



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

CARRERA DE AGRONOMÍA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

**“ANTAGONISMO *IN VITRO* DE *Trichoderma* spp. Y *Bacillus subtilis*
FRENTE AL PATÓGENO *Lasiodiplodia theobromae* EN MORA”**

Proyecto de Investigación presentado previo a la obtención del Título de
Ingeniero Agrónomo

Autor:
Masaquiza Jiménez John Jairo

Tutor:
Granja Guerra Eliana

LATACUNGA – ECUADOR

Febrero 2024

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Masaquiza Jiménez John Jairo, con cédula de ciudadanía No. 200011969-9, declaro ser autor del presente Proyecto de Investigación: “ANTAGONISMO *IN VITRO* DE *Trichoderma* spp. Y *Bacillus subtilis* FRENTE AL PATÓGENO *Lasiodiplodia theobromae* EN MORA”, siendo la Ingeniera Mg. Eliana Granja Guerra, Tutora del presente trabajo; y, eximo expresamente a la Universidad Técnica de Cotopaxi y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

Además, certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Latacunga, 22 de febrero del 2024



John Jairo Masaquiza Jiménez
C.C: 200011969-9
ESTUDIANTE

CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR

Comparecen a la celebración del presente instrumento de cesión no exclusiva de obra, que celebran de una parte **MASQUIZA JIMENEZ JOHN JAIRO**, identificado con cédula de ciudadanía **200011969-9** de estado civil soltero, a quien en lo sucesivo se denominará **EL CEDENTE**; y, de otra parte, la Doctora Idalia Eleonora Pacheco Tigselema, en calidad de Rectora, y por tanto representante legal de la Universidad Técnica de Cotopaxi, con domicilio en la Av. Simón Rodríguez, Barrio El Ejido, Sector San Felipe, a quien en lo sucesivo se le denominará **LA CESIONARIA** en los términos contenidos en las cláusulas siguientes:

ANTECEDENTES: CLÁUSULA PRIMERA. - EL CEDENTE es una persona natural estudiante de la carrera de Agronomía, titular de los derechos patrimoniales y morales sobre el trabajo de grado “**ANTAGONISMO IN VITRO DE *Trichoderma spp. Y Bacillus subtilis* FRENTE AL PATÓGENO *Lasiodiplodia theobromae* EN MORA**”, la cual se encuentra elaborada según los requerimientos académicos propios de la Facultad; y, las características que a continuación se detallan:

Historial Académico

Inicio de la carrera: Abril 2019 - Agosto 2019

Finalización de la carrera: Octubre 2023 – Marzo 2024

Aprobación en Consejo Directivo: 28 de Noviembre del 2023

Tutor: Ing. Eliana Granja Guerra, Mg.

Tema: “**ANTAGONISMO IN VITRO DE *Trichoderma spp. Y Bacillus subtilis* FRENTE AL PATÓGENO *Lasiodiplodia theobromae* EN MORA**”

CLÁUSULA SEGUNDA. - LA CESIONARIA es una persona jurídica de derecho público creada por ley, cuya actividad principal está encaminada a la educación superior formando profesionales de tercer y cuarto nivel normada por la legislación ecuatoriana la misma que establece como requisito obligatorio para publicación de trabajos de investigación de grado en su repositorio institucional, hacerlo en formato digital de la presente investigación.

CLÁUSULA TERCERA. - Por el presente contrato, **EL CEDENTE** autoriza a **LA CESIONARIA** a explotar el trabajo de grado en forma exclusiva dentro del territorio de la República del Ecuador.

CLÁUSULA CUARTA. - OBJETO DEL CONTRATO: Por el presente contrato **EL CEDENTE**, transfiere definitivamente a **LA CESIONARIA** y en forma exclusiva los siguientes derechos patrimoniales; pudiendo a partir de la firma del contrato, realizar, autorizar o prohibir:

- a) La reproducción parcial del trabajo de grado por medio de su fijación en el soporte informático conocido como repositorio institucional que se ajuste a ese fin.
- b) La publicación del trabajo de grado.
- c) La traducción, adaptación, arreglo u otra transformación del trabajo de grado con fines académicos y de consulta.
- d) La importación al territorio nacional de copias del trabajo de grado hechas sin autorización del titular del derecho por cualquier medio incluyendo mediante transmisión.

e) Cualquier otra forma de utilización del trabajo de grado que no está contemplada en la ley como excepción al derecho patrimonial.

CLÁUSULA QUINTA. - El presente contrato se lo realiza a título gratuito por lo que **LA CESIONARIA** no se halla obligada a reconocer pago alguno en igual sentido **EL CEDENTE** declara que no existe obligación pendiente a su favor.

CLÁUSULA SEXTA. - El presente contrato tendrá una duración indefinida, contados a partir de la firma del presente instrumento por ambas partes.

CLÁUSULA SÉPTIMA. - CLÁUSULA DE EXCLUSIVIDAD. - Por medio del presente contrato, se cede en favor de **LA CESIONARIA** el derecho a explotar la obra en forma exclusiva, dentro del marco establecido en la cláusula cuarta, lo que implica que ninguna otra persona incluyendo **EL CEDENTE** podrá utilizarla.

CLÁUSULA OCTAVA. - LICENCIA A FAVOR DE TERCEROS. - **LA CESIONARIA** podrá licenciar la investigación a terceras personas siempre que cuente con el consentimiento de **EL CEDENTE** en forma escrita.

CLÁUSULA NOVENA. - El incumplimiento de la obligación asumida por las partes en la cláusula cuarta, constituirá causal de resolución del presente contrato. En consecuencia, la resolución se producirá de pleno derecho cuando una de las partes comunique, por carta notarial, a la otra que quiere valerse de esta cláusula.

CLÁUSULA DÉCIMA. - En todo lo no previsto por las partes en el presente contrato, ambas se someten a lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, Código Civil y demás del sistema jurídico que resulten aplicables.

CLÁUSULA UNDÉCIMA. - Las controversias que pudieran suscitarse en torno al presente contrato, serán sometidas a mediación, mediante el Centro de Mediación del Consejo de la Judicatura en la ciudad de Latacunga. La resolución adoptada será definitiva e inapelable, así como de obligatorio cumplimiento y ejecución para las partes y, en su caso, para la sociedad. El costo de tasas judiciales por tal concepto será cubierto por parte del estudiante que lo solicitare.

En señal de conformidad las partes suscriben este documento en dos ejemplares de igual valor y tenor en la ciudad de Latacunga, a los 22 días del mes de febrero del 2024.


John Jairo Masaquiza Jiménez

EL CEDENTE

Dra. Idalia Pacheco Tigselema, Ph.D.

LA CESIONARIA

AVAL DE LA TUTORA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

En calidad de la Tutora del Proyecto de Investigación con el título:

“ANTAGONISMO *IN VITRO* DE *Trichoderma* spp. Y *Bacillus subtilis* FRENTE AL PATÓGENO *Lasiodiplodia theobromae* EN MORA”, de Masaquiza Jiménez John Jairo, de la carrera de Agronomía, considero que el presente trabajo investigativo es merecedor del Aval de aprobación al cumplir las normas, técnicas y formatos previstos, así como también ha incorporado las observaciones y recomendaciones propuestas en la Pre-Defensa.

Latacunga, 22 de febrero del 2024



Ing. Eliana Granja Guerra, Mg.

C.C: 1718126301

DOCENTE TUTORA

AVAL DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE TITULACIÓN

En calidad de Tribunal de Lectores, aprobamos el presente Informe de Investigación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de Cotopaxi; y, por la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales; por cuanto, el postulante: Masaquiza Jiménez John Jairo con el título del Proyecto de Investigación: “**ANTAGONISMO *IN VITRO* DE *Trichoderma* spp., Y *Bacillus subtilis* FRENTE AL PATÓGENO *Lasiodiplodia theobromae* EN MORA**”, ha considerado las recomendaciones emitidas oportunamente y reúne los méritos suficientes para ser sometido al acto de sustentación del trabajo de titulación.

Por lo antes expuesto, se autoriza grabar los archivos correspondientes en un CD, según la normativa institucional.

Latacunga, 22 de febrero del 2024



Ing. Diana Elizabeth Toapanta Gallegos, Mg.

C.C: 100274980-0

LECTOR 1 (PRESIDENTE)



Ing. Edwin Marcelo Chancusig Espín, Ph.D.

C.C: 050114883-7

LECTOR 2 (MIEMBRO)



Ing. Guido Yauli Chicaiza, MSc.

CC: 050160440-9

LECTOR 3 (MIEMBRO)

AGRADECIMIENTO

Quiero aprovechar este espacio para expresar mi más profundo agradecimiento a mi familia por su inquebrantable apoyo y constancia a lo largo de este viaje académico. Su amor incondicional, aliento constante y comprensión han sido la fuerza impulsora detrás de cada paso que he dado en la realización de esta tesis. Sin su apoyo incondicional, este logro no habría sido posible. Estaré eternamente agradecido por su presencia constante y su dedicación. Gracias por ser mi roca en los momentos de dificultad y por celebrar conmigo cada pequeño triunfo en este camino. Su amor y apoyo han sido mi mayor motivación e inspiración.

Agradezco sinceramente a la prestigiosa Universidad Técnica de Cotopaxi por brindarme la invaluable oportunidad de formarme como persona y como profesional. Sus puertas abiertas han sido el punto de partida de mi desarrollo académico y personal.

Asimismo, extiendo mi gratitud a todo el cuerpo docente de la carrera de Agronomía por impartir sus conocimientos y enseñanzas de manera dedicada y comprometida. Cada lección recibida ha sido un pilar fundamental en mi crecimiento diario como profesional, y estoy profundamente agradecido por su contribución a mi formación.

A la Ing. Mg. Eliana Granja Guerra, por la paciencia, dedicación y esfuerzo, quien con sus conocimientos y experiencia me motivo a finalizar este de proyecto de titulación.

John Jairo Masaquiza Jiménez

DEDICATORIA

Con profundo cariño y gratitud, dedico este trabajo de investigación a mis padres, Bertha Jiménez y José Masaquiza, quienes han sido mi apoyo incondicional en cada etapa de mi vida universitaria. A mis hermanos, Shirley y Ronny Masaquiza, les agradezco su constante aliento y respaldo, que han sido mi fuerza en los momentos más difíciles.

A mi querida abuela Rosa Caisabanda quien siempre creyó en mí y me inspiró con su fuerza y cariño, le dedico este logro con profundo agradecimiento.

También quiero honrar la memoria de mis abuelos, Francisco Masaquiza y Francisco Jiménez, cuyo amor y sabiduría siguen viviendo en mi corazón. Aunque ya no están físicamente, su legado perdura y me da fuerzas para seguir adelante. Con todo el amor y gratitud, les dedico este logro, sabiendo que desde donde estén, estarán orgullosos de mí.

John Jairo Masaquiza Jiménez

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

**TÍTULO: “ANTAGONISMO IN VITRO DE *Trichoderma* spp. Y *Bacillus subtilis*
FRENTE AL PATÓGENO *Lasiodiplodia theobromae* EN MORA”.**

Autor:

Masaquiza Jiménez John Jairo

RESUMEN

En Ecuador, el cultivo de mora sufre considerables pérdidas debido a la enfermedad conocida como "muerte descendente", afectando aproximadamente el 65% de la producción. Esta patología ocasiona pérdidas anuales significativas y merma el rendimiento del cultivo. El presente estudio se realizó con el fin de explorar el potencial de *Trichoderma* spp. y *Bacillus subtilis* como alternativas sostenibles para el control biológico. La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Microbiología de la Universidad Técnica de Cotopaxi del campus Salache. Las cepas de *Lasiodiplodia theobromae*, aisladas de moras de la accesión OQ879511, fueron obtenidas en colaboración con la Universidad San Francisco de Quito (USFQ). Se realizaron cultivos monospóricos del patógeno para análisis microscópicos y ensayos de enfrentamiento con cultivos duales. Los agentes biocontroladores utilizados fueron *Trichoderma* spp., obtenidos de la colección del laboratorio UTC, y una cepa comercial de *Bacillus subtilis*. Se realizaron conteos en una cámara de Neubauer para obtener suspensiones en dos concentraciones: 10^8 y 10^4 . Se añadieron 50 μ l de cada concentración y se trazó una línea de 3,5 cm en el extremo de la caja Petri, sobre el medio PDA, utilizando un tubo de ensayo. Para *Trichoderma* spp., se cultivaron discos puros de 8 mm de diámetro de cada hongo, los cuales se sembraron en los extremos de la caja Petri con medio PDA a una distancia de 3,5 cm. Los resultados de la inhibición del hongo *Lasiodiplodia theobromae* en cada uno de los enfrentamientos se analizaron mediante el programa INFOSTAT. Tras obtener resultados significativos en el análisis de varianza, se realizó la prueba de Tukey al 5% para determinar diferentes niveles de significancia. Los resultados indicaron que el tratamiento T1 (*Trichoderma* spp. contra *Lasiodiplodia theobromae*) mostró el mejor resultado, con una inhibición de 2,94 cm. Este resultado evidencia la capacidad de este tratamiento para reducir tanto la incidencia como la severidad de la enfermedad cuando se enfrenta directamente al fitopatógeno en condiciones in vitro.

Palabras clave: *Trichoderma* spp, *Bacillus subtilis*, *Lasiodiplodia theobromae*, inhibición.

TECHNICAL UNIVERSITY OF COTOPAXI
FACULTY OF AGRICULTURAL SCIENCE AND NATURAL RESOURCES

**THEME: “*IN VITRO* ANTAGONISM OF *Trichoderma* spp. AND *Bacillus subtilis*
AGAINST THE PATHOGEN *Lasiodiplodia theobromae* IN BLACKBERRY”**

Author:
Masaquiza Jiménez John Jairo

ABSTRACT

In Ecuador, blackberry cultivation suffers considerable losses due to a disease known as "descending death," affecting approximately 65% of production. This pathology causes significant annual losses and reduces crop yield. This study was conducted to explore the potential of *Trichoderma* spp. and *Bacillus subtilis* as sustainable alternatives for biological control. The research was carried out in the Microbiology Laboratory of the Technical University of Cotopaxi, Salache campus. Strains of *Lasiodiplodia theobromae*, isolated from blackberries accession OQ879511, were obtained in collaboration with the University San Francisco de Quito (USFQ). Monosporic crops of the pathogen were prepared for microscopic analysis and dual crops assays. The bio control agents used were *Trichoderma* spp., obtained from the laboratory collection at UTC, and a commercial strain of *Bacillus subtilis*. Counts were made in a Neubauer chamber to obtain suspensions at two concentrations: 10^8 and 10^4 . 50 μ l of each concentration were added, and a line of 3.5 cm was drawn at the end of the Petri dish, on PDA medium, using a test tube. For *Trichoderma* spp., pure discs of 8 mm diameter of each fungus were cultivated, which were then seeded at the ends of the Petri dish with PDA medium at a distance of 3.5 cm. The fungus inhibition results of *Lasiodiplodia theobromae* in each of the confrontations were analyzed using the INFOSTAT program. After obtaining significant results in the analysis of variance, the Tukey test at 5% was performed to determine different levels of significance. The results indicated that treatment T1 (*Trichoderma* spp. against *Lasiodiplodia theobromae*) showed the best result, with an inhibition of 2.94 cm. This result demonstrates the ability of this treatment to reduce both the incidence and severity of the disease when directly confronting to the phytopathogen under in vitro conditions.

Keywords: *Trichoderma* spp., *Bacillus subtilis*, *Lasiodiplodia theobromae*, Mycelial growth.

