (2010). Caracterización Fisiológica de Cepas de *Bacillus* Spp. Aisladas de la rizósfera de papa. Recuperado el 21 de Julio de 2023, de <http://www.scielo.org.pe/pdf/ecol/v9n1/a04v9n1>
- Edwin, E., Sheeja, E., Toppo, E., Tiwari, V., & Dutt, K. R. (2007). Efecto antimicrobiano, antiulceroso y antidiarreico de las hojas de buganvilla (*Bougainvillea glabra* Choisy). *Ars Pharmaceutica* (Internet), 48(2), 135–144. <https://doi.org/10.30827/ars.v48i2.4981>
- Pedraza, A. P. C. (2022). Aislamiento e identificación de metabolitos producidos por la cepa nativa SGP 321 de mucor circinelloides y evaluación de su actividad antimicrobiana. <https://doi.org/10.11144/javeriana.10554.651>
- Kumar, M., & Shukla, P. K. (2005). Use of PCR targeting of internal transcribed spacer regions and Single-Stranded conformation polymorphism analysis of sequence variation in different regions of rRNA genes in fungi for rapid diagnosis of mycotic keratitis. *Journal of Clinical Microbiology*,
- Cenis, J. L. (1992). Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research*, 20(9), 2380. <https://doi.org/10.1093/nar/20.9.2380>
- White, T. J. (1990). AMPLIFICATION AND DIRECT SEQUENCING OF FUNGAL RIBOSOMAL RNA GENES FOR PHYLOGENETICS. In Elsevier eBooks (pp. 315–322). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1>
- Arango, C. S. (2012). Utilización de la fermentación líquida de *lentinula edodes* (shiitake), para la producción de metabolitos secundarios bioactivos y evaluación de su potencial empleo en la producción de un alimento funcional. Universidad Nacional De Colombia.
- Pineda-Insuasti, J. A., Duarte-Trujillo, A. S., Ayala-Pastaz, K. B., Soto-Arroyave, C. P., & Pineda-Soto, C. A. (2016). Producción de metabolitos por *Monascus* spp.: una revisión. *ICIDCA. Sobre Los Derivados De La Caña De Azúcar*, 50(2), 43–52. <https://www.redalyc.org/pdf/2231/223150958007.pdf>
- Rivera, M. P. T., Obregón, C. H., & Chísica, H. J. (2022). Universidad y sociedad elementos pedagógicos para pensar el compromiso social y político de la universidad.
- Almonacid Suárez, A. T. (2018). Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular. Universidad El Bosque Facultad De Ciencias.

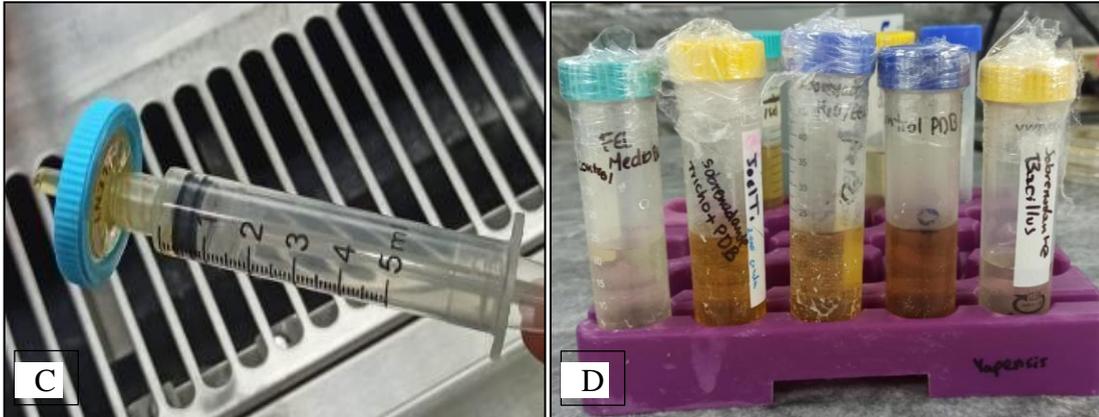
ANEXOS

Anexo 1. Contabilización del total de N de células en la cámara de Neubauer de la concentración de muestras.



