



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS

NATURALES

CARRERA DE AGRONOMIA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

**EVALUACIÓN DE (*Pseudomonas spp*) EN DIFERENTES
CONCENTRACIONES, PARA EL CONTROL DE TRES HONGOS
FITOPATÓGENOS EN EL LABORATORIO DE LA UNIVERSIDAD**

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

Autor:

Ruiz Silva David Iván

Tutora:

Toapanta Gallegos Diana Elizabeth

LATACUNGA – ECUADOR

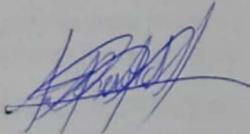
Febrero 2024

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Ruiz Silva David Iván, con cédula de ciudadanía No. 1721069050; declaro ser autor del presente proyecto de investigación: **“EVALUACIÓN DE (*Pseudomonas spp.*) EN DIFERENTES CONCENTRACIONES, PARA EL CONTROL DE TRES HONGOS FITOPATOGENOS EN EL LABORATORIO DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI, CAMPUS CEASA, 2024”**, siendo la Ingeniera Mg. Diana Elizabeth Toapanta Gallegos, 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 nuestra exclusiva responsabilidad.

Latacunga, 22 de febrero del 2024



David Iván Ruiz Silva
CC: 180496142-1
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 **RUIZ SILVA DAVID IVAN**, identificado con cédula de ciudadanía **1721069050** 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 **“EVALUACIÓN DE (*Pseudomonas spp.*) EN DIFERENTES CONCENTRACIONES, PARA EL CONTROL DE TRES HONGOS FITOPATOGENOS EN EL LABORATORIO DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI, CAMPUS CEASA, 2024”**, 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: 30 de noviembre del 2022

Tutor: Ing. Diana Elizabeth Toapanta Gallegos, Mg.

Tema: **“EVALUACIÓN DE (*Pseudomonas spp.*) EN DIFERENTES CONCENTRACIONES, PARA EL CONTROL DE TRES HONGOS FITOPATOGENOS EN EL LABORATORIO DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI, CAMPUS CEASA, 2024”**

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.

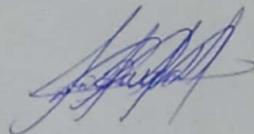
CLÁUSULA OCTAVA. - LICENCIA A FAVOR DE TERCEROS. - **LA CESIONARIA** podrá licenciar la investigación a terceras personas siempre que cuente con el consentimiento de **EL CEDENTE** en forma escrita.

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 20 días del mes de febrero del 2024.



David Iván Ruiz Silva

EL CEDENTE

Dra. Idalia Pacheco Tigselema, Ph.D.

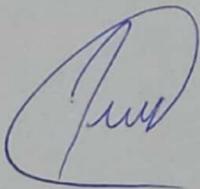
LA CESIONARIA

AVAL DE LA TUTORA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

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

“EVALUACIÓN DE (*Pseudomonas spp.*) EN DIFERENTES CONCENTRACIONES, PARA EL CONTROL DE TRES HONGOS FITOPATOGENOS EN EL LABORATORIO DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI, CAMPUS CEASA, 2024”. de Ruiz Silva David Iván, 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



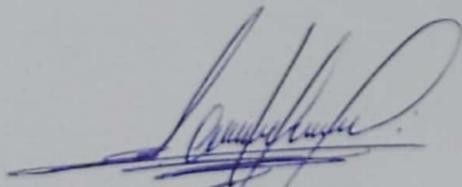
Ing. Diana Elizabeth Toapanta Gallegos, Mg.
CC: 1002749800
DOCENTE TUTORA

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: Ruiz Silva David Iván, con el título de Proyecto de Investigación: "EVALUACIÓN DE (*Pseudomonas spp.*) EN DIFERENTES CONCENTRACIONES, PARA EL CONTROL DE TRES HONGOS FITOPATOGENOS EN EL LABORATORIO DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI, CAMPUS CEASA, 2024", 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.

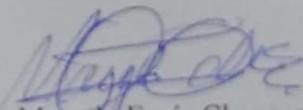
Latacunga, 22 de febrero del 2024



Ing. Guido Euclides Yauli Chicaiza, Mg.

CC: 0501604409

LECTOR 1 (PRESIDENTE)



Ing. Edwin Marcelo Espín Chancusig, Ph.D

C.C: 0501148837

LECTOR 2 (MIEMBRO)



Ing. Alexandra Isabel Tapia Borja, Mg

C.C: 050266174

LECTOR 3 (MIEMBRO)

AGRADECIMIENTO

Quisiera dedicar este espacio para expresar mi gratitud más sincero: en primer lugar, a Dios, y luego a mis padres y abuelos, cuyo apoyo ha sido mi faro durante la travesía de la elaboración de mi este proceso académico. Agradezco también a mis venerados profesores ingenieros, cuya sabiduría y guía han iluminado mi sendero académico. No puedo olvidar a mi tutora y también a los lectores, con sus miradas perspicaces, han pulido los errores y embellecido este viaje con su invaluable contribución.

Es necesario recordar

También 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.

David Iván Ruiz Silva

DEDICATORIA

Con profundo cariño y gratitud, dedico este trabajo de investigación a mi padre, Marcos Ruiz, quien ha sido mi roca en esta travesía universitaria. A mis hermanos, Marcos Ruiz y Diana Ruiz, les agradezco su constante aliento y apoyo.

A mis queridos abuelos, Tamara Tulcán y Luis Alfredo, quienes siempre creyeron en mí, me aconsejaron y me inspiraron a explorar nuevos horizontes. Gracias por la fortaleza y el coraje que me brindaron en cada instante. el combustible que me impulsó en los momentos más difíciles

También quiero expresar mi sincero agradecimiento a mi tutora, la Ing. Diana Toapanta, por brindarme la oportunidad de trabajar en el laboratorio y por su orientación invaluable durante todo el proceso de la tesis. Asimismo, agradezco a la Ing. Tania Llanos por su dedicación al instruirme en todos los procedimientos de laboratorio.

A mis respetados lectores, la Ing. Alexandra Tapia, les estoy profundamente agradecido por su asesoramiento y orientación en la estructura de mi tesis. Finalmente, al Ing. Yauli Guido, le agradezco por avivar mi interés y motivación para profundizar en el aspecto experimental.

David Iván Ruiz Silva

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

TÍTULO: “EVALUACIÓN DE (*Pseudomonas spp.*) EN DIFERENTES CONCENTRACIONES, PARA EL CONTROL DE TRES HONGOS FITOPATOGENOS EN EL LABORATORIO DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI, CAMPUS CEASA, 2024”.

Autor:
Ruiz Silva David Iván

RESUMEN

Botrytis spp., *Fusarium spp.* y *Alternaria spp.* son hongos patógenos que infectan más de 500 de especies vegetales ocasionando pérdidas productivas y económicas a nivel mundial. Atacan a cultivos en diferentes estados de desarrollo de la planta. El presente proyecto de investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de la bacteria *Pseudomonas spp.* en dos concentraciones de 8.3×10^8 y 3.7×10^5 UFC/ml, para el control de los patógenos anteriormente mencionados. Los tratamientos fueron comparados con un tratamiento testigo el cual no fue inoculado con la bacteria. Se planteó un diseño completamente al azar (DCA) AxB, con nueve tratamientos y cinco repeticiones. De los resultados obtenidos determinaron que la mejor concentración fue 8.3×10^8 UFC/ml de la bacteria *Pseudomonas spp.* a los seis días de evaluación. La concentración más efectiva 8.3×10^8 UFC/ml alcanzó el menor desarrollo radial de *Botrytis spp.* en un 84% de inhibición y el segundo patógeno *Fusarium spp.* logro un 80% de inhibición en su desarrollo, *Alternaria ssp.* alcanzó un menor desarrollo radial de un 81% y finalmente el mayor porcentaje de inhibición se presentó en *Botrytis spp.* con un 84% en comparación con el tratamiento testigo que creció normalmente sin la bacteria *Pseudomonas spp.*

Palabras clave: *Botrytis spp.*, *Fusarium spp.*, *Alternaria spp.*, *Pseudomonas spp.*, bioensayo.

TECHNICAL UNIVERSITY OF COTOPAXI
FACULTY OF AGRICULTURAL SCIENCE AND NATURAL RESOURCES

THEME: "EVALUATION OF (*Pseudomonas* spp.) IN DIFFERENT CONCENTRATIONS, FOR THE CONTROL OF THREE PHYTOPATHOGENIC FUNGUSES IN THE LABORATORY OF THE UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI, CAMPUS CEASA, 2023".

Author:
Ruiz Silva David Iván

ABSTRACT

Botrytis spp., *Fusarium* spp. and *Alternaria* spp. are pathogenic fungi that infect more than 500 plant species causing productive and economic losses worldwide. They attack crops at different stages of plant development. The aim of this research project was to evaluate the effect of the bacterium *Pseudomonas* spp. at two concentrations of 8.3×10^8 and 3.7×10^5 CFU/ml, for the control of the above-mentioned pathogens. The treatments were compared with a control treatment which was not inoculated with the bacteria. A completely randomized design (CRD) AxB was used, with nine treatments and five replicates. From the results obtained, it was determined that the best concentration was 8.3×10^8 CFU/ml of *Pseudomonas* spp. bacteria after six days of evaluation. The most effective concentration 8.3×10^8 CFU/ml achieved the lowest radial development of *Botrytis* spp. with 84% inhibition and the second pathogen *Fusarium* spp. achieved 80% inhibition in its development, *Alternaria* spp. achieved a lower radial development of 81% and finally the highest percentage of inhibition was presented in *Botrytis* spp. with 84% compared to the control treatment that grew normally without the bacterium *Pseudomonas* spp.

KEYWORDS: *Botrytis* spp, *Fusarium* spp, *Alternaria* spp, *Pseudomonas* spp, bioassay.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DECLARACIÓN DE AUTORÍA	i
AVAL DE LA TUTORA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.....	v
AVAL DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE TITULACIÓN.....	vi
RESUMEN.....	ix
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	xi
ÍNDICE DE TABLAS.....	xiv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xv
1. INFORMACIÓN GENERAL	1
1.1. Descripción del Proyecto.....	2
1.2. Justificación del Proyecto.....	3
2. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	4
2.1. Beneficiarios directos.....	4
2.2. Beneficiarios indirectos	4
3. PROBLEMÁTICA	4
4. OBJETIVOS	5
4.1. Objetivo General.....	5
4.2. Objetivos específicos.....	5
5. ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS	5
6. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA.....	7
6.1. Control biológico.....	7
6.2. Agentes de Control biológico.....	7
6.3. Ventajas del uso de agentes control biológico.	7
6.4. Desventajas del uso de agentes control biológico.....	7
6.5. Antecedentes del uso de agentes biocontroladores.	7
6.6. Rhizobacterias.....	8
6.6.1. Rhizobacterias para control biológico.	8
6.7. Hongos fitopatógenos.	10
6.7.1. Antecedentes sobre hongos que causan enfermedades en los cultivos.....	10
6.7.2. <i>Botrytis spp.</i>	10
6.7.3. <i>Fusarium spp.</i>	13

6.7.4. <i>Alternaria spp.</i>	15
2. HIPÓTESIS.....	17
2.1. Hipótesis nula.....	17
2.2. Hipótesis alternativa.....	17
3. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL.....	17
3.1. Tipos de investigación.....	17
3.1.1. Investigación bibliográfica	17
3.1.2. Investigación experimental.....	18
3.2. Métodos de Investigación	18
3.2.1. Cuantitativo.	18
3.2.2. Cualitativo.	18
3.3. Técnicas de Investigación.....	18
3.3.1. Observación directa.	18
3.4. Unidad experimental.	18
3.5. Diseño Experimental.	19
3.5.1. Esquema de ADEVA.....	20
3.5.2. Factores en estudio	20
3.5.3. Tratamientos en estudio.....	20
3.5.4. Variables evaluadas.....	21
3.5.5. Esquema de diseño del ensayo	21
3.6. Ubicación de la investigación.....	24
3.7. Materiales, reactivos y equipos.....	25
3.8. Recolección de las muestras.....	26
3.8.1. Muestras vegetales con sintomatología de <i>Botrytis spp.</i>	26
3.8.2. Recolección de muestras de suelo para el aislamiento de <i>Fusarium spp.</i>	26
3.8.3. Muestras vegetales con sintomatología de <i>Alternaria spp.</i>	27
3.9. Elaboración de trampas microbiológicas para la obtención de un biocontrolador	27
3.10. Cultivo de hongos fitopatógenos en el laboratorio	27
3.10.1. Cámara húmeda.	27
3.11. Aislamiento de hongos fitopatógenos.....	28
3.12. Identificación por el microscopio	28
3.12.1. Características morfológicas de <i>Fusarium spp.</i>	28

3.12.2.	Características morfológicas de <i>Botrytis spp.</i>	29
3.12.3.	Características morfológicas de <i>Alternaria spp.</i>	30
3.13.	Aislamiento de un agente biocontrolador en medios de cultivo específicos	31
3.14.	Pruebas bioquímicas para identificar bacterias	33
3.14.1.	Catalasa Prueba de catalasa	33
3.14.2.	Prueba de Gram	33
3.15.	Identificación de bacterias	34
3.15.1.	Preparación de las concentraciones de la bacteria <i>Pseudomonas spp.</i>	34
3.15.2.	Bioensayos in vitro para evaluar la eficiencia de la bacteria <i>Pseudomonas spp.</i> ..	36
3.16.	Datos evaluados.....	38
3.16.1.	Porcentaje de inhibición de los hongos fitopatógenos.....	38
4.	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.	39
4.1.	Caracterización de <i>Botrytis spp.</i>	39
4.2.	Caracterización de <i>Alternaria spp.</i>	41
4.3.	Caracterización de <i>Fusarium spp.</i>.....	42
4.4.	Inhibición en porcentaje de crecimiento en los bioensayos de los hongos fitopatógenos	45
	<i>Nota.</i> Promedio de todos los hongos en inhibición del que corresponde a cada tratamiento	45
4.5.	Análisis de Varianza	46
5.	IMPACTOS	49
5.1.	Impactos Técnicos.....	49
5.2.	Impactos Sociales	49
5.3.	Impactos Ambientales	49
5.4.	Impactos Económicos	49
6.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	50
6.1.	Conclusiones.....	50
6.2.	Recomendaciones.....	50
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	51
8.	Anexos.....	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Actividades y sistemas de tareas.	6
Tabla 2 Taxonomía del <i>Pseudomonas spp.</i>	9
Tabla 3 Taxonomía de <i>Botrytis spp.</i>	12
Tabla 4 Taxonomía de <i>Fusarium spp.</i>	14
Tabla 5 Taxonomía de <i>Alternaria spp.</i>	16
Tabla 6 ADEVA de la evaluación de las diferentes concentraciones de <i>Pseudomonas</i> contra los hongos fitopatógenos.	20
Tabla 7 Matriz experimental	21
Tabla 8 Variables para el bioensayo.....	21
Tabla 9 Esquema del diseño del ensayo.....	23
Tabla 10 Materiales reactivos y equipos.....	25
Tabla 11 Promedio de porcentaje de inhibición de crecimiento	45
Tabla 12 Cuadro de análisis de la varianza (SC III) ($p > 0,05$).	46
Tabla 13 Prueba de Tukey.....	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Pseudomonas aeruginosa	9
Figura 2 Conidióforo de Botrytis spp.....	12
Figura 3 Fusarium spp.....	13
Figura 4 Conidios obovoidales o elipsoidales, con septos transversales, oblicuos y longitudinales.....	15
Figura 5 Universidad Técnica de Cotopaxi	25
Figura 6 Fotografía de síntomas de Botrytis spp.....	26
Figura 7 Material vegetal infectado.....	28
Figura 8 Fusarium spp.....	29
Figura 9 Botrytis spp.	30
Figura 10 Alternaria spp.	30
Figura 11 Trampa de microorganismos contaminada.....	32
Figura 12 Proceso de la preparación de los medios de cultivo para el aislamiento de Pseudomonas spp.....	32
Figura 13 Reacción de la catalasa con H ₂ O ₂	33
Figura 14 Fotografía de observación de prueba Gram negativa.....	34
Figura 15 Disoluciones seriadas	35
Figura 16 Cámara Neubauer.....	36
Figura 17 Rotulación de Cajas Petri.....	37
Figura 18 Preparación de Disco de PDA.....	37
Figura 19 Inoculación de la bacteria alrededor de los hongos fitopatógenos.....	38
Figura 20 Fotografía del micelio tomada en el laboratorio	39
Figura 21 Fotografía de hifas, conidios y conidióforos de Botrytis	40
Figura 21 Alternaria spp.	41
Figura 23 Identificación de Fusarium spp.	42

Figura 22 <i>Fusarium spp.</i>	43
Figura 25 Identificación de <i>Alternaria spp.</i>	41
Figura 26 Pruebas bioquímicas para el aislamiento de <i>Pseudomonas spp.</i>	44
Figura 27 Porcentaje de Inhibición.....	45
Figura 28 Hongos vs. Concentración mediante las Pruebas Tukey.....	47

1. INFORMACIÓN GENERAL

Título de investigación:

“EVALUACIÓN DE (*Pseudomonas spp.*) EN DIFERENTES CONCENTRACIONES, PARA EL CONTROL DE TRES HONGOS FITOPATOGENOS EN CONDICIONES DE LABORATORIO UBICADO EN LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI, CAMPUS CEASA, 2024”.