INDICE DE CONTENIDOS

| | |
|---|------|
| DECLARACIÓN DE AUTORÍA | ii |
| AVAL DE LA TUTORA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN | v |
| AVAL DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE TITULACIÓN | vi |
| <i>AGRADECIMIENTO</i> | vii |
| <i>DEDICATORIA</i> | viii |
| RESUMEN | ix |
| ABSTRACT | x |
| INDICE DE CONTENIDOS | xi |
| INDICE DE TABLA | xiii |
| INDICE DE FIGURAS | xiv |
| 1. INFORMACIÓN GENERAL | 1 |
| 2. Justificación del proyecto | 2 |
| 3. Beneficiarios del proyecto | 3 |
| 4. Problema de investigación | 3 |
| 5. Objetivos: general y específicos. | 5 |
| 5.1. General | 5 |
| 5.2. Específicos | 5 |
| 6. Actividades y sistema de tareas en relación a los objetivos planteados. | 6 |
| 7. Fundamentación científico técnica | 7 |
| 1. Los Hongos | 7 |
| 2. Hongo <i>Trichoderma</i> | 8 |
| 7.2.1. Taxonomía | 9 |
| 7.2.2. Morfología | 10 |
| 3. Hongo <i>Lasiodiplodia theobromae</i> | 11 |
| 7.3.1. Taxonomía | 12 |

| | |
|--|----|
| 7.3.2. Morfología..... | 13 |
| 4. Bacteria <i>Bacillus Subtilis</i> | 14 |
| 7.4.1. Taxonomía..... | 15 |
| 7.4.2. Morfología..... | 16 |
| 8. Validación de las preguntas científicas. | 16 |
| 8. Metodologías y Diseño Experimental. | 17 |
| 8.1 Localización del ensayo..... | 17 |
| 8.1.1 Ubicación Política | 17 |
| 8.1.2 Ubicación Geográfica | 17 |
| 8.1.3 Croquis..... | 18 |
| 8.2 Condiciones agroecológicas | 18 |
| 8.3 Tipo de Investigación | 18 |
| 8.3.1 Experimental | 18 |
| 8.3.2 Cualitativa | 19 |
| 8.4 Modalidad básica de la investigación..... | 19 |
| 8.4.1 Observación científica | 19 |
| 8.4.2 Cuantitativo | 19 |
| 8.4.3 De laboratorio..... | 19 |
| 8.4.4 Bibliografía documental | 19 |
| 8.5 Materiales y equipos..... | 20 |
| 8.6 Diseño Experimental | 20 |
| 8.6.1 Unidad experimental..... | 20 |
| 8.7 Tratamientos en estudio | 21 |
| 8.8 Manejo del experimento | 21 |
| Fase I: Propagación de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> y <i>Trichoderma spp.</i> | 21 |
| Fase II: Concentración de <i>Bacillus subtilis</i> comercial. | 22 |
| Fase III Aplicación de los biocontroladores frente al patógeno. | 23 |

| | |
|--|----|
| Fase IV Registro de Datos..... | 24 |
| Fase VI Variables a evaluar..... | 24 |
| 9. Análisis y discusión de los resultados..... | 24 |
| 10. Impactos | 37 |
| 11. Conclusiones | 38 |
| 12. Recomendaciones..... | 39 |
| 13. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS | 40 |

INDICE DE TABLA

| | |
|---|----|
| Tabla 1 Ubicación Política | 17 |
| Tabla 2 Ubicación Geográfica..... | 17 |
| Tabla 3 Condiciones agroecológicas | 18 |
| Tabla 4 Materiales y equipos que se utilizaron en la investigación..... | 20 |
| Tabla 5 Tratamientos para el control del patógeno <i>Lasiodiplodia theobromae</i> | 21 |
| Tabla 6 Inhibición <i>Lasiodiplodia theobromae</i> | 24 |
| Tabla 7 Inhibición de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> | 25 |
| Tabla 8 Crecimiento de los hongos..... | 29 |
| Tabla 9 Crecimiento del hongo antagonista frente al patógeno | 29 |
| Tabla 10 ADEVA inhibición (cm) (<i>Lasiodiplodia theobromae</i>) frente a los biocontroladores. 31 | |
| Tabla 11 ADEVA inhibición (cm) | 32 |
| Tabla 12 Variable inhibición (cm)..... | 33 |
| Tabla 13 Inhibición (cm) del Hongo <i>Trichoderma</i> spp. | 33 |
| Tabla 14 Inhibición (cm) del Hongo <i>Lasiodiplodia theobromae</i> | 34 |
| Tabla 15 Inhibición (cm) de la bacteria <i>Bacillus subtilis</i> en una concentración 10^8 | 34 |
| Tabla 16 Inhibición (cm) de la bacteria <i>Bacillus subtilis</i> en una concentración 10^4 | 35 |

INDICE DE FIGURAS

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 1 | Croquis del ensayo | 18 |
| | | 18 |
| Figura 2 | Croquis de siembra para la prueba de control biológico in vitro. A. Cultivo dual; B. Control, para pruebas; C. Blanco para observación del buen manejo de siembra..... | 21 |
| Figura 3 | Hongo Lasiodiplodia Theobromae al tercer día de aislamiento en cajas Petri..... | 26 |
| Figura 4 | Observación y caracterización morfológica al hongo Lasiodiplodia | 26 |
| Figura 5 | Observación de las esporas asexuadas y las conidias hialinas inmaduras..... | 27 |
| Figura 6 | Desarrollo morfológico del hongo | 28 |
| Figura 7 | Diferencias en la inhibición | 30 |
| Figura 8 | Lasiodiplodia theobromae vs Bacillus subtilis. | 36 |
| Figura 9 | El patógeno Lasiodiplodia theobromae bacteria Bacillus | 36 |
| Figura 10 | Bacteria Bacillus vs el patógeno Lasiodiplodia theobromae | 37 |

1. INFORMACIÓN GENERAL

Título del Proyecto: Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma spp.* y *Bacillus subtilis* frente al patógeno *Lasiodiplodia theobromae* en mora.

Tipo de proyecto: La investigación es de tipo experimental.

Fecha de inicio: 04 de Noviembre del 2023

Fecha de finalización: 29 de Enero del 2024

Lugar de ejecución: Provincia de Cotopaxi, Cantón Latacunga, Campus Salache

Facultad que auspicia: Ciencias Agronómicas y Recursos Naturales (CAREN)

Carrera que auspicia: Ingeniería Agronómica

Equipo de Trabajo:

Ing. Eliana Granja Guerra, Mg.

John Jairo Masaquiza Jiménez

Área de Conocimiento:

Agricultura

Línea de investigación:

Análisis, conservación y aprovechamiento racional de la biodiversidad, fauna y recursos naturales para el desarrollo sustentable y la prevención de desastres naturales.

Sub línea de investigación:

Producción agrícola sostenible.

2. Justificación del proyecto

La investigación sobre el antagonismo in vitro entre *Trichoderma spp.* y *Bacillus subtilis* frente al patógeno *Lasiodiplodia theobromae* en mora se justifica por la necesidad de abordar los desafíos que enfrenta este cultivo debido a la presencia de patógenos perjudiciales. La mora, al ser un cultivo de importancia económica y nutricional, requiere estrategias de manejo eficientes para garantizar cosechas saludables y sostenibles. En este contexto, la comprensión de las interacciones entre estos agentes biológicos se convierte en un objetivo clave para mejorar las prácticas agrícolas.

Los aportes de esta investigación se sitúan tanto en el ámbito teórico como en el práctico. Desde una perspectiva teórica, se busca ampliar nuestro conocimiento sobre las complejas interacciones biológicas entre *Trichoderma spp.*, *Bacillus subtilis* y *Lasiodiplodia theobromae*. Esto no solo contribuirá a la comprensión fundamental de la biología y ecología de estos organismos, sino que también abrirá nuevas perspectivas para la investigación en el campo de la fitopatología y la microbiología agrícola.

En un sentido práctico, los beneficios se extienden directamente a los agricultores y productores de mora. La identificación de estrategias de control eficaces contra *Lasiodiplodia theobromae* permitirá mejorar la salud de los cultivos y, por ende, aumentar la rentabilidad de las cosechas. Esta investigación se presenta como una herramienta valiosa en el desarrollo de prácticas agrícolas más sostenibles al reducir la dependencia de agroquímicos, lo que, a su vez, puede tener un impacto positivo en la calidad del suelo y en la conservación del medio ambiente.

El impacto y la relevancia de este estudio se manifiestan en la mejora de la seguridad alimentaria y en la mitigación de las pérdidas económicas asociadas a las infecciones por *Lasiodiplodia theobromae*. Al proporcionar soluciones prácticas y sostenibles para el control de este patógeno, la investigación contribuirá a fortalecer la resiliencia de la producción de mora frente a las amenazas fitopatológicas, consolidando así su importancia en la agricultura. En última instancia, este estudio representa un paso significativo hacia el desarrollo de estrategias de manejo integrado de plagas que beneficiarán tanto a los agricultores como al sector agrícola en su conjunto.

3. Beneficiarios del proyecto

Los beneficiarios directos de este proyecto son los agricultores que se dedican al cultivo de moras, con el objetivo de concienciarlos sobre las distintas estrategias para abordar este desafío y reducir la dependencia de los fungicidas.

En términos de beneficiarios indirectos, la mejora en la producción de mora generará efectos positivos en las comunidades locales que dependen económicamente de esta industria. Se estima que miles de personas, se verán beneficiadas de manera indirecta a medida que la actividad económica en estas comunidades se fortalece.

Así, este proyecto aspira a generar impactos positivos, tanto directos como indirectos, que beneficien de manera inclusiva a la comunidad agrícola, promoviendo la igualdad de oportunidades y contribuyendo al desarrollo sostenible de la región.

4. Problema de investigación.

En el cultivo de mora (*Rubus* spp.), la presencia del patógeno *Lasiodiplodia theobromae* ha emergido como una amenaza significativa que afecta la calidad y rendimiento de los cultivos. Este hongo fitopatógeno ha demostrado ser resistente a diversas estrategias de control convencionales, lo que plantea la necesidad de explorar enfoques alternativos para gestionar su impacto negativo. Entre las posibles soluciones, se han identificado dos agentes biológicos prometedores: *Trichoderma* spp. y *Bacillus subtilis*. Estos microorganismos beneficiosos han mostrado capacidad antagonista contra diversos patógenos, generando interés en su aplicación para el control de *Lasiodiplodia theobromae*.

El problema en cuestión involucra la interacción compleja entre *Lasiodiplodia theobromae* y dos agentes biológicos potenciales, *Trichoderma* spp. y *Bacillus subtilis*. Este escenario plantea interrogantes sobre la eficacia relativa de estos agentes en el control de la patogenicidad del hongo, así como sus posibles interacciones y efectos en el entorno del cultivo de mora.

Como parte del análisis de los antecedentes se puede reconocer el trabajo de Solórzano (2023) que se enfocó en identificar bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas a los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* en palto Zutano. *Bacillus subtilis* se destacó por incrementar positivamente el desarrollo de plántulas, afectando el número de hojas, peso fresco y seco de hojas, raíz, tallo y área foliar. La actividad antagónica

de Bac F (*B. subtilis*) y P3 (*P. putida*) se evaluó in vitro, mostrando eficacia contra *Phytophthora cinnamomi* y *Lasiodiplodia theobromae*. En condiciones de invernadero, Bac F redujo la severidad de síntomas por *P. cinnamomi* e incrementó la longitud y peso seco de la raíz. La interacción con micorrizas reveló mejoras en el crecimiento de las plantas a pesar de la presencia de *P. cinnamomi*, y las bacterias PGP favorecieron la absorción de nutrientes. En condiciones de salinidad, *P. plecoglossicida* y *B. subtilis* mitigaron la acumulación de iones cloro y sodio, reduciendo la pérdida de materia seca. La rizosfera de palto Hass/Zutano mostró asociación con *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Lysinibacillus*, destacando el potencial de *B. subtilis* para promover el crecimiento, mejorar resistencia al estrés salino y controlar patógenos radiculares, tanto independientemente como en interacción con micorrizas.

Muñoz (2023) realiza un experimento centrado en el aguacate, se exploró el "Impacto del control biológico de *Bacillus subtilis* a nivel in vitro sobre *Colletotrichum* spp. recolectado de frutos de aguacate (*Persea americana*)". El enfoque se dirige hacia los problemas de las enfermedades post cosecha, específicamente la antracnosis, causada por patógenos que afectan a los brotes, hojas, flores y frutas de los aguacates. El patógeno *Colletotrichum* spp., extraído de la corteza del fruto, fue cultivado en medio PDA. Se diseñaron cinco tratamientos con diversas concentraciones de *B. subtilis*, y se evidenció que el T4 inhibió el crecimiento del hongo patógeno en un 100%, seguido por el T3 con un 91,77%. El biocontrolador exhibió un antagonismo de tipo I, cubriendo completamente la superficie del medio de cultivo desde el primer día e impidiendo el desarrollo de *Colletotrichum* spp.

A su vez, la investigación Cambero et al., (2023) se centró en los patógenos fúngicos *Fusarium falciforme* y *Lasiodiplodia theobromae*, responsables de enfermedades en las raíces y el tallo de los árboles de guanábana en Nayarit, México. Dado que los agricultores no cuentan con estrategias efectivas para controlar estas enfermedades, el estudio se propuso evaluar el potencial de biocontrol in vitro utilizando cepas de *Trichoderma* y la efectividad de fungicidas convencionales. Se analizaron 13 cepas de *Trichoderma*, destacando *T. hamatum* y *T. asperellum*, que lograron inhibir hasta un 75.31% de la inhibición de *F. falciforme*. Asimismo, el fungicida Mancozeb demostró ser eficaz al inhibir completamente la inhibición in vitro de ambos patógenos. Estos resultados indican la posibilidad de emplear de manera conjunta ambas estrategias para

controlar las enfermedades en las raíces y el tallo de la guanábana, subrayando la necesidad de investigaciones adicionales sobre los posibles efectos sinérgicos de esta combinación en la prevención y control de estas enfermedades fúngicas en *Annona muricata*.

En torno a esto, surgen las siguientes interrogantes como parte de la formulación del problema:

- ¿Cómo se puede cuantificar y caracterizar de manera precisa la inhibición de *Lasiodiplodia theobromae in vitro*, considerando las condiciones específicas del medio de cultivo y los factores que influyen en su desarrollo microscópico?
- ¿Cuál es la naturaleza de la interacción entre *Bacillus subtilis*, *Trichoderma* y *Lasiodiplodia theobromae* en pruebas *in vitro*, y cómo afecta esta interacción a la actividad antagónica de los agentes biológicos en un entorno mesocosmos?
- ¿Cuál es el tratamiento más efectivo para el control del hongo *Lasiodiplodia theobromae*, considerando la eficacia observada de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma* en pruebas *in vitro*, y cómo se traduce esta eficacia a nivel de aplicaciones a gran escala en el cultivo de mora?

5. Objetivos: general y específicos.

5.1. General

Evaluar la actividad *in vitro* de *Trichoderma* spp. y *Bacillus subtilis* en la inhibición del crecimiento de *Lasiodiplodia theobromae*.

5.2. Específicos

- Determinar la inhibición de *Lasiodiplodia theobromae in vitro*.
- Caracterizar morfológicamente al hongo *Lasiodiplodia theobromae*.
- Determinar la actividad antagónica de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma* spp. frente a *Lasiodiplodia*, mediante prueba *in vitro*.
- Determinar el mejor tratamiento para el control del hongo *Lasiodiplodia theobromae*.

6. Actividades y sistema de tareas en relación a los objetivos planteados.

| OBJETIVOS | ACTIVIDAD | METODOLOGÍA | RESULTADOS |
|--|--|---|---|
| Determinar la inhibición de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> <i>in vitro</i> . | Preparación de cajas Petri con medio PDA. | Colocación de secciones de micelio de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> en el centro de las cajas Petri. | Mediciones precisas de la inhibición. |
| Caracterizar morfológicamente al hongo <i>Lasiodiplodia theobromae</i> . | Observación microscópica del micelio, picnidios y conidios. | Se realizó la observación microscópica del micelio, picnidios y conidios de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> . | Determinación de las características morfológicas del hongo <i>Lasiodiplodia theobromae</i> , incluyendo la forma y tamaño del micelio, picnidios y conidios. |
| Determinar la actividad antagónica de <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Trichoderma</i> spp. frente a <i>Lasiodiplodia</i> , mediante prueba <i>in vitro</i> . | Obtención de suspensiones de <i>Trichoderma</i> spp. y <i>Bacillus subtilis</i> . | Aplicación de las suspensiones en puntos equidistantes alrededor del hongo <i>Lasiodiplodia theobromae</i> . | Evaluación de la interacción y efectividad antagónica. |
| Determinar el mejor tratamiento para el control del hongo <i>Lasiodiplodia theobromae</i> . | Establecimiento de tratamientos con diferentes concentraciones de <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Trichoderma</i> spp. | Observación del crecimiento del hongo patógeno en presencia de los tratamientos. | Identificación del tratamiento más efectivo. |

Elaborado por: (Masaquiza, 2024)

7. Fundamentación científico técnica.

1. Los Hongos

Los hongos, pertenecientes al reino Fungi, son organismos eucariotas que se caracterizan por su diversidad morfológica y su capacidad de obtener nutrientes mediante la absorción de compuestos orgánicos. A diferencia de las plantas, carecen de clorofila y no pueden llevar a cabo la fotosíntesis, por lo que dependen de fuentes externas de carbono para su supervivencia (Venturella, Ferraro, Cirlincione, & Gargano, 2021). Estos organismos desempeñan roles vitales en los ecosistemas, ya que participan en la descomposición de materia orgánica, el ciclado de nutrientes y la simbiosis con otros organismos. Además, algunos hongos son patógenos de plantas y animales, mientras que otros son utilizados en la industria alimentaria, farmacéutica y biotecnológica (Bahram & Netherway, 2022).