Anexo 2. Metodología experimental. A) Fermentación líquida *Trichoderma* sp. en agua. B) Filtración con papel filtro de la fermentación líquida de *Trichoderma* sp. en PDB. C) Esterilización con Jeringa. D) Tratamientos y controles. E) Preparación de cajas Petri en medio PDA para la aplicación del método de difusión en pocillos destinados a las pruebas antimicrobianas.





Anexo 3. Diseño experimental utilizando ANOVA con *Bacillus* sp., aplicando pruebas de Tukey.

Análisis de la varianza

Bacillus

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Bacillus	32	0,78	0,72	8,44

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	138,85	7	19,84	12,20	<0,0001
Cepas	138,85	7	19,84	12,20	<0,0001
Error	39,04	24	1,63		
Total	177,89	31			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=2,98671

Error: 1,6265 gl: 24

Cepas Medias n E.E.

Cepas	Medias	n	E.E.	
C2	11,44	4	0,64	A
C4	13,13	4	0,64	A B
C1	14,42	4	0,64	A B C
C5	14,88	4	0,64	B C
C6	15,81	4	0,64	B C
C3	16,08	4	0,64	B C D
C7	16,38	4	0,64	C D
C8	18,81	4	0,64	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 4. Análisis de la varianza y pruebas de Tukey del diseño experimental de la mezcla.

Mix

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Mix	32	0,89	0,86	10,02

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	294,44	7	42,06	28,92	<0,0001
Cepas	294,44	7	42,06	28,92	<0,0001
Error	34,91	24	1,45		
Total	329,34	31			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=2,82429

Error: 1,4544 gl: 24

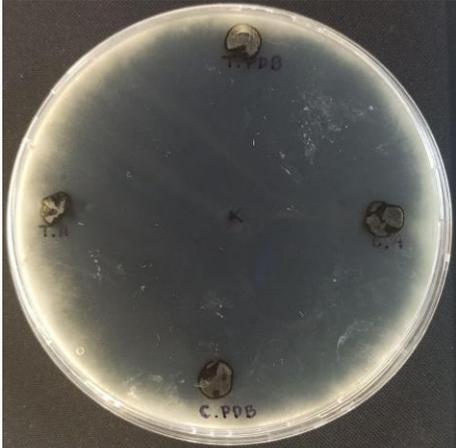
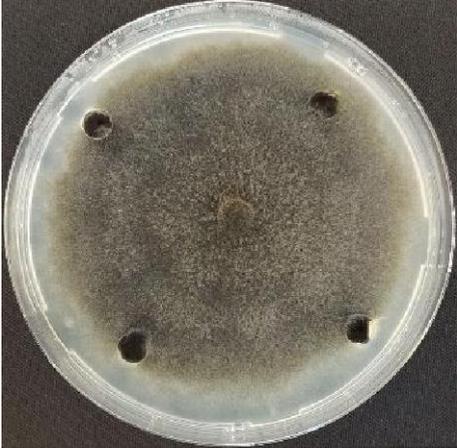
Cepas	Medias	n	E.E.				
C2	6,50	4	0,60	A			
C4	8,67	4	0,60	A	B		
C6	11,31	4	0,60		B	C	
C3	11,92	4	0,60			C	D
C1	12,67	4	0,60			C	D
C5	14,13	4	0,60			C	D E
C7	14,56	4	0,60				D E
C8	16,50	4	0,60				E

