



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
CARRERA RECURSOS NATURALES RENOVABLES

**ALTERNATIVAS SOSTENIBLES Y ECOLÓGICAS DE MANEJO
CON BIOINSUMOS DE HONGOS ASOCIADOS A PUDRICIÓN DE
FRUTOS DE CHONTA (BACTRIS GASIPAES KUNTH) DE LA
PROVINCIA DE PASTAZA.**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERA EN RECURSOS NATURALES RENOVABLES

AUTORA:

JOHANNA LUCIA PANIMBOSA MOPOSITA

Riobamba – Ecuador

2023



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
CARRERA RECURSOS NATURALES RENOVABLES

**ALTERNATIVAS SOSTENIBLES Y ECOLÓGICAS DE MANEJO
CON BIOINSUMOS DE HONGOS ASOCIADOS A PUDRICIÓN DE
FRUTOS DE CHONTA (BACTRIS GASIPAES KUNTH) DE LA
PROVINCIA DE PASTAZA.**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERA EN RECURSOS NATURALES RENOVABLES

AUTORA: JOHANNA LUCIA PANIMBOSA MOPOSITA

DIRECTOR: ING. PABLO ISRAEL ÁLVAREZ ROMERO Ph. D.

Riobamba – Ecuador

2023

© 2023, Johanna Lucia Panimbosa Moposita

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Yo, Johanna Lucia Panimbosa Moposita, declaro que el presente Trabajo de Integración Curricular es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autora asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este Trabajo de Integración Curricular; el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 25 de mayo del 2023



Johanna Lucia Panimbosa Moposita
180434349-7

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
CARRERA RECURSOS NATURALES RENOVABLES

El Tribunal del Trabajo de Integración Curricular certifica que: El Trabajo de Integración Curricular; tipo: Proyecto de Investigación, **ALTERNATIVAS SOSTENIBLES Y ECOLÓGICAS DE MANEJO CON BIOINSUMOS DE HONGOS ASOCIADOS A PUDRICIÓN DE FRUTOS DE CHONTA (*Bactris gasipaes* Kunth) DE LA PROVINCIA DE PASTAZA**, realizado por la señorita: **JOHANNA LUCIA PANIMBOSA MOPOSITA**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Integración Curricular, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
Dr. Rosa del Pilar Castro Gómez PRESIDENTE DEL TRIBUNAL		2023-05-25
Dr. Pablo Israel Álvarez Romero DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR		2023-05-25
Ing. Víctor Mario García Mora ASESOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR		2023-05-25

DEDICATORIA

Primeramente, a Dios por brindarme fortaleza, sabiduría, salud y ser un guía importante en el camino que elegí. A mis padres Martha y José por ser una pieza fundamental en mi vida, gracias por siempre contar con su amor, paciencia, apoyo, consejos y quienes siempre me motivaron a seguir adelante para conseguir el éxito para poder triunfar en la vida. A mi hermano José Luis por siempre estar presente con su paciencia y apoyó en todo momento. A mis abuelitos Pablo, Mercedes y mi hermano José Luis quienes me guían, me cuidan y me protegen.

Johanna

AGRADECIMIENTO

De manera especial al Ingeniero Fernando Rivas, por su tiempo, paciencia por guiarme en este proceso y deseándome lo mejor en todo momento. Al Ingeniero Pablo Álvarez, por su colaboración, seguimiento y apoyo en todo momento. Al Ingeniero Mauricio Rivera, por su paciencia, tiempo, asesoría brindada, y maestro, por la predisposición de ayudar a todos los que le necesiten, me llevó las risas, los regaños que medio a lo largo de mi carrera, gracias por la amistad que me brindó por no haberme dejado sola en los momentos difíciles tanto de la carrera como en lo personal, me llevaré los mejores recuerdos de quién fue mi maestro y mi amigo. Al Ingeniero Juan Guerra, por su paciencia, tiempo, por ser un excelente guía, y maestro en esta última etapa de mi carrera. A mis amigos quienes me acompañaron con su amistad en esta etapa de formación profesional como personal con su apoyo total. De manera especial a Jefferson, Jocelin, Gessebell, Ximely, Roberth, Cristian, Enderson, Jhoana por compartir momentos inolvidables. A mis amigos de laboratorio Kevin, Claire, Nicole, Dennys, Fernanda y María Fernanda con quienes compartí este proceso, siempre apoyándonos los unos con los otros por esos momentos de risas y tristezas que pasamos juntos.

Johanna

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	xiii
ÍNDICE DE ANEXO	xiv
RESUMEN	xv
SUMMARY / ABSTRACT	xvi
INTRODUCCIÓN	1

CAPÍTULO I

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	3
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
1.2. OBJETIVOS.....	3
1.3. JUSTIFICACIÓN	3
1.4. HIPÓTESIS.....	4

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO	5
2.1. CHONTA (<i>BACTRIS GASIPAES</i>)	5
2.1.1. <i>Origen</i>	5
2.1.2. <i>Aspectos generales</i>	5
2.1.3. <i>Clasificación taxonómica</i>	6
2.2. IMPORTANCIA DE LA CHONTA EN EL ECUADOR.....	6
2.3. VARIEDAD DE LA CHONTA EN EL ECUADOR	7
2.4. ENFERMEDADES DE LA CHONTA.....	7
2.4.1. <i>Enfermedades del follaje</i>	7
2.4.2. <i>Pudriciones</i>	8
2.4.3. <i>Enfermedades del fruto</i>	8
2.4.4. <i>Otras afecciones</i>	9
2.5. DIVERSIDAD FÚNGICA ASOCIADOS A FRUTOS DE CHONTA.....	9

2.6. EXTRACTOS VEGETALES Y BIOPRODUCTOS COMO ALTERNATIVAS SUSTENTABLES PARA EL MANEJO DE PUDRICIÓN DE FRUTOS DE CHONTA (<i>BACTRIS GASIPAES</i>)	11
2.6.1. <i>Extractos vegetales como alternativas sostenibles</i>	11
2.6.2. <i>Bioproductos como alternativas sostenibles</i>	13
2.7. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR	15
2.8. MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS FÚNGICOS	16
2.8.1. <i>Métodos de caracterización</i>	16
2.8.2. <i>Métodos Moleculares</i>	18
2.9. REACCIÓN DE LA CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	19
2.10. MARCADORES MOLECULARES COMO HERRAMIENTAS EN LA DISCRIMINACIÓN DE ORGANISMOS	21