Uno de los géneros de hongos más estudiados es *Trichoderma*. Desde el punto de vista taxonómico, *Trichoderma* pertenece a la clase *Sordariomycetes* y la familia *Hypocreaceae*. Esta amplia diversidad de especies se encuentra distribuida en distintos hábitats, desde suelos hasta ambientes acuáticos, y se caracteriza por su capacidad de colonizar y competir con otros microorganismos (Quevedo, Magdama, Castro, & Vera, 2022). Morfológicamente, *Trichoderma* presenta micelios hialinos, esporas conidiógenas y conidios con forma variable según la especie. Además, muchas especies de *Trichoderma* son conocidas por su capacidad de antagonismo hacia patógenos de plantas, lo que las convierte en agentes de biocontrol agrícola (Wahab, y otros, 2023).

Otro hongo relevante es *Lasiodiplodia theobromae*, el cual también se encuentra clasificado en la clase *Sordariomycetes*, pero pertenece a la familia *Botryosphaeriaceae*. Esta especie fúngica es conocida por su amplia distribución geográfica y su capacidad de infectar una variedad de plantas hospedantes, causando enfermedades como la pudrición de la madera y la necrosis de tejidos (Medina, 2022). Morfológicamente, *Lasiodiplodia theobromae* se presenta como colonias de micelio oscuro con conidióforos ramificados que producen conidios hialinos y unicelulares. Su importancia radica en su impacto negativo en la agricultura y la silvicultura, así

como en su capacidad de causar daños económicos significativos (Zhang S. , y otros, 2020).

Por otro lado, *Bacillus subtilis* es una bacteria Gram-positiva que pertenece al filo *Firmicutes* y a la familia *Bacillaceae*. Esta especie bacteriana es ampliamente estudiada y utilizada en diversas aplicaciones biotecnológicas debido a su capacidad de formar esporas resistentes a condiciones adversas y su habilidad para secretar una variedad de enzimas y compuestos bioactivos (Almeida, Lücking, Vasco, Gaya, & Diazgranados, 2022). Morfológicamente, *Bacillus subtilis* se presenta como células bacilares con extremos cuadrados o redondeados, dispuestas individualmente, en pares o en cadenas cortas. Además, *Bacillus subtilis* es conocido por su papel beneficioso como promotor del crecimiento vegetal, biofertilizante y agente de control biológico contra patógenos de plantas y humanos (Jiao & Lu, 2020).

2. Hongo *Trichoderma*

Trichoderma es un género de hongos filamentosos que pertenece a la clase Sordariomycetes y la familia Hypocreaceae. Este género es ampliamente estudiado debido a su diversidad y su importancia en aplicaciones biotecnológicas, especialmente en agricultura (Hidalgo & Morán, 2020). *Trichoderma* se encuentra distribuido en una variedad de hábitats, desde suelos hasta ambientes acuáticos, y es conocido por su capacidad de colonizar y competir con otros microorganismos en estos entornos. Una de las características distintivas de *Trichoderma* es su capacidad de producir una amplia gama de enzimas hidrolíticas, lo que le confiere habilidades degradativas hacia diferentes sustratos orgánicos (Tyśkiewicz, Nowak, Ozimek, & Jaroszek, 2022; Ipiates, Pineda, Barrigas, Muñoz, & Pineda, 2021).

Desde el punto de vista morfológico, *Trichoderma* presenta micelios hialinos y ramificados que crecen de manera rápida en condiciones favorables. Las estructuras reproductivas de *Trichoderma* incluyen conidióforos y conidios, los cuales son producidos en gran cantidad y pueden tener formas y tamaños variables dependiendo de la especie (Andrade, y otros, 2023). Estos conidios son importantes para la dispersión y reproducción del hongo, y su presencia es fundamental para su capacidad

de colonizar nuevos sustratos y competir con otros microorganismos (Khan, Najeeb, Hussain, Xie, & Li, 2020; González, Ortega, Anducho, & Mercado, 2023).

Una de las características más relevantes de *Trichoderma* es su capacidad de antagonismo hacia otros hongos fitopatógenos. Muchas especies de *Trichoderma* han sido identificadas como agentes de biocontrol agrícola debido a su habilidad para colonizar las raíces de las plantas y protegerlas de enfermedades causadas por patógenos como *Fusarium*, *Botrytis* y *Rhizoctonia* (Amerio, Castrillo, Bich, Zapata, & Villalba, 2020). Este fenómeno, conocido como "competencia por espacio y nutrientes", involucra la producción de metabolitos antagónicos, la activación del sistema de defensa de la planta y la inducción de resistencia sistémica, lo que resulta en una reducción significativa de las enfermedades en cultivos agrícolas (Alfik & Weisskopf, 2021).

Además de su papel en la agricultura, *Trichoderma* también ha sido estudiado por su capacidad de degradar compuestos tóxicos y contaminantes ambientales, como pesticidas y residuos industriales (Peña & Pavone, 2020). Esta capacidad de biodegradación lo convierte en un candidato prometedor para aplicaciones en biorremediación y tratamiento de suelos contaminados. En resumen, *Trichoderma* es un género fascinante de hongos con un gran potencial tanto en aplicaciones agrícolas como ambientales, y su estudio continuo promete proporcionar nuevas herramientas para la gestión sostenible de los recursos naturales y la protección de los ecosistemas (Kumari & Kumar, 2020).

7.2.1. Taxonomía

La taxonomía del género *Trichoderma* es un campo en constante evolución debido a la diversidad de especies y a los avances en técnicas de análisis genético. *Trichoderma* pertenece al reino Fungi, dentro de la división *Ascomycota*. Históricamente, el género *Trichoderma* se clasificaba dentro de la familia *Moniliaceae*, pero estudios filogenéticos recientes han llevado a su reubicación en la familia *Hypocreaceae* (Cai & Druzhinina, 2021).

A nivel taxonómico, *Trichoderma* se encuentra dentro de la clase *Sordariomycetes* y del orden *Hypocreales*. La taxonomía de *Trichoderma* se basa principalmente en características morfológicas y moleculares. Las características morfológicas incluyen

la estructura de las conidias, la presencia o ausencia de pigmentación, la formación de esclerocios y la morfología del micelio. Sin embargo, la taxonomía molecular ha cobrado cada vez más importancia y se basa en análisis de secuencias de ADN, como el gen de la subunidad 1 del ARN ribosomal (rDNA), el gen *tef1- α* (que codifica la elongación del factor de traducción), y otros genes específicos (Dou, y otros, 2020).

Las técnicas de secuenciación de ADN han revelado una gran diversidad genética dentro del género *Trichoderma*, lo que ha llevado a la descripción de numerosas especies nuevas en las últimas décadas. Además, se ha observado que algunas especies de *Trichoderma* son morfológicamente similares, pero genéticamente distintas, lo que ha llevado a una reevaluación y reorganización de la taxonomía dentro del género. Un aspecto importante de la taxonomía de *Trichoderma* es su relación con otras especies dentro de la misma familia y orden. La diversidad dentro de la familia *Hypocreaceae* y del orden *Hypocreales* plantea desafíos para la clasificación precisa de *Trichoderma* y su relación filogenética con otros géneros cercanos, como *Hypocrea* y *Tolyptocladium* (Zeng, y otros, 2022).

7.2.2. Morfología

La morfología del hongo *Trichoderma* es notable por varias características distintivas que ayudan en su identificación y comprensión. Este género de hongos filamentoso presenta una morfología típica de muchos hongos filamentosos, pero con algunas características específicas. En términos de su estructura microscópica, *Trichoderma* se caracteriza por tener hifas hialinas y septadas, lo que significa que sus filamentos son transparentes y tienen septos o divisiones transversales. Estas hifas forman un micelio que puede crecer rápidamente sobre diversos sustratos. Además, *Trichoderma* produce estructuras reproductivas llamadas conidióforos, que son estructuras ramificadas donde se forman y se liberan las conidias (Inglis, y otros, 2020).

Las conidias de *Trichoderma* son otro aspecto importante de su morfología. Son esporas asexuales que se forman en cadenas en los extremos de los conidióforos. Estas conidias son generalmente hialinas (transparentes), unicelulares y de forma variable dependiendo de la especie. La producción masiva de conidias y su liberación al ambiente son características clave que contribuyen a la capacidad de dispersión y

colonización de *Trichoderma* en diferentes sustratos (Unartngam, Srithongkum, Intanoo, Charoenrak, & Chamswarng, 2020).

Una característica interesante de la morfología de *Trichoderma* es su capacidad de producir estructuras especializadas en respuesta a su entorno o a la presencia de otros microorganismos. Por ejemplo, algunas especies de *Trichoderma* pueden formar estructuras de resistencia llamadas clamidosporas cuando las condiciones ambientales son adversas. Estas clamidosporas son estructuras gruesas y resistentes que pueden proteger al hongo durante períodos de sequía o estrés (Matas, y otros, 2022).

Otro aspecto de la morfología de *Trichoderma* que se ha estudiado en detalle es su interacción con otros microorganismos, especialmente con hongos fitopatógenos. *Trichoderma* es conocido por su capacidad de competir con otros hongos en el suelo y en ambientes agrícolas, y su morfología, incluyendo la producción de enzimas degradativas y la formación de estructuras de colonización rápida, juega un papel importante en esta capacidad competitiva (Schütz, Haltrich, & Atanasova, 2020).

3. Hongo *Lasiodiplodia theobromae*

Lasiodiplodia theobromae es un hongo fitopatógeno que pertenece a la clase Sordariomycetes y a la familia Botryosphaeriaceae. Este hongo es conocido por su amplia distribución geográfica y su capacidad de infectar una variedad de plantas hospedantes, lo que lo convierte en un importante agente causante de enfermedades vegetales (Polanco, Alvarado, Olivares, González, & Pérez, 2020; Jimenez, Soto, Casas, & Aragón, 2023). Entre las enfermedades más comunes causadas por *Lasiodiplodia theobromae* se encuentran la pudrición de la madera y la necrosis de tejidos en una amplia gama de cultivos agrícolas y árboles frutales, lo que puede resultar en daños significativos en la producción agrícola y en el valor económico de los cultivos afectados (Salvatore, Alves, & Andolfi, 2020).

El control de *Lasiodiplodia theobromae* presenta desafíos significativos debido a su capacidad de infectar una amplia variedad de plantas y su resistencia a diferentes condiciones ambientales (Moreira, Cedeño, Canchignia, & Garcés, 2021). Las estrategias de manejo suelen incluir la aplicación de fungicidas protectores durante los períodos de alta susceptibilidad de las plantas, así como prácticas culturales que reduzcan la propagación del hongo, como la eliminación de tejidos infectados y la

promoción de condiciones de crecimiento saludables para las plantas (Cao, Wang, Liu, Jia, & Sun, 2020; Flores, y otros, 2022).

7.3.1. Taxonomía

El hongo *Lasiodiplodia theobromae* pertenece al reino Fungi y se clasifica dentro de la clase *Sordariomycetes* y la familia *Botryosphaeriaceae*. Esta especie fúngica ha sido objeto de estudio debido a su importancia como fitopatógeno, causando enfermedades en una amplia gama de plantas hospedantes. Su taxonomía ha sido objeto de revisión y refinamiento a lo largo del tiempo a medida que se ha mejorado la comprensión de su diversidad y relaciones filogenéticas (Moubasher, y otros, 2022).

A nivel de orden, *Lasiodiplodia theobromae* se encuentra dentro de los *Hypocreales*, que es un grupo diverso que incluye muchos hongos fitopatógenos importantes. Dentro de este orden, la familia *Botryosphaeriaceae* alberga varios géneros, entre ellos *Lasiodiplodia*, que comprende múltiples especies, siendo *L. theobromae* una de las más destacadas (Salvatore, Andolfi, & Nicoletti, 2022). La taxonomía de *Lasiodiplodia theobromae* se basa en características morfológicas y moleculares. Morfológicamente, este hongo se caracteriza por la formación de colonias de micelio oscuro en medios de cultivo, así como por la producción de conidios unicelulares y hialinos. Estos conidios se forman en conidióforos ramificados y son importantes para la dispersión y propagación del hongo (Huda, Mohamed, Zakaria, Leong, & Mohd, 2022).

Sin embargo, en los últimos años, se ha prestado una atención creciente a la taxonomía molecular para una clasificación más precisa de *Lasiodiplodia theobromae* y otros hongos fitopatógenos. El análisis de secuencias de ADN, particularmente del ADN ribosomal y de genes específicos, ha permitido una mejor comprensión de la diversidad genética y de las relaciones filogenéticas dentro del género *Lasiodiplodia* y de la familia *Botryosphaeriaceae* en general (Pornsuriya, Thaochan, Chairin, & Sunpapao, 2023).

Este enfoque molecular ha llevado a la identificación de múltiples linajes dentro de *Lasiodiplodia theobromae* y ha proporcionado una base para la descripción de nuevas especies y la revisión de la taxonomía existente. Además, la secuenciación del genoma de *Lasiodiplodia theobromae* y de otras especies relacionadas ha proporcionado

información valiosa sobre su biología, patogenicidad y capacidad de adaptación a diferentes ambientes (Rangel, Paolinelli, Rolshausen, Valenzuela, & Hernandez, 2021).

7.3.2. Morfología

La morfología del hongo *Lasiodiplodia theobromae* presenta características distintivas que son importantes para su identificación y comprensión. Este hongo fitopatógeno se caracteriza morfológicamente por su estructura de crecimiento, la formación de colonias y la producción de estructuras reproductivas (Arrieta, Díaz, Pérez, Cadena, & Sánchez, 2021). Las colonias de *Lasiodiplodia theobromae* se desarrollan típicamente en medios de cultivo como placas de agar, presentando un aspecto oscuro debido al color del micelio. Este micelio se extiende sobre la superficie del medio de cultivo, formando una red ramificada de hifas. Las hifas son filamentos delgados y septados que constituyen el cuerpo principal del hongo y que le permiten crecer y colonizar sustratos (Briste, Akanda, Bhuiyan, Mahmud, & Islam, 2022).

Una característica importante de *Lasiodiplodia theobromae* son los conidióforos y conidios que produce. Los conidióforos son estructuras especializadas que emergen del micelio y en las que se forman y maduran las esporas asexuales llamadas conidios. Estas estructuras pueden ser observadas bajo un microscopio óptico y son esenciales para la reproducción y dispersión del hongo (Gnanesh, y otros, 2022). Los conidios de *Lasiodiplodia theobromae* son unicelulares y generalmente hialinos, lo que significa que son transparentes o de color claro. Estas esporas son producidas en gran cantidad en los conidióforos y son liberadas al ambiente, donde pueden dispersarse y colonizar nuevas plantas hospedantes (Dheivam, y otros, 2020).

La morfología de los conidios puede variar ligeramente entre diferentes cepas y condiciones de crecimiento, pero en general, son estructuras pequeñas y ovaladas. Además de estas características principales, *Lasiodiplodia theobromae* también puede formar estructuras de resistencia en ciertas condiciones ambientales desfavorables. Por ejemplo, puede producir clamidosporas, que son estructuras gruesas y resistentes que protegen al hongo durante períodos de estrés, como la sequía o el frío (Phetphan, y otros, 2023; Navarro, Salinas, & Trigos, 2022).

4. Bacteria *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis es una bacteria Gram-positiva que pertenece al filo *Firmicutes* y a la familia *Bacillaceae*. Es una de las bacterias más estudiadas y utilizadas en aplicaciones biotecnológicas debido a su amplia gama de características beneficiosas y su capacidad para adaptarse a diferentes entornos (Jena, Basa, Panda, & Kumar, 2020). Esta bacteria se encuentra comúnmente en el suelo y en ambientes naturales, donde desempeña roles importantes en la descomposición de la materia orgánica y el ciclo de nutrientes. Además, *Bacillus subtilis* es conocido por su capacidad de formar esporas resistentes a condiciones adversas, lo que le permite sobrevivir en condiciones de estrés ambiental y colonizar una variedad de nichos ecológicos (Jaborova, y otros, 2021).

Desde el punto de vista morfológico, *Bacillus subtilis* se presenta como células bacilares con extremos cuadrados o redondeados, dispuestas individualmente, en pares o en cadenas cortas. Estas células pueden exhibir una variedad de tamaños y formas, dependiendo de las condiciones de crecimiento y la fase del ciclo celular (Johnson, Lalanne, Peters, & Wei, 2020). Además, *Bacillus subtilis* produce esporas ovaladas que se forman en condiciones desfavorables, como la falta de nutrientes o la presencia de agentes estresantes, y que le confieren una capacidad de supervivencia prolongada en el medio ambiente (Yong, y otros, 2020).

Una de las características más destacadas de *Bacillus subtilis* es su capacidad para secretar una variedad de enzimas y compuestos bioactivos que tienen aplicaciones en agricultura, medicina y biotecnología (Olmos, Acosta, Mendoza, & Pitones, 2020). Estas enzimas incluyen proteasas, amilasas, lipasas y celulasas, que pueden ser utilizadas en la industria alimentaria para la producción de alimentos fermentados y enzimas industriales. Además, *Bacillus subtilis* produce una variedad de metabolitos secundarios con propiedades antibióticas y antifúngicas, que han sido investigados como posibles agentes terapéuticos contra enfermedades infecciosas en humanos y animales (Chandra, Chandra, & Tripathi, 2021).