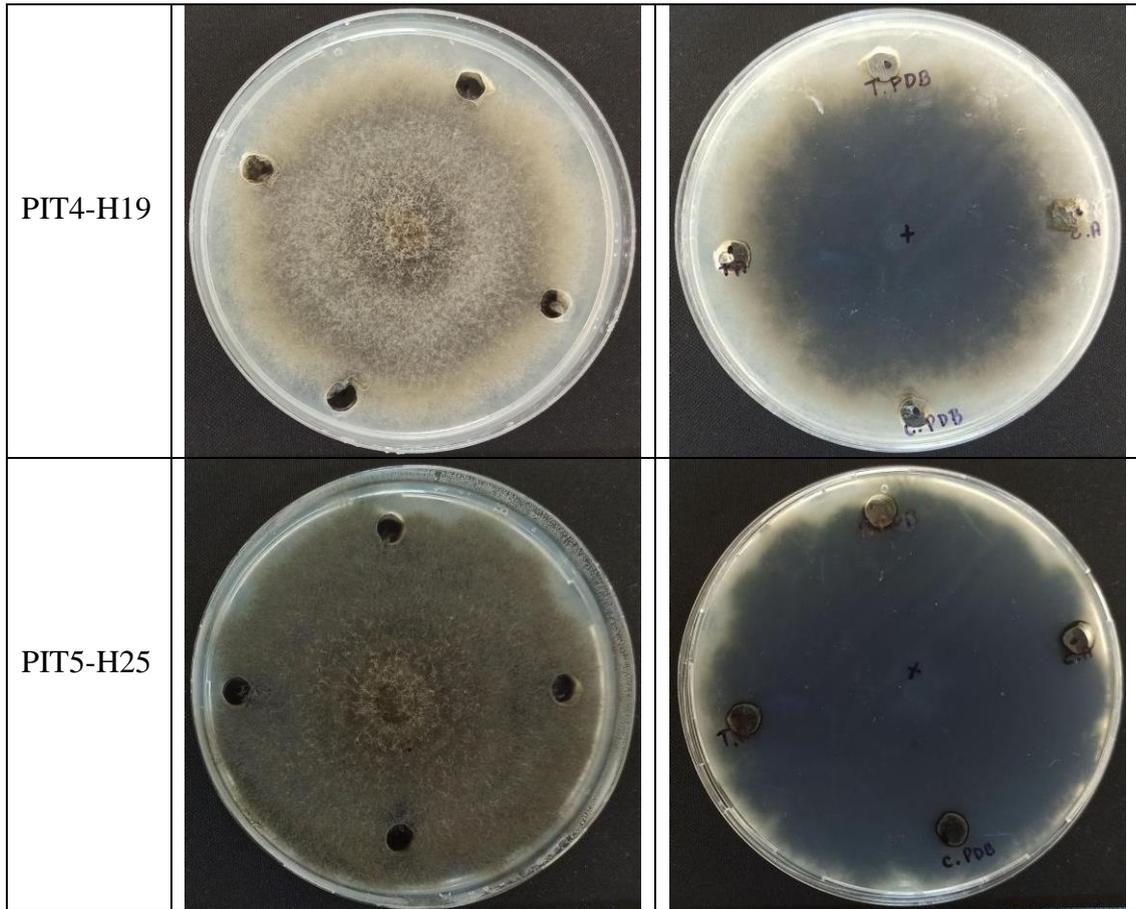
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 5. Base de Datos del ANOVA del *Bacillus* sp. y Mezcla.