CAPÍTULO III

3. MARCO METODOLÓGICO	23
3.1. CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR	23
3.1.1. <i>Localización del laboratorio</i>	23
3.1.2. <i>Ubicación geográfica</i>	23
3.2. MATERIALES Y EQUIPOS	23
3.2.1. <i>Oficina</i>	23
3.2.2. <i>Laboratorio</i>	23
3.2.3. <i>Principios activos utilizados</i>	24
3.2.4. <i>Equipos</i>	25
3.3. METODOLOGÍA PARA LA DETERMINAR DE EFECTO BIOLÓGICO	25
3.3.1. <i>Cálculos para determinar las concentraciones de los productos biológicos a usar en las pruebas de efecto biológico</i>	26
3.3.2. <i>Enmendado del medio de cultivo y ensayo del crecimiento micelial</i>	27
3.3.3. <i>Crecimiento micelial</i>	27
3.3.4. <i>Tasa de crecimiento micelial (TCM)</i>	28
3.3.5. <i>Germinación de esporas</i>	28
3.3.6. <i>Estimación de la concentración letal 50 (CL₅₀)</i>	28
3.3.7. <i>Rango de efecto biológico</i>	29
3.3.8. <i>Clasificación toxicológica de los productos</i>	29
3.4. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

3.4.1. Metodología.....	¡Error! Marcador no definido.
-------------------------	-------------------------------

CAPÍTULO IV

4. MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	33
4.1. PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO MICELIAL	33
4.1.1. <i>Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial de hongos asociados a la pudrición de frutos de chonta (Bactris gasipaes Kunth)</i>	33
4.2. CONCENTRACIÓN LETAL (CL ₅₀)	43
4.2.1 <i>Concentración letal 50 (CL₅₀) de extracto de tomillo (Thymus vulgaris) para los hongos asociados a pudrición de frutos de chonta (Bactris gasipaes Kunth)</i>	44
4.2.2. <i>Concentración letal 50 (CL₅₀) de producto 2 para los hongos asociados a pudrición de frutos de chonta (Bactris gasipaes Kunth)</i>	44
4.2.3. <i>Concentración letal 50 (CL₅₀) de quitosan para los hongos asociados a pudrición de frutos de chonta (Bactris gasipaes Kunth)</i>	45
4.2.4. <i>Concentración letal 50 (CL₅₀) de árbol de Té (Melaleuca alternifolia) para los hongos asociados a pudrición de frutos de chonta (Bactris gasipaes Kunth)</i>	45
4.2.5. <i>Concentración letal 50 (CL₅₀) de Bacillus para los hongos asociados a pudrición de frutos de chonta (Bactris gasipaes Kunth)</i>	46
4.2.6. <i>Concentración letal 50 (CL₅₀) de tebuconazol para los hongos asociados a pudrición de frutos de chonta (Bactris gasipaes Kunth)</i>	47
4.3. GERMINACIÓN DE ESPORAS	49
4.4. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR	54
4.5. DISCUSIÓN	56
4.6. COMPROBACIÓN DE LA HIPÓTESIS	66

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES.....	67
-------------------	----

RECOMENDACIONES	69
-----------------------	----

GLOSARIO

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2-1:	Clasificación taxonómica de la especie <i>Bactris gasipaes</i> Kunth.	6
Tabla 3-2:	Colección de hongos filamentosos de aislados de frutos de chonta (<i>Bactris gasipaes</i>) utilizadas en el estudio.	23
Tabla 3-3:	Listado de ingredientes activos y nombres comerciales que fueron utilizados.	24
Tabla 3-4:	Rango de efecto biológico a hongos asociados a pudrición de frutos de chonta (<i>Bactris gasipaes</i>).....	29
Tabla 3-5:	Clasificación toxicológica de los productos	29
Tabla 3-6:	Primers usados para PCR.....	31
Tabla 4-7:	Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial de hongos asociados a la pudrición de frutos de chonta (<i>Bactris gasipaes</i> Kunth) enmendado con extracto de tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>).....	33
Tabla 4-8:	Test de Tukey al 5% del género <i>Ceratocystis</i> con diferentes dosis de extracto de tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>).	34
Tabla 4-9:	Test de Tukey al 5% del género <i>Geotrichum</i> con diferentes dosis de extracto de tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>).	34
Tabla 4-10:	Test de Tukey al 5% del género <i>Rhizopus</i> con diferentes dosis de extracto de tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>).....	35
Tabla 4-11:	Test de Tukey al 5% del género <i>Fusarium</i> con diferentes dosis de extracto de tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>).....	35
Tabla 4-12:	Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial de hongos asociados a la pudrición de frutos de chonta (<i>Bactris gasipaes</i> Kunth) enmendado con producto 2.	36
Tabla 4-13:	Test de Tukey al 5% del género <i>Ceratocystis</i> con diferentes dosis de producto 2.	37
Tabla 4-14:	Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial de hongos asociados a la pudrición de frutos de chonta (<i>Bactris gasipaes</i> Kunth) enmendado con quitosan oligosacarina.	37
Tabla 4-15:	Test de Tukey al 5% del género <i>Ceratocystis</i> con diferentes dosis de quitosan oligosacarina.	38
Tabla 4-16:	Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial de hongos asociados a la pudrición de frutos de chonta (<i>Bactris gasipaes</i> Kunth) enmendado con aceite de árbol de Té (<i>Melaleuca alternifolia</i>).	39
Tabla 4-17:	Test de Tukey al 5% del género <i>Ceratocystis</i> con diferentes dosis de aceite de árbol de Té (<i>Melaleuca alternifolia</i>).....	39