Otro aspecto importante de *Bacillus subtilis* es su papel beneficioso como promotor del crecimiento vegetal y agente de control biológico en la agricultura. Esta bacteria es capaz de colonizar las raíces de las plantas y promover su crecimiento mediante la producción de hormonas vegetales y la solubilización de nutrientes del suelo (Bai, y

otros, 2022). Además, *Bacillus subtilis* tiene la capacidad de competir con patógenos de plantas por recursos y producir metabolitos antagónicos que inhiben su crecimiento y desarrollo, lo que lo convierte en un agente eficaz para el control de enfermedades de plantas en agricultura orgánica y sostenible (Su, Liu, Fang, & Zhang, 2020).

7.4.1. Taxonomía

La bacteria *Bacillus subtilis* es un microorganismo Gram-positivo que pertenece al filo *Firmicutes* y a la familia *Bacillaceae*. Esta bacteria ha sido objeto de intensa investigación debido a su versatilidad y a su amplia gama de aplicaciones biotecnológicas y agrícolas. Su taxonomía se basa en características morfológicas, bioquímicas y moleculares, lo que ha permitido una clasificación precisa dentro del árbol filogenético de las bacterias (Carroll, Wiedmann, & Kovac, 2020).

A nivel taxonómico, *Bacillus subtilis* se encuentra dentro del orden *Bacillales* y de la clase *Bacilli*. Esta clase incluye a una gran variedad de bacterias Gram-positivas con formas y tamaños diversos. *Bacillus subtilis* se distingue por su capacidad de formar endosporas resistentes a condiciones ambientales adversas, lo que le confiere una notable capacidad de supervivencia en diferentes entornos (Errington & Van der Aart, 2020).

La taxonomía de *Bacillus subtilis* también se basa en análisis moleculares de secuencias de ADN. Los estudios de filogenia molecular han permitido una mejor comprensión de las relaciones evolutivas entre diferentes cepas y especies dentro del género *Bacillus*, así como la identificación de genes específicos que son característicos de *Bacillus subtilis* y que desempeñan roles importantes en su biología y función (Patel & Gupta, 2020).

Además de su clasificación taxonómica, *Bacillus subtilis* se ha subdividido en diferentes cepas y variantes genéticas que pueden tener características y capacidades biológicas únicas. Estas cepas se han caracterizado por su capacidad de producción de metabolitos secundarios, enzimas y compuestos bioactivos que tienen aplicaciones en agricultura, industria alimentaria y salud humana (Xu, y otros, 2022).

7.4.2. Morfología

La morfología de la bacteria *Bacillus subtilis* es característica de muchas bacterias del género *Bacillus* y se distingue por varias características estructurales y biológicas. *Bacillus subtilis* es una bacteria Gram-positiva, lo que significa que retiene el color violeta del tinte de cristal violeta en la tinción de Gram debido a la estructura de su pared celular (Sassine, Sousa, Lalk, Daniel, & Vollmer, 2020).

Morfológicamente, *Bacillus subtilis* se presenta como una bacteria en forma de bastón o bacilo, lo que significa que tiene una forma alargada y cilíndrica. Estas células son generalmente solitarias, pero también pueden agruparse en cadenas cortas o en pares. Aunque su forma puede variar ligeramente dependiendo de las condiciones de crecimiento, *Bacillus subtilis* típicamente presenta una longitud de alrededor de 2-3 micrómetros y un diámetro de alrededor de 0.5-1 micrómetro (Bolívar, y otros, 2021).

Una característica importante de *Bacillus subtilis* es su capacidad de formar esporas, también conocidas como endosporas. Las esporas son estructuras de resistencia que la bacteria produce en condiciones de estrés, como la falta de nutrientes o la exposición a condiciones ambientales adversas. Las esporas de *Bacillus subtilis* son altamente resistentes a la desecación, al calor y a los productos químicos, lo que les permite sobrevivir durante largos períodos de tiempo en el medio ambiente y en condiciones desfavorables (Zhang G. , y otros, 2021).

Además de su morfología celular básica, *Bacillus subtilis* produce una variedad de estructuras y apéndices celulares que desempeñan funciones importantes en su biología. Por ejemplo, puede formar flagelos en la superficie celular que le permiten moverse activamente en medios líquidos. También puede producir pili o fimbrias, que son estructuras filamentosas que facilitan la adhesión a superficies y la formación de biofilms (Khanna, Lopez-Garrido, & Pogliano, 2020).

8. Validación de las preguntas científicas.

Formulación del problema

¿Cómo interactúa la inhibición del patógeno *Lasiodiplodia theobromae* frente a agentes de biocontrol?

Sistematización del problema

- ¿Cómo es la inhibición de *Lasiodiplodia theobromae* *in vitro*?
- ¿Cuál es la actividad antagónica de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma* frente a *Lasiodiplodia theobromae*, determinada mediante prueba *in vitro*?
- ¿Cuál es el tratamiento más efectivo para el control del hongo *Lasiodiplodia theobromae*?
- ¿Cuáles son las características morfológicas del hongo *Lasiodiplodia theobromae*?

8. Metodologías y Diseño Experimental.

8.1 Localización del ensayo

8.1.1 Ubicación Política

Tabla 1 Ubicación Política

| Ubicación Política | |
|--------------------|-------------|
| Provincia | Cotopaxi |
| Cantón | Latacunga |
| Parroquia | Eloy Alfaro |
| Sector | Salache |

Elaborado por: (Masaquiza, 2024)

8.1.2 Ubicación Geográfica

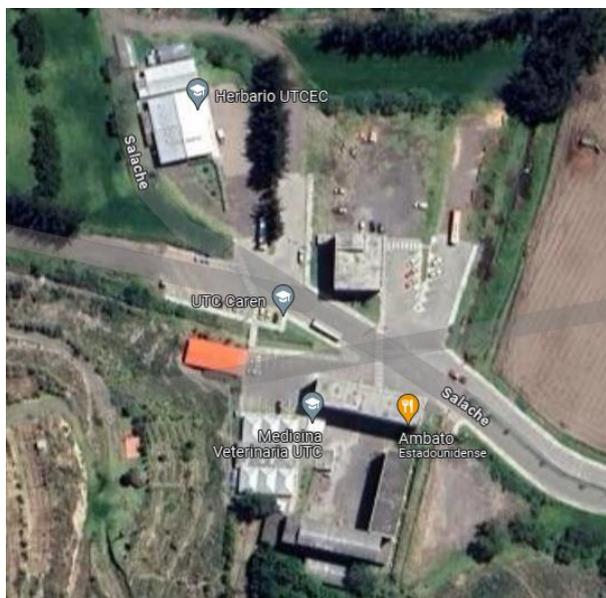
Tabla 2 Ubicación Geográfica

| Ubicación Geográfica | |
|----------------------|--------------------|
| LATITUD | 00°59'47,68" NORTE |
| LONGITUD | 78°37'19,16" OESTE |
| ALTITUD | 2870 msnm |

Elaborado por: (Masaquiza, 2024)

8.1.3 Croquis

Figura 1 Croquis del ensayo



Fuente: (Google earth, 2024)

8.2 Condiciones agroecológicas

Tabla 3 Condiciones agroecológicas

CONDICIONES AGROECOLÓGICAS

| | |
|--------------------|-----------------|
| Temperatura | 14 °C |
| Pluviosidad | 275 mm |
| Heliofanía | 12 Horas |
| Viento | Sureste-Noreste |

Elaborado por: (Masaquiza, 2024)

8.3 Tipo de Investigación

8.3.1 Experimental

La metodología utilizada en esta investigación se basa en un diseño experimental, una estrategia sistemática y controlada que permite realizar observaciones, mediciones y análisis para responder a preguntas específicas de investigación. En el contexto de este estudio, el diseño experimental se emplea para evaluar la actividad in vitro de *Trichoderma* spp. y *Bacillus subtilis* en la inhibición del crecimiento de *Lasiodiplodia theobromae*. El diseño experimental es una herramienta fundamental en la

investigación científica, ya que proporciona una estructura lógica para realizar experimentos de manera organizada y obtener resultados confiables (Ramos, 2021).

8.3.2 Cualitativa

Este enfoque busca obtener una comprensión más completa y profunda al integrar aspectos cualitativos, que se centran en la calidad y la naturaleza del fenómeno, con aspectos cuantitativos, que se centran en la cantidad y la medición numérica.

8.4 Modalidad básica de la investigación

8.4.1 Observación científica

Se empleará para evaluar visualmente la supresión de la inhibición del patógeno por parte de los biocontroladores. Esta observación permitirá una comprensión más profunda de la interacción entre los agentes de control biológico y el patógeno, proporcionando datos visuales que respalden los resultados obtenidos mediante análisis cuantitativos.

8.4.2 Cuantitativo

El ensayo realizado se centró en recopilar datos relativos a la inhibición con el propósito de evaluar la eficacia de los biocontroladores en la supresión del patógeno. La inhibición fue utilizada como una medida cuantitativa para comparar el impacto de los biocontroladores en la inhibición del desarrollo del patógeno.

8.4.3 De laboratorio

La investigación es únicamente de laboratorio, ya que la multiplicación y los enfrentamientos de los biocontroladores frente al patógeno se lo hará directamente en laboratorio.

8.4.4 Bibliografía documental

A lo largo de todo el proceso de investigación se empleó una amplia variedad de recursos científicos y técnicos para respaldar mis argumentos. Este enfoque me permitió establecer una base sólida y confiable de conocimientos, asegurando la calidad y la validez de mis descubrimientos.

8.5 Materiales y equipos

A continuación, se detallan los materiales y equipos se fueron usados en la investigación.

Tabla 4 Materiales y equipos que se utilizaron en la investigación.

| Material Biológico | Equipos de laboratorio | Insumos de laboratorio | Material en general |
|---|--|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • <i>Lasiodiplodia theobromae</i> • <i>Trichoderma</i> spp. • <i>Bacillus subtilis</i> comercial. | <ul style="list-style-type: none"> • Autoclave • Balanza digital gr • Cámara de Flujo laminar • Incubadora • Microscopio • Cámara de Neubauer • Micropipetas • Porta y cubre objetos • Vasos de precipitación • Mechero de Alcohol • Sacabocado • Gradilla | <ul style="list-style-type: none"> • Agar PDA gr • Alcohol comercial • Alcohol al 96% mL • Azul de metileno | <ul style="list-style-type: none"> • Cajas Petri • Papel Parafilm • Jeringuilla mL • Guantes de Látex • Mascarilla quirúrgica • Agua destilada mL • Papel Aluminio • Atomizador • Caja de fosforo • Regla 20 cm • Cartulina negra A3 |

Elaborado por: (Masaquiza, 2024)

8.6 Diseño Experimental

Se realizó un diseño experimental de DCA (Diseño completamente al azar) con un arreglo factorial de 3x2; siendo, los factores biocontroladores y concentraciones (10^4 y 10^8). Se trabajó con un total de 4 tratamientos y 5 repeticiones, la variable de respuesta que se evaluó fue el porcentaje de inhibición de la inhibición del patógeno *Lasiodiplodia theobromae*. Con los datos obtenidos se realizó el análisis de varianza (ADEVA), con la prueba de Tukey al 5% ($T=0,05$) (Leon Ttacca, 2016).

8.6.1 Unidad experimental

Cada unidad experimental consta de 5 repeticiones, también los testigos para *Trichoderma* spp, *Bacillus subtilis* y Blanco, con 2 repeticiones. Con un total de 26 Cajas Petri distribuidas.

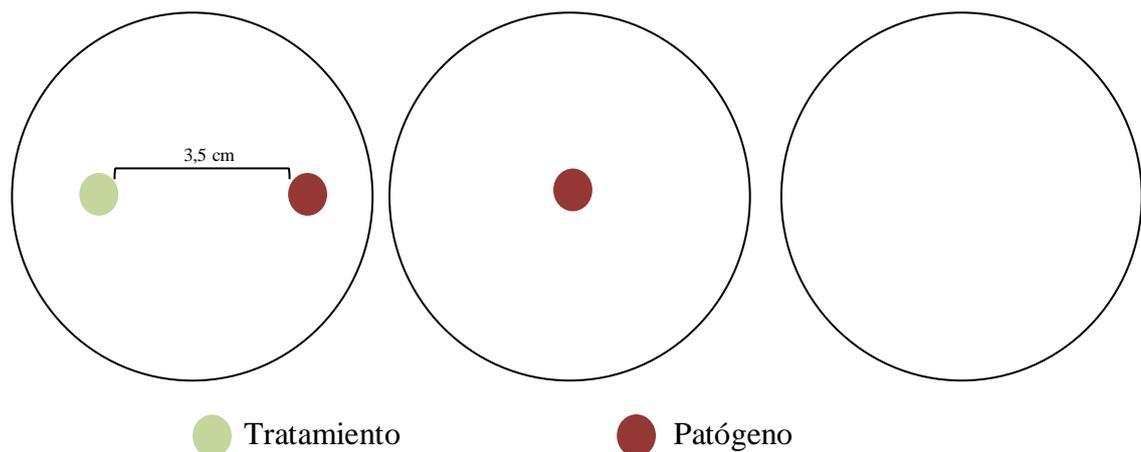
8.7 Tratamientos en estudio

Tabla 5 Tratamientos para el control del patógeno *Lasiodiplodia theobromae*.

| DISEÑO EXPERIMENTAL (DCA) | | |
|---------------------------|---------------|--|
| TRATAMIENTOS | CODIGO | DESCRIPCION |
| T1 | <i>T + L</i> | <i>Trichoderma</i> spp. + <i>Lasiodiplodia theobromae</i> |
| T2 | <i>B4 + L</i> | <i>Bacillus subtilis</i> 10 ⁴ + <i>Lasiodiplodia theobromae</i> |
| T3 | <i>B8 + L</i> | <i>Bacillus subtilis</i> 10 ⁸ + <i>Lasiodiplodia theobromae</i> |
| T4 | <i>L</i> | <i>Lasiodiplodia theobromae</i> |

Elaborado por: (Masaquiza, 2024)

Figura 2 Croquis de siembra para la prueba de control biológico *in vitro*. A. Cultivo dual; B. Control, para pruebas; C. Blanco para observación del buen manejo de siembra.



Elaborado por: (Masaquiza, 2024)

8.8 Manejo del experimento

Fase I: Propagación de *Lasiodiplodia theobromae* y *Trichoderma* spp.

Protocolo para la inoculación de cepas *Trichoderma* spp. (Troya & Vaca Granda, 2014) Modificado.

Procedimiento para propagación

- PDA Agar
- Cajas Petri

- Papel Aluminio
- Rollo film
- Cinta Parafilm
- Atomizador
- Palillos chinos

Materiales de laboratorio

- Autoclave
- Cámara de flujo laminar
- Balanza digital gr.
- Incubadora 28 °C
- Mecheros

Procedimiento

1. Una vez en el laboratorio, en un frasco de vidrio se preparó 3,9 gr de PDA en 100 ml de agua destilada y con aluminio envuelto en la parte de la tapa, se envolvió algunos palillos chinos con aluminio.
2. Se procedió a esterilizar el frasco en conjunto con los palillos en el Autoclave a 35 minutos, a una temperatura de 121 °C.
3. Luego de que haya transcurrido el tiempo estimado, se procedió a llevar el frasco de PDA a la cámara de flujo laminar y los materiales a usar en la propagación.
4. Se vertió de manera homogénea en las cajas Petri dando un total de 5 cajas.
5. Con la ayuda de los palillos chinos se extrajo el micelio de la caja con el hongo y se le inserto en el centro de la caja Petri con todas las medidas de asepsia correspondiente.
6. Se procedió con el sellado con la cinta Parafilm y se embalo con el rollo film para luego ser enviado a la incubadora por 10 días a una temperatura de 28 °C.

Este proceso se realizó hasta que las cajas Petri se encuentren totalmente pobladas y libres de contaminación.

Fase II: Concentración de *Bacillus subtilis* comercial.

1. Cálculo de *Bacillus subtilis* comercial según el fabricante.

13,4 gr 1 000 mL H₂O

X= 53,6 gr 4 000 mL H₂O

2. Con el cálculo obtenido, se procedió a pesar en la balanza digital 53,6 gr del sólido de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, se mezcló con 4000 mL de agua destilada siendo esta la solución madre.
3. Con la ayuda de 6 tubos de ensayo y una gradilla se colocó a cada tubo 9 mL de agua destilada.
4. Con una pipeta se extrajo 1 mL de la solución madre y se lo colocó al primer tubo de ensayo y se agitó durante 2 minutos.
5. Para el conteo se realizó disoluciones seriadas, donde se empezó con el conteo con la disolución -6.
6. Con el uso de una micropipeta se toma 6 µl de la muestra de la disolución -6 y se lo coloca en la cámara Neubauer.
7. Con la ayuda del microscopio Olympus se llevó a cabo el conteo y se obtuvo un número detallado.

