



UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
DR. JACOBO BUCARAM ORTIZ
CARRERA INGENIERÍA AGRONÓMICA

**EFFECTO BIOCONTROLADOR DE *Bacillus subtilis* A
NIVEL *IN VITRO* SOBRE *Colletotrichum spp.*
RECOLECTADO DE FRUTOS DE AGUACATE (*Persea
americana*)**

TRABAJO EXPERIMENTAL

Trabajo de titulación presentado como requisito para la
obtención del título de
INGENIERO AGRÓNOMO

AUTOR
MUÑOZ ALVARADO MELISSA PILAR

TUTOR
PhD. MORÁN BAJAÑA JOAQUÍN TEODORO

MILAGRO – ECUADOR

2023



UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
DR. JACOBO BUCARAM ORTIZ
CARRERA INGENIERÍA AGRONÓMICA

APROBACIÓN DEL TUTOR

Yo, **PhD. MORÁN BAJAÑA JOAQUÍN TEODORO**, docente de la Universidad Agraria del Ecuador, en mi calidad de Tutor, certifico que el presente trabajo de titulación: **EFFECTO BIOCONTROLADOR DE *Bacillus subtilis* A NIVEL IN VITRO SOBRE *Colletotrichum spp.* RECOLECTADO DE FRUTOS DE AGUACATE (*Persea americana*)**, realizado por la estudiante **MUÑOZ ALVARADO MELISSA PILAR**; con cédula de identidad N°0941104374 de la carrera Ingeniería Agronómica, Ciudad Universitaria “Dr. Jacobo Bucaram Ortiz” Milagro, ha sido orientado y revisado durante su ejecución; y cumple con los requisitos técnicos exigidos por la Universidad Agraria del Ecuador; por lo tanto se aprueba la presentación del mismo.

Atentamente,

PhD. MORÁN BAJAÑA JOAQUÍN TEODORO

Milagro, 17 de octubre del 2023



UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
DR. JACOBO BUCARAM ORTIZ
CARRERA INGENIERÍA AGRONÓMICA

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN

Los abajo firmantes, docentes designados por el H. Consejo Directivo como miembros del Tribunal de Sustentación, aprobamos la defensa del trabajo de titulación: “**EFFECTO BIOCONTROLADOR DE *Bacillus subtilis* A NIVEL *IN VITRO* SOBRE *Colletotrichum spp.* RECOLECTADO DE FRUTOS DE AGUACATE (*Persea americana*)**”, realizado por la estudiante **MUÑOZ ALVARADO MELISSA PILAR**, el mismo que cumple con los requisitos exigidos por la Universidad Agraria del Ecuador.

Atentamente,

PhD. Centanaro Quiroz Paulo
PRESIDENTE

Ing. Peña Haro César, M.Sc
EXAMINADOR PRINCIPAL

Ing. Raffo Folleco Luis, M.Sc
EXAMINADOR PRINCIPAL

Milagro, 17 de octubre del 2023

Dedicatoria

Este trabajo de titulación es dedicado principalmente a Dios, por brindarme sabiduría, fuerza, salud para cumplir con el objetivo anhelado.

A mi madre Juana Alvarado; por brindarme sus consejos, por estar siempre a mi lado apoyándome y dándome fuerzas en mi carrera universitaria.

A mi padre Juan Muñoz; por brindarme su conocimiento que me ha servido mucho en mi carrera, por ayudarme siempre cuando más lo necesitaba.

A mis hermanos Dalila, Alexander y Gilman; por ser la razón de mi felicidad, por haberse convertido en mi fortaleza en la culminación de mi carrera.

A mi Esposo José Retto; por apoyarme en todo, por sus enseñanzas y paciencia que me ayudaron a culminar esta etapa y alcanzar un logro importante en mi vida.

Agradecimiento

Quiero agradecer a Dios, primeramente, por darme la salud, una maravillosa familia y un esposo que sin ellos no estaría donde estoy ahora en una gran institución como lo es la Universidad Agraria del Ecuador, la cual me dio la oportunidad de ser una profesional más en la carrera de Ingeniería Agronómica.

Además, quiero agradecer a todos los docentes por impartir sus conocimientos y en especial a mi tutor PhD. Joaquín Morán por su paciencia y constancia a lo largo del desarrollo de la tesis.

Autorización de Autoría Intelectual

Yo **MUÑOZ ALVARADO MELISSA PILAR**, en calidad de autor(a) del proyecto realizado, sobre “**EFFECTO BIOCONTROLADOR DE *Bacillus subtilis* A NIVEL IN VITRO SOBRE *Colletotrichum spp.* RECOLECTADO DE FRUTOS DE AGUACATE (*Persea americana*)**” para optar el título de Ingeniera Agrónoma, por la presente autorizo a la UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR, hacer uso de todos los contenidos que me pertenecen o parte de los que contienen esta obra, con fines estrictamente académicos o de investigación.

Los derechos que como autor(a) me correspondan, con excepción de la presente autorización, seguirán vigentes a mi favor, de conformidad con lo establecido en los artículos 5, 6, 8; 19 y demás pertinentes de la Ley de Propiedad Intelectual y su Reglamento.

Milagro, 17 de octubre del 2023

MUÑOZ ALVARADO MELISSA PILAR
C.I. 094110437-4

Índice general

PORTADA	1
APROBACIÓN DEL TUTOR	2
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN	3
Dedicatoria.....	4
Agradecimiento	5
Autorización de Autoría Intelectual	6
Índice general	7
Índice de tablas	11
Índice de figuras.....	13
Resumen	14
Abstract	15
1. Introducción.....	16
1.1 Antecedentes del problema.....	16
1.2 Planteamiento y formulación del problema	18
1.2.1 Planteamiento del problema	18
1.2.2 Formulación del problema	18
1.3 Justificación de la investigación.....	18
1.4 Delimitación de la investigación	19
1.5 Objetivo general	20
1.6 Objetivos específicos.....	20
1.7 Hipótesis	20

2. Marco teórico.....	21
2.1 Estado del arte.....	21
2.2 Bases teóricas.....	25
2.2.1 Descripción taxonómica de la especie de biocontroladora	25
2.2.2 Comportamiento bioquímico del <i>Bacillus subtilis</i>	27
2.2.3 Ecología bacteriana	28
2.2.4 Descripción Morfológica del <i>Bacillus subtilis</i>	28
2.2.5 Descripción de las características biocontroladoras	29
2.2.6 Pruebas de antagonismo	29
2.2.6.1 Pruebas duales.....	30
2.2.7 Descripción taxonómica del <i>Colletotrichum spp.</i>	30
2.2.8 Descripción Morfológica del <i>Colletotrichum spp.</i>	30
2.2.9 Ecología de <i>Colletotrichum spp</i>	31
2.2.10 Clasificación taxonómica del cultivo de aguacate.....	31
2.2.11 Descripción del cultivo de aguacate	32
2.2.12 Principales fitopatologías presentes en el cultivo de aguacate.	32
2.2.13 Daños económicos causados por <i>Colletotrichum spp.</i>	33
2.2.14 Importancia del control biológico.....	34
2.2.15 Escala de antagonismo	35
2.2.16 Porcentaje de inhibición del crecimiento	35
2.3 Marco legal.....	36

3. Materiales y métodos.....	39
3.1 Enfoque de la investigación	39
3.1.1 Tipo de investigación	39
3.1.2 Diseño de investigación.....	39
3.2 Metodología	39
3.2.1 Variables	39
3.2.1.1. Variable independiente.....	39
3.2.1.2. Variable dependiente.....	39
3.2.2 Tratamientos	39
3.2.3 Diseño experimental.....	40
3.2.4 Recolección de datos	40
3.2.4.1 Recursos.....	40
3.2.4.2 Métodos y técnicas	41
3.2.5 Análisis estadístico.....	44
4. Resultados.....	46
4.1 Identificar la carga bacteriana de <i>Bacillus subtilis</i> con mayor capacidad de biocontrol sobre <i>Colletotrichum spp</i> en condiciones <i>in vitro</i>.	46
4.2 Caracterizar morfológicamente la cepa de <i>Bacillus subtilis</i> con mayor efecto biocontrolador de <i>Colletotrichum spp</i>.	47
4.3 Describir el efecto antagónico de <i>B. subtilis</i> sobre <i>Colletotrichum spp</i> morfológicamente.....	48

5. Discusión	49
6. Conclusiones.....	51
7. Recomendaciones	52
8. Bibliografía	53
9. Anexos	64

Índice de tablas

Tabla 1. Tratamientos a evaluarse	40
Tabla 2. Modelo de ANOVA del experimento.....	45
Tabla 3. Crecimiento miceliar diario de las cepas de <i>Colletotrichum spp.</i> bajo el control del antagonista expresados en milímetros.	46
Tabla 4. Halo de inhibición por parte de <i>Bacillus subtilis</i> sobre <i>Colletotrichum spp.</i> expresados en porcentajes	47
Tabla 5. Promedios del crecimiento miceliar de <i>Colletotrichum spp</i> día 1	64
Tabla 6. Análisis estadístico del crecimiento miceliar de <i>Colletotrichum spp</i> día 1	64
Tabla 7. Promedios del crecimiento miceliar de <i>Colletotrichum spp</i> día 2	64
Tabla 8. Análisis estadístico del crecimiento miceliar de <i>Colletotrichum spp</i> día 2	64
Tabla 9. Promedios del crecimiento miceliar de <i>Colletotrichum spp</i> día 3	65
Tabla 10. Análisis estadístico del crecimiento miceliar de <i>Colletotrichum spp</i> día 3	65
Tabla 11. Promedios del crecimiento miceliar de <i>Colletotrichum spp</i> día 4	66
Tabla 12. Análisis estadístico del crecimiento miceliar de <i>Colletotrichum spp</i> día 4	66
Tabla 13. Promedios del crecimiento miceliar de <i>Colletotrichum spp</i> día 5	66
Tabla 14. Análisis estadístico del crecimiento miceliar de <i>Colletotrichum spp</i> día 5	67
Tabla 15. Promedios del crecimiento miceliar de <i>Colletotrichum spp</i>	67
Tabla 16. Análisis estadístico del crecimiento miceliar de <i>Colletotrichum spp</i>	67

Tabla 17. Promedios de porcentaje de inhibición de <i>B. subtilis</i> sobre <i>Colletotrichum spp</i>	68
Tabla 18. Análisis estadístico porcentaje de inhibición de <i>B. subtilis</i> sobre <i>Colletotrichum spp</i>	68

Índice de figuras

Figura 1. efecto antagónico de <i>B. subtilis</i> sobre <i>Colletotrichum spp</i> morfológicamente.....	48
Figura 2. Selección del hongo patógeno (<i>Colletotrichum spp</i>) que se lo recolectó del aguacate (<i>Persea americana</i>).	69
Figura 3. Preparación del medio de cultivo PDA.	69
Figura 4. Preparación del medio de cultivo Agar nutritivo	69
Figura 5. Aislamiento del hongo patógeno	70
Figura 6. Identificación del hongo patógeno.....	70
Figura 7. Aislamiento de <i>B. subtilis</i>	70

Resumen

El cultivo de Aguacate es la cuarta fruta de más grande relevancia en el mundo, esto se debería a que en los últimos años la venta de este fruto se ha aumentado de forma notable a grado nacional y mundial, las enfermedades post cosecha del aguacate como la antracnosis son causadas por patógenos que tienen la posibilidad de ocasionar males en los retoños adolescentes, hojas, flores y frutos de los aguacateros. Se realizó un estudio experimental el cual fue conocer el “Efecto biocontrolador de *Bacillus subtilis* a nivel in vitro sobre *Colletotrichum spp.* recolectado de frutos de aguacate (*Persea americana*)”. Se obtuvo el patógeno de la corteza del fruto de aguacate y se lo sembró en medio PDA. Se plantearon 5 tratamientos, cada uno con tres repeticiones, donde se el T5 fue el testigo (*Colletotrichum spp.*). Se inocularon 1×10^2 hasta 1×10^5 UFC de *B. subtilis* y se utilizó el test de Duncan con un error de tipo I. Se tomaron datos por 5 días donde el crecimiento micelial de *Colletotrichum spp.* En las diferentes concentraciones donde se visualizó que el T4 inhibió el crecimiento del hongo patógeno al 100% seguido del T3 con 91,77%, el biocontrolador tuvo un antagonismo de tipo I, donde indica que el antagonista ocupa completamente la superficie del medio de cultivo cubriendo totalmente al patógeno, ya que desde el día 1 inhibió el crecimiento de *Colletotrichum spp.*

Palabras claves: *B. subtilis*, *Colletotrichum spp.*, antagonismo, biocontrol, halo de inhibición, crecimiento micelial.