Inicio de la carrera:

Diciembre del 2022

Finalización:

febrero del 2024

Aprobación en Consejo Directivo:

30 de noviembre del 2023

Lugar de ejecución:

Universidad Técnica de Cotopaxi.

Facultad que auspicia

Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales.

Carrera que auspicia:

Agronomía

Nombres del equipo de investigación:

Tutor Ing. Diana Elizabeth Toapanta Gallegos, Mg.

Estudiante David Iván Ruiz Silva.

Lectores:

Lector1 (Presidente) Ing . Guido Euclides Yauli Chicaiza, Mg.

Lector2 Ing. Chancusig Espín Edwin Marcelo, Ph.D.

Lector3 Ing. Tapia Borja Alexandra Isabel, Mg.

Área de Conocimiento:

Agricultura

Línea de investigación:

Análisis, conservación y aprovechamiento de la biodiversidad local.

Sub líneas de investigación de la Carrera:

Caracterización de la biodiversidad.

Línea de vinculación de la carrera:

Gestión de recursos naturales, biodiversidad, biotecnología y genética para el desarrollo humano y social.

Coordinador del Proyecto:

David Iván Ruiz Silva

Tlfno:0992177619

Correo: david.ruiz9050@utc.edu.ec

Área de conocimiento

Área: Agricultura, silvicultura y pesca- Agronomía.

Línea de investigación

Línea: Desarrollo y Seguridad Alimentaria.

Línea de vinculación:

Gestión de recursos naturales biodiversidad biotecnología y genética para el desarrollo humano y social.

1.1.Descripción del Proyecto

El manejo de hongos fitopatógenos es uno de los principales problemas que enfrentan los agricultores, por tal razón utilizan fungicidas tales como: Benzimidazoles, Dicarboximidias, Fenilpirroles. La presente investigación propone una alternativa empleando a *Pseudomonas spp.* como biocontrolador a diferentes concentraciones *para* el control de *Fusarium spp.*, *Botrytis spp.* y *Alternaria spp.* Para la obtención de este potencial biocontrolador se realizó el aislamiento, identificación, reproducción mediante bioensayos se enfrentó la bacteria, a los

hongos fitopatógenos antes mencionados a continuación se realizó en bioensayos de *Pseudomonas spp.* a diferentes concentraciones para determinar la concentración óptima.

1.2. Justificación del Proyecto

Actualmente existe una tendencia hacia una agricultura más limpia y libre de agrotóxicos con el objetivo de reducir el uso de fungicidas que contaminan el medio ambiente, promoviendo el uso de microorganismos como potenciales biocontroladores (Viera, 2020).

El Ecuador se caracteriza por ser un país productivo con grandes hectáreas cultivadas para satisfacer la demanda del país y también para exportaciones de alimentos. Los agricultores buscan garantizar su cosecha al utilizar grandes cantidades de fungicidas en el control de enfermedades de plantas (Benavides, 2022).

El uso de microorganismos como biocontroladores constituye una herramienta para el agricultor de gran utilidad para un desarrollo de una agricultura limpia. Se han realizado estudios de eficiencia contra patógenos que se ha justificado el uso de microorganismos en distintos cultivos como: papa, arroz, maíz, entre otros, y cultivos perennes como frutales (Viera, 2020).

El mercado de los bioinsumos en la última década se ha incrementado en el desarrollo y adquisición por los productores, a nivel mundial estos productos alcanzaron ventas de más de 1.800 millones en el 2018 en dólares, con una tasa promedio anual de crecimiento porcentual alrededor del 14,3% en el período 2010-2020 y podría crecer a una tasa promedio acumulativa anual el 15% está entre el 2021 y al 2030, lo cual pronostica un crecimiento en ventas de 4.700 millones de dólares. El uso de bioinsumos se ha popularizado en varios países, tales como: China 6,7 %, Canadá 11 %, Italia 15% y países de América Latina con un 30.9 % son la población que usan los microorganismos como una alternativa en la producción agrícola (Bullor et al., 2023).

Hay una amplia variedad de microorganismos potencialmente útiles como biocontroladores y biorremediadores. El estudio de estos microorganismos ha llevado al desarrollo de productos biológicos como *Bacillus subtilis*, *Trichoderma spp.*, *Verticillium lecanii*, *Paecilomyces lilacinus*, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas fluorescens* (Toapanta et al., 2019).

2. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

2.1. Beneficiarios directos

El presente trabajo investigativo beneficiara a los productores de la zona central del Ecuador, personas que se dedican a la agricultura y son perjudicados por enfermedades cotidianas como los hongos (*Botrytis spp.*, *Fusarium spp.* y *Alternaria spp.*).

2.2. Beneficiarios indirectos

Estudiantes y miembros de la academia para que puedan conocer los mecanismos de los microorganismos biocontroladores tales como: bacterias y hongos que permitan combatir patógenos presentes en los cultivos

3. PROBLEMÁTICA

A nivel mundial las enfermedades de los cultivos de exportación de gran demanda tales como: banano, flores y claveles ocasionados por hongos fitopatógenos causan grandes pérdidas económicas. Se produjo perdidas en exportaciones por 2300 millones de USD causado por *Fusarium oxysporum* en el cultivo de banano, es el principal producto de exportación (Litardo, 2023).

Para su control se realiza la aplicación de diferentes fungicidas de las familias de Benzimidazoles, Dicarboximidias, Fenilpirroles son usados habitualmente, sin embargo, representa un factor de contaminación para el medio ambiente y a la salud humana (Llanos, 2017).

La resistencia al hongo *Botrytis cinerea* se presenta en nueve mutaciones de fungicidas mono y poligénicos (Calderón, 2020). Otro patógeno, *Fusarium oxysporum*, basado en la infectividad de los fungicidas aplicados a las plantas, es resistente al benomilbenasol (Mancipe & González, 2016). Por último, *Alternaria spp.*, un hongo resistente a ambos fungicidas como lo indica Gauna (2019).

El cultivo del arroz el hongo *Fusarium spp.* provoca pérdidas en la cosecha de hasta el 90% y en la producción de tomate de árbol causa infecciones a raíces llegando a perder un 50% (Salazar, 2023).

Otro de los problemas fitosanitarios es el caso de *Botrytis spp.* en el cultivo de maíz el cual tiende a infectarse el tallo ocasionando pérdidas de hasta en un 40% y en el cultivo de rosas puede llegar causar pérdidas de un 60% afectando las exportaciones (Morán, 2022).

Finalmente, en el cultivo de pitahaya el patógeno más frecuente es *Alternaria spp.*, el cual puede bloquear el desarrollo de nuevas vainas y causar un 80% en pérdidas (Koch & Castro, 2008).

4. OBJETIVOS

4.1.Objetivo General

Evaluar un aislamiento de *Pseudomonas spp.* en diferentes concentraciones, para el control de tres hongos fitopatógenos bajo condiciones de laboratorio.

4.2.Objetivos específicos

- Aislar a partir de material vegetal infectado de hongos fitopatógenos.
- Obtener una cepa nativa de *Pseudomonas spp.* nativa capturada mediante trampa.
- Determinar a través de bioensayos el efecto de *Pseudomonas spp.* a diferentes concentraciones contra hongos fitopatógenos *Fusarium spp.*, *Botrytis spp.* y *Alternaria spp.*

5. ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS

Tabla 1*Actividades y sistemas de tareas.*

OBJETIVOS ESPECÍFICOS	ACTIVIDADES	RESULTADO DE LA ACTIVIDAD	MEDIO DE VERIFICACIÓN
Aislar a partir de material vegetal infectado de hongos fitopatógenos.	Colectar material vegetal enfermo.	Aislamientos de patógenos <i>Fusarium spp.</i> , <i>Alternaria spp.</i> , y <i>Botrytis spp.</i>	Fotografía de Cepas aisladas de hongos
	Aislar hongos fitopatógenos del material vegetal infectado.		
Obtener una cepa nativa de <i>Pseudomonas spp.</i> nativa capturada mediante trampa.	Preparar trampas para la captura de microorganismos.	Aislamiento de <i>Pseudomonas spp.</i>	Fotografías de Cepas aisladas de la bacteria
	Preparación de medios de cultivo selectivos		
	(Nutritivo, King A, Cetrimide).		
	Pruebas bioquímicas y el uso de medio selectivos las cuales ayudaron a detectar y confirmar el género de la <i>Pseudomonas spp.</i>		
Determinar a través de bioensayos el efecto de <i>Pseudomonas spp.</i> a diferentes concentraciones contra los hongos fitopatógenos (<i>Fusarium spp.</i>, <i>Botrytis spp.</i> y <i>Alternaria. spp.</i>)	Realizar suspensiones a diferentes concentraciones de <i>Pseudomonas spp.</i> con la cámara Neubauer.	Porcentaje de inhibición	Fotografías y tablas de datos
	Realizar bioensayos de antagonismo entre la <i>Pseudomonas spp.</i> y los hongos <i>Fusarium spp.</i> , <i>Alternaria spp.</i> y <i>Botrytis spp.</i>		
	Porcentaje de inhibición de crecimiento de los hongos fitopatógenos.		

Elaborado por: Ruiz, 2023

6. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA

6.1.Control biológico.

El control biológico es el uso de organismos vivos suprime la plaga, reduce su población o el efecto de hacerlo menos abundante o menos dañino, tiene como objetivo la utilización de la biología, siempre y cuando esto se haga de manera respetuosa con el medioambiente y asegure cultivos sanos para los consumidores (Navarrete & Tello, 2021).

6.2.Agentes de Control biológico.

Los posibles candidatos para el control biológico, que no representen ningún riesgo para la salud humana y no tengan efectos perjudiciales en las comunidades microbianas presentes en los sistemas agrícolas, debido a su actividad biológica general y no dirigida hacia un patógeno vegetal específico (Villarreal et al., 2018).

6.3.Ventajas del uso de agentes control biológico.

Este método permite monitorear y reducir los ataques de enfermedades. Entre sus principales beneficios se encuentran el aumento de la producción, el rendimiento y la calidad. Se considera una práctica de suma importancia para mantener bajo control de enfermedades de manera económicamente eficiente (Granja et al., 2022).

6.4.Desventajas del uso de agentes control biológico.

Es fundamental destacar que una limitación significativa en la aplicación de entomopatógenos radica en su susceptibilidad a los cambios climáticos, como temperaturas extremas, la exposición a la luz ultravioleta y la desecación. Además, su almacenamiento requiere condiciones específicas y rigurosas. Es importante tener en cuenta que los insecticidas de naturaleza biológica no causan la muerte instantánea de los insectos (Granja et al., 2022).

6.5.Antecedentes del uso de agentes biocontroladores.

En Argentina inicia el uso de microorganismos benéficos en el año 1950 y después en 2013, se forma el Comité Asesor en Bioinsumos de uso Agropecuario (CABUA) asesora sobre el uso técnico que afecta mínimamente la calidad, eficacia y bioseguridad que deben reunir los bioinsumos agropecuarios para el uso en los campos agrícolas (Mamani de Marchese & Filippone, 2018), y a partir de aquello se retoma en el año 2016 con las organizaciones INIAP en Ecuador, e IICA que tiene 34 países miembros en los que en los sectores públicos y

privados ayudaron a dar forma a las normas para la regularización de bioinsumos agrícolas (Ruales & Barriga, 2020).

6.6. Rhizobacterias.

Las Rhizobacterias forman parte de gran cantidad de microorganismos biológicos asociados a la rizosfera que actúa como agente de control de enfermedades fúngicas y bacterianas, tanto en la parte aérea y en la raíz de las plantas hospedadoras, son promotoras de crecimiento vegetal (Hernández et al., 2020).

6.6.1. Rhizobacterias para control biológico.

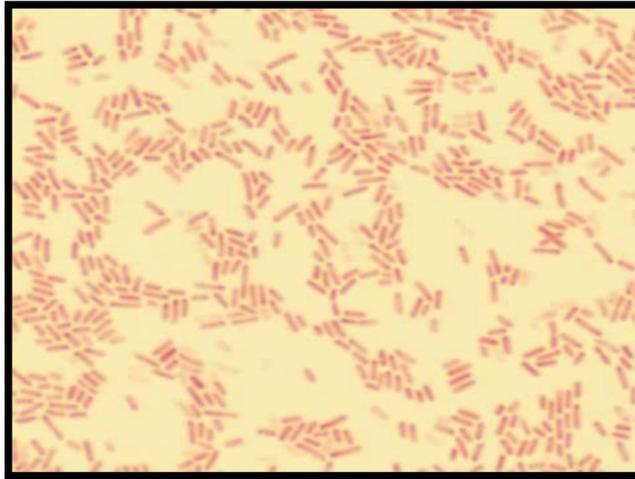
Según la referencia bibliográfica de (Hernández et al., 2020), se emplean los siguientes géneros como agentes de control biológico en plantas:

- *Azotobacter*
- *Pseudomonas*
- *Bacillus*
- *Enterobacter*
- *Rhizobium*
- *Azospirillum*

Muchas especies de Proteobacterias son eficaces para el control biológico en enfermedades foliares y también a las raíces. La aplicación de la cepa *Pseudomonas fluorescens* muestra gran capacidad de inhibición para el crecimiento de los fitopatógenos del suelo, tales como *Fusarium oxysporium*, *Rhizoctonia solani*., *Pythium ultimum*., *Phytophthora nicotianae*, *Sclerotium rolfsii*., *Fusarium moniliforme* y *Fusarium solani* (Aviléz, 2021).

6.6.1.1. Pseudomonas.

La familia *Pseudomonadaceae* son de origen marino y toleran altas concentraciones de sal. Las especies de estas familias producen pigmentos amarillos, verdes y azules, aunque a veces puedan arrojar falsos negativos en las pruebas bioquímicas. El género *Pseudomonas* se caracteriza por ser una bacteria gram negativa, móviles, es aerobios obligatorios, se desarrolla a temperaturas óptimas de 20 a 37°C (Ruiz, 2019).