Guía para el cálculo de la concentración del inóculo. (Peña Sanchez & Páez Mendieta , 2005)

***Bacillus subtilis* comercial.**

$$\frac{N\# \text{ Conidios } \times \text{ disolucion}}{\text{Volumen}} =$$

$$\frac{378 \times 10 \times 10 \times 10 \times 10 \times 10 \times 10}{1} = 378\,000\,000 = 3,78 \times 10^8$$

Fase III Aplicación de los biocontroladores frente al patógeno.

1. Una vez realizado los ensayos en laboratorio, se realizó el enfrentamiento dual entre los biocontroladores frente al patógeno.
2. Se llevaron a cabo enfrentamientos duales entre un fitopatógeno y biocontroladores utilizando cajas Petri de 90x15 mm con medio de cultivo PDA.
3. Se emplearon discos de medio de cultivo con micelio de *Trichoderma* spp. y *Lasiodiplodia theobromae*, obtenidos de cultivos de 15 días, colocados en los extremos de las cajas Petri.

4. Además, para el biocontrolador *Bacillus subtilis*, se realizaron conteos en una cámara de Neubauer para concentraciones de 10^8 y 10^4 . Se añadieron 50 μ l de cada concentración y se trazó una línea de 3,5 cm en el extremo de la caja Petri sobre el medio PDA utilizando un tubo de ensayo (Leon Ttacca, 2016).

Fase IV Registro de Datos.

Una vez obtenido el dato de inhibición del patógeno, se procede a tabular en Excel, para después realizar los análisis en el Software estadístico INFOSTAT.

Fase VI Variables a evaluar.

Con la ayuda de una regla de 20 cm se realizó la toma de datos de su inhibición, de la cual las mediciones se realizaron durante los 10 primeros días después de la aplicación. Donde se tabulo los días 1, 4, 7 y 10.

9. Análisis y discusión de los resultados.

Primero, es crucial destacar que la metodología utilizada fue rigurosa y meticulosa, ya que las cepas fueron aisladas en un mismo día, lo que elimina la posibilidad de que las condiciones de aislamiento difieran entre los grupos. Este protocolo garantiza la validez interna del experimento y fortalece la fiabilidad de los resultados obtenidos.

Tabla 6 Inhibición Lasiodiplodia theobromae

| | D1 | D2 | D3 | D4 | D5 | D6 | D7 | D8 |
|---------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 28-sep | 0,9 | 1,8 | 2,5 | 3 | 3,3 | 3,8 | 4,7 | 6 |
| 28-sep | 1,4 | 1,8 | 2,8 | 3,5 | 4,2 | 5,3 | 6,1 | 6,8 |
| 28-sep | 1,7 | 2,4 | 3,1 | 3,8 | 4,6 | 5,2 | 6 | 6,7 |
| 8-nov | 1,6 | 2,2 | 2,9 | 3,5 | 4,1 | 4,8 | 5,9 | 6,4 |
| 3-ene | 0,4 | 0,9 | 1,1 | 1,3 | 1,4 | 1,5 | 1,7 | 2,2 |

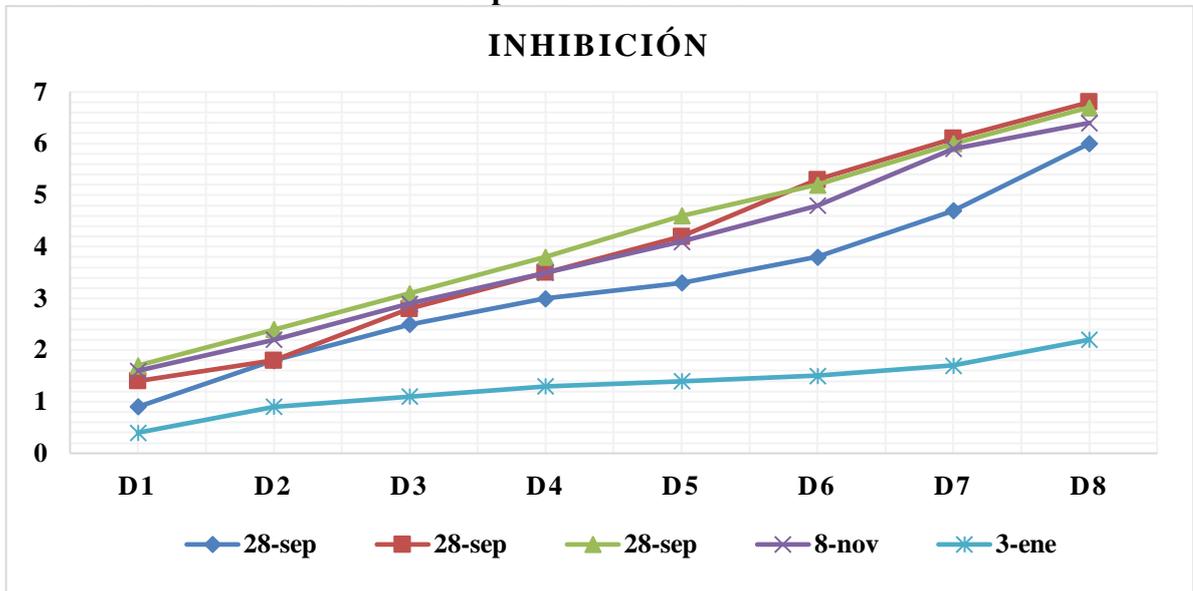
Elaborado por: (Masaquiza, 2024)

En el siguiente cuadro nos muestra la inhibición diaria de las cepas de cada mes, resaltando la significativa diferencia entre ellas.

El hecho de que las cepas aisladas en septiembre hayan exhibido la mayor inhibición, seguidas por las de noviembre y luego en tercer lugar las de enero, es un patrón

consistente que sugiere una correlación entre la fecha de aislamiento y la tasa de crecimiento. Este descubrimiento puede atribuirse a varios factores potenciales.

Tabla 7 Inhibición de *Lasiodiplodia theobromae*



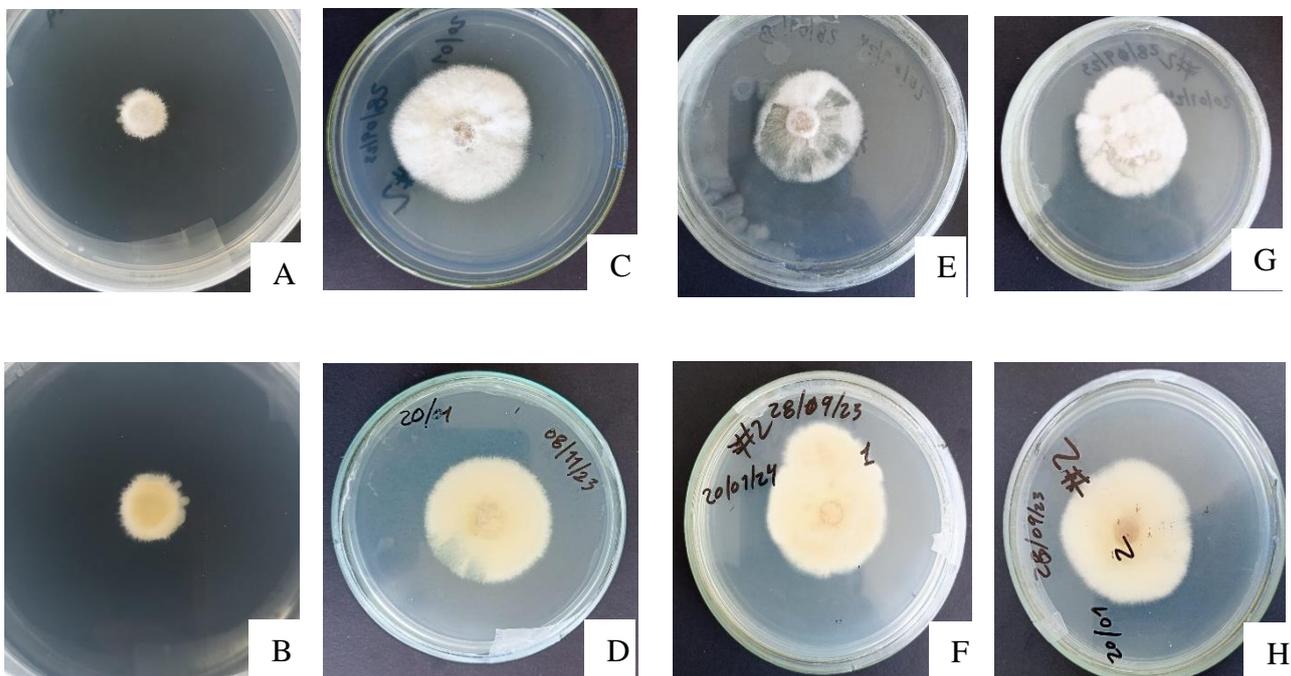
Elaborado por: (Masaquiza, 2024)

En primer lugar, las condiciones ambientales en las que se desarrollaron las cepas pueden haber variado significativamente entre los meses de septiembre, noviembre y enero. Por ejemplo, la temperatura, la humedad y la disponibilidad de nutrientes pueden haber fluctuado, influenciando así la inhibición de los hongos. Este aspecto es particularmente relevante ya que los hongos son organismos muy sensibles a su entorno.

Además, la edad de las cepas puede desempeñar un papel crucial en su capacidad de crecimiento. Es plausible suponer que las cepas aisladas en septiembre, al haber tenido más tiempo para adaptarse y proliferar en su ambiente, estuvieran mejor equipadas para crecer rápidamente en comparación con las cepas más recientes de enero.

Por otro lado, la disponibilidad de recursos también podría haber influido en las tasas de crecimiento observadas. Es posible que las cepas aisladas en septiembre hayan tenido acceso a una mayor cantidad de nutrientes o sustancias promotoras del crecimiento en comparación con las cepas más recientes de enero, lo que podría explicar en parte la diferencia en sus tasas de crecimiento.

Figura 3 *Hongo Lasiodiplodia Theobromae* al tercer día de aislamiento en cajas Petri

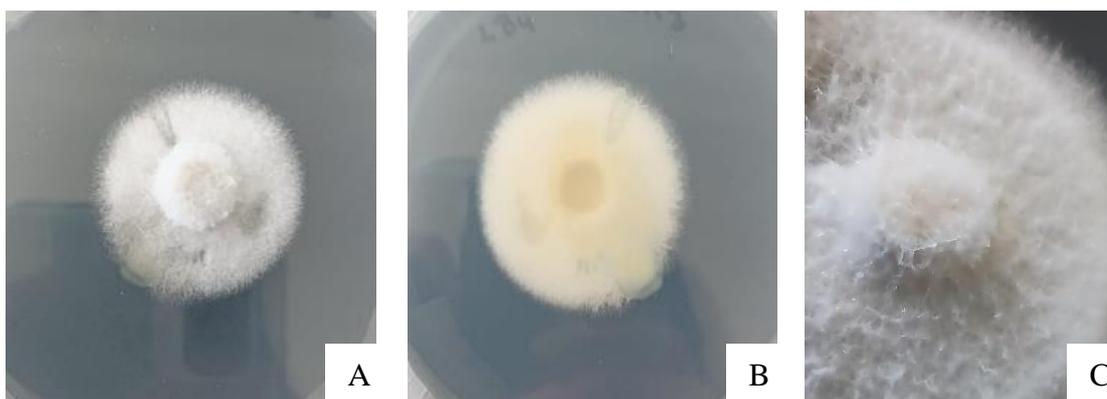


Elaborado por: (Masaquiza, 2024)

A-B Cajas de Enero 2024; *C-D* Cajas de Noviembre 2023; *E,F,G,H* Cajas de Septiembre 2023.

El ensayo realizado para observar y caracterizar morfológicamente al hongo *Lasiodiplodia* es una contribución valiosa al conocimiento de esta especie. La metodología empleada, que involucra el uso de un disco esporulado de 80 mm de diámetro en una caja Petri como fuente de observación, demuestra un enfoque práctico y efectivo para el estudio microscópico de hongos.

Figura 4 *Observación y caracterización morfológica al hongo Lasiodiplodia*



Fotografiado por: (Masaquiza, 2024)

A-B Inhibición Lasiodiplodia theobromae; C Micelio de color blanquecino.

Los hallazgos obtenidos durante el curso del experimento son especialmente destacables. La observación inicial del micelio blanco con aspecto algodonoso el primer día proporciona una base sólida para el seguimiento del desarrollo del hongo. La identificación de las hifas septadas formando conidióforos cortos y simples en el tercer día ofrece una comprensión más detallada de la estructura micelial y la producción de conidios.

La observación de las esporas asexuadas y las conidias hialinas inmaduras con una forma granular para el décimo día del experimento representa algo significativo en la caracterización morfológica del hongo *Lasiodiplodia*.

Figura 5 *Observación de las esporas asexuadas y las conidias hialinas inmaduras*

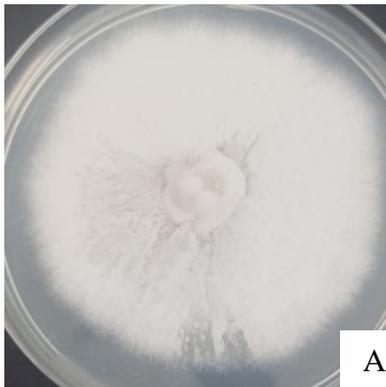


Fotografiado por: (Masaquiza, 2024)

A Formación de picnidios en medio PDA; B Hifas septadas; C Conidias hialinas inmaduras.

Además, el seguimiento detallado del desarrollo morfológico del hongo a lo largo del tiempo ofrece una perspectiva dinámica y completa de su biología. Esto es fundamental para comprender mejor su ecología, patogenicidad y potencial aplicabilidad en diversos campos, como la agricultura, la medicina y la biotecnología.

Figura 6 *Desarrollo morfológico del hongo*



Fotografiado por: (Masaquiza, 2024)

A Crecimiento del micelio en Lasiodiplodia theobromae.

Estos rasgos específicos, junto con las características previamente observadas, como el micelio blanco y algodonoso, las hifas septadas y los conidióforos cortos y simples, refuerzan la identificación del hongo como perteneciente al género *Lasiodiplodia*.

El hecho de que las características morfológicas observadas sean consistentes con las del género *Lasiodiplodia* es un hallazgo significativo que confirma la afinidad taxonómica del organismo en estudio. Esta correlación refuerza aún más la validez de los resultados obtenidos y proporciona una base sólida para concluir que se está trabajando con el mismo género.

De acuerdo con Garcés-Fiallos (2021), en condiciones de laboratorio, el patógeno inicialmente exhibe un desarrollo micelial de color blanco, que posteriormente se torna de un tono cenizo oscuro y finalmente se vuelve negruzco, mientras que los picnidios adquieren una tonalidad negra. Además, las hifas muestran una completa septación, formando conidióforos cortos y simples que eventualmente generan conidios. Estos últimos son hialinos en su estado inmaduro, de forma elipsoidal, unicelulares, con pared gruesa y contenido granular.

En un estudio genómico y trangenómico reciente llevado a cabo por Ali SS (2019), donde se investigaron alrededor de 13,061 genes codificadores de proteínas en 52 cepas de *L. theobromae* aisladas de tejidos sintomáticos de cacao, se identificaron 2,862 genes exclusivos para la especie estudiada en comparación con otros miembros de la familia *Botryosphaeriaceae* estrechamente relacionados.

Esta concordancia entre las características morfológicas observadas y las características típicas del género *Lasiodiplodia* subraya la importancia de la morfología como una herramienta clave en la identificación y clasificación de hongos. Además, fortalece la confianza en la precisión de los resultados del estudio y destaca la utilidad de este enfoque para la investigación micológica.

Enfrentamiento dual *Trichoderma* spp. frente al patógeno *Lasiodiplodia theobromae*.

Este enfoque experimental permitió evaluar la capacidad de los biocontroladores para inhibir el crecimiento del fitopatógeno, proporcionando información valiosa sobre su potencial para su uso en el control de enfermedades en sistemas agrícolas.