Abstract

The cultivation of avocado is the fourth most important fruit in the world. This is because the sale of this fruit has increased significantly in recent years, both nationally and worldwide. Post-harvest diseases of avocados, such as anthracnose, are caused by pathogens that can cause damage to young shoots, leaves, flowers, and fruits of avocado trees. An experimental study was conducted to determine the “Biocontrol effect of *Bacillus subtilis* on *Colletotrichum spp*, collected from avocado fruits (*Persea americana*) at an in vitro level.” The pathogen was obtained from the bark of the avocado fruit and was planted in PDA medium. Five treatments were proposed, each with three repetitions, where T5 was the control (*Colletotrichum spp*), 1×10^2 to 1×10^5 CFU of *B. subtilis*, were inoculated and the Duncan test with a type I error was used. Data were collected for 5 days where the mycelial growth of *Colletotrichum spp*, was observed at different concentrations. It was observed that T4 inhibited the growth of the pathogenic fungus by 100%, followed by T3 with 91.77%. The biocontroller had a type I antagonism, which indicates that the antagonist completely occupies the surface of the culture medium, completely covering the pathogen, since it inhibited the growth of *Colletotrichum spp*, from day one.

Keywords: *B. subtilis*, *Colletotrichum spp*, antagonism, biocontrol, inhibition halo, mycelial growth.

1. Introducción

1.1 Antecedentes del problema

La aplicación de microorganismos para el manejo biológico de los agentes patógenos causantes de enfermedades en los cultivos representa una elección efectiva y ecológica para el desarrollo de una agricultura sostenible, ya que reduce los impactos inherentes al uso de pesticidas y productos químicos. A nivel global, diversas investigaciones han abordado el aislamiento de bacterias del género *Bacillus* a partir de muestras recolectadas en la rizosfera de diferentes cultivos, con el propósito de evaluar su capacidad antifúngica contra fitopatógenos. En el caso específico de *Bacillus subtilis*, se ha evidenciado su eficacia *in vitro* en el control de más de 23 variedades de agentes patógenos de plantas (Méndez J. , 2018). En este contexto, numerosas investigaciones se han enfocado en la identificación de microorganismos autóctonos capaces de operar en consonancia con las condiciones ambientales de cada región, con el objetivo de ser utilizados para restablecer las interacciones dentro del microbiota del suelo. Estos microorganismos podrían ser aprovechados como biofertilizantes y/o biocontroladores (bioinsumos), contribuyendo a mitigar el impacto ambiental de los productos químicos agrícolas y a reducir los costos de producción.

Las enfermedades de origen biótico están teniendo un impacto directo en la calidad de los frutos y se han convertido en una amenaza de gran envergadura para la industria a nivel global, especialmente en el caso de la fruta destinada a la exportación, que se espera tenga la máxima calidad. Entre estas enfermedades se encuentra la antracnosis, causada por el hongo *Colletotrichum spp.*, el cual se ha convertido en uno de los principales patógenos que afectan al aguacate 'Hass', resultando en una disminución en su calidad. Esta enfermedad no solo provoca daños directos en la fruta debido a la formación de pudriciones, sino que también

afecta la comercialización del producto, disminuyendo su valor y obstaculizando su exportación de manera efectiva (Trinidad , et al., 2017).

En la actualidad, existe una diversidad de opciones para el control de *Colletotrichum spp.*, ya que la estrategia más común, que es el uso de pesticidas, ha llevado a la aparición de resistencia en los patógenos. En efecto, (Landro, Lara, Andrade, Aguilar y Aguado , 2016) informan que entre las técnicas utilizadas para el control de este patógeno tanto antes como después de la cosecha, se encuentran el empleo de métodos como el aire caliente, tratamientos hidrotérmicos, modificaciones en la atmósfera, radiación ultravioleta, ozono, extractos derivados de plantas y microorganismos con funciones de control biológico que actúan de manera antagónica frente a diversos patógenos, como es el caso de *Rodhotorula minuta*, *Bacillus subtilis*, *Trichoderma spp.*, entre otros.

El cultivo del aguacate se ubica en el cuarto lugar en cuanto a su relevancia a nivel mundial. En los últimos años, ha experimentado un notable incremento en su venta tanto a nivel nacional como internacional. Su importancia radica en su alto valor nutricional, la capacidad de generar altos rendimientos y sus beneficios económicos. Según Terán (2018), el cultivo del aguacate en Ecuador ha adquirido un potencial de exportación significativo. Aunque la mayoría de la producción se destina al mercado local, una pequeña proporción se exporta a países como Colombia, EE. UU. y Europa. Al igual que otras frutas, el aguacate puede verse afectado por enfermedades causadas por hongos, bacterias y virus, tanto en etapas pre como post cosecha. Entre estas, la antracnosis es una enfermedad post cosecha que afecta los brotes jóvenes, hojas, flores y frutos de los árboles de aguacate. Estudios adicionales han identificado que los hongos del género *Fusarium* y *Colletotrichum* son los principales causantes de patologías en el

aguacate, siendo responsables de problemas como la costra y la pudrición radicular.

1.2 Planteamiento y formulación del problema

1.2.1 Planteamiento del problema

En Ecuador, el cultivo del aguacate posee una gran importancia económica dentro de los sistemas de producción perenne, siendo considerado a nivel nacional como un cultivo de gran relevancia. Sin embargo, este cultivo se enfrenta a diversos patógenos que afectan su desarrollo, entre los cuales destaca *Colletotrichum spp*, el agente causante de la enfermedad conocida como antracnosis.

La antracnosis afecta diferentes partes de la planta, incluyendo hojas, ramas jóvenes, flores y frutos, en todas las etapas fenológicas, siendo más común en la postcosecha. Esta enfermedad causa importantes pérdidas económicas para los agricultores. Ante esta problemática, se propone la utilización de productos biocontroladores basados en *Bacillus subtilis* como una alternativa para mitigar los problemas mencionados anteriormente y promover la adopción de una agricultura sostenible mediante el uso de microorganismos para el control biológico de los patógenos, evitando así la dependencia de productos químicos.

1.2.2 Formulación del problema

¿Será posible evitar el crecimiento micelial del hongo *Colletotrichum spp* mediante el uso de cepas de *Bacillus subtilis* en presentación comercial bajo condiciones *in vitro*?

1.3 Justificación de la investigación

Al abordar el tema de los biocontroladores a base de *Bacillus subtilis* para el control de la antracnosis en el cultivo de aguacate en Ecuador se sustenta en diversas razones de relevancia económica, ambiental y agronómica.

El cultivo de aguacate es de gran importancia económica en el país, siendo considerado uno de los sistemas de producción perenne más relevantes a nivel nacional. Sin embargo, la presencia de patógenos como *Colletotrichum spp.*, que causa la antracnosis, afecta negativamente la calidad y cantidad de la producción, lo que resulta en pérdidas económicas para los agricultores. La implementación de estrategias de control biológico mediante el uso de *Bacillus subtilis* podría significar una solución efectiva para reducir las pérdidas económicas y mejorar la rentabilidad de este cultivo.

Desde una perspectiva ambiental, el uso excesivo de productos químicos en la agricultura puede tener impactos negativos en los ecosistemas, la biodiversidad y la calidad del suelo y agua. La adopción de enfoques basados en microorganismos beneficiosos como *Bacillus subtilis* ofrece una alternativa más sostenible y amigable con el medio ambiente al reducir la necesidad de utilizar plaguicidas y productos químicos sintéticos, disminuyendo así la contaminación ambiental y los efectos adversos en los sistemas naturales.

Además, desde un punto de vista agronómico, el control biológico con *B. subtilis* puede contribuir a establecer un equilibrio natural en el agroecosistema, promoviendo la salud de las plantas y mejorando su resistencia frente a patógenos. Al fortalecer la respuesta inmunológica de las plantas y reducir la presencia de enfermedades, se puede incrementar la productividad y calidad de los cultivos, lo que a su vez beneficiaría a los agricultores al obtener cosechas más abundantes y de mejor calidad.

1.4 Delimitación de la investigación

Espacio: La investigación se realizó en los laboratorios de Biotecnología de la ciudad Universitaria “Dr. Jacobo Bucaram Ortiz “Campus Milagro.

Tiempo: El desarrollo de este trabajo de titulación se realizó en cuatro meses.

1.5 Objetivo general

Evaluar el efecto biocontrolador de *Bacillus subtilis* a nivel *in vitro* sobre *Colletotrichum spp.* recolectado de frutos de aguacate (*Persea americana*).

1.6 Objetivos específicos

- Identificar la carga bacteriana de *Bacillus subtilis* con mayor capacidad de biocontrol sobre *Colletotrichum spp* en condiciones *in vitro*.
- Caracterizar morfológicamente la cepa de *Bacillus subtilis* con mayor efecto biocontrolador de *Colletotrichum spp.*
- Describir el efecto antagónico de *B. subtilis* sobre *Colletotrichum spp* morfológicamente

1.7 Hipótesis

B. subtilis presenta un efecto antagónico sobre *Colletotrichum spp.* bajo condiciones *in vitro*.

2. Marco teórico

2.1 Estado del arte

En un estudio llevado a cabo en México en 2017 por Rojo y su equipo de investigadores en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo en Culiacán, Sinaloa, se demostró el efecto biocontrolador de *Bacillus subtilis* y *Rhodotorula minuta* sobre *Colletotrichum* spp., el agente causante de la antracnosis en mango. Este estudio involucró la aplicación de estos agentes tanto en etapas precosecha como postcosecha. La combinación de *R. minuta* y *B. subtilis* ($10^6 + 10^4$ ufc mL⁻¹) mostró una eficacia superior al control químico (Benomil). Además, se desarrolló un proceso de fermentación a nivel planta piloto para producir la levadura *R. minuta*, lo que permitió la creación de una formulación de bajo costo para reducir la antracnosis en los mangos (Rojo, *et al.*, 2017).

En el año 2019, en el Instituto Tecnológico Superior de Ciudad Hidalgo en México, se cultivaron cepas en agar papa dextrosa, y las esporas se recolectaron en tubos para ajustar sus concentraciones a 10^7 esporas/mL para *Trichoderma* spp. y 10^8 UFC para *B. subtilis*. Para inactivar el micelio de *C. gloeosporoides*, se utilizó un procedimiento en el cual se añadieron 15 discos de cultivo del patógeno, con un diámetro de 0.8 centímetros, a matraces de 250 mL conteniendo 200 mL de medio PDA. Estos matraces se incubaron durante quince días a 32 °C con agitación constante a 180 rpm. Luego de la incubación, se filtró el micelio mediante una manta de cielo y se realizó un proceso de lavado con agua destilada estéril en tres ocasiones. Posteriormente, el micelio recolectado se desactivó hirviéndolo a alrededor de 100 °C durante 30 minutos y enfriándolo a temperatura ambiente, seguido de otra filtración para eliminar el exceso de agua. El micelio se conservó a una temperatura de -20 °C hasta su utilización (Chávez, 2019).

En un estudio previo llevado a cabo en México por De Dios , *et al.*, (2020) en la Universidad Autónoma de Nayarit, quienes investigaron la actividad antifúngica mediante ensayos *in vitro*. Los autores, examinaron la capacidad antagónica de 10 cepas bacterianas aisladas de la rizosfera del aguacate contra los hongos *Phytophthora cinnamomi*, *Fusarium oxysporum* y *Colletotrichum sp.*, los cuales fueron obtenidos del depósito de microorganismos del CEMIC. El análisis se realizó a través de enfrentamientos *in vitro* utilizando métodos de difusión y evaluando las interacciones en cuatro cuadrantes.