Figura 1*Pseudomonas aeruginosa**Fuente:* Tomado de Jaramillo (2022)**Tabla 2***Taxonomía del Pseudomonas spp.*

Reino	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	Gammmaproteobacteria
Orden	Pseudomonadales
Familia	Pseudomonadaceae
Género	<i>Pseudomonas</i>
Especies	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> , <i>Pseudomonas stutzeri</i> ,

Fuente: Tomado de Ruiz (2019).

6.7.Hongos fitopatógenos.

Los hongos son organismos eucariotas unicelulares o pluricelulares. Las células del segundo se agrupan en filamentos. llamadas hifas, que en conjunto se denominan micelio las cuales atacan absorbiendo los nutrientes de las plantas (Peña & Páez, 2018).

6.7.1. Antecedentes sobre hongos que causan enfermedades en los cultivos

En 1875, se realizaron significativas contribuciones a la fitopatología cuando se introdujeron y desarrollaron técnicas modernas para el cultivo de microorganismos en cultivos puros. El éxito de Brefeld en el desarrollo de sus métodos se vio respaldado por las técnicas y mejoras desarrolladas previamente por Koch, Petri y otros. Además, Brefeld llevó a cabo investigaciones detalladas y representó gráficamente los ciclos de vida completos de las enfermedades de los cultivos, especialmente las que afectan a los cereales (Peña & Páez, 2018).

En el año 1926 Kurosawa demostró que el helecho de arroz daba como resultado plántulas delgadas y demasiado altas por el hongo causal (*Fusarium*) también puede multiplicarse cuando se manipulan plántulas sanas. gibberellina a finales de la década de 1950 se demostró que numerosos, las bacterias y hongos fitopatógenos producen la fitohormona ácido indolacético (George, 2018).

Según investigadores de 1998, concluyen que la salud de las plantas se conserva al llevar a cabo funciones fisiológicas dentro de los límites de su potencial genético. Sin embargo, la enfermedad surge cuando estas funciones se ven afectadas por patógenos o condiciones ambientales específicas. Los procesos que caracterizan las enfermedades varían según el agente causal (George, 2018).

6.7.2. *Botrytis spp.*

Proviene del término griego "botryose", que alude a racimos de esporas. La afección, comúnmente denominada moho gris de la fruta, se manifiesta tanto en entornos agrícolas como durante el almacenamiento y transporte. Su control se ve complicado cuando las condiciones ambientales propician su desarrollo y expansión. (García, 2017). La penetración directa de esporas germinadas en tejidos en crecimiento activo es rara. Generalmente, la infección se produce a través de tejidos dañados por insectos o heridas, como las causadas por la poda. Después de un período sobre pétalos de flores o en hojas, se manifiestan principalmente los síntomas en los cultivos.

Las especies de *Botrytis* se distinguen mediante características morfométricas, morfológicas y condiciones de crecimiento, incluyendo la morfología del micelio, el tamaño y la forma de los conidios, el tamaño de los esclerocios y la especificidad del hospedante, aspecto crucial para la diferenciación. Esto resulta especialmente significativo al detectar especies en pétalos con síntomas de tono marrón en los sépalos y el receptáculo. Si el patógeno persiste en el crecimiento floral, puede ocasionar la muerte del pedúnculo, llevando consigo el deceso de la flor y del fruto inmaduro (Elad et al., 2020).

Debido a que la enfermedad no puede infectar los tejidos internos durante la etapa inactiva, los primeros estadios, al menos hasta el segundo o tercer día, no revelarán indicios. Sin embargo, una vez que los frutos comienzan a desarrollarse, el patógeno se propaga y da lugar a la denominada pudrición, manifestándose con una tonalidad marrón en la región cercana al cáliz en los extremos (Mendoza, 2021). Al igual en hojas en alguna herida el patógeno ingresa e infecta a la planta hasta causar la muerte si no se la trata químicamente o hasta biológicamente.

En frutas maduras, el moho gris es atraído fácilmente por hongos que provocan daños tanto en la fruta como en su apariencia física. Este moho tiene la capacidad de colonizar rápidamente los tejidos afectados del fruto, causando putrefacción y deterioro, según De Vallée et al. (2023). La infección puede propagarse fácilmente a otros frutos, siguiendo un patrón de anidación comúnmente observado en grupos de frutas infestadas. Si la fruta afectada no se retira de la planta, tiende a volverse seca y dura, incluso después de la cosecha.

De acuerdo con la información encontrada en la literatura, cuando *Botrytis* infecta, se revela que este hongo comprende varias especies dentro del mismo género. Según la investigación molecular, "*Botrytis cinérea*" se presenta como una entidad compleja que incluye diversas especies relacionadas, a pesar de las diferencias en su base de análisis de ADN (Elad et al., 2020).

Figura 2

Conidióforo de Botrytis spp.



Fuente: Tomado de Cáceres (2020).

Tabla 3

Taxonomía de Botrytis spp.

Reino	Fungi
Filo	Ascomycota
Clase	Leotiomycetes
Orden	Heliales
Familia	Sclerotiniaceae
Género	<i>Botryotinia</i>
	<i>Botrytis cinérea</i>
	<i>Botrytis fabae</i>
Especie	<i>Botrytis tulipae</i>
	<i>Botrytis tulipae</i>
	<i>Botrytis narcissicola</i>

Fuente: Tomado de Cáceres (2020).

6.7.2.1. Ciclo biológico de Botrytis spp.

Las condiciones ideales para la reproducción del hongo se dan cuando la humedad relativa varía entre el 90% y el 95%, y las temperaturas se mantienen dentro del rango de 18°C a 23°C. En contraste, si la temperatura es más baja, como 5 °C, la duración del período de humedad necesario se incrementa a 50 horas. Esto explica por qué los mayores daños se observan en climas templados y húmedos (Córdova, 2020).

6.7.2. Control biológico de *Botrytis* spp.

Existen hongos y bacterias con gran eficacia como agentes de control biológico. Se ha estudiado la simbiosis de *Pseudomonas fluorescens* y otras especies, considerándolas como posibles biocontroladores contra hongos fitopatógenos. Se han obtenido resultados positivos en términos de inhibición frente a *Botrytis cinérea*. (Ghadamgahi et al., 2022).

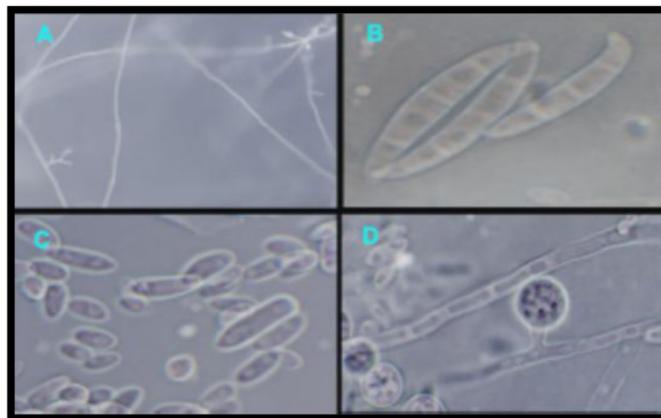
6.7.3. *Fusarium* spp.

El termino *Fusarium* spp. deriva del latín que tienen como significado “fucus”. Es un género de hongos de distribución mundial, ubicuos y con gran importancia económica ya que son habituales fitopatógenos. Su extensa distribución se debe a su capacidad de crecer en diversos sustratos como en restos de la planta, por lo que son saprofitos y sus mecanismos efectivos de dispersión como el viento y la lluvia juegan un papel importante en su propagación (Morán, 2022).

El hongo puede sobrevivir en el suelo como micelio o como esporas en ausencia de sus huéspedes; la temperatura óptima para el desarrollo de *Fusarium* spp. es de 25 a 28°C, el crecimiento se incrementa cuando la temperatura es cercana a 33°C y su desarrollo no es favorable cuando tiene temperaturas iguales o menores a 17°C, es capaz de crecer y esporular en un rango de pH que ronda aproximadamente los 6, y su crecimiento se ve más favorecido en un ambiente con poca luz (Martínez, 2020).

Figura 3

Fusarium spp.



Nota. A: Hifas. B: Macroconidios. C: Microconidios. D: Hifa y clamidosporas

Fuente: Tomado de Castro (2018).

Tabla 4

Taxonomía de *Fusarium spp.*

Reino:	Fungi
Filo:	Ascomycota
Clase:	Deuteromycete
Orden:	Hypocreales
Familia:	Hypocreaceae
Género:	<i>Fusarium</i>
	<i>F. culmorum</i>
	<i>F. graminearum</i>
	<i>F. proliferatum</i>
Especie:	<i>F. avenaceum</i>
	<i>F. acuminatum</i>
	<i>F. equiseti</i>

Fuente: Tomado de Morán (2022).

6.7.3.1. Ciclo biológico de *Fusarium spp.*

El inicio de la enfermedad comienza cuando las hifas crecen o cuando las clamidosporas se encuentran en forma de dormancia, se presentan en los tejidos muertos del hospedero, estimulando por los exudados secretados por las raíces de las plantas recién sembradas. Las hifas del hongo penetran directamente la epidermis de las raíces, pasan a la corteza y a la endodermis y entran a los vasos de la xilema, también las hifas pueden penetrar a través de las heridas; sin embargo, la penetración directa a través de las raíces es el método más común. Al estar dentro de la planta, el patógeno se traslada hacia el tejido vascular esto ocurre mediante una colonización que se produce dentro de la célula, para después dirigirse hacia los vasos del xilema, donde lleva a cabo la invasión una vez que estos vasos están en su fase madura, el patógeno puede crecer mediante el micelio y tener en consecuencia la muerte prematura de la planta, cuyo proceso de crecimiento consta primero de monofiálides (simples o ramificadas), después crecen y son células poliblasticas (conidios solitarios), luego se enrollan y se conocen como polifiálides (cadenas para formar falsas cabezas), y por último esporodoquio (macroconidios) (Manosalvas & Acurio, 2012).

6.7.3.2. Control biológico de *Fusarium spp.*

Hay hongos y bacterias que pueden ser muy eficientes al momento de ser usadas como controladores biológicos se ha investigado sobre la simbiosis de *Pseudomonas spp* con las raíces de las plantas y el efecto de inhibición contra *Fusarium spp.* En esta investigación han descrito diversidad también el hongo *Trichoderma spp* como potenciales antagonistas de *Fusarium spp.* (Chauca & Oñate, 2023).

6.7.4. *Alternaria spp.*

La palabra *Alternaria spp.* proviene de latín "alternus" que significa alternante; la enfermedad es endémica de México y tiene mayor incidencia en la madurez de los frutos y puede provocar un retraso o en el peor de los casos no hubiera cosecha. Cuando es época de invierno y por el riego existe una humedad alta, *Alternaria spp.* se desarrolla con el exceso de lluvias o mal drenaje promueva que se propague más el hongo, los conidios del hongo crecen en respuesta de nutrientes en la superficie de la planta invadiendo hasta un 50% del ellos (Azanza, 2022).

Alternaria spp. ataca a la mayoría de cultivos de gran importancia económica, causando daños severos antes y después de la cosecha. La presencia de hongo que se relacionan con este género que se extiende en todo el fruto; en los tallos se presentan necrosis que pueden llegar a medir de 0,5 a 1,5 cm). Tiene una temperatura de crecimiento mesófila, es decir la temperatura tienen un rango de 20°C y 30°C que puede crecer y sobrevivir y causar daños a los cultivos agrícolas (Azanza, 2022).

Figura 4

Conidios obovoidales o elipsoidales, con septos transversales, oblicuos y longitudinales



Fuente: Tomado de Cruz (2016).

Tabla 5

Taxonomía de Alternaria spp.

Reino:	<i>Fungi</i>
Filo:	Ascomycota
Clase:	Dothideomycetes
Orden:	Pleosporales
Familia:	Pleosporaceae
Género:	<i>Alternaria</i>
Especie:	<i>Alternaria alternata,</i> <i>Alternaria citri,</i> <i>Alternaria dauci,</i> <i>Alternaria mali</i>

Fuente: Tomado de Cruz (2016).

6.7.4.1. Ciclo biológico de *Alternaria spp.*

La presencia de infección (manchas negras redondas) inicia en la parte inferior de la planta a partir de 2 a 3 días luego de la siembra, la presencia de las esporas se presenta a los 4 días, cuando la mancha causada por la infección presenta alrededor de 3 mm diámetro, las esporas y conidios son diseminadas por el viento infectando plantas sanas (Azanza, 2022).

6.7.4.2. Control biológico de *Alternaria spp.*

La aplicación de levaduras epifitas para intentar reducir la incidencia del hongo *Alternaria spp.*, puesto que son capaces de competir por el espacio y permanecer durante largos periodos en épocas de temperaturas altas y bajas. Las Rhizobacterias como *Pseudomonas fluorescens* u otras especies pueden llegar a usarse como biocontroladores en hongos *Curvularia spp.*, *Fusarium spp.* y *Alternaria spp.*, constituyendo una asociación con el cultivo de maíz (Aviléz, 2021).

1.1.1.1. Ciclo biológico de Alternaria spp.

La presencia de infección (manchas negras redondas) inicia en la parte inferior de la planta a partir de 2 a 3 días luego de la siembra, la presencia de las esporas se presenta a los 4 días, cuando la mancha causada por la infección presenta alrededor de 3 mm diámetro, las esporas y conidios son diseminadas por el viento infectando plantas sanas (Azanza, 2022).

1.1.1.2. Control biológico de Alternaria spp.

La aplicación de levaduras epifitas para intentar reducir la incidencia del hongo *Alternaria spp.*, puesto que son capaces de competir por el espacio y permanecer durante largos periodos en épocas de temperaturas altas y bajas. Las Rhizobacterias como *Pseudomonas fluorescens* u otras especies pueden llegar a usarse como biocontroladores en hongos *Curvularia spp.*, *Fusarium spp.* y *Alternaria spp.*, constituyendo una asociación con el cultivo de maíz (Aviléz, 2021).

2. HIPÓTESIS.

2.1. Hipótesis nula.

Ho: *Pseudomonas spp* a diferentes concentraciones no ejerce un efecto inhibitor sobre los hongos fitopatógenos. (*Botrytis spp.*, *Fusarium spp.* y *Alternaria spp.*) en condiciones de laboratorio.

2.2. Hipótesis alternativa.

H1: la *Pseudomonas spp* en diferentes concentraciones logra controlar a los hongos fitopatógenos (*Botrytis spp.*, *Fusarium spp.* y *Alternaria spp.*) en condiciones de laboratorio.

3. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL.

3.1. Tipos de investigación

3.1.1. Investigación bibliográfica

Consiste en la recopilación de material bibliográfico existente como artículos científicos, libros, tesis, documentos, entre otros con respecto al tema de estudio sobre agentes biocontroladores, se analizó y destacó lo más importante para la construcción de nuevos conocimientos para el desarrollo del documento del proyecto de investigación

3.1.2. Investigación experimental.

Se realizó una investigación experimental utilizando un diseño completamente al azar (DCA) tipo AXB, que incluyó 9 tratamientos y 5 repeticiones. En este contexto, se llevó a cabo la manipulación deliberada de las variables, con un nivel de significancia inferior al 11% (Silva et al., 2018). En el laboratorio, se realizó un experimento con diversas concentraciones de *Pseudomonas spp* para evaluar su eficacia en el control de hongos patógenos, como *Botrytis spp.*, *Fusarium spp.* y *Alternaria spp.* Este modelo nos permite comparar las medias de los niveles del factor A y entre los diferentes niveles del factor B.