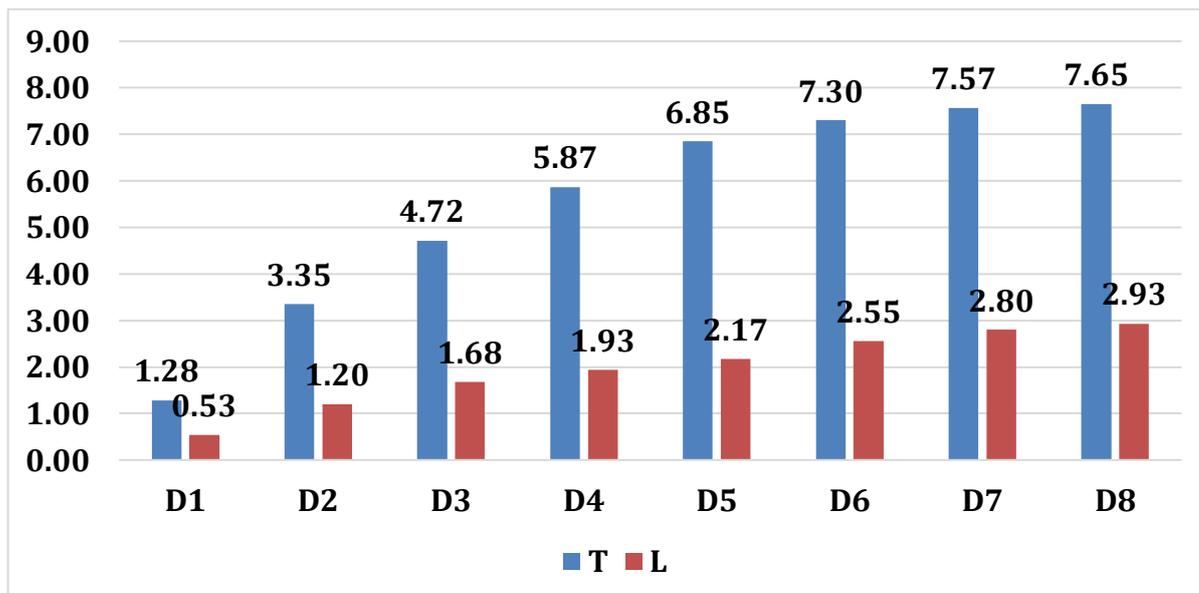
Tabla 8 Crecimiento de los hongos

| | Días | | | | | | | |
|---|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | D1 | D2 | D3 | D4 | D5 | D6 | D7 | D8 |
| T | 1,28 | 3,35 | 4,72 | 5,87 | 6,85 | 7,30 | 7,57 | 7,65 |
| L | 0,53 | 1,20 | 1,68 | 1,93 | 2,17 | 2,55 | 2,80 | 2,93 |

Elaborado por: (Masaquiza, 2024)

El hongo *Trichoderma* demostró una notable inhibición en comparación con el hongo *Lasiodiplodia*. Este fenómeno se evidenció claramente al observar que, para el séptimo día, las cajas Petri conteniendo *Trichoderma* estaban completamente colonizadas, mientras que *Lasiodiplodia* no solo no pudo alcanzar un crecimiento similar, sino que también mostró incapacidad para obtener nutrientes del agar PDA.

Tabla 9 Crecimiento del hongo antagonista frente al patógeno



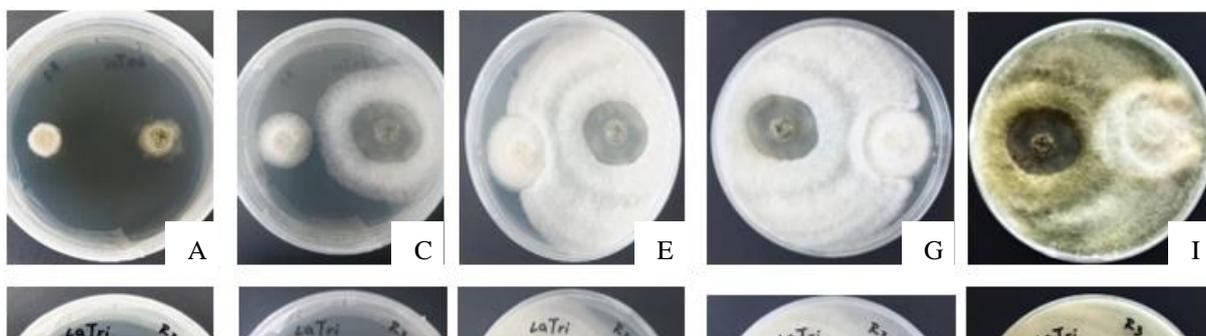
Nota: T: *Trichoderma* spp. L: *Lasiodiplodia theobromae*

Elaborado por: (Masaquiza, 2024)

Los resultados obtenidos muestran claramente una diferencia significativa en la inhibición entre *Trichoderma* spp. y el hongo *Lasiodiplodia theobromae*. El *Trichoderma* spp. exhibió un impresionante crecimiento de aproximadamente 9 mm por día, destacando su capacidad para colonizar el medio de cultivo de manera rápida y eficiente. Por otro lado, el hongo *Lasiodiplodia theobromae* mostró un crecimiento mucho más modesto, con aproximadamente 3,5 mm por día.

Después de ocho días, se observó que el patógeno alcanzó un diámetro de 2,93 cm. Esta diferencia notable en las tasas de crecimiento sugiere la posibilidad de una superioridad competitiva por parte del *Trichoderma* spp. cuando se enfrenta directamente al patógeno. Este hallazgo está en línea con la investigación de Leon Ttacca (2016), quien reportó una inhibición de 1,54 cm, lo que respalda la efectividad del control ejercido por el *Trichoderma* spp. La diferencia en el ritmo de crecimiento podría estar relacionada con diversas características intrínsecas de cada hongo, como su eficiencia en la utilización de nutrientes, la producción de metabolitos secundarios u otras adaptaciones biológicas.

Figura 7 *Diferencias en la inhibición*



Fotografiado por: (Masaquiza, 2024)

A-B Inhibición día 1; *C-D* Inhibición día 3; *E-F* Inhibición día 5; *G-H* Inhibición día 7; *I-J* Inhibición día 10.

Inicialmente no se observaron diferencias notables en la inhibición durante el primer día del enfrentamiento dual entre *Trichoderma* y *Lasiodiplodia theobromae*. Sin embargo, tras 72 horas de observación, se manifestó una clara disparidad en el crecimiento entre ambos hongos, especialmente evidente en los extremos de la caja Petri. Esta discrepancia en el desarrollo se intensificó con el paso del tiempo, culminando en el séptimo día, cuando *Trichoderma* logró colonizar por completo el medio de cultivo, en contraste con *Lasiodiplodia*.

Este cambio drástico en el patrón de inhibición pone de relieve la marcada ventaja competitiva de *Trichoderma* sobre *Lasiodiplodia* en este contexto experimental. Tal dominio podría deberse a una serie de factores, como una mayor eficiencia en la utilización de nutrientes, la producción de metabolitos secundarios con propiedades antimicrobianas o adaptaciones biológicas específicas que favorecen el crecimiento rápido y la colonización del sustrato.

T1: *Trichoderma* spp. vs *Lasiodiplodia theobromae*.

T2: *Bacillus subtilis* concentración 10^8 vs *Lasiodiplodia theobromae*.

T3: *Bacillus subtilis* concentración 10^4 vs *Lasiodiplodia theobromae*.

T4: Testigo *Lasiodiplodia theobromae*.

ADEVA para inhibición de (*Lasiodiplodia theobromae*) frente a los biocontroladores.

Tabla 10 ADEVA inhibición (cm) (*Lasiodiplodia theobromae*) frente a los biocontroladores.

| ADEVA inhibición (cm) | | | | | | | | | |
|-----------------------|----|-------|---------|-------|---------|-------|---------|--------|---------|
| F.V. | gl | DIA 1 | | DIA 4 | | DIA 7 | | DIA 10 | |
| | | CM | p-valor | CM | p-valor | CM | p-valor | CM | p-valor |
| Modelo | 3 | 1,17 | <0,0001 | 2,96 | <0,0001 | 3,44 | <0,0001 | 7,00 | <0,0001 |
| Tratamientos | 3 | 1,17 | <0,0001 | 2,96 | <0,0001 | 3,44 | <0,0001 | 7,00 | <0,0001 |
| Error | 16 | 0,04 | | 0,09 | | 0,11 | | 0,11 | |
| Total | 19 | | | | | | | | |
| CV% | | 23,89 | | 13,87 | | 9,87 | | 7,48 | |

Elaborado por: (Masaquiza, 2024)

En el primer día se pudo observar la existencia de diferencia estadística significativa en tratamientos y su coeficiente de variación fue de 23,89 %

Al cuarto día se pudo observar la existencia de diferencia estadística significativa en tratamientos y su coeficiente de variación fue de 13,87 %

En el séptimo día se pudo observar la existencia de diferencia estadística significativa en tratamientos y su coeficiente de variación fue de 9,87 %

En el décimo día se pudo observar la existencia de diferencia estadística significativa en tratamientos y su coeficiente de variación fue de 7,48 %

Tukey al 5% para los tratamientos en la inhibición (cm) del hongo *Lasiodiplodia theobromae* frente a los biocontroladores.

Tabla 11 ADEVA inhibición (cm)

| ADEVA inhibición (cm) | | | | | | | | | | |
|-----------------------|-------|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|------|
| DIA 1 | | DIA 4 | | | DIA 7 | | | DIA 10 | | |
| TRAT. | Media | TRATAMIENTOS | Media | TRAT. | Media | TRAT. | Media | TRAT. | Media | |
| T4 | 1,24 | A | T4 | 3,20 | A | T4 | 4,56 | A | T4 | 5,82 |
| T1 | 1,20 | A | T1 | 1,96 | B | T2 | 3,40 | B | T2 | 4,64 |
| T2 | 0,46 | B | T2 | 1,86 | BC | T3 | 2,80 | B | T3 | 4,36 |
| T3 | 0,32 | B | T3 | 1,40 | C | T1 | 2,80 | B | T1 | 2,94 |
| E.E. | 0,03 | | 0,08 | | 0,11 | | 0,11 | | 0,11 | |
| CV % | 23,89 | | 13,87 | | 9,87 | | 7,48 | | 7,48 | |

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

Elaborado por: (Masaquiza, 2024)

En el primer día de la inhibición se puede evidenciar que el mayor crecimiento tiene el tratamiento T4 (Testigo *Lasiodiplodia theobromae*) con un promedio de 1,24 cm ubicándose en el rango “A” y el tratamiento con menor resultado es el T3 (*Bacillus*

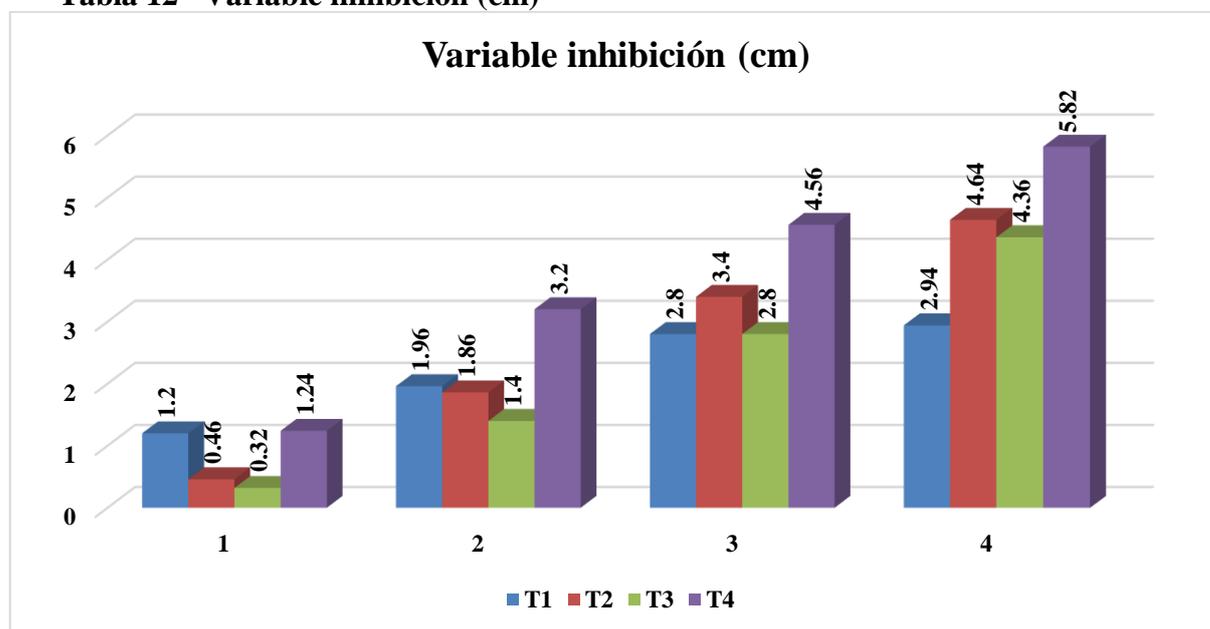
subtilis a la concentración 10^4) con un promedio de 0,32 cm ubicándose en el rango “B”.

En el cuarto día de crecimiento se puede observar que el mayor crecimiento es el T4 (*Lasiodiplodia theobromae*) con un promedio de 3,20 cm ubicándose en el rango “A” y el tratamiento con menor resultado es el T3 (*Bacillus subtilis* a la concentración 10^4) con un promedio de 1,40 cm ubicándose en el rango “C”.

En el séptimo día del ensayo se puede observar que el mayor crecimiento es el T4 (*Lasiodiplodia theobromae*) con un promedio de 4,56 cm ubicándose en el rango “A” y el tratamiento con menor resultado es el T1 (*Trichoderma* spp.) con un promedio de 2,80 cm ubicándose en el rango “B”.

En el décimo día de crecimiento se puede observar que el mayor crecimiento es el T4 (*Lasiodiplodia theobromae*) con un promedio de 5,82 cm ubicándose en el rango “A” y el tratamiento con menor resultado es el T1 (*Trichoderma* spp.) con un promedio de 2,94 cm ubicándose en el rango “C”.

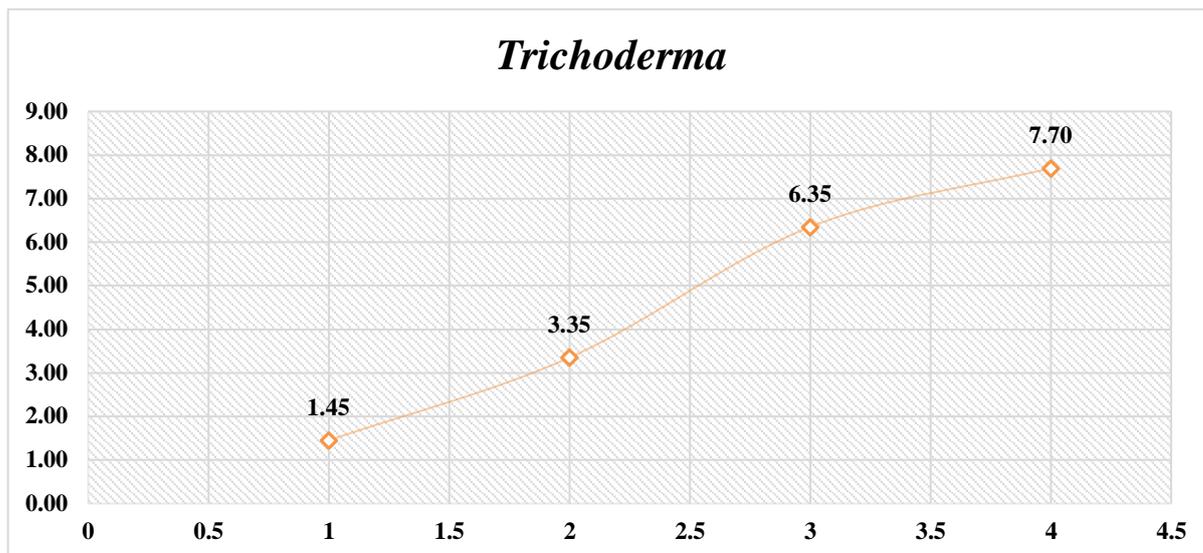
Tabla 12 Variable inhibición (cm)



Elaborado por: (Masaquiza, 2024)

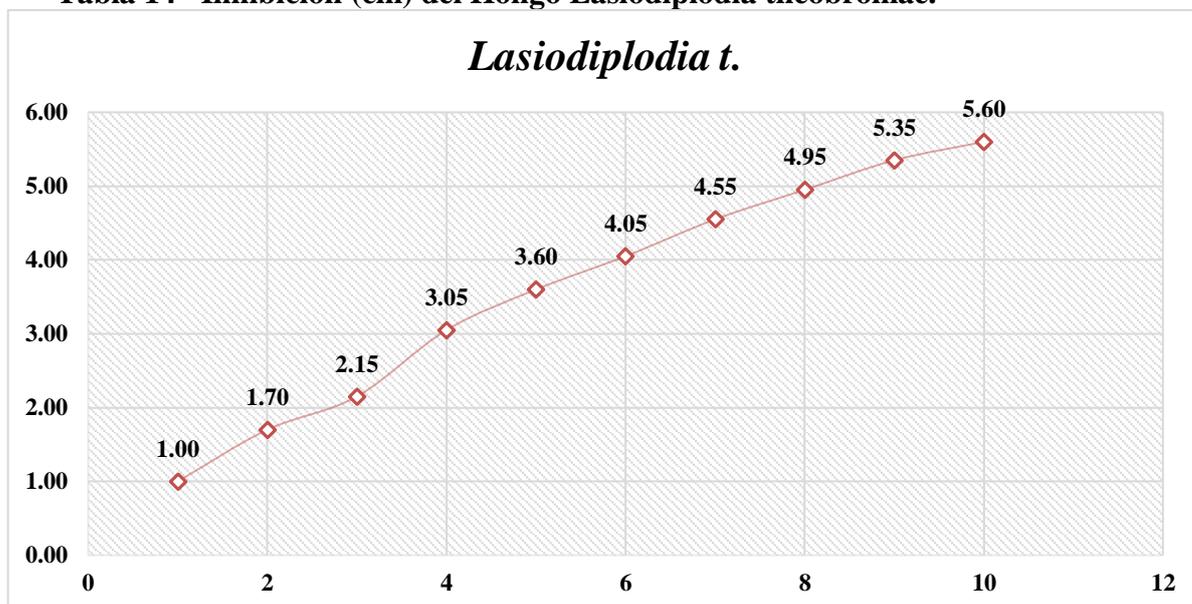
Variable de inhibición (cm) de *Lasiodiplodia theobromae* después del aislamiento de los biocontroladores.