Los resultados de los enfrentamientos *in vitro*, (De Dios , *et al.*, 2020), revelaron que las 10 cepas bacterianas aisladas exhibieron una destacada actividad antagónica frente a *Phytophthora cinnamomi*, *Fusarium oxysporum* y *Colletotrichum sp.* En particular, los aislados Ba-05 y Bs-11 demostraron una inhibición en el crecimiento de *F. oxysporum* en un rango de 33 % a 56.33 %, reduciendo su tasa de crecimiento en 7.33 mm/día.

Por otro lado, los aislados Bs-11 y Bs-06, identificados como *B. subtilis*, mostraron una inhibición aún más significativa, alcanzando un 63.24 % contra *Colletotrichum sp.* En contraste, el aislado *B. cepacia* (Bc-06) exhibió la inhibición más baja (35.72 %) en comparación con el grupo de control. Cabe mencionar que se observó una notable reducción en la tasa de crecimiento micelial del hongo, que disminuyó en 10.47 mm/día al enfrentarse con el aislado Bs-11 de *B. subtilis* (De Dios, *et al.*, 2020).

En un estudio realizado por la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo en México en 2020, se descubrió que los agentes de biocontrol pueden detener el crecimiento de fitopatógenos al generar metabolitos secundarios. Para mejorar su eficacia, se recomienda combinar estos agentes. En este estudio, se

utilizó una técnica innovadora que involucra la co-inoculación de agentes de biocontrol como *B. subtilis*, *Trichoderma.sp* y micelio inactivo de *C. gloeosporioides* para detener el aumento del patógeno en aguacates. Se realizaron tres sistemas tripartitos y se extrajeron y fraccionaron los compuestos orgánicos solubles sintetizados por cada sistema. Después, se evaluó la capacidad antifúngica de las fracciones seleccionadas en el crecimiento de *C. gloeosporioides*. Las fracciones del sistema T1 lograron reducir significativamente el crecimiento del hongo, aunque no lo inhibieron completamente. También causaron alteraciones en los discos y en las zonas de esporulación del micelio (Ramírez, Macías, Peña, Chávez y Reyes, 2020).

En un estudio realizado en la Universidad Federal de Uberlândia, se demostró que la mayoría de los aislamientos de *Bacillus subtilis* inhibieron el crecimiento del hongo patógeno *C. gloeosporioides*. Se seleccionaron 10 de estos aislamientos para realizar experimentos adicionales y se observó una disminución significativa en el crecimiento del hongo, con una variación entre el 48,75% y el 72,01%, además de la formación de un halo de inhibición. Esto indica que estos aislamientos tienen potencial para controlar el crecimiento de *C. gloeosporioides*. Estudios anteriores han mostrado que el antagonismo directo de *Bacillus subtilis* contra patógenos implica la producción de sustancias antimicrobianas, competencia por nutrientes y producción de compuestos volátiles. Específicamente, los aislamientos BSV-20, BSV-18, BSV-17, BSV-07 y BSV-12 de *Bacillus subtilis* mostraron un alto potencial antagonista contra *C. gloeosporioides* (Cortes , Vieira y Sousa, 2018).

En Ecuador, en el año 2016, Ñacato y Valencia llevaron a cabo estudios en la Universidad Politécnica Salesiana de Quito. En estos estudios, se realizaron identificaciones macroscópicas de las colonias que crecieron en el medio de cultivo

PCA (Plate Count Agar) + Bromocresol. Se seleccionaron como cepas candidatas de *Bacillus subtilis* aquellas que mostraron un color blanco o crema, un tamaño aproximado de 2 a 4 mm de diámetro, una apariencia lisa, mucosa o rugosa, y bordes ondulados o extendidos en el medio (Ñacato Suntaxi y Valencia Gordón, 2016).

La evaluación de la capacidad antagónica *in vitro* se efectuó mediante la técnica de cultivos duales, la cual se apoya en situar en un extremo de la caja Petri un disco de 5 mm de diámetro del contrincante crecido en el medio y en el otro extremo de la caja un disco igual al anterior, empero con el manager fitopatógeno. En estas pruebas se evaluó la función de competencia por sustrato y el impacto antibiótico (Marín, Rivera, Orozco, Villalobos y Orozco, 2017).

En un estudio realizado por Goñas, Bobadilla, Rascón y Vera (2017), se utilizó la metodología de cultivos duales para realizar una prueba de antagonismo. Se sembró el oponente biológico en un extremo de una placa Petri con medio de cultivo PDA, y el hongo fitopatógeno en el otro extremo a una distancia de 7 centímetros, se utilizaron 5 placas Petri por cada procedimiento, las cuales se incubaron a una temperatura constante de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Se comparó el crecimiento radial de los fitopatógenos enfrentados con los biocontroladores y los fitopatógenos utilizados como testigos. Esta comparación se realizó visualizando y midiendo el crecimiento cada 24 horas, hasta que los testigos alcanzaron la totalidad de la superficie de la placa Petri.

En el análisis efectuado por Zambrano y Torres (2016), se llevaron a cabo pruebas de enfrentamiento entre microorganismos fitopatógenos y los microorganismos antagonistas *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis*, en el caso de las bacterias fitopatógenas contra *Bacillus subtilis*, se cultivaron en un

medio de cultivo nutritivo y posteriormente se dispersaron en una placa de Petri, junto a un disco impregnado con la bacteria antagonista. La aparición de un halo inhibitorio alrededor del disco indicó el efecto inhibitorio de *Bacillus subtilis* sobre la bacteria fitopatógena, en el caso de los hongos patógenos contra *Bacillus subtilis*, se sembró el hongo en el centro de la placa de Petri y se agregó *Bacillus subtilis* a ambos lados. Se evaluó el crecimiento del hongo patógeno y la bacteria antagonista en intervalos de tiempo específicos, se realizaron tres repeticiones para cada bacteria patógena o hongo patógeno, y se incluyó un grupo de control para realizar comparaciones.

2.2 Bases teóricas

2.2.1 Descripción taxonómica de la especie de biocontroladora

Según Veléz, (2018) La clasificación taxonómica de la bacteria *Bacillus subtilis* es la siguiente:

Dominio: Bacteria

Filo: *Firmicutes*

Clase: *Bacilli*

Orden: *Bacillales*

Familia: *Bacillaceae*

Género: *Bacillus*

Especie: *Bacillus subtilis*

El género *Bacillus* ha sido comunicado por primera vez por Cohn en 1872, quien lo explicó como bacterias productoras de endosporas resistentes al calor.

El género de bacterias *Bacillus* es parte del Reino Bacteria, el Filo *Firmicutes*, la Clase *Bacilli*, el Orden *Bacillales* y la Familia *Bacillaceae*. En la actualidad, existen más de 336 especies distintas dentro de este género. Estas especies pueden ser

agrupadas según su similitud genética. Algunos de los grupos más importantes son: a) el grupo de *B. cereus*, que está relacionado con la patogenicidad y comprende las especies *B. cereus-anthraxis-thuringiensis*; b) los bacilos ambientales, que se encuentran en diversos hábitats, como el grupo de *Bacillus subtilis*, que incluye a las especies *B. subtilis-licheniformis-pumilus*, c) el grupo de *B. clausii-halodurans*; y d) el grupo que abarca varias especies de *Bacillus*, conocido como *Bacillus sp* (Villarreal, et al., 2018).

El género *Bacillus*, que incluye especies como *B. subtilis*, *B. brevis*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. licheniformis* y *B. amyloliquefaciens*, tiene la capacidad de ser utilizado como agente de control biológico en la agricultura. Estas bacterias son ubicuas en el suelo y producen esporas resistentes a diferentes condiciones adversas. Además, promueven el crecimiento de las plantas, tienen un sistema de resistencia inducida y producen sustancias enzimáticas y antibióticas. En conjunto, estas características hacen que las bacterias del género *Bacillus* sean una alternativa eficaz para controlar enfermedades y plagas de manera biológica en la agricultura (Castañeda y Consuelo, 2016).

Algunas especies de *Bacillus* pueden representar un peligro para la salud humana. Por ejemplo, *Bacillus anthracis* puede afectar diversos sistemas del organismo como el gastrointestinal, cutáneo y respiratorio, e incluso ha sido utilizado como arma terrorista, causando múltiples muertes. Otra especie de este género, *B. cereus*, puede ser patógena para los seres humanos. Esta bacteria se desarrolla con facilidad en los alimentos y puede ocasionar enfermedades como la diarrea y el vómito (Mendoza, 2016).

2.2.2 Comportamiento bioquímico del *Bacillus subtilis*

Algunas de las especies más importantes dentro del género *Bacillus* para combatir patógenos específicos de las plantas son *Bacillus brevis* y *Bacillus subtilis*. *Bacillus subtilis* se basa en la respiración y utiliza el oxígeno como aceptor final de electrones para su metabolismo. Cuando hay presencia de oxígeno, muestra un crecimiento abundante y produce algunos productos principales como el 2,3-butanodiol, acetoína y CO₂. Sin embargo, en ambientes con bajos niveles de oxígeno, el crecimiento y la fermentación de *Bacillus subtilis* son débiles, especialmente cuando se cultiva en medios que contienen glucosa (Cobo, 2017).

El *Bacillus subtilis* demuestra una amplia flexibilidad para desarrollar estrategias de biocontrol, entre las cuales se encuentran la generación de enzimas extracelulares, el estímulo de las capacidades defensivas de la planta y principalmente la producción de metabolitos secundarios, que en su mayoría consisten en lipopéptidos de bajo peso molecular. La síntesis de estos lipopéptidos cíclicos se lleva a cabo a través de un metabolismo no ribosomal, su proceso de biosíntesis implica la participación de complejos enzimáticos conocidos como péptido-sintetasas (Sarti, 2019).

La bacteria *Bacillus subtilis* tiene un potencial biotecnológico debido a su actividad como biocontrol y su capacidad de síntesis enzimática. Esta capacidad incluye la producción de proteasas, celulasas, pectinasas, quitinasas, así como lipopéptidos como la Surfactina, Fengycina e Iturina A, metabolitos primarios y secundarios, antibióticos, fitohormonas como auxinas, capacidad de solubilizar fosfato, sideróforos y otras sustancias de interés agrobiotecnológico. Estos recursos contribuyen al crecimiento vegetal de las plantas (Gutiérrez y Gutiérrez, 2020).

2.2.3 Ecología bacteriana

En los últimos años, ha habido un crecimiento significativo en la identificación y análisis de la ecología bacteriana. Esto se debe a que, al identificar los microorganismos, se pueden evaluar y utilizar en procesos biotecnológicos, lo que proporciona información valiosa para diversos campos de la microbiología y la biotecnología (Castro, 2019).

2.2.4 Descripción Morfológica del *Bacillus subtilis*

Las características de un bacilo Gram-positivo, que es catalasa-positivo y aerobio facultativo. A pesar de esto, también puede crecer en condiciones anaeróbicas. Este bacilo forma endosporas resistentes y produce antibióticos y una matriz extracelular llamada biofilm. Su principal función es producir una amplia variedad de moléculas bioactivas con propiedades antifúngicas. Estas moléculas son de baja toxicidad, altamente biodegradables y beneficiosas para el ecosistema en comparación con los productos químicos utilizados actualmente (Nagua, 2016).

El *Bacillus subtilis* es una bacteria que comúnmente se encuentra en el suelo y en la rizósfera. Al observar sus colonias en agar sangre y agar nutritivo, se pueden detectar diferencias visuales, como la textura de las colonias, que pueden ser lisas o rugosas, con aspecto seco y márgenes irregulares que pueden estar curvados o extendidos en el medio de cultivo. Al observarla al microscopio, se puede observar que son bacilos de Gram positivo con un diámetro de 0.8 mm y una longitud de 2 a 3 mm, con bordes redondeados. Además, presentan esporas esféricas y centrales que no alteran la forma del bacilo (Silva, 2018). Se caracteriza por una acción bactericida-fungicida y puede actuar como un solubilizador biológico.

2.2.5 Descripción de las características biocontroladoras

El *Bacillus subtilis* es considerado uno de los principales agentes biocontroladores para proteger los cultivos más importantes en nuestro entorno. Esto se debe a que produce moléculas con propiedades antifúngicas, como la bacilicina, la fengimicina y la proteína bacisubina. Estas moléculas tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de levaduras y diferentes tipos de hongos, como el *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria oleracea*, *A. brassicae* y *Botrytis cinérea*. En resumen, el *Bacillus subtilis* es un agente biocontrolador eficaz para proteger los cultivos debido a sus moléculas antifúngicas. (Vilañéz, 2019).