3.2.Métodos de Investigación

3.2.1. Cuantitativo.

Esta investigación se considera cuantitativa debido a que involucra la recopilación de datos relacionados con el crecimiento radial, los cuales fueron sometidos a un análisis estadístico. Además, estos datos se han transformado en una tabla que muestra el porcentaje de inhibición, lo que añade un componente numérico y cuantitativo a la evaluación de los resultados.

3.2.2. Cualitativo.

Se utilizó las claves taxonómicas de los hongos para la identificación de los agentes patógenos al utilizando el microscopio observando la morfología de los hongos fitopatógenos, mientras que en las bacterias se identificó mediante pruebas bioquímicas.

3.3.Técnicas de Investigación

3.3.1. Observación directa.

Esta técnica consiste en observar detenidamente el crecimiento de los hongos fitopatógenos para tomar información por la aplicación de *Pseudomonas spp.*

3.4.Unidad experimental.

Para el bioensayo, la unidad experimental consistió en 45 unidades experimentales (cajas petri), en las cuales se aplicó *Pseudomonas spp* a diferentes tipos de hongos fitopatógenos. cada uno con su respectivo tratamiento y repetición.

3.5.Diseño Experimental.

Se llevó a cabo un Diseño Completamente Aleatorizado (DCA) AxB, en el cual se consideró el Factor (A) como los hongos patógenos (*Botrytis spp.*, *Fusarium spp.* y *Alternaria spp.*), y el Factor (B) con las concentraciones de *Pseudomonas spp* (105 UFC y 108 UFC), además de un testigo (en el que solo se cultivaron los hongos sin la bacteria *Pseudomonas spp*) se realizaron cinco repeticiones para los 9 tratamiento propuesto dando un total de $9 \times 5 = 45$ unidades experimentales.

3.5.1. Esquema de ADEVA

Tabla 6

ADEVA de la evaluación de las diferentes concentraciones de Pseudomonas spp contra los hongos fitopatógenos.

Factor de variable	Grados de libertad
Hongos fitopatógenos	2
Concentraciones de <i>Pseudomonas spp</i>	2
Hongos fitopatógenos x Concentraciones de <i>Pseudomonas spp</i>	4
Repeticiones	4
Error experimental	32
Total	44

Elaborado por: Ruiz, 2023

3.5.2. Factores en estudio

3.5.2.1. Factor A (hongos fitopatógenos)

- FS1: *Fusarium spp.*
- BS2: *Botrytis spp.*
- AS1: *Alternaria spp.*

3.5.2.2. Factor B (concentración del biocontrolador *Pseudomonas spp* UFC/ml)

- P0: (testigo sin bacteria).
- PS1: 3.7×10^5 UFC.
- PS2: 8.3×10^8 UFC.

Los factores en estudio fueron las aplicaciones de *Pseudomonas spp* en tres niveles de concentraciones contra tres hongos patógenos: *Botrytis spp.*, *Fusarium spp.* y *Alternaria spp.*

3.5.3. Tratamientos en estudio

Este ensayo cuenta con nueve tratamientos que resultaron de la combinación de tres hongos fitopatógenos contra dos niveles de concentración de *Pseudomonas spp* y un testigo. En la

Tabla 7 la matriz experimental detallando 9 corridas experimentales, usando como factores A (hongos), y B (bacteria).

Tabla 7

Matriz experimental

Factor A	Factor B	Tratamientos	Descripción
		-T1 = BS1PS1C1	- <i>Pseudomonas spp</i> $10x^8$ x <i>Botrytis spp</i>
		-T2 = BS1PS1C2	- <i>Pseudomonas spp</i> $10x^5$ x <i>Botrytis spp</i>
		-T3 = BS1P0	- <i>Botrytis spp</i> (testigos)
-BS1(<i>Botrytis spp</i>)	-PS1C1($8.3x10^8$)	-T4 = FS1PS1C1	- <i>Pseudomonas spp</i> $10x^8$ x <i>Fusarium spp</i>
-FS1 (<i>Fusarium spp</i>)	-PS1C2($3.7x10^5$)	-T5 = FS1PS1C2	- <i>Pseudomonas spp</i> $10x^5$ x <i>Fusarium spp</i>
-AS1(<i>Alternaria spp</i>)	-P0(testigo sin bacteria)	-T6 = FS1 P0	- <i>Fusarium spp</i> (testigos)
		-T7 = AS1PS1C1	- <i>Pseudomonas spp</i> $10x^8$ x <i>Alternaria spp</i>
		-T8 = AS1PS1C2	- <i>Pseudomonas spp</i> $10x^5$ x <i>Alternaria spp</i>
		-T9 = AS1 P0	- <i>Alternaria spp</i> (testigos)

Elaborado por: Ruiz, 2023

3.5.4. Variables evaluadas

A continuación, se presenta las variables en estudios a evaluar en la investigación:

Tabla 8

Variables para el bioensayo.

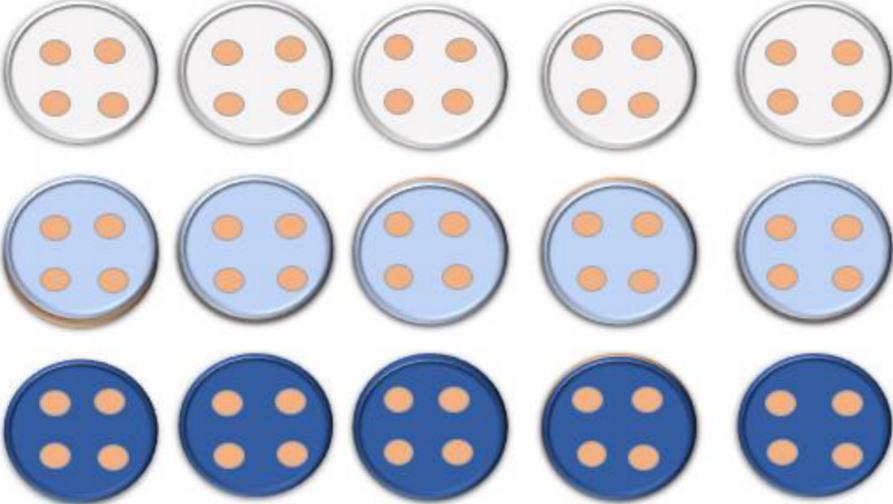
Variable Independiente	Variable Dependiente	Parámetros	Indicadores
Concentración de <i>Pseudomonas spp.</i>	Desarrollo de los hongos <i>Fusarium spp.</i> <i>Botrytis spp.</i> , <i>Alternaria spp.</i>	Inhibición radial.	Inhibición en % radial de los diferentes hongos.

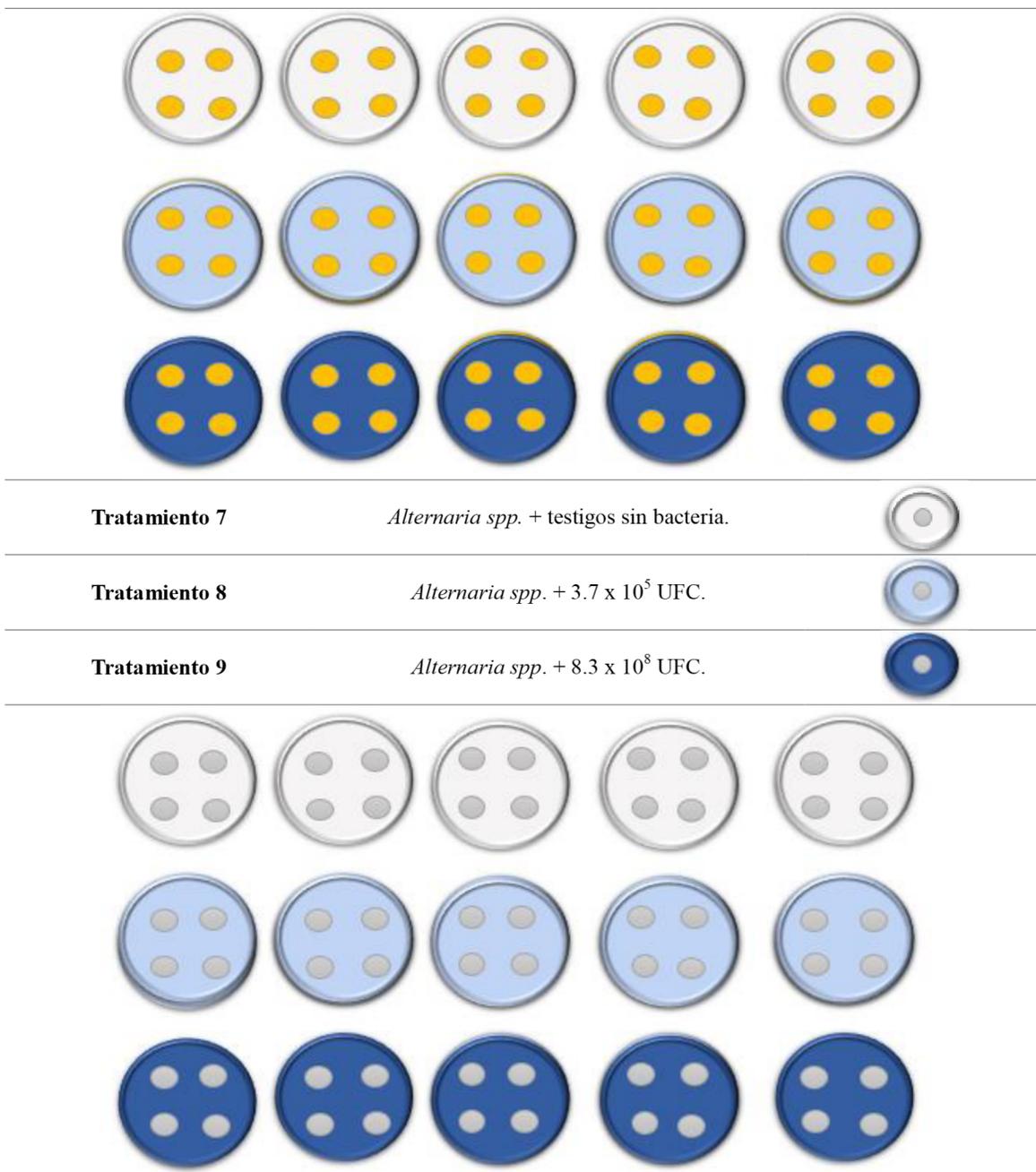
Elaborado por: Ruiz, 2023

3.5.5. Esquema de diseño del ensayo

Los datos recopilados fueron estructurados en un Diseño Completamente al Azar (AxB). Esto comprende tres tipos de hongos fitopatógenos y tres niveles de concentración, y en cada tratamiento se realizaron con 5 repeticiones.

Tabla 9*Esquema del diseño del ensayo.*

Tratamiento 1	<i>Fusarium spp</i> + testigos sin bacteria.	
Tratamiento 2	<i>Fusarium spp</i> + 3.7×10^5 UFC.	
Tratamiento 3	<i>Fusarium spp</i> + 8.3×10^8 UFC.	
		
Tratamiento 4	<i>Botrytis spp.</i> + testigos sin bacteria.	
Tratamiento 5	<i>Botrytis spp.</i> + 3.7×10^5 UFC.	
Tratamiento 6	<i>Botrytis spp.</i> + 8.3×10^8 UFC.	



Elaborado por: Ruiz, 2023

3.6.Ubicación de la investigación.

La presente investigación se realizó en el laboratorio de microbiología de la Universidad técnica de Cotopaxi campus Salache, está dentro del perímetro rural cantón Latacunga, ubicada al suroeste de la cabecera cantonal, junto a la E35 en el km 7,53 de la carretera que va vía Salache la cual está ubicado a una altura de 2,870 msnm.

Figura 5*Universidad Técnica de Cotopaxi**Fuente:* Google maps, 2023**3.7. Materiales, reactivos y equipos****Tabla 10***Materiales reactivos y equipos.*

Materiales	Equipos	Reactivos/Sustancias
	- Autoclave	-PDA(HONGOS)
	- Balanza analítica	-Alcohol al 96%
	- Agitador magnético	-Cloro al 3%
- Fundas plásticas	- Microondas	-Alcohol antiséptico
- Frascos desechables	- Destilador de agua	-Hipoclorito de sodio
- Cajas Petri	- Refrigerador	-Agua destilada, esterilizada
- Mechero	- Cámara de flujo laminar	-Tinción de gran (cristal violeta, yodo, alcohol acetona y safranina)
	- Cámara Neubauer	
	- Autoclave	-Arroz
	- Balanza analítica	-Melaza

Elaborado por: Ruiz, 2023

3.8.Recolección de las muestras.

3.8.1. Muestras vegetales con sintomatología de *Botrytis spp.*

Se recolectaron muestras vegetales en el invernadero de rosas del Campus Salache. La manifestación de este fenómeno se observa en el haz de las hojas y a lo largo de los nervios de la planta, donde aparecen puntos amarillos que con el tiempo evolucionan hacia un tono marrón, dando lugar a una apariencia polvorienta. Este proceso conlleva al debilitamiento de las hojas y en algunos casos se pueden apreciar finas telarañas en la parte inferior de las hojas afectadas según Elad (2020).

Así también, es posible fijarse en los síntomas guiados por lo mencionado en el trabajo de Bika et al. (2021), quienes recalcan que las plantas enfrentan amenazas de *Botrytis cinerea*, generando síntomas como manchas, pudrición y marchitez. El tizón, caracterizado por lesiones necróticas, afecta pétalos, hojas y tallos, llevando a la destrucción de las cabezas florales y la caída de pétalos. Este hongo también induce tizón en las hojas cuando el tejido floral infectado entra en contacto con ellas. En situaciones extremas, el tizón del tallo progresa, alcanzando la base y potencialmente causando la muerte de la planta, impactando negativamente la longevidad y calidad como se observa en la Tabla 6, fotografía tomada por el investigador actual.

Figura 6

Fotografía de síntomas de *Botrytis spp.*



Elaborado por: Ruiz, 2023

3.8.2. Recolección de muestras de suelo para el aislamiento de *Fusarium spp.*

Se procedió a la obtención de muestras botánicas en el invernadero de rosas situado en el Campus Salache. Las plantas afectadas por *Fusarium spp.* tienden a exhibir una sintomatología caracterizada por marchitamiento, deterioro de las raíces, putrefacción del pie

y del tallo. Un indicador crucial para la identificación de esta enfermedad, según Morán (2022), es la manifestación de un amarillamiento excesivo en las hojas. Para realizar la recolección de la muestra, se seleccionaron aquellas plantas que presentaban un marcado descoloramiento o amarillamiento en sus hojas.

3.8.3. Muestras vegetales con sintomatología de *Alternaria spp.*

Se tomaron muestras vegetales del cultivo de tomate de árbol en las terrazas del Campus Salache de árbol con signos de infección las cuales mostrando manchas circulares pardo oscuro de 5 a 8 mm en las hojas más antiguas, adoptando la forma de anillos con resplandor amarillento. Los frutos, tanto en su fase verde como madura, pueden ser afectados en la región cercana al pedúnculo, con manchas oscuras y secas capaces de propagarse por toda la superficie. En los tallos, se observan áreas necróticas de 0,5 a 1,5 cm (Azanza, 2022).

3.9. Elaboración de trampas microbiológicas para la obtención de un biocontrolador

Se prepararon trampas de microbiológicas para la obtención de un biocontrolador. Se pesó 1 kg de arroz precocido (sin sal), se mezcló con $\frac{1}{4}$ de litro de melaza, distribuyendo el arroz en varios frascos desechables. Las trampas se colocaron en dos áreas forestales distintas del campus Salache a 10 cm de profundidad, esto se realizó de acuerdo a la investigación realizada por Navarrete (2021).