Tabla 13 Inhibición (cm) del Hongo *Trichoderma* spp.



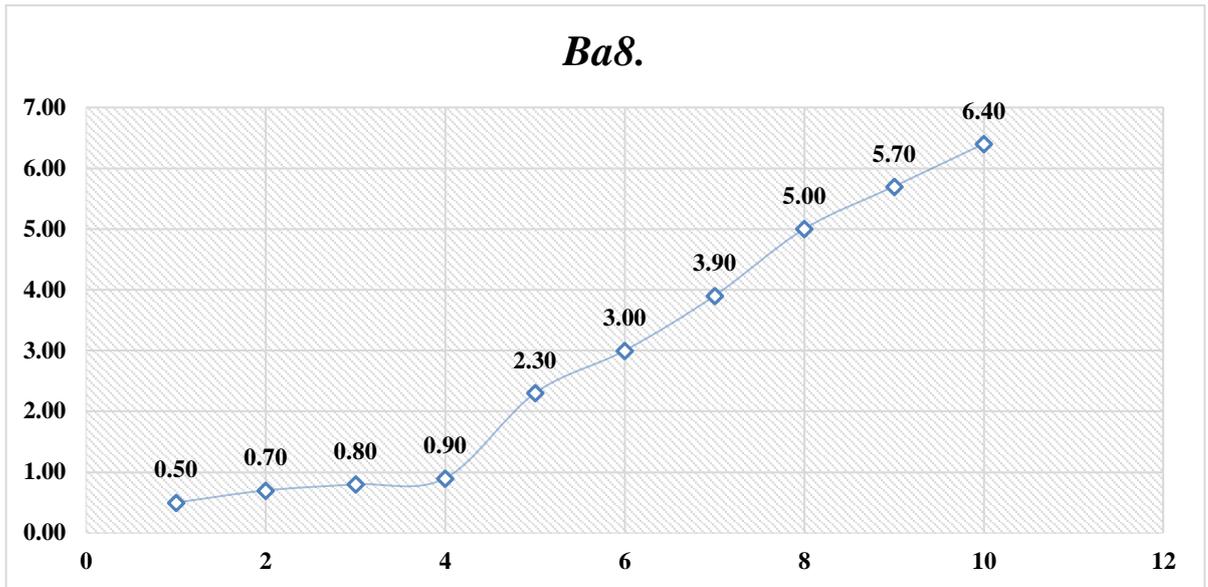
Elaborado por: (Masaquiza, 2024)

Tabla 14 Inhibición (cm) del Hongo *Lasiodiplodia theobromae*.



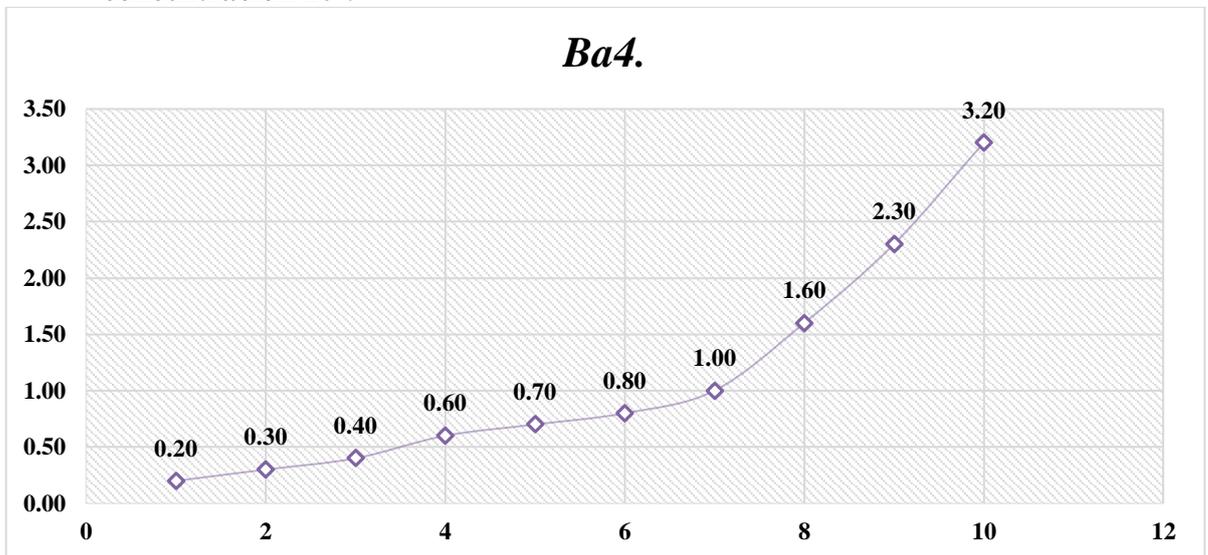
Elaborado por: (Masaquiza, 2024)

Tabla 15 Inhibición (cm) de la bacteria *Bacillus subtilis* en una concentración 10^8 .



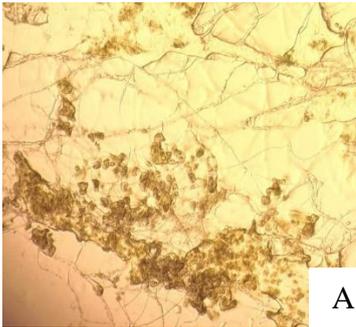
Elaborado por: (Masaquiza, 2024)

Tabla 16 Inhibición (cm) de la bacteria *Bacillus subtilis* en una concentración 10^4 .



Elaborado por: (Masaquiza, 2024)

Figura 8 *Lasiodiplodia theobromae* vs *Bacillus subtilis*.



Fotografiado por: (Masaquiza, 2024)

Se puede observar que el patógeno *Lasiodiplodia theobromae* no fue combatido por la bacteria *Bacillus* llenando y a la vez invadiendo la zona en donde se encuentra la bacteria.

Figura 9 *El patógeno Lasiodiplodia theobromae* bacteria *Bacillus*

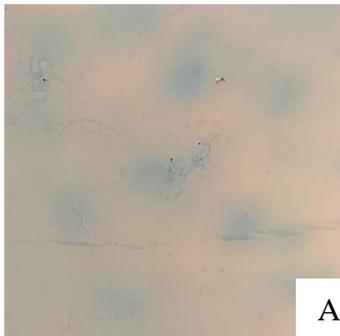


Fotografiado por: (Masaquiza, 2024)

A Invasión del hongo *Lasiodiplodia theobromae*

Se puede observar que el patógeno *Lasiodiplodia theobromae* tuvo una inhibición moderada llegando a colonizar la caja Petri por completo sin ser afectado por la bacteria *Bacillus subtilis*. Según (Leon Ttacca, 2016) el enfrentamiento con *Bacillus subtilis* tuvo un mejor control en la inhibición en el patógeno con un total de 3,15 cm de diámetro.

Figura 10 *Bacteria Bacillus vs el patógeno Lasiodiplodia theobromae*



Fotografiado por: (Masaquiza, 2024)

A Foto tomada en Microscopio de la bacteria *Bacillus* vs el patógeno *Lasiodiplodia theobromae*. No hay rastros de confrontación entre ambos.

10. Impactos

Los resultados de este estudio tienen una serie de impactos significativos en varios aspectos. Desde una perspectiva técnica, el estudio proporciona información crucial sobre la eficacia de los biocontroladores *Trichoderma* spp. y *Bacillus subtilis* en la inhibición del crecimiento del fitopatógeno *Lasiodiplodia theobromae*. Esta información es esencial para el desarrollo de estrategias de control biológico de enfermedades en cultivos agrícolas, lo que puede tener repercusiones directas en la productividad y la salud de los cultivos. Además, la caracterización morfológica del hongo *Lasiodiplodia theobromae* ofrece una comprensión más profunda de su biología y ecología, lo que puede ser fundamental para futuros estudios relacionados con su identificación, diagnóstico y control.

Desde una perspectiva social, la investigación en el control biológico de enfermedades en los cultivos agrícolas tiene el potencial de beneficiar a los agricultores al reducir su dependencia de los pesticidas químicos. Al disminuir el uso de estos productos, se pueden reducir los riesgos para la salud humana y el medio ambiente asociados con su uso excesivo. Además, el conocimiento generado sobre la morfología y el ciclo de vida del hongo *Lasiodiplodia theobromae* puede ser útil para educar a agricultores y otros profesionales relacionados con la agricultura sobre la identificación y manejo de enfermedades en los cultivos, lo que puede mejorar la resiliencia de las comunidades agrícolas.

En términos ambientales, el uso de biocontroladores en lugar de pesticidas químicos puede reducir la contaminación del suelo y del agua, así como minimizar los efectos negativos sobre la biodiversidad y los ecosistemas asociados a los agroecosistemas. Además, la investigación sobre la biología y ecología del hongo *Lasiodiplodia theobromae* puede contribuir a una mejor comprensión de su papel en los ecosistemas agrícolas y naturales, lo que puede ser importante para la conservación de la biodiversidad y la salud de los ecosistemas.

Finalmente, en términos económicos, el desarrollo de estrategias de control biológico efectivas puede reducir los costos asociados con el manejo de enfermedades en los cultivos agrícolas, al tiempo que puede mejorar la productividad y la calidad de los productos agrícolas. La aplicación comercial de biocontroladores en la agricultura también puede generar nuevas oportunidades de negocio para empresas dedicadas a la producción y comercialización de estos productos biológicos. En resumen, los impactos técnicos, sociales, ambientales y económicos derivados de este estudio resaltan la importancia de la investigación en el control biológico de enfermedades en la agricultura y su contribución al desarrollo sostenible y la seguridad alimentaria.

11. Conclusiones

Las observaciones sobre la inhibición del hongo *Lasiodiplodia theobromae* en el octavo día da como resultado que la cepa del mes de Septiembre tiene un crecimiento de 6,8 cm, el mes de Noviembre una inhibición de 6,7 cm y el mes de Enero con una inhibición total de 2,2 cm.

Con respecto a las observaciones y morfología revisados en microscopio demuestra con las revisiones bibliográficas que el hongo en estudio es del genero *Lasiodiplodia*.

El tratamiento T1 con *Trichoderma* spp. presento una inhibición de 2,94 cm, evidenciando un rendimiento superior en relación con las demás condiciones de tratamiento. Por otro lado, al estar en contacto con la bacteria *Bacillus subtilis*, se registró un crecimiento aún mayor, con una inhibición de 4,36 cm.

Los resultados de este estudio demuestran que *Trichoderma* spp. es más efectivo en su función como biocontrolador contra *Lasiodiplodia theobromae*.

12. Recomendaciones

Investigar y desarrollar estrategias de control para mitigar la propagación y el daño causado por *Lasiodiplodia theobromae*. Realizar estudios para identificar y seleccionar variedades de plantas que sean resistentes o menos susceptibles a la infección que causa.

Es crucial considerar que la elección del tratamiento más adecuado puede depender de diversos factores, como la disponibilidad y costo de los biocontroladores, así como las condiciones específicas del cultivo y el entorno. Por lo tanto, se recomienda realizar estudios adicionales para evaluar la eficacia de diferentes combinaciones de biocontroladores y concentraciones, así como su viabilidad en condiciones de campo.

Además, es importante tener en cuenta que el éxito de las estrategias de control biológico no solo depende de la eficacia de los biocontroladores, sino también de la implementación adecuada de prácticas agrícolas integradas y sostenibles. Esto incluye medidas preventivas, como la rotación de cultivos, el manejo adecuado de residuos vegetales y la mejora de la salud del suelo, que pueden contribuir a reducir la incidencia de enfermedades y promover la sostenibilidad a largo plazo de los sistemas agrícolas.

Sin embargo, se necesita más investigación para optimizar y adaptar estas estrategias a diferentes contextos agrícolas, con el objetivo de mejorar la resiliencia de los cultivos y promover la sostenibilidad de la agricultura.

13. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Alfik, A., & Weisskopf, L. (2021). Deciphering Trichoderma–plant–pathogen interactions for better development of biocontrol applications. *Journal of Fungi*, 7(1), 1-18. doi:10.3390/jof7010061
- Ali SS, A. A. (2019). *Genome and transcriptome analysis of the latent pathogen Lasiodiplodia theobromae, an emerging threat to the cacao industry*. *Genome*. doi:10.1139/gen-2019-0112
- Almeida, R. F., Lücking, R., Vasco, A., Gaya, E., & Diazgranados, M. (2022). Catálogo de los hongos de Colombia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 46(181), 1050-1053. doi:10.18257/raccefyn.1842
- Amerio, N. S., Castrillo, M. L., Bich, G. A., Zapata, P. D., & Villalba, L. L. (2020). Trichoderma en la Argentina: Estado del arte. *Ecología austral*, 30(1), 113-124. Obtenido de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S1667-782X2020000100015&script=sci_arttext&tlng=en
- Andrade, H. P., Rivera, J. M., Landero, V. N., Silva, R. H., Martínez, S. S., & Romero, A. O. (2023). Beneficios ecológicos y biológicos del hongo cosmopolita Trichoderma spp. en la agricultura: una perspectiva en el campo mexicano. *Revista Argentina de Microbiología*, 55(4), 366-377. doi:10.1016/j.ram.2023.06.005
- Arrieta, G. J., Díaz, C. A., Pérez, P. J., Cadena, T. J., & Sánchez, L. D. (2021). Hongos asociados a la pudrición seca de tubérculos de ñame (*Dioscorea rotundata* Poir.) en Córdoba, Colombia. *Agronomía Mesoamericana*, 32(3), 790-807. doi:10.15517/am.v32i3.41697
- Bahram, M., & Netherway, T. (2022). Fungi as mediators linking organisms and ecosystems. *Microbiology Reviews*, 46(2), 1–16. doi:10.1093/femsre/fuab058

- Bai, J., Franco, M., Ding, Z., Hao, L., Ke, W., Wang, M., . . . Guo, X. (2022). Effect of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis* on fermentation, dynamics of bacterial community and their functional shifts of whole-plant corn silage. *Journal of animal science and biotechnology* , 13(7), 1-14. doi:10.1186/s40104-021-00649-0
- Bolivar, H. J., Bolivar, H. J., González, V. E., García, D., Collado, I. G., & Garrido, C. (2021). Endophytic Bacteria *Bacillus subtilis*, Isolated from *Zea mays*, as Potential Biocontrol Agent against *Botrytis cinerea*. *Biology* , 10(6), 1-26. doi:10.3390/biology10060492
- Briste, P. S., Akanda, A. M., Bhuiyan, M. A., Mahmud, N. U., & Islam, T. (2022). Morphomolecular and cultural characteristics and host range of *Lasiodiplodia theobromae* causing stem canker disease in dragon fruit. *Journal of Basic Microbiology*, 62(6), 689-700. doi:10.1002/jobm.202100501
- Cai, F., & Druzhinina, I. S. (2021). In honor of John Bissett: authoritative guidelines on molecular identification of *Trichoderma*. *Fungal Diversity*, 107, 1-69. doi:10.1007/s13225-020-00464-4
- Camero, A. C., Rios, V. C., Luna, E. G., López, G. G., V. M., & Camero, C. O. (2023). Supresión in vitro de patógenos fúngicos de raíz en *Annona muricata* L. por cepas de *Trichoderma* y fungicidas convencionales. *Revista Bio Ciencias*, 10, 1-15. doi:10.15741/revbio.10.e1497
- Cao, H., Wang, C., Liu, H., Jia, W., & Sun, H. (2020). Enzyme activities during Benzo[a]pyrene degradation by the fungus *Lasiodiplodia theobromae* isolated from a polluted soil. *Scientific Reports*, 10(1), 1-11. doi:10.1038/s41598-020-57692-6
- Carroll, L. M., Wiedmann, M., & Kovac, J. (2020). Proposal of a Taxonomic Nomenclature for the *Bacillus cereus* Group Which Reconciles Genomic Definitions of Bacterial Species with Clinical and Industrial Phenotypes. *MBio* , 11(1), 10-1128. doi:10.1128/mbio.00034-20
- Chacha, R. (05 de Agosto de 2022).