El *Bacillus subtilis* es reconocido principalmente por ser la especie que produce la subtilina, un antibiótico compuesto por un péptido que contiene lantionina. La subtilina exhibe una alta actividad antimicrobiana contra diversas bacterias Gram positivas. Esta capacidad se debe a la presencia de enlaces de sulfuro, específicamente de mesolantionina y 3-metillantion (Caicedo y Chacón , 2017).

Nuevas investigaciones demuestran que las bacterias aeróbicas formadoras de endosporas las BAFEs del género *Bacillus* tienen características y habilidades que las hacen prometedoras para su uso como agentes de control biológico (Herrera & de Von Chong, 2023). Además, cabe destacar que estas bacterias son capaces de producir metabolitos con actividad antimicrobiana, lo que las convierte en una herramienta valiosa para el control de plagas y enfermedades en la agricultura.

2.2.6 Pruebas de antagonismo

Según Cadena y López (2021) esta interacción ocurre cuando dos microorganismos se encuentran en el mismo entorno y experimentan las mismas condiciones, pero uno de ellos tiene la capacidad de inhibir la actividad del otro. Estas pruebas son útiles para entender el ciclo de vida, reproducción y

supervivencia de los hongos dañinos, así como las respuestas que tienen frente a organismos que pueden inhibir su crecimiento.

2.2.6.1 Pruebas duales

Esta técnica facilita la identificación rápida de la supresión del desarrollo de cultivos debido a la acción de antibióticos, el daño a las hifas del patógeno causado por el antagonista o el parasitismo directo. Además, también permite determinar el efecto que tienen los cultivos en el crecimiento de otros organismos (Yélamos, 2021).

2.2.7 Descripción taxonómica del *Colletotrichum spp.*

En la actualidad, hay cerca de 190 especies tanto saprófitas como parásitas incluidas en el género *Colletotrichum*.

La diversidad de *Colletotrichum* se ha reorganizado por complejos de especies, desde información molecular de zonas enormemente conservadas y comprende conjuntos con morfología y patogenicidad variable que cubren un extenso rango de hospederos. Se resaltan los complicados *C. acutatum*, *C. gloesporioies* y *C. boninese* (Guevara , 2017).

Según Riveros y Rosero (2019), la clasificación taxonómica del género *Colletotrichum spp* es la siguiente:

REINO: Fungi

DIVISION: *Ascomycota*

CLASE: *Sordariomycetes*

FAMILIA: *Glomerellaceae*

GÉNERO: *Colletotrichum* (asexual) *Glomerella* (sexual)

2.2.8 Descripción Morfológica del *Colletotrichum spp.*

La antracnosis es una patología causada por el hongo *Colletotrichum*, los síntomas de esta enfermedad incluyen lesiones necróticas limitadas, a menudo

deprimidas, en hojas, tallos, flores y frutos, así como pudrición de la corona y del tallo, y tizón de las plántulas (Cajas, 2020, pág. 4) .

El hongo del género *Colletotrichum* se caracteriza por su apariencia de polvillo de color blanco a gris oscuro, que puede llegar a tener tonos naranja-rojizos. Presenta micelio aéreo con apresorios clavados, de forma ovalada y algunas veces lobulados, de color sepia. Tiene un tamaño de 6-20 x 4-12 μm . Además, muestra conidios unicelulares de 12-17 x 3.5-6 μm , transparentes, dentro de una matriz de color salmón en el acérvulo, que también es de color salmón y muestra setas (Méndez F. , 2020).

El hongo se encuentra naturalmente en forma asexual con un micelio blanco sumergido. Presenta acérvulos de color salmón en forma de disco, con setas en el borde, entre estructuras llamadas conidióforos simples y alargados. Sus conidias son unicelulares, transparentes y tienen forma de huevo. Al germinar, adquieren un color pálido, se dividen en segmentos y forman una estructura llamada apresorio. Las esporas del hongo son abundantes y forman masas rosadas que brillan.(Tacoaman, 2018).

2.2.9 Ecología de *Colletotrichum spp*

Colletotrichum es un género que comprende más de 100 especies que exhiben un tipo de vida hemibiótrofo. Estas especies pasan por una fase biotrófica temprana en la que el hongo se hospeda de manera asintomática en el tejido vegetal, seguido de una fase necrotrófica en la que el patógeno se adapta al ambiente fisiológico y bioquímico del hospedante. Durante esta fase, se desarrollan hifas de infección secundaria que causan la muerte de las células vecinas (Mercado y Arrieta , 2021).

2.2.10 Clasificación taxonómica del cultivo de aguacate

Según Ruiz (2019) la clasificación taxonómica del aguacate es la siguiente:

Reino: vegetal;

División: *Spermatophyta*;

Subdivisión: *Angiospermae*;

Clase: *Dicotyledoneae*;

Subclase: *Dipétala*;

Orden: *Ranales*;

Familia: *Lauraceae*;

Género: *Persea*;

Especie: *Persea americana* Miller, *Persea gratissima* Gaerth, *Persea drymifolia* Blake.

2.2.11 Descripción del cultivo de aguacate

El aguacate es una planta de gran vitalidad que se origina en América Central y pertenece a la familia de las Lauráceas. Es cultivado principalmente por su fruto, el cual es una baya de forma ovalada o pera, que contiene una sola semilla y una pulpa abundante en grasas monoinsaturadas, antioxidantes y minerales (Climent , 2020).

Según Bernal y Díaz (2021), el aguacate tiene un crecimiento monopodial rítmico con brotes que se desarrollan año tras año a partir de una yema terminal en el eje central. Las ramas se forman de manera similar al tronco y las flores aparecen lateralmente sin influencia en el crecimiento de los brotes. La formación de los brotes puede ser por prolepsis o silepsis, determinada por la relación entre la dominancia apical y la acrotonía, lo que varía entre los diferentes cultivares.

2.2.12 Principales fitopatologías presentes en el cultivo de aguacate.

La antracnosis es un problema fitosanitario que afecta la producción de aguacate, especialmente después de la cosecha. Esta enfermedad es causada por hongos del género *Colletotrichum*, en particular la especie *Colletotrichum*

gloeosporioides, aunque también se han identificado otras especies como *C. hymenocallidis* y *C. siamense*. La antracnosis provoca síntomas en el aguacate que son visibles y perjudiciales para su calidad y comercialización (Tapia A. , Ramírez, Figueroa, Salgado y Serrato, 2020).

La antracnosis y la pudrición peduncular son dos enfermedades que provocan pérdidas de cosecha. Estas enfermedades son causadas por los hongos *Colletotrichum gloeosporioides* y *Lasiodiplodia theobroame*, respectivamente. Aunque los síntomas de daño se observan después de la cosecha, la infección suele ocurrir durante la etapa de crecimiento del fruto. *C. gloeosporioides* puede entrar al fruto a través de aberturas naturales, heridas o separación de la piel. *L. theobromae* también puede ingresar por estas vías, pero es más común en plantaciones con condiciones inadecuadas, lo que facilita su ataque como hongo oportunista (Herrera, Bautista, Salazar y Gutiérrez, 2021).

2.2.13 Daños económicos causados por *Colletotrichum* spp.

Las enfermedades del cultivo de aguacate son un problema importante para las exportaciones. La antracnosis es una de las principales enfermedades que afecta al fruto y causa pérdidas significativas, llegando incluso al 20-30% de la cosecha. Si el ataque es severo y el manejo de la enfermedad es deficiente, este porcentaje puede ser aún mayor. Además de dañar el amarre de flor y fruto, la antracnosis también afecta ramas tiernas y hojas, lo que reduce la capacidad fotosintética del árbol. Esta enfermedad también se observa en otros cultivos tropicales como mango, plátano, papaya, maracuyá y cítricos (Intagri, 2017).

La antracnosis es ocasionada por especies de *Colletotrichum* (*Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum boninense*). Este tipo de patógeno se desarrolla principalmente durante la temporada de lluvias y en

condiciones de alta humedad relativa. Causa daños tanto en hojas como en frutos en todas las etapas de crecimiento, incluyendo la fase de poscosecha. Se estima que las pérdidas asociadas a esta enfermedad representan aproximadamente un 20% de la producción nacional (Tapia A. , et al., 2020).

Bajo condiciones favorables, esta patología puede afectar hasta el 90% del cultivo. Se observa daño en hojas, ramas jóvenes, flores y frutos, donde se presenta una lesión de color oscuro a negro con forma irregular y circular. En casos graves, pueden aparecer pequeñas estructuras de color anaranjado a negro en las heridas (Pérez , 2020).

2.2.14 Importancia del control biológico

El control biológico, también llamado biocontrol, consiste en utilizar organismos o sustancias derivadas de ellos para reducir los daños causados por enfermedades en un cultivo. Esta estrategia se basa en las interacciones entre la planta, el patógeno, el organismo de control biológico y el ambiente en el que se desarrolla esta interacción. Su objetivo es minimizar los impactos negativos que una población de patógenos puede tener en el crecimiento y la productividad de las plantas (Vinchira y Moreno, 2019, p. 3).

Cotes (2018), Los términos control biológico y biocontrol han sido utilizados en diferentes áreas de la biología, especialmente en entomología y fitopatología. En entomología, el control biológico se define como la acción ejercida por parásitos, depredadores o patógenos para mantener la población de otros organismos en niveles más bajos de lo que sería sin la intervención de estos enemigos naturales. Esto se logra mediante la conservación de la densidad poblacional.

El control biológico es fundamental para los sistemas sostenibles, ya que proporciona una opción rentable y respetuosa con el medio ambiente para reducir

la dependencia de insumos externos y mejorar los recursos internos. Se basa en el uso de microorganismos seleccionados por su eficacia y seguridad. Además, estos microorganismos pueden obtenerse de fuentes locales y formar parte integral del sistema (Ñacato Suntaxi & Valencia Gordón, 2016).

Diversos científicos han explicado el control biológico de enfermedades como la reducción de la cantidad de agentes patógenos actuando o en estado de reposo, gracias a la intervención de uno o más organismos, ya sea de manera natural o a través del manejo del entorno, el hospedador o un organismo antagonista. (Chaupín, 2018).

2.2.15 Escala de antagonismo

Escala de Bell competencia por el sustrato.

Clase I. El antagonista ocupa completamente la superficie del medio de cultivo cubriendo totalmente al patógeno.

Clase II El antagonista llega a sobrepasar las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo.

Clase III. El antagonista y el patógeno coloniza cada uno aproximadamente la mitad de la superficie del medio y ninguno parece dominar al otro.

Clase IV. El patógeno sobrepasa al crecimiento del antagonista colonizando tres cuartas partes de la caja Petri.

Clase V. El agente fitopatógeno llega a cubrir totalmente la caja Petri (Acurio, Ñacato, & Valencia, 2018).

2.2.16 Porcentaje de inhibición del crecimiento

Se tomó nota de la dimensión del crecimiento del hongo (problema) tanto en presencia como en ausencia del hongo biocontrolador, utilizando un dispositivo de medición. La inhibición del crecimiento se determinó mediante el cálculo del porcentaje de reducción utilizando la siguiente fórmula:

$$P.I = \left(\frac{D.C.C - D.C.P}{D.C.C} \right) \times 100$$

donde:

- P.I - Porcentaje de inhibición.
- D.C.C - Diámetro de la colonia control.

- D.C.P - Diámetro de la colonia problema (con la presencia del agente de biocontrol (Rojas , Sánchez, Perdomo, & Moya, 2017)

Para calcular el porcentaje de inhibición sobre el crecimiento del micelio se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Inhibición micelial} = \frac{dc-dt}{dc} \times 100$$

Donde:

- dc = diámetro del micelio del control en mm en la caja Petri
- dt = diámetro del micelio del tratamiento en mm en la caja Petri (Apaza, Smeltekop, Flores, Almanza, & Salcedo, 2016).