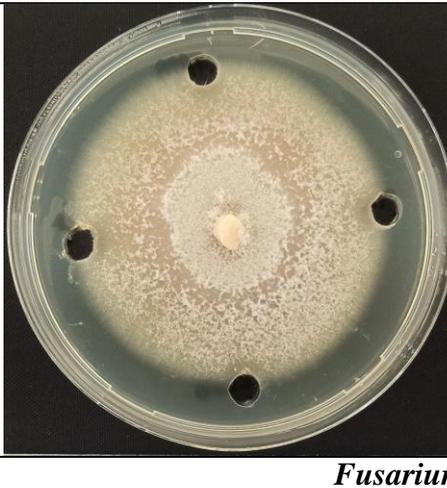
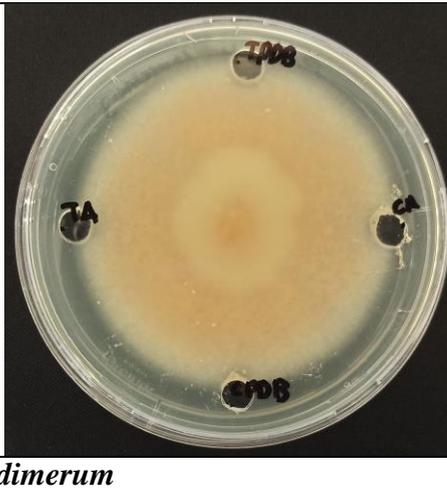
Caso	Cepas	Replicas	Bacillus	Mix	RE Bacillus	PRED Bacillus	RE Mix	PRED Mix
1	C1	R1	14,42	12,67	0,00	14,42	0,00	12,67
2	C1	R2	13,00	11,50	-1,28	14,42	-1,12	12,67
3	C1	R3	14,75	13,25	0,30	14,42	0,56	12,67
4	C1	R4	15,50	13,25	0,98	14,42	0,56	12,67
5	C2	R1	11,25	7,50	-0,17	11,44	0,96	6,50
6	C2	R2	11,50	5,25	0,06	11,44	-1,20	6,50
7	C2	R3	10,75	6,50	-0,62	11,44	0,00	6,50
8	C2	R4	12,25	6,75	0,74	11,44	0,24	6,50
9	C3	R1	17,00	11,00	0,83	16,08	-0,88	11,92
10	C3	R2	14,00	11,75	-1,89	16,08	-0,16	11,92
11	C3	R3	17,25	13,00	1,06	16,08	1,04	11,92
12	C3	R4	16,08	11,92	0,00	16,08	0,00	11,92
13	C4	R1	11,50	8,67	-1,47	13,13	0,00	8,67
14	C4	R2	14,25	7,75	1,02	13,13	-0,88	8,67
15	C4	R3	11,75	8,25	-1,24	13,13	-0,40	8,67
16	C4	R4	15,00	10,00	1,70	13,13	1,28	8,67
17	C5	R1	15,75	13,75	0,79	14,88	-0,36	14,13
18	C5	R2	15,00	14,75	0,11	14,88	0,60	14,13
19	C5	R3	14,50	16,25	-0,34	14,88	2,03	14,13
20	C5	R4	14,25	11,75	-0,57	14,88	-2,27	14,13
21	C6	R1	16,25	10,25	0,40	15,81	-1,02	11,31
22	C6	R2	15,00	13,25	-0,74	15,81	1,86	11,31
23	C6	R3	16,00	10,75	0,17	15,81	-0,54	11,31
24	C6	R4	16,00	11,00	0,17	15,81	-0,30	11,31
25	C7	R1	15,50	13,50	-0,79	16,38	-1,02	14,56
26	C7	R2	17,25	15,00	0,79	16,38	0,42	14,56
27	C7	R3	19,00	15,50	2,38	16,38	0,90	14,56
28	C7	R4	13,75	14,25	-2,38	16,38	-0,30	14,56
29	C8	R1	18,50	15,50	-0,28	18,81	-0,96	16,50
30	C8	R2	19,75	18,75	0,85	18,81	2,15	16,50
31	C8	R3	18,50	16,25	-0,28	18,81	-0,24	16,50
32	C8	R4	18,50	15,50	-0,28	18,81	-0,96	16,50