Tabla 4-18:	Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial de hongos asociados a la pudrición de frutos de chonta (<i>Bactris gasipaes</i> Kunth) enmendado con <i>Bacillus</i>	40
Tabla 4-19:	Test de Tukey al 5% del género <i>Fusarium</i> con diferentes dosis de <i>Bacillus</i>	41
Tabla 4-20:	Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial de hongos asociados a la pudrición de frutos de chonta (<i>Bactris gasipaes</i> Kunth) enmendado con tebuconazol.	41
Tabla 4-21:	Test de Tukey al 5% del género <i>Ceratocystis</i> con diferentes dosis de tebuconazol.	42
Tabla 4-22:	Test de Tukey al 5% del género <i>Geotrichum</i> con diferentes dosis de tebuconazol.	42
Tabla 4-23:	Test de Tukey al 5% del género <i>Mucor</i> con diferentes dosis de tebuconazol.	43
Tabla 4-24:	Test de Tukey al 5 % del género <i>Rhizopus</i> con diferentes dosis de tebuconazol.	43
Tabla 4-25:	Test de Tukey al 5% del género <i>Fusarium</i> con diferentes dosis de tebuconazol.	43
Tabla 4-26:	Rango de efecto biológico de los géneros en diferentes productos.	47
Tabla 4-27:	Test de Tukey al 5% con diferentes dosis de quitosán oligosacarina.	51
Tabla 4-28:	Test de Tukey al 5% con diferentes dosis de <i>Bacillus</i>	52
Tabla 4-29:	Test de Tukey al 5% con diferentes dosis de tebuconazol.	52
Tabla 4-30:	Identificación molecular mediante análisis BLASTn de las cepas del género <i>Penicillium</i> , <i>Mucor</i> , <i>Ceratocystis</i> y <i>Geotrichum</i> alineadas con especies de la base de datos del NCBI.	54

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1-2:	Morfología y crecimiento de colonias.	17
Ilustración 3-3:	Protocolo de extracción de ADN.....	30
Ilustración 4-4:	Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial con extracto de tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>).....	33
Ilustración 4-5:	Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial con producto 2.....	36
Ilustración 4-6:	Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial con quitosan oligosacarina	37
Ilustración 4-7:	Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial con aceite de árbol de Té (<i>Melaleuca alternifolia</i>)	38
Ilustración 4-8:	Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial con <i>Bacillus</i>	40
Ilustración 4-9:	Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial con tebuconazol.....	41
Ilustración 4-10:	CL ₅₀ de hongos asociados a pudrición de frutos de chonta (<i>Bactris gasipaes</i> Kunth) de extracto de tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>).	44
Ilustración 4-11:	CL ₅₀ de hongos asociados a pudrición de frutos de chonta (<i>Bactris gasipaes</i> Kunth) de producto 2.	44
Ilustración 4-12:	CL ₅₀ de hongos asociados a pudrición de frutos de chonta (<i>Bactris gasipaes</i> Kunth) de quitosan.	45
Ilustración 4-13:	CL ₅₀ de hongos asociados a pudrición de frutos de chonta (<i>Bactris gasipaes</i> Kunth) de árbol de Té (<i>Melaleuca alternifolia</i>).....	46
Ilustración 4-14:	CL ₅₀ de hongos asociados a pudrición de frutos de chonta (<i>Bactris gasipaes</i> Kunth) de <i>Bacillus</i>	46
Ilustración 4-15:	CL ₅₀ de hongos asociados a pudrición de frutos de chonta (<i>Bactris gasipaes</i> Kunth) de tebuconazol.	47
Ilustración 4-16:	Porcentaje de germinación de esporas de <i>Penicillium</i> en diferentes dosis de producto 2.	49
Ilustración 4-17:	Porcentaje de germinación de esporas de <i>Penicillium</i> en diferentes dosis de Aceite de árbol de Té (<i>Melaleuca alternifolia</i>).....	50
Ilustración 4-18:	Porcentaje de germinación de esporas de <i>Penicillium</i> en diferentes dosis de quitosan oligosacarina.	50
Ilustración 4-19:	Porcentaje de germinación de esporas de <i>Penicillium</i> en diferentes dosis de <i>Bacillus</i>	51
Ilustración 4-20:	Porcentaje de germinación de esporas de <i>Penicillium</i> en diferentes dosis de tebuconazol.	52

ÍNDICE DE ANEXOS

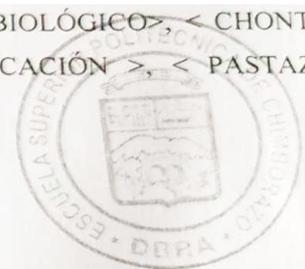
- ANEXO A:** PREPARACIÓN DEL MEDIOS DE CULTIVOS PDA Y SDA, CON BIOPRODUCTOS CON SUS RESPECTIVAS DOSIS
- ANEXO B:** SIEMBRA DE LOS DISCOS DE MICELIO CON *Fusarium* sp., *Rhizopus* sp., *Ceratocystis* sp., *Mucor* sp., *Geotrichum* sp., y *Penicillium* sp., EN LAS CAJAS PETRI ENMENDADO CON FUNGICIDAS
- ANEXO C:** CRECIMIENTO DE LOS AISLADOS *Fusarium* sp., *Rhizopus* sp., *Ceratocystis* sp., *Mucor* sp., *Geotrichum* sp., y *Penicillium* sp., EN LOS DISTINTOS BIOPRODUCTOS
- ANEXO D:** CONCENTRACIÓN LETAL 50 (CL50)
- ANEXO E:** ANÁLISIS DE VARIANZA PARA CONCENTRACIÓN LETAL 50 (CL50)
- ANEXO F:** ANALISIS DE VARIANZA DE GERMINACIÓN DE ESPORAS
- ANEXO G:** GERMINACIÓN DE ESPORAS
- ANEXO H:** ESPORAS GERMINADAS SEGÚN LOS BIOPRODUCTOS Y FUNGICIDA EN ESTUDIO
- ANEXO I:** EXTRACCIÓN DE ADN (LISIS FÍSICA).
- ANEXO J:** EXTRACCIÓN DE ADN (LISIS QUÍMICA).
- ANEXO K:** CUANTIFICACIÓN DE ADN
- ANEXO L:** PCR Y ELECTROFORESIS.
- ANEXO M:** GEL DE AGAROSA REVELADO.