2.3 Marco legal

Según la Asamblea Nacional (2017)

LEY ORGANICA DE SANIDAD AGROPECUARIA
TITULO II
DEL REGIMEN DE SANIDAD VEGETAL
CAPITULO I
DE LA PROTECCION FITOSANITARIA

Art. 21.- Del control fitosanitario. - El control fitosanitario en los términos de esta Ley, es responsabilidad de la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario, tiene por finalidad prevenir y controlar el ingreso, establecimiento y la diseminación de plagas que afecten a los vegetales, productos vegetales y artículos reglamentados que representen riesgo fitosanitario. El control fitosanitario y sus medidas son de aplicación inmediata y obligatoria para las personas naturales o jurídicas, públicas o privadas, dedicadas a la producción, comercialización, importación y exportación de tales plantas y productos.

Art. 22.- De las medidas fitosanitarias. - Para mantener y mejorar el estatus fitosanitario, la Agencia de Regulación y Control, implementará en el territorio nacional y en las zonas especiales de desarrollo económico, las siguientes medidas fitosanitarias de cumplimiento obligatorio:

- a) Requisitos fitosanitarios;
- b) Campañas de sanidad vegetal, de carácter preventivo, de control y erradicación;
- c) Diagnóstico, vigilancia y notificación fitosanitaria de plantas y productos vegetales;
- d) Tratamientos de saneamiento y desinfección de plantas y productos vegetales, instalaciones, equipos, maquinarias y vehículos de transporte que representen un riesgo fitosanitario;

- e) Cuarentena cuando se detecte una o varias plagas que represente un riesgo fitosanitario;
- f) Áreas libres de plagas y de escasa prevalencia de plagas; g) Procedimientos fitosanitarios para la importación y exportación de plantas, productos vegetales y artículos reglamentados; y,
- h) Las demás que establezca la Agencia. Cuando la información científica sobre una nueva plaga o enfermedad sea insuficiente, la Agencia, definirá las medidas provisionales, de emergencia o previsión para aplicarse en caso de una situación fitosanitaria nueva o imprevista.

Art. 23.- De los centros de propagación de especies vegetales. - La Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario realizará el control fitosanitario de los centros de propagación de especies vegetales y establecerá la aplicación de las medidas fitosanitarias de conformidad con esta Ley y su reglamento.

Toda persona natural o jurídica propietaria de un centro de propagación de especies vegetales para su funcionamiento deberá contar con la autorización de la Agencia y cumplirá con los requisitos y permisos fitosanitarios establecidos en el reglamento de esta Ley.

Art. 24.- De la cuarentena. - La Agencia, mediante resolución establecerá áreas, lugares y sitios bajo cuarentena ante la presunción de la presencia de una plaga cuarentenaria reglamentada o no, de plantas, productos vegetales y artículos reglamentados; esta condición podrá ser, revisada periódicamente, ratificada o revocada por la autoridad responsable, en forma inmediata, en función de la información técnica y científica disponible.

La declaración, modificación o revocatoria de la cuarentena, será notificada al interesado de inmediato de expedida la resolución que declara o modifica el estatus cuarentenario. En el caso de que la Agencia determine la presencia de una plaga y luego del análisis respectivo se establezca que no requiera el estatus cuarentenario, en forma inmediata dictará las medidas fitosanitarias para su control y permanente evaluación según el caso.

Art. 25.- De las campañas. - La Agencia realizará campañas de prevención, control y erradicación de plagas reglamentadas que afectan a las plantas, productos vegetales y artículos reglamentados, para mejorar y salvaguardar el estatus fitosanitario del país.

Estas campañas se difundirán y ejecutarán en coordinación con los Gobiernos Autónomos Descentralizados, provinciales, municipales y metropolitanos, de conformidad con sus respectivas competencias.

Art. 26.- De la declaratoria de emergencia fitosanitaria. - La Autoridad Agraria Nacional, previo informe motivado de la Agencia cuando detecte en un área, lugar o sitio la presencia de una plaga que ponga en riesgo fitosanitario una o varias especies vegetales, en forma inmediata, declarará la emergencia fitosanitaria, con la finalidad de impedir su diseminación.

Art. 27.- De la movilización y transporte en caso de emergencia. - En caso de emergencia, la Agencia realizará el control de la movilización y transporte de plantas, productos vegetales y artículos reglamentados, los mismos que deben cumplir las medidas fitosanitarias establecidas en esta Ley y su reglamento.

Se prohíbe la movilización y transporte de plantas, productos vegetales y artículos reglamentados en el interior del país que representen un riesgo de diseminación y propagación de plagas que afecten el estatus fitosanitario, de conformidad con la Ley y su reglamento.

En los casos en que se realice la movilización y transporte de plantas, productos vegetales y artículos reglamentados, fuera de las zonas declaradas en emergencia fitosanitaria, la Agencia deberá controlar que los medios de transporte cumplan con las medidas fitosanitarias determinadas en esta Ley y su reglamento.

3. Materiales y métodos

3.1 Enfoque de la investigación

3.1.1 Tipo de investigación

El presente estudio es de tipo experimental debido a que se analizó el comportamiento controlado de *B. subtilis* como un biocontrolador para inhibir el crecimiento de *Colletotrichum spp* bajo condiciones de laboratorio.

3.1.2 Diseño de investigación

El planteamiento investigativo propuso un experimento en él que se observó el efecto biocontrolador de la bacteria *B. subtilis* sobre la especie fúngica de *Colletotrichum spp* la misma que fue recolectada de frutos de aguacates (*Persea americana*) y luego se aislado en medio Dextrosa de Papa Agar. Previamente la bacteria se inoculó en medio Agar Nutritivo empleando una cepa comercial *B. subtilis*.

3.2 Metodología

3.2.1 Variables

3.2.1.1. Variable independiente

Concentraciones de *B. subtilis*.

3.2.1.2. Variable dependiente

Halo de inhibición.

Crecimiento micelial de *Colletotrichum spp*

3.2.2 Tratamientos

Los tratamientos planteados en la investigación tuvieron relación directa con las recomendaciones sugeridas por el laboratorio donde se aisló el biocontrolador y estos son:

Tabla 1. Tratamientos a evaluarse

No.	Tratamiento	Dosis % por Litro
1	T1	1×10^2
2	T2	1×10^3
3	T3	1×10^4
4	T4	1×10^5
5	(Testigo)	0

Muñoz, 2023

3.2.3 Diseño experimental

El estudio planteado propuso la aplicación de un diseño completamente al azar DCA con cinco tratamientos incluyendo un testigo (*Colletotrichum spp*). La unidad experimental estuvo constituida por una caja Petri por tratamiento, considerándose para todo el ensayo tres repeticiones por cada uno, lo que significa un total de 15 cajas Petri.

3.2.4 Recolección de datos**3.2.4.1 Recursos**

Agar nutritivo

PDA

Agua de peptona

Vasos de precipitación (300 ml y 500 ml de capacidad)

Erlenmeyer (300 ml y 500 ml de capacidad)

Asas microbiológicas

Placas porta objetos

Placas cubre objetos

Cajas Petri (90 mm diámetro)

Tubos de ensayo

Agitador magnético (Thermo-scientific, USA)

Agua destilada

Balanza

Alcohol

Microscopio (Vanguard, USA)

Cámara húmeda

Cabina de flujo

Autoclave (Artesanal, Ecuador)

Pinzas

Microondas

Azul de metileno

Lugol

Cristal violeta

Cabina de esterilización

Calibrado

pH metro digital de bolsillo (Hanna, USA),

Varilla de vidrio

Papel de aluminio

Micropipetas

Algodón

Gasas

Mechero

Espátula

Para film

3.2.4.2 Métodos y técnicas

Halo de inhibición y crecimiento micelar

Los datos se tomaron mediante el uso de un pie de rey o un calibrador para medir el diámetro micelar, así como el diámetro del halo formado al inicio. Los datos se expresaron en Unidades Formadoras de Colonias UFC/g.

Se evaluó el potencial antagónico de *Bacillus subtilis*, y se realizaron pruebas de enfrentamiento dual en cajas Petri con Agar nutritivo, se utilizaron discos de 5mm de diámetros colonizados con *B. subtilis*, a un lado de la caja Petri y otro disco con micelio del patógeno en el otro extremo a una distancia de 5cm entre discos. El material se inoculó por 5 días en una incubadora a una temperatura de 37.5°C y se realizó la correspondiente observación en el momento indicado para cada variable.

Preparación del PDA y Agar Nutritivo

1.- Leer la etiqueta y verificar las recomendaciones del fabricante dosis por litro condiciones de pH, y las recomendaciones del laboratorio.

2.- Se realizó el cálculo para preparar 200 ml de ambos medios, 200 PDA y agar nutritivo.

PDA = 39 g en 1000 ml

$200 \text{ ml} \times 39 / 1000 \text{ ml}$

Agar Nutritivo = 28 g en 1000ml

$200\text{ml} \times 28 / 1000\text{ml}$

3.- Pesar y colocar el medio beaker aforar con agua destilada hasta completar la cantidad deseada (200ml y 200ml). Agitar con una varilla hasta hidratar totalmente el medio y disolverlo.

4.- Se mide el pH para el PDA 5.6 ± 0.2 y para el Agar 7.4 ± 0.2 , ajustarlo en caso de ser necesario con hidróxido de sodio (NaOH) o Ácido clorhídrico (HCl) respectivamente, luego disolver en el microondas por un 1 min de hervor para fundir el medio en el agua destilada.

5.- dispensar en un matraz Erlenmeyer para autoclavar a 121°C por 20 min a 0.1 MPa, luego dejar enfriar hasta 40°C en la cabina de flujo y se dispensó en las cajas Petri previamente esterilizadas a razón de 20 g por caja Petri, hasta que se gelificó y luego se las volteó.

6.- Inoculación

Biocontrolador (*Bacillus subtilis*)

- Se preparó 135 ml agua de peptona se colocó 9ml en 3 tubos de ensayos con el pellet de *Bacillus*, luego se lo acompañó con 4 tubos de agua de peptona 9ml, al primer tubo con pellet y agua de peptona se le sacó 1ml, se reguló y sacó una micropipeta para 100 microlitros, de cada uno de los 15 tubos se incubaron en agar nutritivo.
- Y se llevó las cajas Petri con el medio a 37.5°C.

Hongo patógeno (*Colletotrichum spp.*)

La obtención del hongo antagónico se obtuvo de la cascara del fruto del aguacate infectada, luego se procedió a colocarlas en las cajas Petri con medio PDA para después ser ubicadas en una cámara húmeda, donde las condiciones para los patógenos son adecuadas para su proliferación, posteriormente se identificó y se aisló la cepa hasta que se obtuvo una colonia completamente pura para someterla en las pruebas correspondientes.

Pruebas de antagonismos

- en cajas Petri con el microorganismo patógeno purificado en crecimiento se colocaron discos empapados con el biocontrolador en las diversas concentraciones, y luego a las 24, 48, 72 horas se le midió el halo de inhibición y se lo expresó en milímetros.

Método de tinción

Para caracterizar morfológicamente la cepa con mayor control utilizamos, azul de metileno, safranina y lugol que permite detectar la presencia de microorganismos con esporas.

Para forzar la tinción con el azul de metileno, safranina y lugol se utilizó calor.

- Con un asa microbiológica se recoge la muestra y se la colocó sobre una gota de agua destilada estéril en el porta objeto.
- Para evaporar el agua en el porta objeto se necesitó un mechero y teniendo cuidado de no dejar por mucho tiempo el porta objeto ya que puede explotar, una vez evaporada el agua se le agregó azul de metileno y se lo dejó actuar por 1min, pasado el minuto se lo enjuagó con alcohol y agua destilada estéril, se lleva la muestra a la llama de nuevo hasta que se evapore el agua, después se le agrega la safranina por 1min y se repite los pasos como en el anterior y al final se le agregó el Lugol por 30 segundos se enjuagó y se lo llevó a la llama por última vez.
- Con eso ya las esporas se pueden observar con la ayuda de un microscopio.

3.2.5 Análisis estadístico

Los datos provenientes de las variables se sometieron al análisis de varianza (ANOVA), con el fin de establecer diferencias significativas entre los tratamientos indicados en la tabla 1. La comparación de medias se realizó a través del test de Duncan. Estos dos análisis se realizarón al 5% de error tipo I (alfa), con la ayuda de la versión estudiantil del software Infostat. El esquema del modelo de ANOVA a considerarse se detalla en la tabla 2.