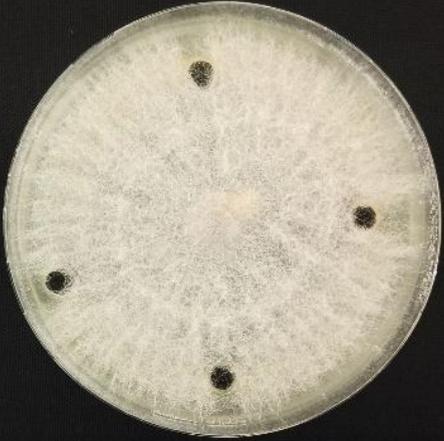
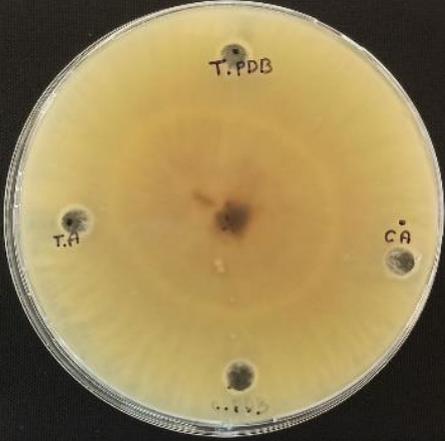
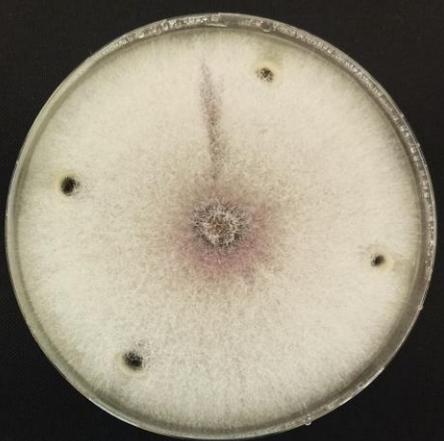
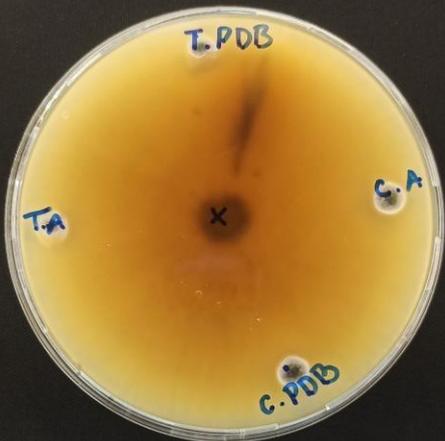
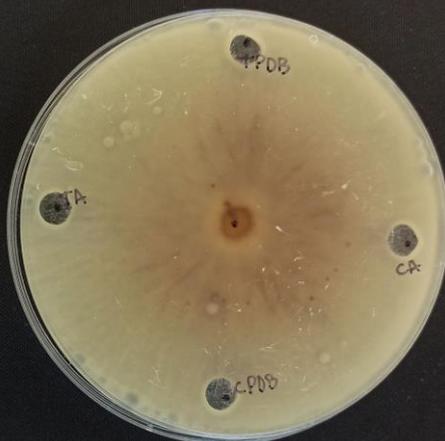
Anexo 6. Tabla de la actividad antimicrobiana (método modificado de difusión de pocillos en agar) del sobrenadante estéril de *Trichoderma* frente a *Curvularia cactivora* con código de muestra PIT2-8, PIT3-H10, PIT3-H12, PIT4-H19, PIT5-H25.