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo evaluar alternativas sostenibles y ecológicas de manejo con bioinsumos de hongos asociados a pudrición de frutos de chonta (*Bactris gasipaes* Kunth) de la provincia de Pastaza. Para lo cual se utilizaron seis principios activos: extracto de tomillo (*Thymus vulgaris*), aceite de árbol de Té (*Melaleuca alternifolia*), *Bacillus*, quitosan oligosacarina, producto 2 y tebuconazol, además, se utilizaron seis géneros identificados morfológicamente procedentes de la provincia de Pastaza, Se realizaron dos metodologías: la primera basada la determinación del efecto biológico para los hongos de: *Ceratocystis*, *Mucor*, *Geotrichum*, *Fusarium* y *Rhizopus* se utilizó la metodología de crecimiento micelial; la segunda basada la germinación de esporas para el hongo *Penicillium* y para la identificación molecular se realizó la técnica de ampliación de la cadena de ADN con los iniciadores ITS1 e ITS4 con la herramienta Blast del NCBI se compararon las secuencias obtenidas con el banco de datos. Los resultados obtenidos en los diferentes productos fueron: quitosan oligosacarina el género (*Mucor*) ingresó en la categoría "Muy sensible" (< 10µg/mL), árbol de Té (*Melaleuca alternifolia*) el género (*Geotrichum*) ingresó en la categoría "Muy sensible" (< 10µg/mL), tebuconazol los cinco géneros (*Ceratocystis*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Fusarium*) ingresaron en la categoría "Muy sensible" (<10µg/mL). Se identificaron molecularmente los hongos identificados morfológicamente los cuales fueron: *Ceratocystis paradoxa*, *Mucor nidicola*, *Geotrichum candidus* y *Penicillium purpurogenum*. Se concluye que los productos biológicos que tuvieron efecto en los géneros *Ceratocystis*, *Mucor* y *Geotrichum* extracto de tomillo y producto 2; para *Rhizopus* y *Fusarium* Aceite de árbol de té y extracto de tomillo y para *Penicillium* Aceite de árbol de té, *Bacillus*, quitosan oligosacarina y producto 2. Se recomienda realizar más estudios de efecto biológico utilizando más productos diferentes a los utilizados en este estudio para el control de las especies ya identificadas.

Palabras clave: < CONCENTRACIÓN LETAL >, <EFECTO BIOLÓGICO>, < CHONTA (*Bactris gasipaes* Kunth) >, < PATOGENOS >, <IDENTIFICACIÓN >, < PASTAZA (PROVINCIA)>.


D.B.R.A.I.
Ing. Cristóbal Castillo



1132-DBRA-UPT-2023

SUMMARY / ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate sustainable and ecological management alternatives with bio-inputs of fungi associated with rotting of chonta (*Bactris gasipaes* Kunth) fruits from the Pastaza province. For which six active principles were used: thyme extract (*Thymus vulgaris*), Tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*), Bacillus, chitosan oligosaccharin, product 2 and tebuconazole, in addition, six morphologically identified genera from the province of Pastaza, two methodologies were carried out: the first based on the determination of the biological effect for the fungi of: *Ceratocystis*, *Mucor*, *Geotrichum*, *Fusarium* and *Rhizopus*, the mycelial growth methodology was used; the second based on the germination of spores for the *Penicillium* fungus and for molecular identification, the DNA chain amplification technique was performed with the ITS1 and ITS4 primers with the NCBI Blast tool, the sequences obtained were compared with the data bank. The results obtained in the different products were: chitosan oligosaccharin the genus (*Mucor*) entered in the "Very sensitive" category ($< 10\mu\text{g/mL}$), Tea tree (*Melaleuca alternifolia*) the genus (*Geotrichum*) entered in the "Very sensitive" category. " $< 10\mu\text{g/mL}$ ", tebuconazole the five genera (*Ceratocystis*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Fusarium*) entered in the category "Very sensitive" ($< 10\mu\text{g/mL}$). The morphologically identified fungi were molecularly identified, which were: *Ceratocystis paradoxa*, *Mucor nidicola*, *Geotrichum candidus* and *Penicillium purpurogenum*. It is concluded that the biological products had an effect on the genera *Ceratocystis*, *Mucor* and *Geotrichum* thyme extract and product 2, for *Rhizopus* and *Fusarium* Tea tree oil and thyme extract and for *Penicillium* Tea tree oil, Bacillus, chitosan oligosaccharin and product 2. It is recommended to carry out more studies of biological effect using more products different from those used in this study to control the species already identified.

Keywords: <LETHAL CONCENTRATION>, <BIOLOGICAL EFFECT>, <CHONTA (*Bactris gasipaes* Kunth)>, <PATHOGENS>, <IDENTIFICATION>, <PASTAZA (PROVINCE)>.



Lic. Lorena Hernández A. Mcs

180373788-9

INTRODUCCIÓN

La alimentación y la agricultura son un componente importante en el desarrollo y la supervivencia de las civilizaciones. Alrededor de la mitad de la población mundial y sus economías están influidas por la producción agrícola. Las enfermedades de las plantas se cobran hasta un 30% de la cosecha si no se gestionan de forma adecuada y eficiente (Borkar,SG y Yumlembam, RA. 2016, pp. 16-22).

El chontaduro o chonta (*Bactris gasipaes*) es uno de los cultivos de mayor importancia cultural y económica en la región amazónica del Ecuador. La palma de chonta está afectada por una gama de microorganismos patógenos, que en condiciones de alta humedad en el suelo y en el ambiente ocasionan problemas fitosanitarios, los cuales provocan pérdidas económicas importantes. Dentro de las enfermedades asociadas con protistas, hongos y bacterias se encuentran la pudrición del cogollo o de la flecha relacionada con *Phytophthora palmivora* o *Erwinia chrysanthemi*, la mancha negra de las hojas causadas por *Colletotrichum* spp., la mancha foliar por *Pestalotia* spp., la mancha parda por *Mycosphaerella* spp., la mancha de anillo por *Drechslera setariae*. El manejo convencional de este cultivo no logra identificar tempranamente enfermedades, síntomas y patógenos, lo que lleva a los agricultores a aplicar indiscriminadamente fungicidas sin saber que estos productos son dañinos para el ambiental (Riascos-Ortiz, Donald et al. 2011, pp. 319-327).