Tabla 2. Modelo de ANOVA del experimento

Fuentes de variación	Grados de libertad
Total (tr-1)	14
Tratamientos (t-1)	4
Error experimental t(r-1)	10

Muñoz, 2023

4. Resultados

4.1 Identificar la carga bacteriana de *Bacillus subtilis* con mayor capacidad de biocontrol sobre *Colletotrichum spp* en condiciones *in vitro*.

En base a los resultados obtenidos y a la variable independiente evaluada esto se detalla en la Tabla 3, donde se muestra el comportamiento de crecimiento micelial del patógeno bajo el control del antagonista a excepción de T5 durante el transcurso de los primeros 5 días. En el día 1 se presentó una significancia estadística entre el crecimiento micelial de *Colletotrichum spp*, en el día 2 y 3 se evidenció una significancia estadística en cuanto al crecimiento micelial, ya a partir del día 4 se observó una significancia estadística ($p < 0.05$) entre los crecimientos miceliares, donde el T4 con 0,00 mm y seguido del T3 con medidas de 5,80 mm presentaron un menor crecimiento micelial por influencia de las cepas de *B. subtilis* dentro del medio de cultivo a excepción de los demás tratamientos los cuales presentaron un mayor crecimiento, donde destacó el T5 como testigo sin la presencia del antagonista. Luego del día 5 de la toma de datos se muestra que el T4 logró destacar por tener el menor crecimiento micelial el cual fue de 0,00 mm seguido del T3 con una medida de 5,80 mm los demás tratamientos no mostraron una significancia estadística debido a que los hongos responden de maneras distintas a las diferentes concentraciones de medios de cultivo.

Tabla 3. Crecimiento micelial diario de las cepas de *Colletotrichum spp.* bajo el control del antagonista expresados en milímetros.

Nº	Tratamiento	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
T1	1 x 10 ²	6,23 bc	9,70 b	14,45 b	14,67 b	14,80 b
T2	1 x 10 ³	8,35 b	10,03 b	11,57 bc	11,65 b	12,02 b
T3	1 x 10 ⁴	5,67 c	5,80 b	5,80 cd	5,80 c	5,80 c
T4	1 x 10 ⁵	0,00 d	0,00 c	0,00 d	0,00 d	0,00 d
T5	Testigo	12,58 a	54,31 a	64,61 a	69,99 a	70,96 a
	Cv (%)	20,25	18,92	18,58	12,88	14,43

Muñoz, 2023

A continuación, en la Tabla 4 se presentan los datos obtenidos del halo de inhibición de *B. subtilis* sobre *Colletotrichum spp* obtenidos durante el día 5 , donde se nota una significancia estadística ($p < 0.05$), el T4 logró tener una cobertura del 100% de halo inhibitorio puesto que este tratamiento fue el que más carga de esporas poseía, seguido de T3 con 91,77%, los tratamientos T1 y T2 fueron los que obtuvieron el menor rango de halo inhibitorio por poseer menor carga de esporas.

Tabla 4. Halo de inhibición por parte de *Bacillus subtilis* sobre *Colletotrichum spp.* expresados en porcentajes

No	Tratamiento	Halo bacteriano %
T1	1×10^2	79,18 d
T2	1×10^3	83,03 c
T3	1×10^4	91,77 b
T4	1×10^5	100,00 a
T5	Testigo	0.00 e
	CV(%)	0,96

Muñoz, 2023

4.2 Caracterizar morfológicamente la cepa de *Bacillus subtilis* con mayor efecto biocontrolador de *Colletotrichum spp.*

Para caracterizar la morfología de la cepa con mayor control sobre el patógeno, se realizaron de dos formas y estas fueron a nivel macroscópico y microscópico.

Caracterización morfológica macroscópica

Presento un aspecto crema con una textura suave que cubrió toda la caja Petri, se observó en la prueba de enfrentamiento mostro signos de inhibición de crecimiento.

Caracterización morfológica microscópica

Para la caracterización morfológica microscópica de *Bacillus subtilis* se procedió a la tinción de la misma, se utilizó un aumento de 100x, con una gota de aceite de inmersión que ayudó a obtener una buena visualización, se observó la forma y el tamaño de las células, lo cual se apreció bacilos largos y rectos.

4.3 Describir el efecto antagónico de *B. subtilis* sobre *Colletotrichum spp* morfológicamente

Teniendo como base los resultados obtenidos, los efectos antagónicos de *Bacillus subtilis* fueron significativas, cumplieron con las características de un agente biocontrolador, pues se evidencio un nivel de competencia por nutrientes y espacio ya que *Bacillus subtilis* reduce los recursos disponibles para el patógeno, inhibiendo su crecimiento y desarrollo.

En el ensayo experimental se observó un antagonismo de clase 1, teniendo como base referencial la tabla propuesta por Bell, donde indica que el antagonista ocupa completamente la superficie del medio de cultivo cubriendo totalmente al patógeno, ya que desde el día 1 inhibió el crecimiento de *Colletotrichum spp* (figura 1).



Figura 1. efecto antagónico de *B. subtilis* sobre *Colletotrichum spp* morfológicamente

Muñoz, 2023

5. Discusión

En el crecimiento bacteriano de *B. subtilis* se observó que presenta un cubrimiento total de la caja Petri a partir del día 1 alcanzando el 100% y 91,77%, siendo un comportamiento relativamente similar para todos los tratamientos aun cuando curiosamente las concentraciones de esporas de 1×10^4 y 1×10^5 las que crecieron significativamente más que los otros tratamientos con menor y mayor carga y pudo deberse a la competencia por los nutrientes presentes en el medio. Esto demuestra la facilidad con la que *B. subtilis* logra ocupar y sobrepoblar el medio. Así se concuerda con Li *et al.* (2020), que una concentración de 10^5 UFC de *Bacillus subtilis* tuvo un efecto inhibitorio significativo sobre el crecimiento de *Colletotrichum spp in vitro*. Este estudio indica que el uso de *Bacillus subtilis* puede ser una estrategia efectiva para el control de la enfermedad de *Colletotrichum* en cultivos agrícolas.

Dentro de la caracterización morfológica y las observaciones realizadas de manera macro y microscópicas de las cepas de mayor control sobre *Colletotrichum spp* con un aumento de 40 y 100x y aceite de inmersión, donde se observó que los bacilos. Se concuerda Ñacato y Valencia, (2016) donde se identificaron macroscópicamente las colonias que crecieron en el medio de cultivo PCA (Plate Count Agar) + Bromocresol, se seleccionaron como cepas candidatas de *Bacillus subtilis* a aquellas que presentaron color blanco o crema, tamaño aproximado de 2 a 4mm de diámetro, aspecto liso, mucoide o rugoso, bordes ondulados o extendidos en el medio.

En el efecto antagónico de *B. subtilis* se evidenció de manera muy notoria el tipo de antagonismo que presentaron los tratamientos, puesto que al primer día se visualizó el halo de inhibición por parte de *B. subtilis*, el cual ya estaba cubriendo

todas las partes de la caja Petri. Entonces se coincide Ariza y Sanchez, (2017) las pruebas de antagonismo *in vitro* expresaron un porcentaje de 70 a 100% de inhibición de crecimiento sobre *Fusarium* sp. Se espera a futuro identificar la presencia de otros metabolitos de tipo secundario, de importancia en fitosanidad, como la producción de surfactina y fengicina.

6. Conclusiones

Con base a los datos obtenidos a través del ensayo experimental se concluye que:

La concentración más alta (1×10^5) de espora de *Bacillus subtilis* generó un mayor y rápido crecimiento bacteriano en las pruebas *in vitro* otorgándole la facultad de abarcar todo el medio de cultivo. Puesto que al ver mayor concentración el halo de inhibición logra ser mucho mayor, ya que el biocontrolador se desplazan más rápido e identifican al patógeno, tal como aconteció en este ensayo.

La morfología de *Bacillus subtilis* apreciada de manera macroscópica se observó un aspecto crema con una textura suave que cubrió toda la caja Petri, se observó en la prueba de enfrentamiento mostro signos de inhibición de crecimiento.

En cuanto al efecto antagónico de *Bacillus subtilis* se muestra de manera muy notable un nivel de competencia por nutrientes y espacio, inhibiendo su crecimiento y desarrollo, presentó un antagonismo de clase 1, teniendo como base referencial la tabla propuesta por Bell, donde indica que el antagonista ocupa completamente la superficie del medio de cultivo cubriendo totalmente al patógeno, ya que desde el día 1 inhibió el crecimiento de *Colletotrichum spp.*

7. Recomendaciones

Evaluar el comportamiento de *Bacillus subtilis* frente a *Colletotrichum spp* en diferentes temperaturas para conocer el nivel de control que ejerce cuando se le proporciona las condiciones y una temperatura totalmente controladas.

Para obtener aislamientos completamente puros, es fundamental emplear y usar un mechero. Esto se debe a que, para insertar una muestra en una caja Petri, se debe acercar la caja al fuego y depositar la muestra, de esta manera se evitará que organismos no deseados como hongos o bacterias se introduzcan y compliquen la identificación y descripción de las muestras sujetas a estudio.

Se deben realizar posteriores estudios de los efectos inhibitorios de los productos a base de *Bacillus subtilis* en condiciones de invernadero o campo para establecer dosificaciones o concentraciones más eficaces para el control de *Colletotrichum spp*.

8. Bibliografía

- Acurio, R., Ñacato, C., & Valencia, V. (2018). Cepas autóctonas de *Bacillus subtilis* como agente de biocontrol in vitro de *Alternaria spp.* en *Brassica oleracea* var. *italica*. *revistabionatura*. Obtenido de <https://www.revistabionatura.com/2018.03.02.8.html>
- Apaza, R., Smeltekop, H., Flores, Y., Almanza, G., & Salcedo, L. (Abril de 2016). Efecto de saponinas de *Chenopodium quinoa Willd* contra el fitopatógeno *Cercospora beticola* Sacc. *Protección Vegetal*, 31(1). Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522016000100009
- Ariza, Y., & Sanchez, L. (2017). Determinación de metabolitos secundarios a partir de *Bacillus subtilis* efecto biocontrolador sobre *Fusarium sp.* *Scielo*. Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1794-24702012000200002&lng=es&nrm=is.&tlng=es
- Asamblea Nacional. (3 de Julio de 2017). *Ley organica de sanidad agropecuaria*. Obtenido de gob.ec: https://www.gob.ec/sites/default/files/regulations/2018-09/Documento_Ley%20Org%C3%A1nica%20de%20Sanidad%20Agropecuaria.pdf
- Bernal , J. A., & Díaz , C. A. (03 de Enero de 2021). *Generalidades del cultivo*. Obtenido de [editorial.agrosavia.co: http://editorial.agrosavia.co/index.php/publicaciones/catalog/download/162/145/1120-1?inline=1](http://editorial.agrosavia.co/index.php/publicaciones/catalog/download/162/145/1120-1?inline=1)

- Cadena , V. P., & López, A. M. (junio de 2021). *Identificación de hongos con potencial biocontrolador de Colletotrichum sp., en cultivo de tomate de árbol (Solanum betaceum), en la provincia de Tungurahua*. Obtenido de dspace.ups.edu.ec:
<https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/20345/1/UPS-TTQ314.pdf>
- Caicedo , S. E., & Chacón , J. A. (Febrero de 2017). *Pruebas bajo invernadero de cepas de Bacillus subtilis como agente de biocontrol de Alternaria spp. en Brassica oleracea var italica y técnicas de conservación de cepas*. Obtenido de dspace: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/13545/1/UPS-QT11349.pdf>
- Cajas, A. K. (2020). *Identificación de Colletotrichum spp. como agente causante de la antracnosis en hojas de uvilla (Physalis peruviana L.) en el centro de la región interandina del Ecuador*. Obtenido de repositorio:
http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/18535/Trabajo%20de%20titulaci%3%b3n%20Final%20Anabeliza_Cajas%20%281%29.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Castañeda, E., & Consuelo, L. (18 de Octubre de 2016). Evaluación del crecimiento de cuatro especies del género *Bacillus sp.*, primer paso para entender su efecto biocontrolador sobre *Fusarium sp.* *NOVA*, 13(26). Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v14n26/v14n26a06.pdf>
- Castro, I. (Enero de 2019). “*Características fisicoquímicas y microbianas de un suelo en un gradiente contaminado de hidrocarburos*”. Obtenido de cdigital:
<https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/1944/50841/CastroRonzonImelda.pdf?sequence=1>