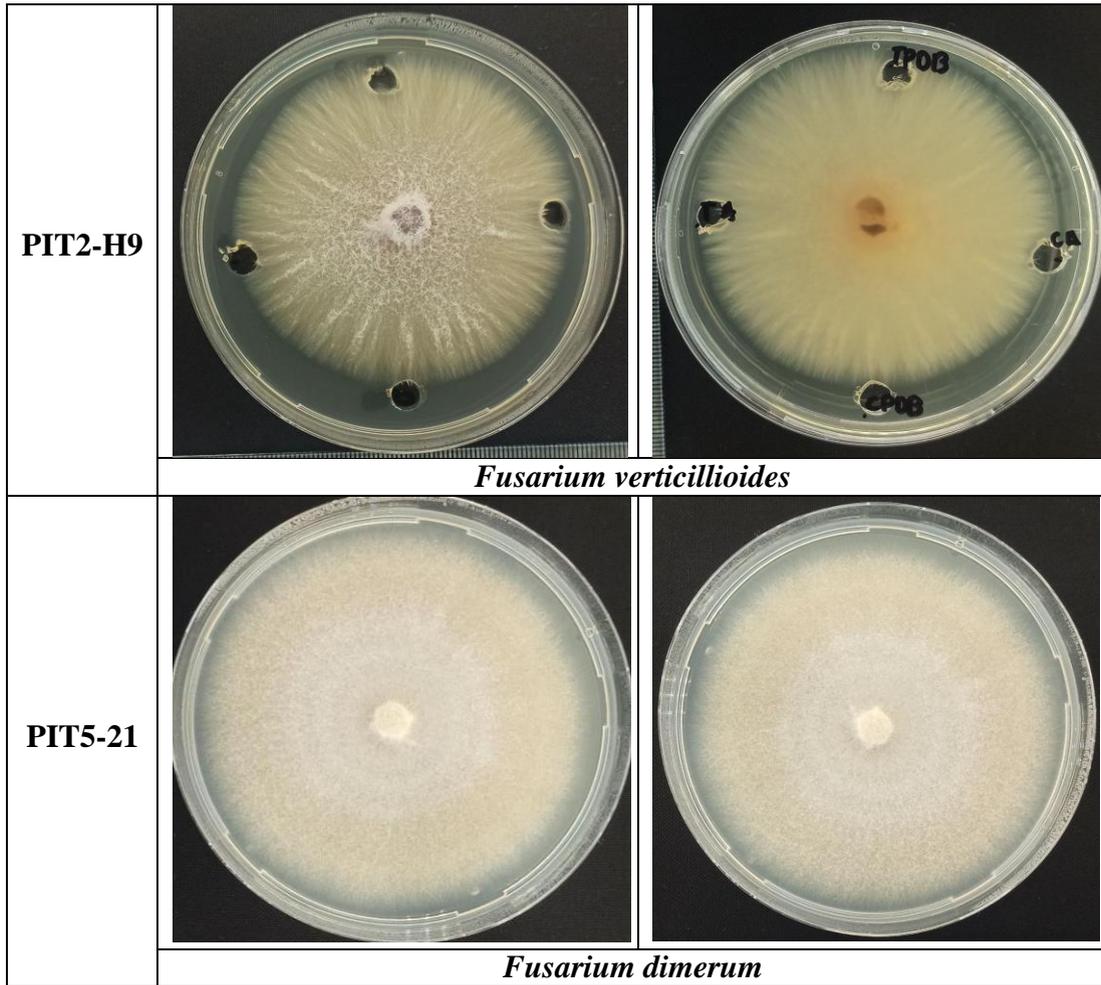
Confrontación in vitro del sobrenadante estéril de <i>Trichoderma</i> en medio PDB y agua desionizada vs. <i>Curvularia cactivora</i> .		
Código	Anverso	Reverso
PIT2-8		
PIT3-H10		
PIT3-H12		



Anexo 7. Tabla de la actividad antimicrobiana (método modificado de difusión de pocillos en agar) del sobrenadante estéril de *Trichoderma* frente a *Fusarium* spp. con código de muestra PIT1-H2, PIT2-6, PIT2A-6, PIT2-H6, PIT2-H9, PIT5-21.