3.10. Cultivo de hongos fitopatógenos en el laboratorio

3.10.1. Cámara húmeda.

Se elaboró una cámara húmeda para *Botrytis spp.*, *Fusarium spp.* y *Alternaria spp.* según el protocolo de Muñoz et al. (2019). Para proporcionar las condiciones de temperatura y humedad que provocan el crecimiento y desarrollo de estructuras de hongos. Se utilizaron fundas de plástico estéril y desinfectado con alcohol 70%, en el interior se colocó papel absorbente, se humedece con agua destilada y se colocan las muestras distribuyéndolas sobre el papel, sellando con cinta scotch, esto se realiza para formar un ambiente húmedo y finalmente por 3 días a condiciones normales.

Figura 7

Material vegetal infectado



Elaborado por: Ruiz, 2023.

3.11. Aislamiento de hongos fitopatógenos

Se aplicó la metodología establecida por Muñoz et al. (2019), que recomienda el empleo del medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) para el desarrollo de las muestras afectadas por hongos fitopatógenos, como se detalla en el Anexo 1.

Primero se prepara el medio de cultivo PDA se utilizó 1000 ml de agua destilada y se pesa 39 gr de PDA, después se coloca en el autoclave por 40 minutos a unas 15 libras de presión, después en la cámara de flujo laminar en la que se procedió a aislar en el medio de cultivo PDA los fragmentos de material vegetal infectados con síntomas de los patógenos *Botrytis spp.*, *Fusarium spp.* y *Alternaria spp.* Los pedazos del material vegetal, tenían alrededor de 1 centímetro, se distribuyeron en diferentes cajas de petri, asignando cajas específicas por cada tipo de hongo patógeno. El proceso de cultivo se repitió a intervalos de 7 días hasta lograr purificar a los hongos deseados, tal como se describe en el trabajo de Castro (2020). Este procedimiento es esencial en la investigación de fitopatología, ya que permite el aislamiento y un análisis de los hongos en estudio.

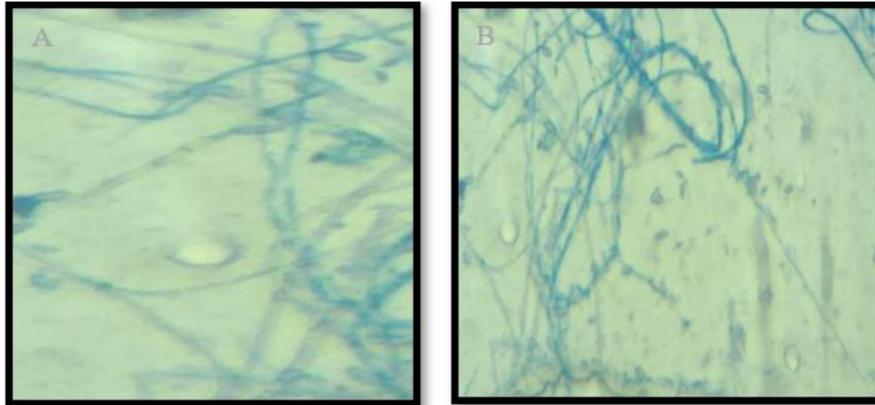
3.12. Identificación por el microscopio**3.12.1. Características morfológicas de *Fusarium spp.***

Fusarium spp. produce esporas asexuales llamadas conidios con forma un poco alargada curva y con hifas cenocíticas y también se le considera un hongo séstil lo que significa que no

es móvil según (George, 2018). En la fotografía número B se muestran en las imágenes esporas asexuales de forma de bastón y en la fotografía número A se puede distinguir las hifas septadas.

Figura 8

Fusarium spp.



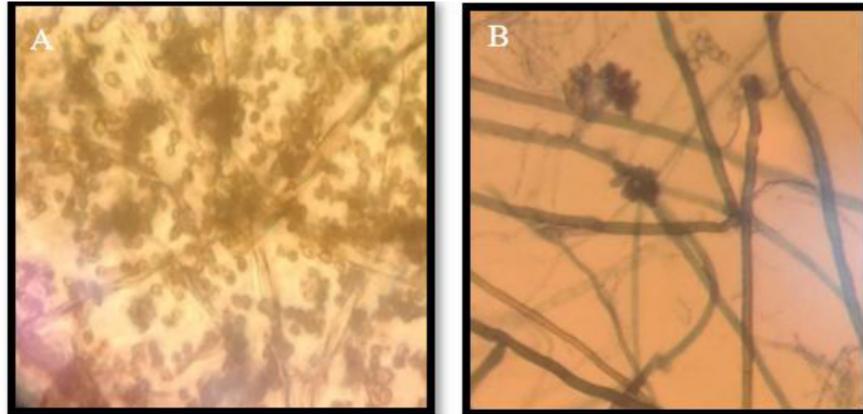
Elaborado por: Ruiz, 2023.

3.12.2. Características morfológicas de *Botrytis spp.*

Botrytis spp. produce esporas asexuales llamadas conidióforos que tiene forma ovalada y con hifas septadas y también se le considera un hongo sésil lo que significa que no es móvil según (George, 2018). En la fotografía A indica las esporas de forma ovalada y en la fotografía B el cuerpo fructífero en forma de ramo y las hifas captadas.

Figura 9

Botrytis spp.



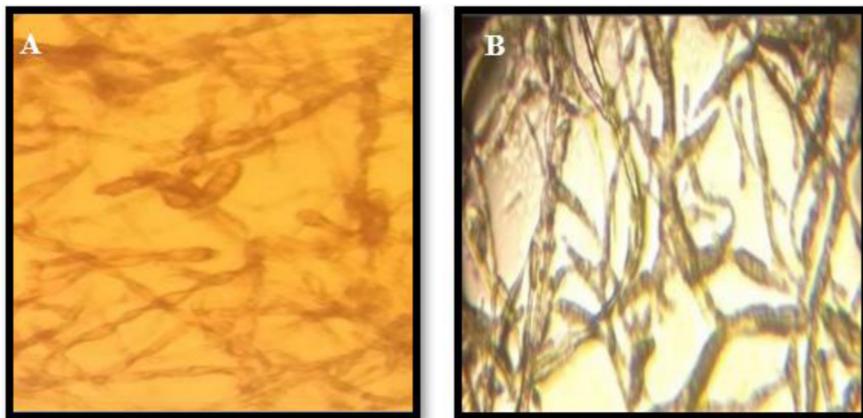
Elaborado por: Ruiz, 2023

3.12.3. Características morfológicas de *Alternaria spp.*

Alternaria spp. produce esporas asexuales llamadas conidióforos usualmente son pluricelulares que tiene forma de bastón y con hifas septadas formando cadenas y también se le considera un hongo sésil lo que significa que no es móvil según Kumari et al. (2020). En la fotografía tomada en el laboratorio A se puede notar las hifas captadas y en la fotografía B se logra distinguir de mejor manera los conidios captados y en cadenas acropétalas.

Figura 10

Alternaria spp.



Elaborado por: Ruiz, 2023

3.13. Aislamiento de un agente biocontrolador en medios de cultivo específicos

Para la preparación de medios de cultivos para el aislamiento de un agente biocontrolador se utilizó las metodologías establecidas por Al-Rubaye et al. (2020). La cual explica los reactivos de cual se componen.

Se preparó un medio enriquecido líquido utilizando 3.6 gramos de peptona disueltos en 100 mL de agua destilada. Después de preparar la solución se sometió a la autoclave durante 40 minutos. A partir de este medio esterilizado se cultivaron microorganismos a partir de la trampa de microorganismos que creció en movimiento constante con la ayuda de un agitador orbital para muestras microbiana, en un periodo de 24 horas. Luego, se realizó un aislamiento en un medio sólido de agar nutritivo, utilizando 3,9 gramos de agar en 100 ml de agua destilada, y se incubó durante 48 horas. Después, se procedió a preparar medios selectivos para las bacterias del género *Pseudomonas*, como el medio King A y el medio Cetrimide.

Para el medio King A, se preparó una solución homogénea con lo que se realizó la solución homogeneizada de la que se usó 3.9 gr en 100 ml de agua destilada el cual se autoclavó durante 40 minutos a una presión de 15 libras. Luego, este medio se cultivó durante 48 horas en la incubadora. Finalmente, se realizó un reaislamiento en un medio de cultivo con Cetrimide. Para preparar este agar Cetrimide, se disolvieron 3.9 gramos de Cetrimide en 100 ml de agua destilada. Este medio contenía un agente químico llamado acetamida, que tenía la capacidad de inhibir el crecimiento de otras bacterias gramnegativas, favoreciendo así el crecimiento de las bacterias del género *Pseudomonas spp.*

Después se aisló en un medio solido agar nutritivo del cual se toma 3.9g en 100 ml de agua destilada y se incuba por 48 horas, después se procede a preparar medios selectivos para *Pseudomonas spp.* como King A y Cetrimide, para el medio King A se utilizó agar purificado, K_2HPO_4 (anhidro), $MgSO_4$ y $7H_2O$ (anhidro) hasta tener una solución homogénea, y autoclavar por 40 minutos a 15 libras de presión el cual se cultivó por 48 horas en la incubadora, finalmente se re aisló en un medio de cultivo con Cetrimide del que se prepara 3.9gr de Cetrimide en 100 ml de agua destilada el agar Cetrimide tiene un agente químico Acetamida el cual puede inhibir el crecimiento de otras bacterias gran negativas teniendo preferencias el crecimiento de las bacterias del género *Pseudomonas spp.*

Para el aislamiento del agente biocontrolador se utilizó las metodologías establecidas por (Acaro, 2020). Se extrajo un fragmento de la trampa de microorganismos, el mismo que se

mantuvo en constante movimiento con ayuda de un agitador orbital para muestras microbiana, en un periodo de 24 horas, luego del tiempo establecido con una micropipeta se toma una suspensión de 100 microlitros en medios sólidos de agar nutritivo y se incubo por 48 horas, nuevamente se aíslan en medios de cultivo selectivo agar King A el cual contiene glicerol e inhibe el crecimiento de otras bacterias que no sea la *Pseudomonas spp.*, finalmente se aisló nuevamente en un medio de cultivo con Cetrimide que tiene un agente químico Acetamida el cual puede inhibir el crecimiento de otras bacterias gran negativas teniendo preferencias el crecimiento de las bacterias del género *Pseudomonas spp.*

Figura 11

Trampa de microorganismos contaminada



Elaborado por: Ruiz, 2023.

Figura 12

Proceso de la preparación de los medios de cultivo para el aislamiento de Pseudomonas spp



Nota. Se usó como medios de cultivo del agar King, Cetrimide y Nutritivo.

Elaborado por: Ruiz, 2023

3.14. Pruebas bioquímicas para identificar bacterias

3.14.1. Catalasa Prueba de catalasa

La catalasa es una prueba bioquímica se utiliza para determinar la enzima catalasa que descompone el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua (H_2O) y oxígeno (O_2) como se muestran los reactivos en la Figura 13 y la reacción química $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$, donde se observan burbujas por lo que se descompone el peróxido (Jaramillo, 2022). Sobre un cubre objetos se colocó una muestra tomada con un asa de la bacteria que se desarrolló con el medio Cetrimide Se tomaron 50 microlitros de agua oxigenada al 3%, con la que reacciono la bacteria al instante con burbujas en toda la muestra expuesta a el agua oxigenada al 3%, siendo como resultado catalasa positiva. El principal objetivo de esta prueba es separar *Micrococacceae* y *Pseudomonadaceae* (positiva) de *Streptococcus spp.* y *Enterococcus spp.* (negativa)

Figura 13

Reacción de la catalasa con H_2O_2 .



Elaboración propia: Ruiz, 2023.

3.14.2. Prueba de Gram

La tinción de Gram reacciona según el tipo de pared celular que tiene la bacteria, la retención o el escape del complejo cristal violeta/yodo (Lugol). Entre otras diferencias la bacteria Gram positiva tiene un peptidoglicano en la pared celular más gruesa que las bacterias Gram negativas (Rodríguez & Arenas, 2018).

Se puede observar un color rojo claro propio de las bacterias gran negativas según protocolo de Hans Christian que se describe en el trabajo de Rodríguez (2018). El lugol ayudo a fijar la unión que hay entre peptidoglicano y el cristal violeta por un minuto y luego el decolorante alcohol acetona se dejó reposar por treinta segundos y por último se coloca la safranina con un tiempo de 30 segundos y en el microscopio en un aumento de 100X aplicando en el porta objetos se le añade aceite de inmersión resultando gran negativa como se muestra en la Figura 14.

Figura 14

Fotografía de observación de prueba Gram negativa



Elaborado propia: Ruiz, 2023

3.15. Identificación de bacterias

Para llevar a cabo la identificación de bacterias, se emplearon pruebas bioquímicas, como se detalla en este proceso, se obtuvo la bacteria *Pseudomonas putida*. Estas actividades se llevaron a cabo en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Técnica de Cotopaxi. Es importante destacar que la identificación del género se efectuó en el laboratorio interno, mientras que la identificación a nivel de especie se realizó en un laboratorio externo.

3.15.1. Preparación de las concentraciones de la bacteria *Pseudomonas spp.*

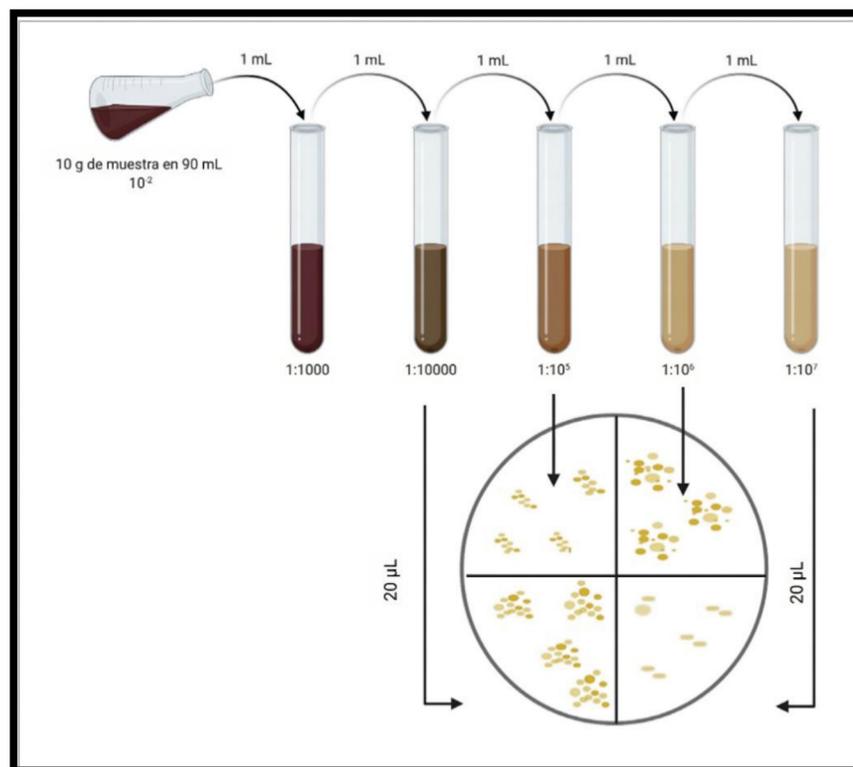
Se procedió a la preparación de concentraciones de *Pseudomonas spp.* mediante la confección de una solución de 500 mL de peptona. Posteriormente, se obtuvo el material bacteriano de una caja petri utilizando un asa microbiológica, introduciéndolo en la solución y agitándolo durante 5 minutos hasta lograr una homogeneidad adecuada. Para la preparación de diluciones seriadas, se siguieron los lineamientos establecidos por Ramírez et al. (2018). Se utilizó el

medio de cultivo Cetrimide, donde se crecieron las *Pseudomonas spp.* a partir de 20 cajas petri. Luego, se raspó el contenido para transferirlo a un medio de cultivo líquido en una solución enriquecida de peptona, denominada solución madre. Esta última se sometió a diluciones seriadas mediante una pipeta Pasteur. Se tomó 1 ml de la suspensión madre, se aforó con 9 ml de agua destilada (disolución de 1/10), y este proceso se repitió para la segunda disolución (1/100).