- Chaupín, M. O. (2018). *Incidencia, etiología y control in vitro de la muerte regresiva en el palto (Persea americana Mill.) en Luricocha, Huanta, 2017*. Obtenido de [repositorio.unsch.edu.pe:
http://repositorio.unsch.edu.pe/xmlui/bitstream/handle/UNSCH/3085/TESIS
%20AG1214_Cha.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.unsch.edu.pe:repositorio.unsch.edu.pe:repositorio.unsch.edu.pe/xmlui/bitstream/handle/UNSCH/3085/TESIS%20AG1214_Cha.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Chávez, M. N. (30 de Marzo de 2019). *Evaluación de metabolitos antifúngicos obtenidos en medio PD mediante el cultivo y co-cultivo de Bacillus subtilis y Trichoderma spp. sobre el crecimiento de Colletotrichum gloeosporioides y Fusarium oxysporum*. Obtenido de [researchgate.net:
https://www.researchgate.net/profile/Mauricio-Chavez-
Aviles/publication/332100019_Evaluacion_de_metabolitos_antifungicos_ob-
tenidos_en_medio_PD_mediante_el_cultivo_y_co-
cultivo_de_Bacillus_subtilis_y_Trichoderma_spp_sobre_el_crecimiento_de
_Colletotrichum_g](https://www.researchgate.net/profile/Mauricio-Chavez-Aviles/publication/332100019_Evaluacion_de_metabolitos_antifungicos_obtenidos_en_medio_PD_mediante_el_cultivo_y_co-cultivo_de_Bacillus_subtilis_y_Trichoderma_spp_sobre_el_crecimiento_de_Colletotrichum_g)
- Climent , J. (Abril de 2020). *Cultivo del Aguacate*. Obtenido de [agroambient:
https://agroambient.gva.es/documents/163228750/169854881/CULTIVO+D
EL+AGUACATE.+Ficha+t%C3%A9cnica/fd75a360-7039-4c0f-8abf-
bbd40095d071](https://agroambient.gva.es/documents/163228750/169854881/CULTIVO+DEL+AGUACATE.+Ficha+t%C3%A9cnica/fd75a360-7039-4c0f-8abf-bbd40095d071)
- Cobo , C. F. (2017, Mayo 15). *Evaluación de medios de cultivo líquidos para la multiplicación de la bacteria Bacillus subtilis*. Retrieved from [repositorio:
https://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/6598/1/131031.pdf](https://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/6598/1/131031.pdf)
- Cortes , J. K., Vieira, B. S., & Sousa, L. A. (2018). Biological control of *Colletotrichum gloeosporioides* in pepper with isolates of *Bacillus subtilis*. *Brazilian Journal of Agriculture*, 93(2). Obtenido de

<https://www.revistadeagricultura.org.br/index.php/revistadeagricultura/articloe/view/3299/pdf#>

Cotes, A. M. (2018). *El concepto de control biológico y sus premisas fundamentales*. Obtenido de repository.agrosavia.co: <https://repository.agrosavia.co/handle/20.500.12324/34057>

De Dios , N., Ríos , C., Luna, G., Cambero , O., Cambero , C., & Estrada, M. (2020, Febrero 13). Identificación y actividad antagónica in vitro de aislados de bacterias contra hongos de importancia agrícola. *Revista bio ciencias*, 8. Retrieved from <http://revista.uan.mx/index.php/BIOCIENCIAS/article/view/803/pdf>

Goñas, M., Bobadilla, L. G., Rascón, J., & Vera, N. Y. (2017). Efecto *in vitro* de controladores biológicos sobre *Colletotrichum spp.* y *Botrytis spp.* *Rev. de investig. agroproducción sustentable*, 1(2). Retrieved from <https://docs.google.com/viewerng/viewer?url=http://revistas.untrm.edu.pe/index.php/INDESDOS/article/viewFile/359/672>

Guevara , Y. A. (2017). *Identificación de especies de Colletotrichum spp. asociadas a la Antracnosis de tres núcleos productivos de Caucho Natural en Colombia*. Obtenido de repositorio: <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/64033/YudyGuevara.2018.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Gutiérrez , C. V., & Gutiérrez , R. . (2020). *Bacillus subtilis Cepa Bacteriana con Actividad de Biocontrol Aplicada en Agricultura Sostenible*. Obtenido de repositorio: https://repositorio.udes.edu.co/bitstream/001/5894/1/Bacillus_subtilis_Cepa

_Bacteriana_con_Actividad_de_Biocontrol_Aplicada_en_%20Agricultura_Sostenible_Una_Revisi%3%b3n_Sistem%3%a1tica.pdf

Herrera, J. A., Bautista, S., Salazar, S., & Gutiérrez, P. (2021). Situación actual del manejo poscosecha y de enfermedades fungosas del aguacate 'Hass' para exportación en Michoacán. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 11(7).
Obtenido de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-09342020000701647&script=sci_arttext

Herrera, R., & de Von Chong, M. (mayo de 2023). *Aislamiento y caracterización de bacterias con potencial antagonico para el control biológico de Burkholderia glumae, en la filósferadel cultivo de arroz en la República de Panamá.*
Obtenido de <https://uptv.up.ac.pa/index.php/antataura/article/view/3383/2887>

Intagri. (2017). Antracnosis en el Cultivo de Aguacate. *intagri*(81). Obtenido de intagri: <https://www.intagri.com/articulos/fitosanidad/antracnosis-en-el-cultivo-de-aguacate>

Landero, N., Lara, F. M., Andrade, P., Aguilar, L. A., & Aguado, G. J. (13 de Agosto de 2016). Alternativas para el control de *Colletotrichum spp.**. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(5). Obtenido de <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v7n5/2007-0934-remexca-7-05-1189.pdf>

Li, Q., Li, C., Feng, Z., & iao, X. (2020). *Antifungal Activity of Bacillus subtilis Against Colletotrichum gloeosporioides and Its Potential for Controlling Anthracnose Disease in Mango. Frontiers in microbiology.*

Marín, M. A., Rivera, G., Orozco, R., Villalobos, K., & Orozco, S. (2017). Evaluación de Hongos Antagonistas De *Botrytis cinerea Pers.*, en Plantaciones de Mora,

Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 41(1). Obtenido de https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0377-94242017000100007

Méndez, F. (2020). *Efecto de la nutrición mineral en el control de Colletotrichum spp. En aguacate, en estado de michoacán*. Retrieved from http://193.122.196.39:8080/xmlui/bitstream/handle/10521/4275/Mendez_Jaime_F_MC_Edafologia_2020.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Méndez, J. (2018, Julio). *Desarrollo a nivel de laboratorio de un bioplaguicida a base de Bacillus subtilis, para el control de hongos fitopatógenos en cultivos de interés agrícola*. Retrieved from repositorio: <https://repositorio.unan.edu.ni/9098/1/98683.pdf>

Mendoza, D. I. (2016). *“control de ácaros mediante la aplicación de Bacillus subtilis en el cultivo de fresa (Fragaria vesca)”*. Retrieved from repositorio: <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/24013/1/Tesis-138%20%20Ingenier%C3%ADa%20Agron%C3%B3mica%20-CD%20427.pdf>

Mercado, Á. J., & Arrieta, L. E. (2021). *Patogenicidad de aislamientos endofíticos e inducidos de estados quiescentes de Colletotrichum spp., sobre órganos de mango cv. Azúcar*. Obtenido de Repositorio Digital oroteca Universidad del Magdalena: <http://ns2.pringleman.com/jspui/bitstream/123456789/6217/1/Patogenicidad%20de%20aislamientos%20endofiticos%20e%20inducidos%20de%20estados%20quiescentes%20de%20Colletotrichum%20spp.%2C%20sobre%20organos%20de%20mango%20cv.%20Azucar.pdf>

Nagua, E. S. (2016). *Uso de la bacteria Bacillus subtilis como agente de control biológico de hongos fitopatógenos en cultivos tropicales*. Obtenido de repositorio:

http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/7606/1/DE00003_EXAMENCOMPLEXIVO.pdf

Ñacato Suntaxi, C. A., & Valencia Gordón, M. F. (Marzo de 2016). *dspace.ups.edu.ec*. Obtenido de *dspace.ups.edu.ec*:

<https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/12144/1/UPS-QT09671.pdf>

Pérez , J. L. (Noviembre de 2020). *Caracterización, virulencia y sensibilidad a fungicidas de aislados de Colletotrichum spp. causantes de la antracnosis de los cítricos (Citrus spp.) en el norte de Sinaloa*. Obtenido de uadeo.mx:

<https://uadeo.mx/wp-content/uploads/2021/06/TESIS-JUAN-LUIS-PEREZ.pdf>

Ramírez, E., Macías, L. I., Peña, C. A., Chávez, M. N., & Reyes, H. (Agosto de 2020). In vitro growth of *Colletotrichum gloeosporioides* is affected by butyl acetate, a compound produced during the co-culture of *Trichoderma sp.* and *Bacillus subtilis*. *3 Biotech*, 10(8). Obtenido de

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7334336/#CR22>

Riveros, N., & Rosero, R. A. (2019). *Aislamiento y caracterización de microorganismos procedentes de macroorganismos marinos colombianos, como agentes biocontroladores de Colletotrichum spp., causante de antracnosis en fresa (Fragaria sp.)*. Obtenido de repositorio:

<https://repositorio.unicolmayor.edu.co/bitstream/handle/unicolmayor/308/1%20PARA%20SUBIR%20Natalia%20Riveros%20Fraile->

- Rubi%20Rosero%20Calder%C3%B3n%20%281%29.pdf?sequence=2&isAllowed=y
- Rojas , M., Sánchez, D., Perdomo, K., & Moya, D. (Agosto de 2017). Antagonismo de *Bacillus* frente a hongos fitopatógenos de cultivos hortícolas. *Protección Vegetal*, 32(2). Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1010-27522017000200005&script=sci_arttext&tlng=pt
- Rojo, I., Álvarez, B., García, R. S., León, J., Sañudo, A., & Allende, R. (2017, Septiembre). Situación actual de *Colletotrichums spp.* en México: Taxonomía, caracterización, patogénesis y control. *Revista mexicana de fitopatología*, 35(3). Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092017000300549
- Ruiz , M. P. (29 de Julio de 2019). *Diseño e implementación de una estrategia para el establecimiento de un cultivo de aguacate Hass y mejoramiento de calidad de vida de familias vinculadas a asopranorte municipio de Corinto*. Obtenido de [repository.unad.edu.co: https://repository.unad.edu.co/bitstream/handle/10596/271133/mpruizv.pdf?sequence=1](https://repository.unad.edu.co/bitstream/handle/10596/271133/mpruizv.pdf?sequence=1)
- Sarti, G. (2019). Metabolitos con actividad antifúngica producidos por el género *Bacillus*. *Terra Mundus*, 5(1). Obtenido de http://dspace.uces.edu.ar:8180/xmlui/bitstream/handle/123456789/5377/Metabolitos_Sarti.pdf?sequence=1
- Silva, A. D. (2018). *Acción in vitro de Trichoderma spp. y Bacillus spp. como controladores biológicos conjuntos contra Fusarium oxysporum en uvilla (Physalis peruviana), ecotipo colombiano, en la sierra norte y centro del*

Ecuador. Obtenido de repositorio:
<http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/14680/Disertaci%3%b3n%20Final%20-%20Alexander%20Silva%20segunda%20correcci%3%b3n.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Tacoaman, D. C. (2018). “Evaluación de productos orgánicos para el control de antracnosis (*Colletotrichum spp.*) en cultivo de brócoli en pishilata provincia de tungurahua”. Obtenido de repositorio.uta.edu.ec:
<https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/29086/1/Tesis-218%20%20Ingenier%3%ada%20Agron%3%b3mica%20-CD%20615.pdf>

Tapia, A., Ramírez , J. F., Salgado, M. L., Castañeda, Á., Maldonado, F. I., & Lara, A. V. (2020, Enero 08). Distribución espaciales Delaware antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides Penz*) es aguacate es el Estado De México, México. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(1). Retrieved from <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0325754119300872?token=90F2280F333E5D31D48B47F9C2FC924C3920E183B8DC505DD55FC1446BCB33936C0CB341D04BDA0340263C09CDB0B7CC&originRegion=us-east-1&originCreation=20220125060709>