Debido a la necesidad actual de encontrar alternativas ambientalmente compatibles, existe un interés en el creciente desarrollo de medidas de control biológico y control integrado de enfermedades para cultivos económicamente importantes. El control biológico se define como la reducción de patógenos por la acción de uno o más organismos no humanos (Riascos-Ortiz, Donald et al. 2011, pp. 319-327).

Definir la identificación de cepas es un paso insustituible en la investigación de bioagentes, y la elección de herramientas y mecanismos de identificación constituye la confiabilidad de la información. El uso de la tecnología de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como mecanismo de reconocimiento molecular se basa en esta tecnología para amplificar fragmentos de ADN respaldados por cebadores como el tampón de transcripción interno (ITS) que forman regiones ITS altamente distintivas necesarias para la durabilidad y la practicidad. Contiene rDNA repetitivo, regiones conservadas, de evolución relativamente lenta, pero a la vez regiones menos conservadas, cuyas funciones son conferidas por ITS1 e ITS4, respectivamente. Aunque los espaciadores transcritos internos han sido denominados marcadores de barra por grupos de micólogos para identificar taxones y son uno de los mecanismos más confiables para identificar

hongos a nivel de especie, estas características hacen de la región ITS un segmento muy interesante para estudios taxonómicos (Suarez-Contreras et al. 2022, pp. 194-206).

En este estudio se determina los mecanismos de determinación molecular de 6 especies de hongos distribuidas en los géneros *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Penicillium*, *Ceratocystis*, *Fusarium* y *Mucor*.

CAPÍTULO I

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Planteamiento del Problema

Actualmente no existen alternativas sostenibles ni ecológicamente amigables, para el manejo de patología de frutos de Chonta y estas alternativas podrían disminuir el uso indiscriminado de plaguicidas y la contaminación ambiental generada por este uso indiscriminado, donde en Ecuador no se ha dado importancia científica del fruto a pesar del valor cultural y económica de esta especie en la región Amazónica específicamente de la provincia de Pastaza. Por otro lado, no se ha realizado identificación molecular a nivel de especie de los microorganismos asociados a los frutos de Chonta (*Bactris gasipaes*).

1.2 Objetivos

Objetivo General

- Evaluar alternativas sostenibles y ecológicas de manejo con bioinsumos de hongos asociados a pudrición de frutos de chonta (*Bactris gasipaes* Kunth) de la provincia de Pastaza.

Objetivos Específicos

- Estudiar dos bioinsumos basados en microorganismos y dos bioinsumos basados en extractos vegetales como alternativas sostenibles de manejo.
- Identificar molecularmente microorganismos asociados a los frutos de chonta (*Bactris gasipaes*) de la provincia de Pastaza.

1.3 Justificación

Las raíces coloniales han devaluado a la chonta, y se la llamó despectivamente fruto de los indios. Esta visión probablemente ha mantenido a la chonta fuera de los programas de investigación, conservación y desarrollo productivo, e inclusive olvidada por la literatura científica, además de ser considerada una de las culturas olvidadas.

En Ecuador existe un vacío en el conocimiento e importancia de hongos asociados a pudrición de frutos de chonta, es decir que no se conoce alternativas sostenibles y ecológicas para el manejo de estos patógenos, es por ello que este estudio pretende reducir el uso de plaguicidas y a su vez la contaminación ambiental ocasionada por este mismo uso, esto permitirá establecer alternativas sostenibles en el control de patógenos de los frutos de chonta.

1.4 Hipótesis

Nula

Los extractos vegetales y bioinsumos no reducen el crecimiento de las diferentes especies de hongos identificados molecularmente de los frutos de Chonta (*Bactris gasipaes*) de la provincia de Pastaza.

Alternativa

Los extractos vegetales y bioinsumos reducen el crecimiento de las diferentes especies de hongos identificados molecularmente de los frutos de Chonta (*Bactris gasipaes*) de la provincia de Pastaza.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Chonta (*Bactris gasipaes*)

2.1.1 Origen

La chonta es una palma totalmente domesticada. Esto significa que su domesticación comenzó con especie silvestre, a partir de las cuales los humanos desarrollaron un proceso deliberado de rasgos. Este proceso tomaría miles de años, para producir una amplia variedad de formas domesticadas. La domesticación de la chonta sigue siendo especulación (Clement et al., 2021; citados en Valencia et al., 2015: pp.18-22).

La fruta es claramente un objetivo principal para la domesticación, la concentración de almidones, de lípidos, y componentes menores. El color del fruto de la chonta también puede constituir un rasgo de domesticación. Además de los frutos también se encuentran otras características. Además, se observan otros caracteres de interés más allá de los frutos; en particular, la ausencia de espinas en los tallos. Sin embargo, en la Amazonía ecuatoriana se observó chontas con espinas blandas y también sin espinas, es una variante domesticada que facilita la recolección de frutos. Otros caracteres que pueden ser favorables el tamaño del individuo, su naturaleza multicaule y su adaptación a diferentes suelos y altitudes (Clement et al., 2021; citados en Valencia et al., 2015: pp.18-22).

2.1.2 Aspectos generales

La palma de chonta forma parte de la familia de las Arecáceas, es una planta monocotiledónea, originaria de la región amazónica de Brasil, Ecuador, Colombia y Perú. En Centro América esta especie se ha naturalizado, destacándose en Costa Rica como el más grande productor mundial (Crane, 2016: p.1).

Es una palmera de 20-31m de altura que crece en los bosques tropicales. Su tronco es esbelto, solitario o herboso, y en la mayoría de las variedades cubierto de espinas rígidas que pueden perforar fácilmente la suela de una bota (Carrera, 2018: p. 7).