- Chandra, A., Chandra, P., & Tripathi, P. (2021). Whole genome sequence insight of two plant growth-promoting bacteria (*B. subtilis* BS87 and *B. megaterium* BM89) isolated and characterized from sugarcane rhizosphere depicting better crop yield potentiality. *Microbiological Research*, 247, 1-11. doi:10.1016/j.micres.2021.126733
- Dheivam, M., Manonmani, K., Kalpana, K., Senthilraja, C., Theradimani, M., & Rajangam, J. (2020). Studies on Morphological Variability of the Fungal Pathogen, *Lasiodiplodia theobromae* causing Dieback in Mango. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 9(12), 2446-2454. doi:10.20546/ijcmas.2020.912.289
- Dou, K., Lu, Z., Wu, Q., Ni, M., Yu, C., Wang, M., . . . Zhang, C. (2020). MIST: a Multilocus Identification System for *Trichoderma*. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(18), 1-13. doi:10.1128/AEM.01532-20
- Errington, J., & Van der Aart, L. T. (2020). Microbe Profile: *Bacillus subtilis*: model organism for cellular development, and industrial workhorse. *Microbiology*, 166(5), 425-427. doi:10.1099/mic.0.000922
- Flores, H., Flores, J., Varela, S. E., Pérez, A., Domínguez, A. A., & Monteon, A. (2022). Reporte de *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon y Maubl. en árboles cítricos de Tamaulipas. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 12(3), 499-511. doi:10.29312/remexca.v12i3.2640
- Garcés-Fiallos, F. R. (2021). *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maul [(sin.) *Botryodiplodia theobromae* Pat]. Scientia Agropecuaria. Obtenido de file:///D:/Descargas/Dialnet-LasiodiplodiaTheobromaePatGriffonMaulSinBotryodipl-8672863%20.pdf
- Gnanesh, B. N., Arunakumar, G. S., Tejaswi, A., Supriya, M., Manojkumar, H. B., & Devi, S. S. (2022). Characterization and Pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* Causing Black Root Rot and Identification of Novel Sources of Resistance in Mulberry Collections. *The Plant Pathology Journal*, 38(4), 272–286. doi:10.5423/PPJ.OA.01.2022.0005
- González, L. Y., Ortega, B. J., Anducho, R. M., & Mercado, F. Y. (2023). *Bacillus subtilis* y *Trichoderma*: Características generales y su aplicación en la

- agricultura. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 25(1), 1-14. Obtenido de <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=113132>
- Hidalgo, R., & Morán, I. (2020). Trichoderma: Hongo fungicida usado en tratamientos foliares del suelo y el control de diversas enfermedades producidas por hongos. *Revista Caribeña de Ciencias Sociales*(4), 1-13. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=9037959>
- Huda, A. R., Mohamed, N. M., Zakaria, L., Leong, Y.-H., & Mohd, M. H. (2022). Lasiodiplodia theobromae as a causal pathogen of leaf blight, stem canker, and pod rot of Theobroma cacao in Malaysia. *Scientific Reports*, 12(1), 1-14. doi:10.1038/s41598-022-13057-9
- Inglis, P. W., Mello, S. C., Martins, I., Silva, J. B., Macêd, K., Sifuentes, D. N., & Valadares-Inglis, M. C. (2020). Trichoderma from Brazilian garlic and onion crop soils and description of two new species: Trichoderma azevedoi and Trichoderma peberdyi. *PloS one*, 15(3), 1-23. doi:10.1371/journal.pone.0228485
- Ipiates, J. P., Pineda, J. A., Barrigas, D. A., Muñoz, F. A., & Pineda, C. A. (2021). Producción del hongo-moho (Trichoderma harzianum): una revisión. *Revista Biorrefinería*, 4(4), 1-6. Obtenido de <https://www.cebaecuador.org/wp-content/uploads/2022/01/14.pdf>
- Jaborova, D., Enakiev, Y., Sulaymanov, K., Kadirova, D., Ali, A., & Annapurna, K. (2021). Plant growth promoting bacteria *Bacillus subtilis* promote growth and physiological parameters of Zingiber officinale Roscoe. *Plant Science Today*, 8(1), 66-71. doi:0.14719/pst.2021.8.1.997
- Jena, S., Basa, B., Panda, K. C., & Kumar, N. (2020). Impact of *Bacillus subtilis* bacterium on the properties of concrete. *Materials Today: Proceedings*, 32(4), 651-656. doi:10.1016/j.matpr.2020.03.129
- Jiao, S., & Lu, Y. (2020). Abundant fungi adapt to broader environmental gradients than rare fungi in agricultural fields. *Global Change Biology*, 26(8), 4506-4520. doi:10.1111/gcb.15130

- Jimenez, N. V., Soto, J. M., Casas, A. V., & Aragón, L. M. (2023). Posible inducción de resistencia sistémica a *Lasiodiplodia theobromae* en aguacate (*Persea americana* Mill.) en condiciones semicontroladas en La Molina. *Peruvian Journal of Agronomy*, 7(2), 132-143. doi:10.21704/pja.v7i2.2053
- Johnson, G. E., Lalanne, J.-B., Peters, M. L., & Wei, L. G. (2020). Functionally uncoupled transcription–translation in *Bacillus subtilis*. *Nature*, 585(7823), 124-128.
- Khan, R. A., Najeeb, S., Hussain, S., Xie, B., & Li, Y. (2020). Bioactive Secondary Metabolites from *Trichoderma* spp. against Phytopathogenic Fungi. *Microorganisms*, 8(6), 1-22. doi:10.3390/microorganisms8060817
- Khanna, K., Lopez-Garrido, J., & Pogliano, K. (2020). Shaping an Endospore: Architectural Transformations During *Bacillus subtilis* Sporulation. *Annual review of microbiology*, 74, 361-386. doi:10.1146/annurev-micro-022520-074650
- Kumari, P., & Kumar, P. (2020). *Trichoderma* fungus in mitigation of rhizosphere arsenic: with special reference to biochemical changes. *Plant Archives*, 20(2), 3512-3517.
- Leon Ttacca, B. &. (2016). *Hongos Fitopatógenos asociados a semillas de palto (Persea Americana mill.)*. *Revista de Investigaciones Altoandinas*. doi:https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v5i3.483
- Masaquiza, J. (21 de 02 de 2024).
- Matas, B. M., Urías, G. C., Pérez, Á. S., Flores-Córdova, M. A., Escobedo, B. C., Magallanes, T. M., & Sánchez, C. E. (2022). Morphological and molecular characterization of a new autochthonous *Trichoderma* sp. isolate and its biocontrol efficacy against *Alternaria* sp. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(4), 2620-2625. doi:10.1016/j.sjbs.2021.12.052
- Medina, G. L. (2022). Los hongos micorrízicos arbusculares y su rol en los agroecosistemas. *Cultivos Tropicales*, 43(1), 1-21. Obtenido de <https://ediciones.inca.edu.cu/index.php/ediciones/article/view/1650>

- Moreira, A. A., Cedeño, Á. V., Canchignia, F., & Garcés, F. R. (2021). "Lasiodiplodia theobromae (Pat.) Griffon & Maul [(sin.) Botryodiplodia theobromae Pat] en el cultivo de cacao: síntomas, ciclo biológico y estrategias de manejo. *Scientia Agropecuaria*, 12(4), 653-662. doi:10.17268/sci.agropecu.2021.068
- Moubasher, H. A., Balbool, B. A., Helmy, Y. A., Mohammed, A., Atta, A. A., Sheir, D. H., & Abdel, A. M. (2022). Insights into Asparaginase from Endophytic Fungus *Lasiodiplodia theobromae*: Purification, Characterization and Antileukemic Activity. *International journal of environmental research and public health*, 19(2), 1-14. doi:10.3390/ijerph19020680
- Muñoz, A. M. (2023). *Efecto biocontrolador de Bacillus subtilis a nivel in vitro sobre Colletotrichum spp. recolectado de frutos de aguacate (Persea americana)*. [Tesis de Licenciatura, Universidad Agraria del Ecuador]. Obtenido de <https://cia.uagraria.edu.ec/Archivos/MU%C3%91OZ%20ALVARADO%20MELISSA%20PILAR.pdf>
- Navarro, D.-I.-F. L., Salinas, C. A., & Trigos, Á. (2022). Hongos endófitos aislados de *Manilkara zapota* y su actividad antibacteriana y antifúngica. *Scientia Fungorum*, 53, 1-13. doi:10.33885/sf.2022.53.1407
- Olmos, J., Acosta, M., Mendoza, G., & Pitones, V. (2020). *Bacillus subtilis*, an ideal probiotic bacterium to shrimp and fish aquaculture that increase feed digestibility, prevent microbial diseases, and avoid water pollution. *Archives of microbiology*, 202, 427-435.
- Patel, S., & Gupta, R. S. (2020). A phylogenomic and comparative genomic framework for resolving the polyphyly of the genus *Bacillus*: Proposal for six new genera of *Bacillus* species, *Peribacillus* gen. nov., *Cytobacillus* gen. nov., *Mesobacillus* gen. nov., *Neobacillus* gen. nov., *Metabacillus*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 70(1), 406-438. doi:10.1099/ijsem.0.003775
- Peña Sanchez, R. E., & Páez Mendieta, J. E. (2005). *GUIA PARA EL CÁLCULO DE LA CONCENTRACIÓN DE INÓCULO. UNIVERSIDAD PEDAGOGICA Y TECNOLOGICA DE COLOMBIA FITOPATOLOGIA GENERAL*. Obtenido de <https://virtual.uptc.edu.co/ova/fito/archivo/guia1.pdf>

- Peña, T. E., & Pavone, M. D. (2020). "Efecto de *Trichoderma* spp. sobre el desarrollo de plántulas de *Capsicum annum* L.(pimentón) y el biocontrol del hongo fitopatógeno *Sclerotium* sp. *Agrobiología: Una visión general y sus aplicaciones*(3), 45-55. doi:10.4322/mp.2020.001.03
- Phetphan, C., Supakitthanakorn, S., Phuakjaiphaeo, C., Pipattanapuckdee, A., Kunasakdakul, K., & Ruangwong, O.-U. (2023). Biological and molecular characterization of *Lasiodiplodia theobromae* causing dieback disease of strawberry in Thailand. *Journal of Phytopathology*. doi:10.1111/jph.13181
- Polanco, L. G., Alvarado, O. G., Olivares, E., González, R., & Pérez, O. (2020). Control biológico de *Lasiodiplodia theobromae* y *Fomitopsis meliae* causantes de la muerte regresiva de los cítricos. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 11(5), 1069-1081. doi:10.29312/remexca.v11i5.2272
- Pornsuriya, C., Thaochan, N., Chairin, T., & Sunpapao, A. (2023). Morphological and phylogenetic evidences reveal *Lasiodiplodia chonburiensis* and *L. theobromae* associated with leaf blight in *Hevea brasiliensis* in Southern Thailand. *Diversity* , 15(9), 1-12. doi:10.3390/d15090961
- Quevedo, A., Magdama, F., Castro, J., & Vera, M. (2022). Interacciones ecológicas de los hongos nematófagos y su potencial uso en cultivos tropicales. *Agropecuaria* , 13(1), 97-108. doi:10.17268/sci.agropecu.2022.009
- Ramos, G. C. (2021). Diseños de investigación experimental. *CienciAmérica* , 10(1), 1-7. doi:10.33210/ca.v10i1.356
- Rangel, M. E., Paolinelli, M., Rolshausen, P., Valenzuela, S. C., & Hernandez, M. R. (2021). Characterization of *Lasiodiplodia* species associated with grapevines in Mexico. *Phytopathologia Mediterranea*, 60(2), 237-251. doi:10.36253/phyto-12576
- Salvatore, M. M., Alves, A., & Andolfi, A. (2020). Secondary metabolites of *Lasiodiplodia theobromae*: Distribution, chemical diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. *Toxins* , 12(7), 1-29. doi:10.3390/toxins12070457

- Salvatore, M. M., Andolfi, A., & Nicoletti, R. (2022). The Thin Line between Pathogenicity and Endophytism: The Case of *Lasiodiplodia theobromae*. *10.3390/agriculture10100488*, *10*(10), 1-22. doi:10.3390/agriculture10100488
- Sassine, J., Sousa, RRrr J., Lalk, M., Daniel, R. A., & Vollmer, W. (2020). Cell morphology maintenance in *Bacillus subtilis* through balanced peptidoglycan synthesis and hydrolysis. *Scientific Reports*, *10*(1), 1-14. doi:10.1038/s41598-020-74609-5
- Schütz, G., Haltrich, D., & Atanasova, L. (2020). Influence of spore morphology on spectrophotometric quantification of *Trichoderma* inocula. *BioTechniques*, *68*(5), 279-282. doi:10.2144/btn-2019-0152
- Solórzano, R. A. (2023). *Inoculación de Persea americana con rizobacterias de los géneros Pseudomonas y Bacillus antagonistas de Phytophthora cinnamomi y Lasiodiplodia theobromae*. [Tesis de Doctorado, Universidad Nacional Agraria la Molina]. Obtenido de <https://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/5814/solorzano-acosta-richard-andi.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Su, Y., Liu, C., Fang, H., & Zhang, D. (2020). *Bacillus subtilis*: a universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine. *Microbial cell factories*, *19*(1), 1-12. doi:10.1186/s12934-020-01436-8
- Troya, C., & Vaca Granda, L. (2014). *PROTOCOLO PARA LA REPRODUCCION DE CEPAS NATIVAS DE Trichoderma spp. EN LABORATORIOS ARTESANALES*. Obtenido de <https://www.agricultura.gob.ec/wp-content/uploads/2016/01/MANUAL-labos-para-web.pdf>
- Tyśkiewicz, R., Nowak, A., Ozimek, E., & Jaroszek, J. (2022). *Trichoderma*: The current status of its application in agriculture for the biocontrol of fungal phytopathogens and stimulation of plant growth. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(4), 1-28. doi:10.3390/ijms23042329
- Unartngam, J., Srithongkum, B., Intanoo, W., Charoenrak, & Chamswarnng, C. (2020). Morphological and molecular based identification of *Trichoderma* CB-Pin-01

- biological control agent of plant pathogenic fungi in Thailand. *International Journal of Agricultural Technology*, 16(1), 175-188. Obtenido de [http://www.ijat-aatsea.com/pdf/v16_n1_2020_January/17_IJAT_16\(1\)_2020_Unartngam,%20J..pdf](http://www.ijat-aatsea.com/pdf/v16_n1_2020_January/17_IJAT_16(1)_2020_Unartngam,%20J..pdf)
- Venturella, G., Ferraro, V., Cirlincione, F., & Gargano, M. L. (2021). Medicinal Mushrooms: Bioactive Compounds, Use, and Clinical Trials. *International journal of molecular sciences*, 22(2), 1-30. doi:10.3390/ijms22020634
- Wahab, A., Muhammad, M., Munir, A., Abdi, G., Zaman, W., Ayaz, A., . . . Pappula, S. P. (2023). Role of arbuscular mycorrhizal fungi in regulating growth, enhancing productivity, and potentially influencing ecosystems under abiotic and biotic stresses. *Plants*, 12(17), 1-40. doi:10.3390/plants12173102
- Xu, F., Liao, H., Zhang, Y., Yao, M., Liu, J., Sun, L., . . . Xu, W. (2022). Coordination of root auxin with the fungus *Piriformospora indica* and bacterium *Bacillus cereus* enhances rice rhizosphere formation under soil drying. *The ISME Journal*, 16(3), 801-811. doi:10.1038/s41396-021-01133-3
- Yong, B., Fei, X., Shao, H., Xu, P., Hu, Y., Ni, W., . . . Feng, H. (2020). Recombinant expression and biochemical characterization of a novel keratinase BsKER71 from feather degrading bacterium *Bacillus subtilis* S1-4. *AMB Express*, 10(9), 1-10. doi:10.1186/s13568-019-0939-6
- Zeng, X.-Y., Yuan, X.-X., Peng, K.-Q., Pan, Y.-T., Tan, T.-J., Wu, N., & Tian, F.-H. (2022). Taxonomy and control of *Trichoderma hymenopellicola* sp. nov. responsible for the first green mold disease on *Hymenopellis raphanipes*. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1-10. doi:10.3389/fmicb.2022.991987
- Zhang, G., Wang, H. W., Zhang, J., Tang, X., Wang, M., Lin, W., . . . Qin, T. (2021). Modulatory Effects of *Bacillus subtilis* on the Performance, Morphology, Cecal Microbiota and Gut Barrier Function of Laying Hens. *Animals*, 11(6), 1-15. doi:10.3390/ani11061523
- Zhang, S., Wang, Y., Sun, L., Qiu, C., Ding, Y., Gu, H., . . . Ding, Z. (2020). Organic mulching positively regulates the soil microbial communities and ecosystem

functions in tea plantation. *BMC microbiology*, 20(1), 1-13.
doi:10.1186/s12866-020-01794-8