Se aplicó la técnica de conteo en la cámara de Neubauer, obteniendo la concentración de unidades formadoras de colonias (UFC) mediante la fórmula: *Promedio de los cuadros de la cámara de Neubauer* \times *dilución*. Siguiendo los protocolos de Muñoz S. (2016), se logró una concentración inicial de 8.3×10^8 UFC/ml, y a partir de esta suspensión, se obtuvo una segunda concentración de 3.7×10^5 UFC/ml mediante un proceso similar de dilución y conteo.

Figura 15

Disoluciones seriadas

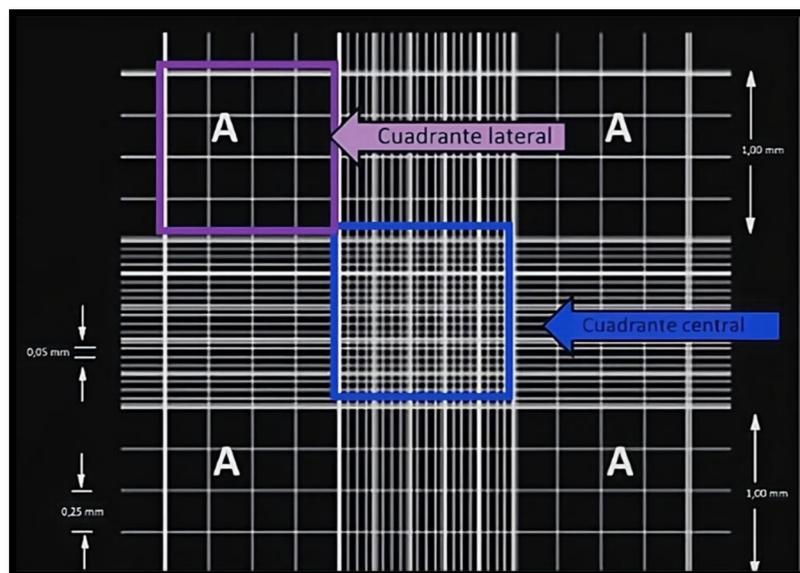


Fuente: Tomado de Ramírez et al. (2018)

Para calcular la fórmula de UFC/ml, es esencial considerar las dimensiones específicas de la cámara de Neubauer, ya que diferentes fabricantes pueden tener volúmenes distintos para realizar el conteo. Después de tener en cuenta este aspecto, se aplicó la fórmula mencionada, resultando en un promedio de células contadas de 830.25. Esto se multiplicó por el factor 10,000 y la dilución de 1/100 (10^{-2}) para obtener el resultado final (Muñoz, 2016).

Figura 16

Cámara Neubauer



Nota. Unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC mL⁻¹), se recomienda asegurarse de que el número de colonias que se cuenten esté dentro del rango de 30 a 300 antes de aplicar la fórmula proporcionada.

Fuente: Tomado de Ramírez et al. (2018)

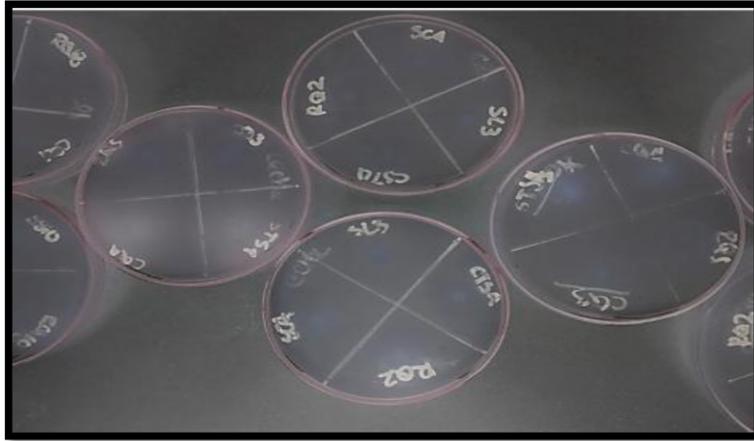
3.15.2. Bioensayos in vitro para evaluar la eficiencia de la bacteria *Pseudomonas spp.*

Los bioensayos se realizaron siguiendo las directrices de Ruiz (2019). Los aislamientos de hongos fitopatógenos, purificados y cultivados en medio PDA, fueron utilizados en el experimento. Se extrajeron discos de 0.7 cm de diámetro de estos cultivos, y cada caja Petri se dividió en cuatro cuadrantes, cada uno inoculado con un disco previamente contaminado con los hongos fitopatógenos, sumando así cuatro discos por caja. Se aplicaron diferentes concentraciones de *Pseudomonas spp.* alrededor de los discos contaminados, manteniendo un radio de 1 cm y dispensando 125 microlitros de la solución por disco. Posteriormente, se sellaron herméticamente las cajas Petri con papel parafilm y se etiquetaron individualmente con la identificación de los aislamientos de hongos. Los aislamientos se

incubaron a 27 °C y, a lo largo del experimento, se registró diariamente el crecimiento del micelio de los hongos utilizando una regla para medir en centímetros.

Figura 17

Rotulación de Cajas Petri



Fuente: Tomado de Nova (2021)

Figura 18

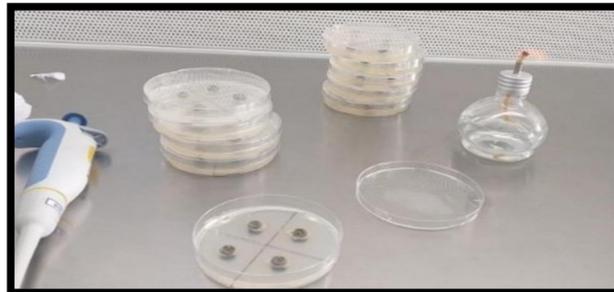
Preparación de Disco de PDA



Elaborado por: Ruiz, 2023

Figura 19

Inoculación de la bacteria alrededor de los hongos fitopatógenos



Elaborado por: Ruiz, 2023

3.16. Datos evaluados.

3.16.1. Porcentaje de inhibición de los hongos fitopatógenos.

Se realizó una evaluación de la inhibición a lo largo de 7 días, midiendo diariamente el crecimiento radial del micelio de los hongos con la ayuda de una regla. El propósito era determinar si la aplicación de *Pseudomonas spp.* a diferentes concentraciones presentaba alguna diferencia significativa en comparación con el grupo control o testigo, que experimentó crecimiento sin la presencia de *Pseudomonas spp.* los datos se evaluaron con la fórmula:

$$% I = \%C - \%CT$$

I%= Porcentaje de inhibición

C%= Porcentaje de crecimiento

CT= Porcentaje de crecimiento del testigo en el último día evaluado

La fórmula normal difiere en su formulación, aunque no se compara con el testigo por razones prácticas. Según la bibliografía consultada, la fórmula hace referencia al crecimiento final. Sin embargo, en la ejecución del ensayo, se optó por medir el crecimiento del testigo al séptimo día. Esto se debió a que, de los tres hongos investigados, dos alcanzaron el 100% de crecimiento en dicho periodo. Por esta razón, se concluyó el ensayo en el séptimo día, ya que se consideró que este tiempo era suficiente para obtener resultados representativos dada la rápida expansión de los hongos en estudio.

Para calcular el porcentaje de inhibición se toma en cuenta la dimensión máxima de la caja Petri, los resultados del crecimiento de los hongos fitopatógenos en un medio PDA se convirtieron en datos de porcentaje de inhibición.

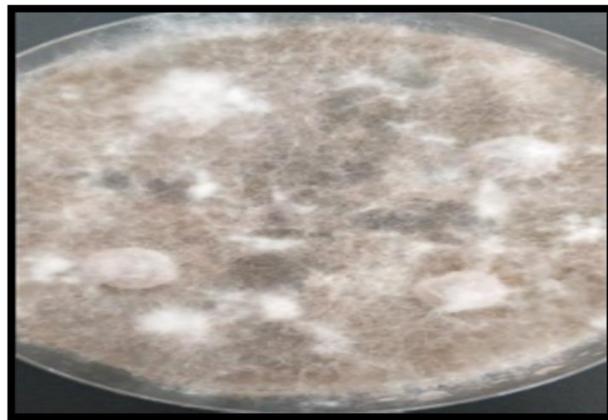
4. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.

4.1. Caracterización de *Botrytis spp.*

Se identificó dos características correspondientes a *Botrytis spp.* debido a que presentaba un micelio de color grisáceo y una estructura filamentosa de aspecto algodonoso lo cual se comparado con los resultados obtenidos (W. Castro et al., 2018). Determinando que corresponde a una *Botrytis spp.*

Figura 20

Fotografía del micelio tomada en el laboratorio

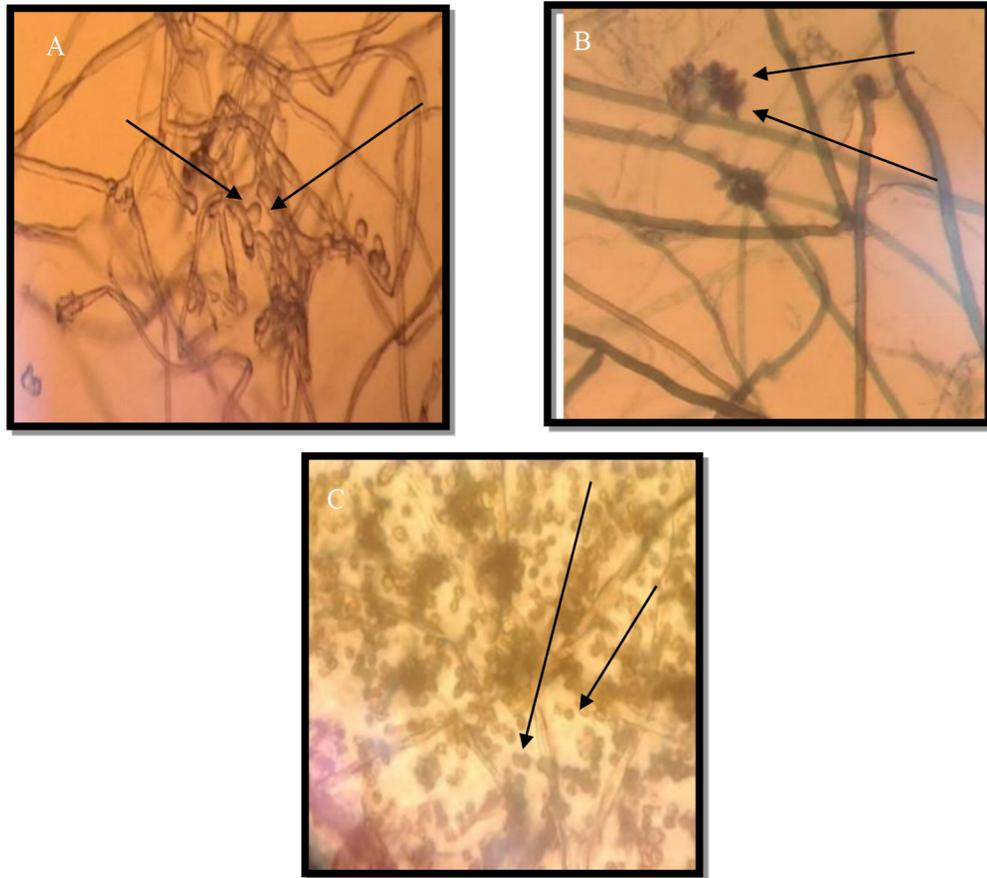


Elaborado por: Ruiz, 2023

En la imagen A, se señala las hifas que se han observa en la imagen B hifas septadas cortas en la imagen B se destaca claramente la estructura del cuerpo fructífero en forma de ramo y en la fotografía C se señalan las esporas que tienen una forma ovalada comparando (Cáceres, 2020). Suelen tener esporas en estructuras especializadas llamadas conidiósporas. Estas conidiósporas se forman en estructuras en forma de racimo llamadas conidióforos. Los conidióforos pueden ser ramificados y pueden estar cubiertos de conidios (esporas).

Figura 21

Fotografía de hifas, conidios y conidióforos de *Botrytis*



Elaborado por: Ruiz, 2023

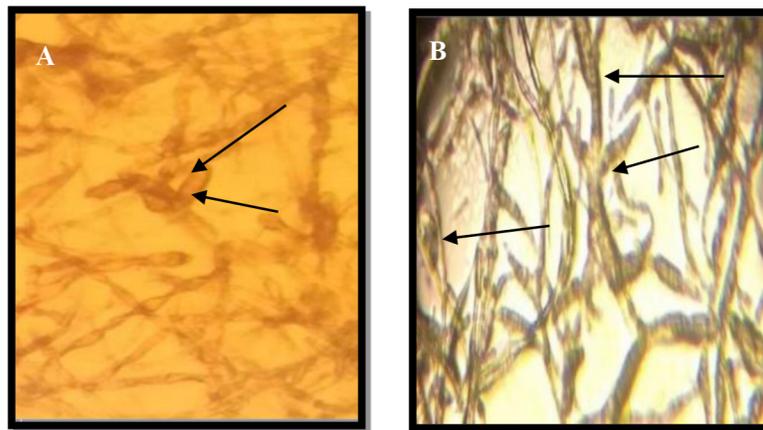
Así también, Harper (2019) en su estudio identificaron que el aislado B-555 de *Botrytis*, aunque no mostraba diferencias macroscópicas notables, reveló características fenotípicas crípticas al crecer a diferentes temperaturas, exhibiendo tasas variadas de crecimiento y formación de esclerocios. En condiciones de esporulación, se destacó por micelios aéreos esponjosos y conidióforos ramificados, en contraste con otras especies. En ensayos de virulencia, B-555, junto con Bp-362 y Bc-385, demostró una menor incidencia de enfermedad y lesiones más pequeñas en hojas de parra, diferenciándose de otras cepas de *B. cinerea*. En pruebas de virulencia en uvas, B-555 cumplió con los postulados de Koch al ser reaislado de bayas dañadas e ilesas.

4.2. Caracterización de *Alternaria* spp.

Se identificó *Alternaria* spp. al observar sus características distintivas, que incluyeron un color oscuro y una superficie de estructura lisa comparado con fotografía y resultados de Cruz et al. (2016). Por otro lado, Elfar et al. (2018), mencionaron que los aislados de *Alternaria* presentaron conidióforos únicos y conidias catenuladas muriformes en tonos marrones a marrón dorado. Se clasificaron en seis grupos (A, B, C, D, E y F) según la morfología de la colonia, conidióforos y conidios. Los grupos exhibieron variaciones en el color y la textura de las colonias, así como en la estructura de los conidióforos y conidios. Los grupos A, B, C, D, E y F se identificaron como *A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. arborescens*, *A. frumentii*, *A. kordkuyana* y *A. dumosa*, respectivamente. Cada grupo mostró características morfológicas distintivas, incluyendo tamaños de conidios, estructuras de conidióforos y colores de colonias, proporcionando una clasificación detallada de los aislados de *Alternaria*.