2.1.3 Clasificación taxonómica

Tabla 2-1: Clasificación taxonómica de la especie *Bactris gasipaes* Kunth.

REINO	PLANTAE
SUBREINO	Viridaplantae
INFREINO	Streptophyta
DIVISIÓN	Tracheophyta
SUBDIVISIÓN	Spermatophytina
INFRADIVISIÓN	Angiospermae
CLASE	Magnoliopsida
SUPERORDEN	Lilianae
ORDEN	Arecales
FAMILIA	Arecaceae
GÉNERO	<i>Bactris</i>
ESPECIE	<i>Bactris gasipaes</i>
NOMBRES COMUNES	Chonta, Pejibaye, Chontaduro, Pijigao, Pirijaho, Cachipae, etc

Fuente: Integrated Taxonomic Information System (ITIS), 2020.

2.2 Importancia de la chonta en el Ecuador

Actualmente, la chonta es un importante elemento de soberanía y seguridad alimentaria para los pueblos indígenas y mestizos de la Costa y la Amazonia ecuatoriana. El fruto se utiliza de diversas formas, ya sea cocinado y consumido directamente o utilizado en la preparación de la elaboración de la tradicional chicha de chonta. Los frutos frescos y maduros se venden en mercados de pueblos como Tena, Puyo, El Coca, Lago Agrio y Archidona. La chonta fresca generalmente se vende en paquetes recién salidos de fábrica, mientras que la fruta cocida se vende para consumo inmediato o transformado en una harina húmeda o pasta fermentada que sirve para preparar la chicha. La chicha de chonta, una bebida alcohólica y no alcohólica, constituye una importante fuente de alimentación y un símbolo cultural de abundancia y fertilidad para los indígenas amazónicos (Anitha Karun. et al. 2015: pp. 505-513).

Para Ecuador, la protección y manejo de la chonta es un tema aún más estratégico. Además del importante papel del chontaduro como fuente de almidones, lípidos y subproductos en la dieta ecuatoriana. La especie, también se ha adaptado a diseños agroforestales en la Amazonía y de las tierras bajas occidentales de Ecuador, donde contribuye con servicios ambientales importantes al integrarse amablemente con cultivos alimentarios. La importancia de este cultivo no es solo como alimento directo para los humanos, sino que debido a que los cuerpos fructíferos son tan abundantes, proporciona alimento para toda la familia y la vida silvestre (Henderson, A. M. et al. 2019: p. 4).

2.3 Variedad de la Chonta en el Ecuador

Existen dos ancestros de los Chonta en Ecuador. *Chichagui* conocido localmente como chontilla y *Bactris gasipaes* llamada chonta o chunda. Chonta y Chontilla son similares en morfología. Algunas miden entre 10 y 15 metros de altura y están cubiertas de largas espinas. Hojas de pinnadas cubiertas de espinas. inflorescencias colgantes; las flores son pequeñas (1–2 cm), amarillas, polinizadas por insectos. Sin embargo, la diferencia más obvia entre las dos plantas progenitoras es el tamaño de la fruta. El rasgo se llama síndrome de domesticación. Así lo hace Chontilla (*var. chichagui*) tiene frutos anaranjados pequeños, globosos, de pulpa baja, de 1-1.5 cm de diámetro, mientras que Chonta (*var. gasipaes*) tiene 3-12 cm de diámetro, mucho más pesado que sus parientes silvestres y son muy variables en forma y color (Montúfar et al. 2013: pp. 77-79).

Asimismo, Chontilla crece en la vegetación remanente de la costa central y sur ecuatoriana (zonas con escasas precipitaciones). La chonta (*var. gasipaes*), por otro lado, crece en áreas de alta precipitación, está presente en el noroeste de Ecuador y la región amazónica, se adapta a altitudes de alrededor de 1500 m (Montúfar et al. 2013: pp. 77-79).

2.4 Enfermedades de la Chonta

2.4.1 Enfermedades del follaje

2.4.1.1 Mancha negra de las hojas

También se conoce como Añublo foliar, que se considera endémico para las condiciones de la costa pacífica colombiana. Es causada por el hongo *Colletotrichum* sp. Se presenta en hojas de palmas de vivero y en palmas adultas. Son manchas negras rodeadas de un pequeño halo clorótico que se extienden hasta causar necrosis del 70 a 100% de la lámina foliar. Este tipo de lesión puede servir para favorecer la presencia de bacterias como *Erwinia* sp. que causa la muerte de las hojas y una pudrición general de la médula o palmito y ocurre en áreas con exceso de humedad en el suelo (Peña, 1996: p. 4).

2.4.1.2 Otros tipos de manchas:

Mancha amarilla (*Pestalotiopsis* sp.)

Son manchas amarillas de aspecto acuoso, que posteriormente se necrosan tornándose pardo oscuras. Afecta palmeras de vivero (Mexzon, 1995: p. 2).

Mancha parda (*Mycosphaerella* sp.).

Se presenta como manchas redondas de color pardo oscuro rodeadas por halo amarillo. El ataque se inicia por la punta de los folíolos extendiéndose hacia la lámina foliar dando un aspecto de quemazón (Mexzon, 1995: p. 3).

Manchas pardas.

En Tumaco se han reportado los hongos *Petalotia* sp, *Curvularia* sp y *Helminthosporium* sp. Como causantes de manchas foliares en plantas de vivero de coloración parda y que al coalescer, ocasionan lesiones que pueden extenderse hasta un 50% de la lámina foliar. (Instituto Colombiano Agropecuario, 1992: p. 2).

Vena corchosa (*Fusarium* sp.)

Se caracteriza por una especie de pudrición de la flecha que puede afectar el meristemo, presentándose en este caso una asociación con la bacteria *Erwinia* sp. Se presenta tanto en viveros como en campo en focos aislados. En palmas adultas de plantaciones para palmito, la planta afectada se puede cortar y en ocasiones se salva la cepa (Mora, 1983: p. 5).