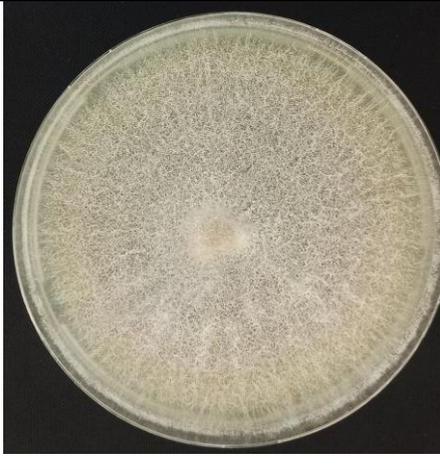
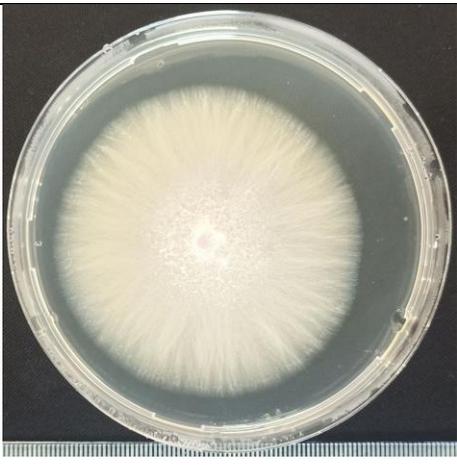
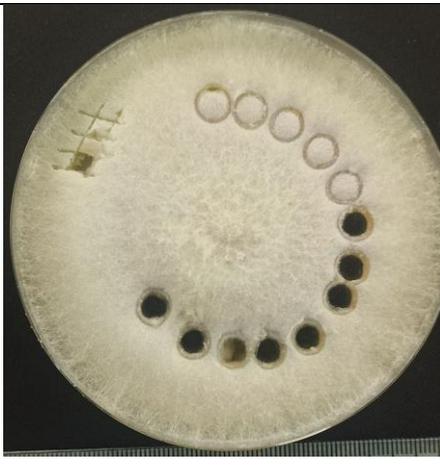
Confrontación in vitro del sobrenadante estéril de <i>Trichoderma</i> en medio PDB y agua desionizada vs. cepa <i>Fusarium</i> spp.		
Código	Anverso	Reverso
PIT1-H2		
<i>Fusarium dimerum</i>		

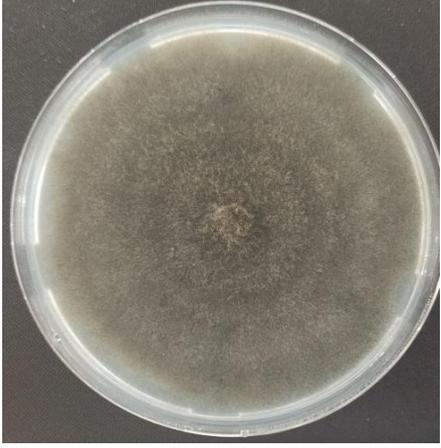
<p>PIT2-6</p>		
<p><i>Fusarium verticillioides</i></p>		
<p>PIT2A-6</p>		
<p><i>Fusarium verticillioides</i></p>		
<p>PIT2-H6</p>		
<p><i>Fusarium falciforme</i></p>		

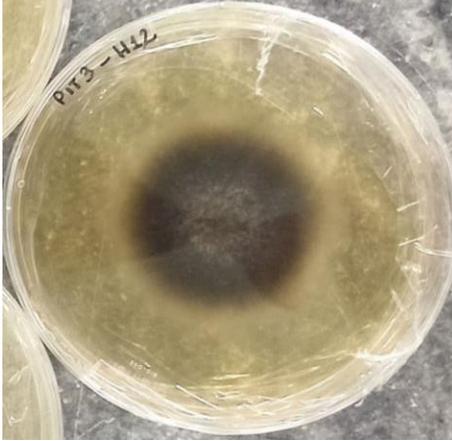


Anexo 8. Tabla de cepas madre de *Curvularia cactivora* aislada de frutos de pitahaya roja y subcultivo de *Curvularia cactivora* como control.

Cepas madres y controles de cepas <i>Fusarium</i> spp. y <i>Curvularia cactivora</i>		
Código	Cepa madre	Control
PIT1-H2		
	<i>Fusarium dimerum</i>	

<p>PIT2-6</p>		
<p><i>Fusarium verticillioides</i></p>		
<p>PIT2A-6</p>		
<p><i>Fusarium verticillioides</i></p>		
<p>PIT2-H9</p>		
<p><i>Fusarium verticillioides</i></p>		

<p>PIT5-21</p>		
<p><i>Fusarium dimerum</i></p>		
<p>PIT2-8</p>		
<p><i>Curvularia cactivora</i></p>		
<p>PIT3-H10</p>		
<p><i>Curvularia cactivora</i></p>		

<p>PIT3-H12</p>		
<p><i>Curvularia cactivora</i></p>		
<p>PIT4-H19</p>		
<p><i>Curvularia cactivora</i></p>		
<p>PIT5-H25</p>		
<p><i>Curvularia cactivora</i></p>		