Figura 22

Identificación de Alternaria spp.



Elaborado por: Ruiz, 2023

Figura 23*Alternaria spp.*

Elaborado por: Ruiz, 2023

En la figura B, se pueden apreciar esporas asexuales que presentan una estructura de forma alargada, similar a un bastón, mientras que en la imagen A, se distinguen de manera evidente las hifas con divisiones septada comparado con lo desarrollado en el trabajo de Castro et al. (2018). Produce esporas asexuales llamadas conidios en estructuras especializadas llamadas conidióforos. Estos conidióforos pueden ser simples o ramificados y a menudo están agrupados en esporádicos.

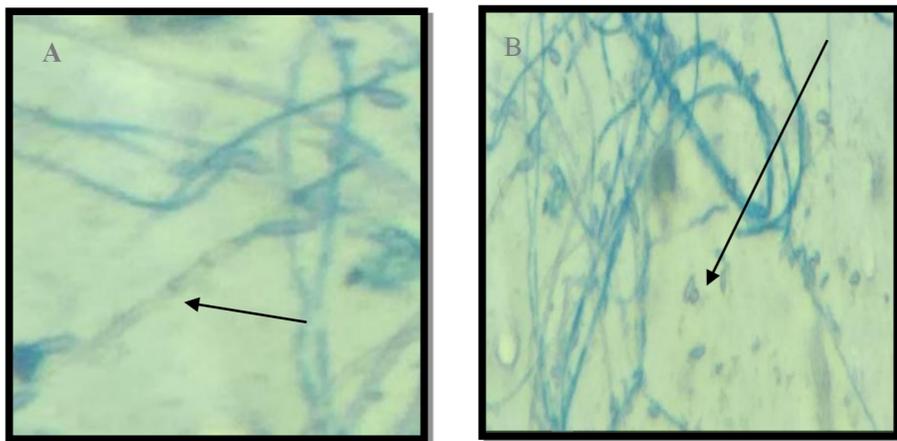
4.3. Caracterización de *Fusarium spp*

Se identificó *Fusarium spp* al observar sus características distintivas, que incluyeron un rosado y una superficie de hifas algodonosa según las fotografía y resultados de Castro et al. (2018). En el caso de Kalman et al. (2020) los cultivos analizados fueron confirmados como pertenecientes al género *Fusarium* mediante análisis microscópico. Las hifas, hialinas, septadas y ramificadas, presentaban un ancho de 3,1 a 3,6 μm . La esporulación, que se observó días después de la transferencia a nuevas placas, generó tres tipos de esporas vegetativas: microconidias, macroconidias y clamidosporas, cada una con características distintivas. Las microconidias, células pequeñas, carecían de septos, mientras que las macroconidias, células grandes, exhibían una forma falcada con tres o cuatro septos. Las clamidosporas, presentes en el micelio más antiguo, tenían paredes gruesas y proporcionaban

defensa contra la degradación y los antagonistas. Los conidióforos, hialinos y a veces ramificados, portaban abundantes microconidias.

Figura 24

Identificación de Fusarium spp.



Elaborado por: Ruiz, 2023

Figura 25

Fusarium spp.



Elaborado por: Ruiz, 2023

En la imagen capturada en el laboratorio A, se observan claramente las esporas septadas, mientras que en la imagen B se logra discernir cadenas acropétalas, corroborando los hallazgos de Cruz (2016). El hongo genera conidios (esporas asexuales) en estructuras

especializadas denominadas conidióforos, los cuales tienden a ser ramificados y pueden albergar varios conidios en su asca.

Para el cumplimiento del segundo objetivo del aislamiento de un agente biocontrolador se realizó varias pruebas bioquímicas para el aislamiento de *Pseudomonas spp.*

Figura 26

Pruebas bioquímicas para el aislamiento de Pseudomonas spp.



Nota. A *Pseudomonas putida* y B *Burkholderia pseudomallei*, el medio Cetrimide.

Elaborado por: Ruiz, 2023

La concentración de 3.7×10^5 células por ml de la *Pseudomonas* arrojó como resultado el menor porcentaje de inhibición con tres los 3 hongos evaluados, mientras que la concentración más alta de 8.3×10^8 por células por ml fue la que mayor eficiencia de resultados dio en todo el periodo de crecimiento de los hongos fitopatógenos.

El crecimiento diario de los fitopatógenos se evaluó durante un período de seis días. Se observó que el grupo de control, que no recibió la aplicación de *Pseudomonas spp.*, alcanzó un crecimiento del 100%. En contraste, los grupos tratados con concentraciones de 3.7×10^5 y 8.3×10^8 de *Pseudomonas spp.* mostraron una disminución significativa en el crecimiento de los fitopatógenos. Entre estos, *Alternaria spp.* y *Botrytis spp.* fueron los hongos que experimentaron la mayor inhibición en su crecimiento en comparación con el grupo de control. Este hallazgo destaca la efectividad de *Pseudomonas spp.* como agente de inhibición del crecimiento de estos fitopatógenos.

4.4. Inhibición en porcentaje de crecimiento en los bioensayos de los hongos fitopatógenos

Los resultados de los bioensayos de hongos fitopatógenos revelan el impacto significativo de las concentraciones de los agentes inhibidores. Para *Botrytis spp*, se observa una fuerte inhibición, con porcentajes de crecimiento de 84% y 53% a las concentraciones Tx10⁸ HB y Tx10⁵ HB, respectivamente, mientras que el testigo muestra un 0%. En el caso de *Fusarium spp*, las concentraciones Tx10⁸ HB y Tx10⁵ HB logran inhibiciones del 80% y 70%, respectivamente, contrastando con el 0% del testigo. Similarmente, para *Alternaria spp*, se registran notables inhibiciones del 81% y 52% a las concentraciones Tx10⁸ HB y Tx10⁵ HB, mientras que el testigo alcanza un 4% de crecimiento, esto demuestra la efectividad de las concentraciones aplicadas en la inhibición del crecimiento de los hongos fitopatógenos evaluados.

Tabla 11

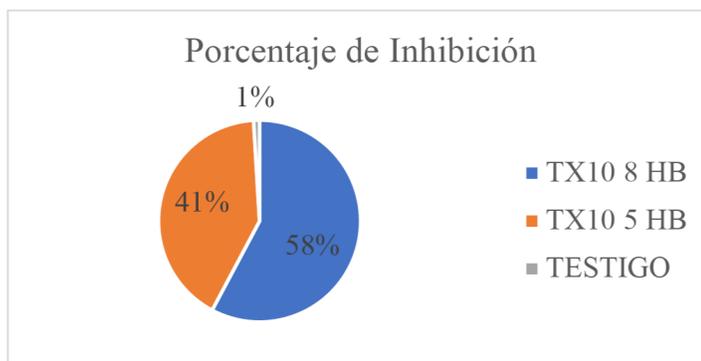
Promedio de porcentaje de inhibición del crecimiento de los tratamientos

Concentraciones	Tx10 ⁸ HB	Tx10 ⁵ HB	Testigo
<i>Botrytis spp</i>	84%	53%	0%
<i>Fusarium spp</i>	80%	70%	0%
<i>Alternaria spp</i>	81%	52%	4%

Elaborado por: Ruiz, 2023

Figura 27

Porcentaje de Inhibición



Nota. Promedio de todos los hongos en inhibición del que corresponde a cada tratamiento

Elaborado por: Ruiz, 2023

4.5. Análisis de Varianza

Tabla 12

Cuadro de análisis de la varianza (SC III) ($p > 0,05$).

Fuente de variación	G. L.	C. M.	F	p-valor
Modelo	12	0.09	275.60	<0.0001
Concentraciones	2	0.51	1629.0661	<0.0001 **
Hongos	2	1.6 E ⁻⁰³	4.98	0.0158 *
Concentraciones*Hongos	4	2.5 E ⁻⁰³	8.16	0.0001 **
Repeticiones	4	5.0 E ⁻⁰⁴	1.61	0.1962
Error	32	3.1 E ⁻⁰⁴		
Total	44			
CV %	1.51			

Nota. Extraído de Info Stat/L 2023

Tabla 13

Prueba de Tukey

Hongos	Concentraciones	Medias	N	E.E.	Categoría
BS1	PS1	1,03	5	0,01	A
AS1	PS1	1,03	5	0,01	A
FS1	PS1	1,04	5	0,01	A
FS1	PS2	1,07	5	0,01	A, B
AS1	PS2	1,1	5	0,01	B
BS1	PS2	1,1	5	0,01	B
AS1	PS0	1,34	5	0,01	C
FS1	PS0	1,39	5	0,01	D
BS1	PS0	1,4	5	0,01	D

Nota. Extraído de Info Stat/L 2023

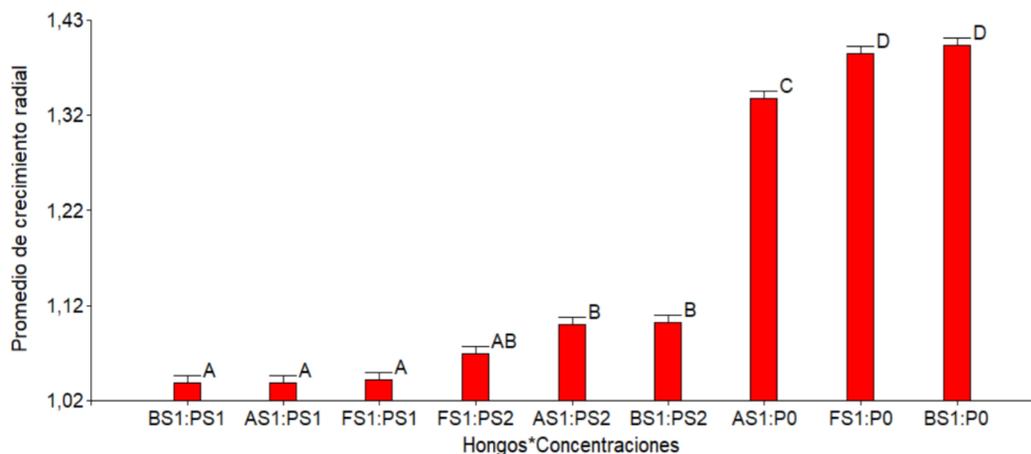
En el Diseño Completamente al Azar (DCA), la relación entre las Concentraciones y los Hongos exhibió un valor p del 0.0001 mostrando un valor significativo, los factores por sí solos también demostraron ser significativos, dado el primer factor que son las concentraciones que tiene un valor p de 0.0001 altamente significativo, Además, para el análisis del segundo factor se identificó una diferencia estadísticamente significativa entre los hongos fitopatógenos, con un valor p de 0.0158. Esto implica que existen diferencia

significativa entre las concentraciones como entre los hongos fitopatógenos examinados en la investigación. Además, es fundamental destacar que el Coeficiente de Variación presenta una dispersión baja, registrando un valor del 1.56%.

Los resultados de la prueba de Tukey revelan diferencias significativas en las concentraciones de diversos hongos fitopatógenos. A una concentración de PS1, las medias de crecimiento para BS1, AS1 y FS1 son similares, todas alrededor de 1,03, y se categorizan como A. Sin embargo, a la concentración PS2, FS1 y AS1 presentan medias de 1,07 y 1,1 respectivamente, clasificándose como A y B, indicando una diferencia notable. Además, BS1 en PS2 comparte la categoría B. A PS0, las medias varían significativamente, con AS1 liderando con 1,34, categorizada como C, seguida de FS1 (1,39, categoría D) y BS1 (1,4, categoría D). Estos resultados destacan las variaciones en la respuesta de los hongos a diferentes concentraciones, resaltando la eficacia diferencial de las condiciones evaluadas.

Figura 28

Hongos vs. Concentración mediante las Pruebas Tukey



Nota. Extraído de Info Stat/L 2023.

La categoría A se destacó al exhibir el mayor porcentaje de inhibición radial frente a los hongos *Botrytis spp.*, *Fusarium spp.* y *Alternaria spp.*, utilizando una concentración de *Pseudomonas spp* de 8.3×10^8 UFC/ml. Los resultados mostraron una inhibición del 84% en *Botrytis spp*, 81% en *Alternaria spp* y 80% en *Fusarium spp* Esto se compara con los hallazgos de Álvarez et al. (2020), quien utilizó la bacteria *Pseudomonas fluorescen* en una

concentración de 10^7 UFC/ml y logró un porcentaje de inhibición del 86% en el patógeno *Botrytis* spp, valores superiores al 94% en el hongo *Alternaria alternata*, y sin encontrar diferencias significativas entre los tratamientos. Además, en el caso de *Fusarium oxysporum*, se logró una inhibición del 72%, según lo informado por Acaro y Leal (2020).

En lo que respecta a la inhibición del hongo *Fusarium* spp, no se observa una diferencia significativa entre las dos categorías, A y B, en relación con las dos concentraciones de *Pseudomonas* spp. Evaluando los datos, se pudo diferenciar que la concentración de 3.7×10^5 logró una inhibición del 70%, mientras que la concentración de 8.3×10^8 alcanzó una inhibición del 80%. según lo señalado por Caviedes (2019). *Fusarium oxysporum* logra inhibir el crecimiento en un 72%. Por lo tanto, para el control del hongo *Fusarium* spp., al comparar los resultados con Caviedes (2019). Se obtuvo un resultado similar, lo que indica que es más eficiente trabajar con la concentración más baja de *Pseudomonas* spp. desde una perspectiva económica, ya que no se detecta una diferencia significativa entre los tratamientos hasta el sexto día de seguimiento.

5. IMPACTOS

Los impactos generados en los ámbitos técnicos, sociales, ambientales y económicos son los siguientes:

5.1. Impactos Técnicos

Con el desarrollo de este proyecto de investigación, marcada una alternativa para el control de hongos fitopatógenos en los cultivos en general. Además de que permite transmitir a los agricultores y estudiantes de la carrera de ingeniería agrónoma un conocimiento en la captura, aislamiento, multiplicación y aplicación de la bacteria biocontroladora *Pseudomonas spp.*

5.2. Impactos Sociales

Con este proyecto de investigación tenemos un impacto social positivo y efectivo debido a que con los resultados obtenidos se podrá hacer conciencia en los agricultores para optar por alternativas de control amigables con el ambiente y para sí mismo, así como también a los estudiantes a realizar investigación nuevas alternativas de control sin afectar ni dañar al ecosistema.

5.3. Impactos Ambientales

Esta investigación contribuye en el cuidado del medio ambiente ya al proporcionar una alternativa de control con el uso de aplicación de la bacteria biocontroladora *Pseudomonas spp.*, se contrarrestar los efectos devastadores de productos tóxicos.

5.4. Impactos Económicos

La investigación no genera un impacto negativo, pero da inicio a desarrollar un bioinsumo que se podrá comparar con productos comerciales y conocer la cantidad de reducción de costos. Por el momento el impacto económico que ha generado la investigación es aportar a la comunidad Universitaria con cepas bacterianas biocontroladoras como es la *Pseudomonas spp.*, para aquellos estudiantes que deseen profundizar más en el tema.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. Conclusiones

- Se logró aislar *Alternaria spp.*, *Botrytis spp.* y *Fusarium spp.* a partir del material vegetal recolectado en la Universidad Técnica de Cotopaxi. Estos hongos fitopatógenos, presentes en los cultivos de flores y de tomate de árbol, fueron aislados siguiendo las claves taxonómicas correspondientes.
- Se obtuvo una cepa nativa de *Pseudomonas spp* a partir de cultivos trampas de microorganismos con potencial biocontrolador aislados en las áreas reforestales de la Universidad Técnica de Cotopaxi.
- La concentración óptima de *Pseudomonas spp* 8.3×10^8 UFC/ml, expresada estadísticamente categoría (A), demostró un mayor control sobre los hongos patógenos, con una inhibición significativa de un 84% en *Botrytis spp*, un 80% en *Fusarium spp* y un 81% en *Alternaria spp*. Estos resultados respaldan la eficiencia del uso de *Pseudomonas spp* para el control de hongos fitopatógenos.