2.4.2 Pudriciones

2.4.2.1 Pudrición de Cogollo

Se reporta como causado por *Phytophthora* sp. en asociación con la bacteria *Erwinia* sp.. El disturbio se detecta a partir del amarillamiento de las hojas circundantes a la flecha y que posteriormente se tornan pardas (marchitas). La flecha se seca y se puede retirar fácilmente debido al efecto de una pudrición de la parte basal y que puede afectar al meristemo. La pudrición en ocasiones es maloliente (ICA, 1992: p 1).

2.4.3 Enfermedades del fruto

2.4.3.1 Pudrición blanca

Causada por *Monilia* sp. Ataca los frutos que han alcanzado la madurez. Los aspectos característicos son coloración blanquizca, consistencia blanda, mal olor y caída de frutos afectados (Pava et al, 1981: p. 3).

2.4.3.2 Pudrición negra

La afección es importante en frutos maduros cosechados por lo cual afecta su presentación y comercialización. Agente causal: *Ceratomyces* sp (*Thielaviopsis* sp., fase imperfecta del hongo). La intensidad de la enfermedad se acentúa debido al daño que sufren los frutos al ser atacados por insectos, mal manejo del racimo en cosecha y postcosecha. Se caracteriza por una pudrición por una suave pudrición suave en el fruto que conforme avanza la enfermedad se torna negruzco. Los frutos presentan olor característico de fermentación (olor a piña madura) siendo atractivos para insectos (Pava et al., 1981: p. 3).

2.4.4 Otras afecciones

2.4.4.1 Punta de lápiz

Se caracteriza por un amarillamiento progresivo de las hojas bajas hacia la corona para posteriormente tomarse necróticas. El estipe se va adelgazando hacia el cogollo semejando la punta de un lápiz. Las inflorescencias son de tamaño reducido. Se considera que para su manifestación inciden factores como avanzada edad de la cepa, degradación del hábitat y empobrecimiento del suelo (Vargas, 1989: pp. 1 - 2).

2.4.4.2 Marchitez asociada a protozoarios

Hasta el presente ha sido reportado en Costa Rica en plantaciones para palmito. Los síntomas consisten en un amarillamiento de los folíolos de los ápices de las hojas más viejas, seguida por secamiento y muerte descendente: ocasionalmente se puede presentar necrosis de raíces adventicias. Algunas plantas presentan pudrición meristemática asociada con la bacteria *Erwinia* sp., (Vargas, 1989: pp. 1- 2).

2.5 Diversidad fúngica asociados a frutos de Chonta

Trichoderma es el género fúngico que predomina en la rizosfera de chontaduro. La prevalencia de *Trichoderma* en la rizosfera de chontaduro en Citronela, aún bajo condiciones contrastantes de precipitación, sugiere una interacción sinérgica hongo-hospedante. Esto es producto de una

interacción entre las raíces de las plantas, sus exudados y los estímulos de la comunidad microbiana que favorece un ambiente dinámico en la rizosfera (Barea et al., 2005; citados en Riascos-Ortiz, Donald et al. 2011: p. 5).

La rizosfera de algunas plantas está dominada por especies fúngicas no patógenas, como sugiere Alexander (1994), siendo *Trichoderma* uno de los principales géneros (Whipps, 2001; Manoharachary et al., 2006; citados en Riascos-Ortiz, Donald et al. 2011: pp. 6 - 9).

En ambas localidades presentaban la mayor diversidad fúngica, es posible que los cambios fisiológicos debidos al llenado de los frutos afectaron de forma positiva a la calidad y cantidad de exudados radiculares liberados por las raíces (Souza-Mota et al., 2003; Drigo et al., 2009; citados en Riascos-Ortiz, Donald et al. 2011: pp. 6 -9).

Según Bardgett (2005) y Manoharachary et al. (2006) estos compuestos tienen un efecto selectivo sobre los microorganismos presentes en la zona rizosférica, lo que favorece el establecimiento y la actividad de los hongos encontrados. De igual manera, esta condición puede estimular la presencia de comunidades microbianas, principalmente de hongos formadores de micorrizas arbusculares, los cuales han sido encontrados en asociación con palmas chontaduro cultivadas en los mismos sistemas de producción en la región Pacífica de Colombia (Moliner-Hurtado, 2007; citados en Riascos-Ortiz, Donald et al. 2011: pp. 6 -9).

Los géneros fúngicos identificados *Fusarium*, *Rhizopus*, *Penicillium* y *Thielaviopsis* han sido asociados a la rizosfera de otras especies vegetales de interés agrícola, alimentario y ambiental (Souza-Mota et al., 2003; Tariq et al., 2008; citados en Riascos-Ortiz, Donald et al. 2011: pp. 6 -9).

Es posible que, en los sistemas de producción de chontaduro estudiados, estos hongos tengan un papel benéfico ya que no se encontraron síntomas de enfermedad, contraría, su acción benéfica se traduce en crecimiento de la planta, desarrollo y protección contra problemas fitosanitarios (Orduz y Rangel, 2002; Barea et al., 2005; Yedidia y Chet, 1999; Baker y Dickman, 1995; citados en Riascos-Ortiz, Donald et al. 2011: pp. 6 -9).

Es posible que la población de *Penicillium* contribuya de forma similar a la de *Trichoderma*, teniendo en cuenta su capacidad para producir antibióticos útiles para el control de patógenos del suelo (Baker y Dickman, 1995; citados en Riascos-Ortiz, Donald et al. 2011: pp. 6 -9).

En el caso de *Fusarium*, no todas las especies son patógenas, ya que existen evidencias de su actividad antagonista o saprofita en la rizosfera (Barnett y Hunter, 1972; Whipps, 2001; citados en Riascos-Ortiz, Donald et al. 2011: pp. 6 -9).

Además, *Rhizopus* (Agrios, 2005) y *Thielaviopsis* (Mora et al., 1997) presentan actividades similares a las de *Fusarium*, además de su participación en actividades de ciclaje de nutrientes (Alexander, 1994) en el agroecosistema chontaduro.