Tapia, A., Ramírez, J. F., Figueroa, D. K., Salgado, M. L., & Serrato, R. (2020). Análisis espacial de antracnosis en el cultivo de aguacate en el Estado de México. *Revista mexicana de fitopatología*, 38(1). Obtenido de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092020000100108

- Terán , N. (Noviembre de 2018). *Reconocimiento y control de plagas y enfermedades de mayor importancia económica en Persea americana Mill: Revis.* Obtenido de Academia: scholar.google.es/scholar?hl=es&lr=lang_es&as_sdt=0%2C5&as_ylo=2020&q=cultivo+de+aguacate+en+el+ecuador+afectado+por+antracnosis&btnG=&oq=cultivo+de+aguacate+en+el+ecuador+afectado+por+antrac
- Trinidad , E., Ascencio , F., ULLOA, J. A., Ramírez , J. C., RAGAZZO , J. A., CALDERON , M., & Bautista , P. U. (2017, Diciembre 31). Identificación y caracterización de *Colletotrichum spp.* causante de antracnosis en aguacate Nayarit, México*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*(19). Retrieved from <https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/986/1/PUB-ARTICULO-4004.PDF>
- Veléz , K. D. (Diciembre de 2018). *Uso de un probiótico Bacillus subtilis, durante la fase de finalización de pollos de engorde, montecristi - manabí -ecuador 2018.* Obtenido de repositorio: <https://repositorio.ulead.edu.ec/bitstream/123456789/1966/1/ULEAM-AGRO-0050.pdf>
- Vilañez, P. A. (Noviembre de 2019). *Evaluación de Bacillus thuringiensis y Bacillus subtilis aisladas de la rizósfera de papa (Solanum tuberosum) para el control de Phytophthora infestans.* Obtenido de dspace: <http://dspace.pucesi.edu.ec/bitstream/11010/508/1/1.%20TESIS.pdf>
- Villarreal, M. F., Villa, E. D., Cira, L. A., Estrada, M. I., Parra, F. I., & de los Santos, S. (2018, Enero). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista mexicana de*

- fitopatología*, 36(1), 99. Retrieved from <https://www.smf.org.mx/rmf/ojs/index.php/RMF/article/view/100/97>
- Vinchira, M. D., & Moreno, N. (2019). Control biológico: Camino a la agricultura moderna. *Rev. Colomb. Biotecno*, 21(1), 3. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v21n1/0123-3475-biote-21-01-2.pdf>
- Yélamos, A. M. (julio de 2021). “*Biocontrol del hongo endófito cdg-17 sobre hongos causantes de podredumbres*”. Obtenido de repositorio.ual.es: <http://repositorio.ual.es/bitstream/handle/10835/13336/YELAMOS%20LEON%2C%20ANA%20MARIA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Zambrano , L. M., & Torres , C. (2016). *Evaluación, diagnóstico y biocontrol de fitopatógenos de capsicum frutescens (Solanaceae) en guacarí, valle del cauca*. Obtenido de bibliotecadigital: <https://bibliotecadigital.univalle.edu.co/bitstream/handle/10893/9974/CB-0551854.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

9. Anexos

Tabla 5. Promedios del crecimiento micelar de *Colletotrichum spp* día 1

No.	Tratamiento	Dosis % por Litro	Repeticiones			Promedios
			I	II	III	
1	T1	1 x 10 ²	5,7	7	6	6,23
2	T2	1 x 10 ³	6,45	7,5	11,1	8,35
3	T3	1 x 10 ⁴	5,7	5,7	5,6	5,67
4	T4	1 x 10 ⁵	0	0	0	0,00
5	(Testigo)	0	13,23	13,7	10,8	12,58

Muñoz, 2023

Tabla 6. Análisis estadístico del crecimiento micelar de *Colletotrichum spp* día 1Crecimiento micelar de *Colletotrichum spp* a las 24h

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
D1C	15	0,93	0,91	20,25

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	250,03	4	62,51	35,37	<0,0001
TRATAMIENTOS	250,03	4	62,51	35,37	<0,0001
Error	17,67	10	1,77		
Total	267,70	14			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 1,7674 gl: 10

TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.			
4	0,00	3	0,77	A		
3	5,67	3	0,77		B	
1	6,23	3	0,77		B	C
2	8,35	3	0,77			C
5	12,58	3	0,77			D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)Tabla 7. Promedios del crecimiento micelar de *Colletotrichum spp* día 2

No.	Tratamiento	Dosis % por Litro	Repeticiones			Promedios
			I	II	III	
1	T1	1 x 10 ²	6,4	13,25	9,45	9,70
2	T2	1 x 10 ³	10,2	8,25	11,65	10,03
3	T3	1 x 10 ⁴	5,7	5,7	6	5,80
4	T4	1 x 10 ⁵	0	0	0	0,00
5	(Testigo)	0	58,74	56,12	48,07	54,31

Muñoz, 2023

Tabla 8. Análisis estadístico del crecimiento micelar de *Colletotrichum spp* día 2Crecimiento micelar de *Colletotrichum spp* a las 48h

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
D2C	15	0,98	0,98	18,92

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	5708,95	4	1427,24	156,37	<0,0001
TRATAMIENTOS	5708,95	4	1427,24	156,37	<0,0001
Error	91,28	10	9,13		
Total	5800,22	14			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 9,1275 gl: 10

TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.	
4	0,00	3	1,74	A
3	5,80	3	1,74	B
1	9,70	3	1,74	B
2	10,03	3	1,74	B
5	54,31	3	1,74	C

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

Tabla 9. Promedios del crecimiento micelar de *Colletotrichum spp* día 3

No.	Tratamiento	Dosis % por Litro	Repeticiones			Promedios
			I	II	III	
1	T1	1 x 10 ²	15,7	14,75	12,9	14,45
2	T2	1 x 10 ³	12,25	10,55	11,9	11,57
3	T3	1 x 10 ⁴	5,7	5,7	6	5,80
4	T4	1 x 10 ⁵	0	0	0	0,00
5	(Testigo)	0	71,9	65,23	56,69	64,61

Muñoz, 2023

Tabla 10. Análisis estadístico del crecimiento micelar de *Colletotrichum spp* día 3

Crecimiento micelar de *Colletotrichum spp* a las 72h

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
D3C	15	0,98	0,98	18,58

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	8097,66	4	2024,41	159,48	<0,0001
TRATAMIENTOS	8097,66	4	2024,41	159,48	<0,0001
Error	126,94	10	12,69		
Total	8224,60	14			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 12,6942 gl: 10

TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.	
4	0,00	3	2,06	A
3	5,80	3	2,06	A B
2	11,03	3	2,06	B C
1	14,45	3	2,06	C
5	64,61	3	2,06	D

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

Tabla 11. Promedios del crecimiento micelar de *Colletotrichum* spp día 4

No.	Tratamiento	Dosis % por Litro	Repeticiones			Promedios
			I	II	III	
1	T1	1 x 10 ²	16,2	14,9	12,9	14,67
2	T2	1 x 10 ³	12,5	10,55	11,9	11,65
3	T3	1 x 10 ⁴	5,7	5,7	6	5,80
4	T4	1 x 10 ⁵	0	0	0	0,00
5	(Testigo)	0	75,87	69,27	64,84	69,99

Muñoz, 2023

Tabla 12. Análisis estadístico del crecimiento micelar de *Colletotrichum* spp día 4**Crecimiento micelar de *Colletotrichum* spp a las 96h**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
D4C	15	0,99	0,99	12,88

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	9594,75	4	2398,69	346,65	<0,0001
TRATAMIENTOS	9594,75	4	2398,69	346,65	<0,0001
Error	69,20	10	6,92		
Total	9663,95	14			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 6,9197 gl: 10

TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.	
4	0,00	3	1,52	A
3	5,80	3	1,52	B
2	11,65	3	1,52	C
1	14,67	3	1,52	C
5	69,99	3	1,52	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)**Tabla 13. Promedios del crecimiento micelar de *Colletotrichum* spp día 5**

No.	Tratamiento	Dosis % por Litro	Repeticiones			Promedios
			I	II	III	
1	T1	1 x 10 ²	16,6	14,9	12,9	14,80
2	T2	1 x 10 ³	13	11,15	11,9	12,02
3	T3	1 x 10 ⁴	5,7	5,7	6	5,80
4	T4	1 x 10 ⁵	0	0	0	0,00
5	(Testigo)	0	77,82	69,77	65,28	70,96

Muñoz, 2023

Tabla 14. Análisis estadístico del crecimiento miceliar de *Colletotrichum spp* día 5

Crecimiento miceliar de *Colletotrichum spp* a las 120h

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
D5C	15	0,99	0,99	14,43

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	9859,33	4	2464,83	275,74	<0,0001
TRATAMIENTOS	9859,33	4	2464,83	275,74	<0,0001
Error	89,39	10	8,94		
Total	9948,71	14			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 8,9390 gl: 10

TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.		
4	0,00	3	1,73	A	
3	5,80	3	1,73		B
2	12,02	3	1,73		C
1	14,80	3	1,73		C
5	70,96	3	1,73		D

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

Tabla 15. Promedios del crecimiento miceliar de *Colletotrichum spp*

No.	Tratamiento	Dosis % por Litro	Repeticiones			Promedios
			I	II	III	
1	T1	1 x 10 ²	12,12	12,96	10,83	11,97
2	T2	1 x 10 ³	10,88	9,28	11,69	10,62
3	T3	1 x 10 ⁴	5,7	5,7	5,92	5,77
4	T4	1 x 10 ⁵	0	0	0	0,00
5	(Testigo)	0	59,51	54,82	49,14	54,49

Muñoz, 2023

Tabla 16. Análisis estadístico del crecimiento miceliar de *Colletotrichum spp*

Crecimiento miceliar de *Colletotrichum spp*

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
PROMEDIO	15	0,99	0,99	14,69

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	5656,98	4	1414,25	238,59	<0,0001
TRATAMIENTOS	5656,98	4	1414,25	238,59	<0,0001
Error	59,27	10	5,93		
Total	5716,26	14			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 5,9274 gl: 10

TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.		
4	0,00	3	1,41	A	
3	5,77	3	1,41		B
2	10,62	3	1,41		C

1	11,97	3	1,41	C
5	54,49	3	1,41	D

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

Tabla 17. Promedios de porcentaje de inhibición de *B. subtilis* sobre *Colletotrichum spp*

No.	Tratamiento	Dosis % por Litro	Repeticiones			Promedios
			I	II	III	
1	T1	1×10^2	78,67	78,64	80,24	79,18
2	T2	1×10^3	83,29	84,02	81,77	83,03
3	T3	1×10^4	92,68	91,83	90,81	91,77
4	T4	1×10^5	100	100	100	100,00
5	(Testigo)	0	78,67	78,64	80,24	79,18

Muñoz, 2023

Tabla 18. Análisis estadístico porcentaje de inhibición de *B. subtilis* sobre *Colletotrichum spp*

Porcentaje de inhibición de *B. subtilis* sobre *Colletotrichum spp*

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
%	15	1,00	1,00	0,96

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	19609,07	4	4902,27	10504,86	<0,0001
TRATAMIENTOS	19609,07	4	4902,27	10504,86	<0,0001
Error	4,67	10	0,47		
Total	19613,73	14			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,4667 gl: 10

TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.	
4	100,00	3	0,39	A
3	92,00	3	0,39	B
2	83,00	3	0,39	C
1	79,33	3	0,39	D
5	0,00	3	0,39	E

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



Figura 2. Selección del hongo patógeno (*Colletotrichum spp*) que se lo recolectó del aguacate (*Persea americana*).
Muñoz, 2023



Figura 3. Preparación del medio de cultivo PDA.
Muñoz, 2023



Figura 4. Preparación del medio de cultivo Agar nutritivo
Muñoz, 2023



Figura 5. Aislamiento del hongo patógeno
Muñoz, 2023



Figura 6. Identificación del hongo patógeno
Muñoz, 2023



Figura 7. Aislamiento de *B. subtilis*
Muñoz, 2023