6.2. Recomendaciones

- Realizar más investigaciones sobre *Pseudomonas spp* para que sea evaluada en campo y ver su eficiencia de controlador biológico.
- Investigar sobre protocolos de aislamiento e identificación de bacterias mediante pruebas bioquímicas.
- Explorar medios de cultivo selectivos que faciliten la detección de especies bacterianas.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Acaro, D. S., & Leal, F. D. A. (2020). Microbiología del agua termal del balneario Ilaló. Pichincha. Ecuador. *FIGEMPA: Investigación y Desarrollo*, 9(1), 18–25. <https://doi.org/10.29166/revfig.v1i1.2178>
- Al-Rubaye, M., Mohammed, T. K., & Abdullah, H. N. (2020). Isolation and Diagnosis of Multi Drug Resistance *Pseudomonas Aeruginosa* from Wound and Burnpatients in Baghdad City. *Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology*, 14(3), 2431–2437. <https://pdfs.semanticscholar.org/4d3d/ff5e2d1eed2a5642b70a2443ccbc6f8956e2.pdf>
- Álvarez, J.-A., Santoyo, G., & del Carmen Rocha-Granados, M. (2020). *Pseudomonas fluorescens*: Mecanismos y aplicaciones en la agricultura sustentable. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, 16(1), 1–10.
- Aviléz, A. A. (2021). *Bacteria benéfica Pseudomona fluorescens como agente de control biológico para mejorar la producción del cultivos de maíz*. [Tesis, Universidad Técnica de Babahoyo]. <http://dspace.utb.edu.ec/bitstream/handle/49000/9355/E-UTB-FACIAG-ING%20AGROP-000154.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Azanza, J. B. (2022). *Efectos del hongo Alternaria sp. en el cultivo de pitahaya (Hylocereus spp.) en el Ecuador* [Tesis, Universidad Técnica de Babahoyo]. <http://dspace.utb.edu.ec/bitstream/handle/49000/13326/E-UTB-FACIAG-AGRON-000033.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Benavides, L. H. (2022). *Efecto del té de compost como control biológico al ataque del mildiu polvoso (Oidium sp.) en dos variedades susceptibles de rosa en la provincia de Cotopaxi – 2021* [Maestría]. Universidad Técnica de Cotopaxi.
- Bika, R., Baysal-Gurel, F., & Jennings, C. (2021). Botrytis cinerea management in ornamental production: a continuous battle. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 43(3), 345–365. <https://doi.org/10.1080/07060661.2020.1807409>
- Bullor, L., Braude, H., Monzón, J., Cotes, A., Casavola, V., Carbajal, N., & Risopoulos, J. (2023). *Bioinsumos: Oportunidades de inversión en América Latina* (9th ed.). FAO. <https://doi.org/10.4060/cc9060es>

- Cáceres, D. P. (2020). *Control de Botrytis cinerea Pers. en mandarina Satsuma var. Okitsu mediante fungicidas biológicos y químicos en Huaura* [Tesis]. Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Calderón, D. A. (2020). *Resistencia mono y poligénica de Botrytis cinerea a botricidas usados en rosas de exportación* [Tesis]. Universidad Central del Ecuador.
- Castro, J. F. (2020). *Conformación de colecciones de cultivos microbianos*. https://bibliotecadigital.ciren.cl/bitstream/handle/20.500.13082/32964/INIA_2020_conformaci%C3%B3n_colecciones_cultivos_microbianos.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Castro, W., Carrera, K., Herrera, F. L., Cupull, R., Castro, W., Carrera, K., Herrera, F. L., & Cupull, R. (2018). Identificación de aislados de Fusarium spp. asociados a Solanum quitoense Lam en Pastaza, Ecuador. *Centro Agrícola*, 45(4), 5–11. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0253-57852018000400005&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Caviedes, D. C. (2019). *Aislamiento y selección de Pseudomonas sp., y Bacillus sp., promotoras del crecimiento vegetal en cultivo de uchuva (Physalis peruviana L.) con actividad antagónica frente a Fusarium oxysporum* [Tesis, Pontificia Universidad Javeriana]. <http://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/8628>
- Chauca, S. F., & Oñate, J. E. (2023). *Estado del arte de la oferta y disponibilidad de los insumos agropecuarios alternativos (orgánicos, minerales y biológicos) a los convencionales (agroquímicos) en Ecuador* [Tesis, Universidad Central del Ecuador]. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/29956>
- Cruz, R. M., Piontelli, E., Vieille, P., & Carvajal, L. (2016). Identificación de Alternaria botrytis (Preuss) Woudenberg y Crous. *Revista Argentina de Microbiología*, 48(2), 182–183. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.02.004>
- De Vallée, A., Dupuy, J.-W., Moriscot, C., Gallet, B., Vanderperre, S., Guignard, G., Rasclé, C., Calvar, G., Malbert, B., Gillet, F.-X., Dieryckx, C., Choquer, M., Girard, V., Poussereau, N., & Bruel, C. (2023). Extracellular Vesicles of the Plant Pathogen Botrytis cinerea. *Journal of Fungi*, 9(4), 495. <https://doi.org/10.3390/jof9040495>
- Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P., & Delen, N. (2020). Botrytis spp. and Diseases They Cause in Agricultural Systems – An Introduction. In Y. Elad, B. Williamson, P.

- Tudzynski, & N. Delen (Eds.), *Botrytis: Biology, Pathology and Control* (pp. 1–8). Springer Netherlands. [files/111/3BC2890AF14517103A0CB17404B89AF1.html](https://doi.org/10.1007/978-94-007-1111-1_1)
- Elfar, K., Zoffoli, J. P., & Latorre, B. A. (2018). Identification and Characterization of *Alternaria* Species Associated with Moldy Core of Apple in Chile. *Plant Disease*, *102*(11), 2158–2169. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-18-0282-RE>
- García, R. (2017). *Botrytis cinerea en el cultivo de Rosa híbrida en la zona florícola sur del Estado de México y la evaluación de su sensibilidad in vitro a fungicidas*. Universidad Autónoma del Estado de México.
- Gauna, M. P. (2019). *Tizón foliar (alternaria sp.) en crisantemo (dendranthema grandiflorum). Caracterización diagnóstica y estrategia de control para la provincia de Corrientes* [Tesis]. Universidad Nacional del Nordeste.
- George, N. (2018). *Introducción a la Fitopatología*. Agrios. <https://biblioteca.utsem-morelos.edu.mx/files/asp/biologia/FITOPATOLOGIA%20-%20George%20N-Agrios.pdf>
- Ghadamgahi, F., Tarighi, S., Taheri, P., Saripella, G. V., Anzalone, A., Kalyandurg, P. B., Catara, V., Ortiz, R., & Vetukuri, R. R. (2022). Plant Growth-Promoting Activity of *Pseudomonas aeruginosa* FG106 and Its Ability to Act as a Biocontrol Agent against Potato, Tomato and Taro Pathogens. *Biology*, *11*(1), 140. <https://doi.org/10.3390/biology11010140>
- Granja, L. M., Morales, S. D., & Hernández, V. (2022). *Retos y Perspectivas del uso de Beauveria bassiana para el Control de Hypothenemus hampei en Zonas Cafeteras del Tolima, Colombia* [Universidad Colegio Mayor De Cundinamarca]. <https://repositorio.unicolmayor.edu.co/handle/unicolmayor/5678>
- Harper, L. A., Derbyshire, M. C., & Lopez-Ruiz, F. J. (2019). Identification and characterization of *Botrytis medusae*, a novel cryptic species causing grey mould on wine grapes in Australia. *Plant Pathology*, *68*(5), 939–953. <https://doi.org/10.1111/ppa.13005>
- Hernández, L. G., Murillo, B., Chiquito, C. J., Zuñiga, C. E., Ruiz, J., & Chiquito, R. G. (2020). Respuesta morfo-productiva de plantas de pimiento morrón biofertilizadas con *Pseudomonas putida* y dosis reducida de fertilizantes sintéticos en invernadero. *Terra Latinoamericana*, *38*(3), 583–596. <https://doi.org/10.28940/terra.v38i3.651>

- Jaramillo, M. J. (2022). *Evaluación in vitro de la capacidad antagonista de Trichoderma harzianum y Pseudomonas fluorescens frente a Phytophthora infestans, agente causal de tizón tardío en la papa (Solanum tuberosum L.)* [Tesis]. Universidad Politécnica Salesiana.
- Kalman, B., Abraham, D., Graph, S., Perl-Treves, R., Meller Harel, Y., & Degani, O. (2020). Isolation and Identification of Fusarium spp., the Causal Agents of Onion (Allium cepa) Basal Rot in Northeastern Israel. *Biology*, 9(4), 69. <https://doi.org/10.3390/biology9040069>
- Koch, E., & Castro, A. (2008). *Trabajo Práctico Coloración de Gram y siembra en placa B101*.
- Kumari, P., Trivedi, A., Meena, S., Deora, A., & Maurya, S. (2020). Identification of Alternaria alternate. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 9, 1011–1015. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2020.902.118>
- Litardo, N. J. (2023). *Estado actual de la Marchitez por Fusarium oxysporum f. sp. cubense (Foc) raza tropical 4 (R4T), en el cultivo de Banano, en el continente americano* [Tesis, Universidad Técnica de Babahoyo]. <http://dspace.utb.edu.ec/handle/49000/13819>
- Llanos, A. K. (2017). *Control de Botrytis cinerea Pers. en fresa (Fragaria x ananassa Duch.) cv. Aromas mediante fungicidas biológicos y químicos en Huaral* [Tesis]. Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Mamani de Marchese, A., & Filippone, M. P. (2018). Bioinsumos: componentes claves de una agricultura sostenible. *Revista Agronómica Del Noroeste Argentino*, 38(1), 9–21. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S2314-369X2018000100001&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Mancipe, E. F., & González, L. F. (2016). *Estudio de los efectos fungicidas del extracto etanólico, aceite esencial y fracción lipídica de la planta Anredera cordifolia contra el hongo Fusarium oxysporum* [Tesis]. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales.
- Manosalvas, L., & Acurio, R. D. (2012). *Técnicas de prevención y control de fusarium oxysporum f.sp. dianthi en clavel dianthus caryophyllus y su incidencia en la productividad* [Tesis]. Universidad Técnica de Ambato.

- Martínez, M. (2020). *Interacción de Fusarium en trigo y cebada bajo condiciones de temperatura actuales y proyectadas a futuro* [Tesis Doctoral]. Universidad Nacional de La Plata.
- Mendoza, J. (2021). *Efectividad in vitro de aceites esenciales de Cinnamomum zeylanicum y Syzygium aromaticum frente a Botrytis cinerea Pers* [Tesis, Universidad Autónoma del estado de México]. [http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/113003/TESIS%20FINAL%20%20JOCELYNE%20MENDOZA%20ARANDA%20\(2\).pdf?sequence=2](http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/113003/TESIS%20FINAL%20%20JOCELYNE%20MENDOZA%20ARANDA%20(2).pdf?sequence=2)
- Morán, J. J. (2022). *Principales fungicidas químicos para el control del hongo Fusarium verticillioides, que afectan en el cultivo de maíz (Zea mays L.)* [Tesis, Universidad Técnica de Babahoyo]. <http://dspace.utb.edu.ec/bitstream/handle/49000/13370/E-UTB-FACIAG-AGROP-000024.pdf?sequence=1#:~:text=Dentro%20de%20las%20conclusiones%20se%20determin%C3%B3%20que%20Fusarium,mol%C3%A9cula%20activa%20contra%20hongos%20de%20la%20clase%20Oomycetos>.
- Muñoz R, V., Cisterna O, V., & France I, A. (2019). *Aislamiento de microorganismos fitopatógenos* (p. 17). Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA. <https://biblioteca.inia.cl/bitstream/handle/20.500.14001/6945/NR42411.pdf?sequence=10&isAllowed=y>
- Muñoz, S. D. (2016). *Evaluación de la eficacia de Trichoderma sp y Pseudomonas sp para biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos* [Tesis]. Universidad Politécnica Salesiana.
- Navarrete, R., & Tello, X. B. (2021). *Efecto antagónico in vitro de Trichoderma sp. y Pseudomonas sp. frente a Lasiodiplodia sp., Ica, agosto 2017 - enero 2018* [Tesis, Universidad Nacional "San Luis Gonzaga"]. <https://repositorio.unica.edu.pe/handle/20.500.13028/3419>
- Córdova, B. E. (2020). Evaluación de la actividad antifúngica de peróxidos sobre botrytis (Botrytis cinerea) en el cultivo de fresa (Fragaria vesca L.), bajo condiciones de campo abierto. *Revista Científica UNTRM: Ciencias Naturales e Ingeniería*, 3(1). <https://doi.org/https://doi.org/10.25127/ucni.v3i1.595>

- Nova, K. G. (2021). *Construcción de la colección de microorganismos de interés ambiental para el mejoramiento del sector agrícola bajo el convenio marco de la Universidad Cooperativa de Colombia y Forbio Colombia SAS*.
<https://repository.ucc.edu.co/server/api/core/bitstreams/991930d7-8c0e-47f8-8dbe-112e1c99b09f/content>
- Peña, R., & Páez, J. (2018). *¿Qué es la fitopatología?*
- Ramírez, J., Medina, Y., & Uscanga, I. (2018). *Manual de Laboratorio de Microbiología*.
- Rodríguez, P. A., & Arenas, R. (2018). Hans Christian Gram y su tinción. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*, 16(2), 166–167.
<https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2018/dcm182n.pdf>
- Ruales, P., & Barriga, S. (2020). Normativa De Bioinsumos, Fomento A Reducir La Carga Química. *Ecuador Es Calidad*, 7(1).
<https://revistaecuadorestcalidad.agrocalidad.gov.ec/revistaecuadorestcalidad/index.php/revista/article/view/100>
- Ruiz, L. (2019). “*Pseudomonas aeruginosa*”: *Aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos*. Universitat de Barcelona. <https://diposit.ub.edu/dspace/handle/2445/42532>
- Salazar, M. S. (2023). *Resistencia a enfermedades y calidad fisicoquímica del fruto de seis segregantes de tomate de árbol (Solanum betaceum Cav.)* [Tesis]. Universidad Central del Ecuador.
- Silva, C. A. Da, Soares, A. S., Silva, A. S., Pires, E. C. F., & Portella, A. C. F. (2018). Fully Casualized Design: A Brief Literary Review. *International Journal of Advanced Engineering Research and Science*, 5(7), 100–108. <https://doi.org/10.22161/ijaers.5.7.14>
- Toapanta, D. E., Morillo, L. E., & Viera, W. F. (2019). Diagnóstico molecular de *Phytophthora cinnamomi* asociado a la pudrición radicular en zonas productoras de aguacate en Ecuador. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 18(2), 285–294.
https://doi.org/10.21930/rcta.vol18_num2_art:628
- Viera, W. F. (2020). Rol de los microorganismos benéficos en la Agricultura Sustentable. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 8(2), 67–68.
<https://doi.org/10.36610/j.jsab.2020.080200067>

Villarreal, M. F., Villa, E. D., Cira, L. A., Estrada, M. I., Parra, F. I., & De los Santos, S. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 36(1). <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1706-5>