2.6 Extractos vegetales y bioproductos como alternativas sustentables para el manejo de pudrición de frutos de chonta (*Bactris gasipaes*)

2.6.1 Extractos vegetales como alternativas sostenibles

Los extractos de vegetales son mezclas complejas con numerosos compuestos que se pueden obtener de fuentes naturales mediante procesos físicos, químicos o microbiológicos y se pueden utilizar en todos los ámbitos, de una misma planta se obtienen diferentes extractos con distintos principios activos. Además, depende del solvente utilizado para extraer la parte particular de la planta. El alcohol disuelve las sustancias activas liposolubles en ciertas partes de la planta. Los extractos de hierbas difieren no solo en el solvente primario utilizado, sino también en los pasos de preparación utilizados. La extracción de plantas vegetales con solventes primarios inicialmente proporciona extractos convencionales crudos o sin procesar. Sin embargo, si este extracto crudo se procesa aún más mediante un paso de purificación, es decir, para eliminar ciertos fitoquímicos indeseables o para ajustar la concentración de los ingredientes activos clave requeridos, el rendimiento se reducirá, a diferencia del extracto crudo (García-Mateo, 2021: pp. 213-228).

Debido a la necesidad de encontrar una nueva alternativa natural para controlar las plagas de insectos y así reemplazar los pesticidas sintéticos, los extractos de plantas parecen tener las ventajas de ser de origen biológico, ser degradables y tener impactos negativos mínimos en la salud humana y el medio ambiente. El uso de plantas que son consideradas malezas es una fuente económica y muy importante para la obtención de extractos vegetales con actividad antimicrobiana. En nuestro país la información sobre este tema es limitada, especialmente en lo que se refiere a extractos de plantas para combatir microorganismos fitopatógenos (Guerrero R., et al. 2021; pp. 5-6).

Los insecticidas naturales a partir de extractos de plantas representan una interesante alternativa para el control de insectos, además de que muy pocas plantas han sido evaluadas frente a la fuente natural que ofrece el planeta, por lo que las perspectivas de futuras investigaciones son aún mayores. Debido a la necesidad de encontrar una nueva alternativa natural para controlar las plagas de insectos y así sustituir a los plaguicidas sintéticos, están surgiendo insecticidas botánicos que son a la vez respetuosos con el medio ambiente y una opción agronómica eficaz. Alternativamente, los productos naturales de una gran variedad de plantas actúan inhibiendo,

repele, ahuyentando o matando insectos plaga de varios tipos (rastreros, voladores, chupadores, caducifolios, etc.) y también estimulan los procesos vitales de la planta para fortalecerse y así protegerse del ataque de diversas plagas. Algunas de estas plantas han sido estudiadas científicamente, mientras que otras siguen siendo legendarias (Celis, Álvaro et al. 2008; pp. 100-101).

La mayoría de las especies de plantas utilizadas en la protección de plantas presentan un efecto insecticida más que insecticida, es decir, inhiben el desarrollo normal de los insectos. Pueden hacerlo de varias formas: Reguladores del crecimiento. Un efecto que se manifiesta de diferentes formas. Por un lado, existen moléculas que inhiben la metamorfosis, evitando que se produzca en el momento adecuado. Otros compuestos hacen que el insecto sufra una metamorfosis temprana y, por lo tanto, se desarrolle en un momento desfavorable. También se ha observado que determinadas moléculas pueden alterar la función de las hormonas que regulan estos mecanismos, de forma que aparecen insectos deformes, estériles o muertos. Inhibidores nutricionales. Este es el modo de acción más estudiado de los compuestos vegetales como insecticidas (Celis, Álvaro et al. 2008; pp. 100-101).

Un inhibidor de la alimentación es un compuesto que, después de un breve ensayo, hace que el insecto deje de alimentarse y muera de hambre. Muchos de los compuestos que muestran esta actividad pertenecen al grupo de los terpenos y se han aislado principalmente de plantas medicinales nativas de África y la India, el uso de plantas como repelentes es muy antiguo, pero se ha prestado poca atención a su desarrollo. Esta práctica se realiza con compuestos olorosos o irritantes como los chiles y el ajo. Un ejemplo se puede ver en las prácticas que realizan los nativos costarricenses que rocían con chiles los recipientes en los que almacenan el maíz y el frijol para evitar que se infesten de plagas. Numerosos compuestos químicos ocurren naturalmente y actúan como insecticidas hasta cierto punto. Su efecto protector varía desde la repelencia, la inhibición de la alimentación y la oviposición, hasta la toxicidad aguda y la interferencia con el crecimiento y desarrollo de los insectos (Celis, Álvaro et al. 2008; pp. 100-101).

Los insecticidas para plantas tienen la ventaja de ser compatibles con otros agentes aceptables de control de insectos de bajo riesgo, como feromonas, aceites, jabones, hongos entomopatógenos, depredadores y parasitoides, lo que aumenta considerablemente sus posibilidades de ser incluidos en un programa de manejo integrado de plagas. Entre los compuestos aislados de plantas utilizadas con fines insecticidas, se distingue la rotenona, extraída de *Derris elliptica* y *Lonchocarpus utilis*, y es un flavonoide extraído, respectivamente, al 13% y al 5% de las raíces de estas plantas. Este compuesto es un insecticida y repelente de contacto y oral. Su mecanismo de acción implica la inhibición del transporte de electrones a nivel mitocondrial, bloqueando así

la fosforilación de ADP a ATP. Por ello, actúa inhibiendo el metabolismo del insecto. Los síntomas que presentan los insectos envenenados con rotenona incluyen disminución del consumo de oxígeno, depresión respiratoria y ataxia, que provocan convulsiones y finalmente provocan parálisis y muerte del insecto debido a un paro respiratorio (Celis, Álvaro et al. 2008; pp. 100-101).

2.6.2 *Bioproductos como alternativas sostenibles*

Los bioproductos o bioinsumos son productos obtenidos a partir de organismos vivos o sus derivados tales como hongos, bacterias, material vegetal, enzimas u otros, que mediante el uso de herramientas biotecnológicas permiten cubrir un amplio espectro de prestaciones durante mucho tiempo delegadas en la agricultura particularmente a productos obtenidos artificialmente mediante síntesis química. Lo que se pretende con los primeros es que los mismos efectos de los segundos se produzcan de manera “natural”, propendiendo a una relación más íntimamente relacionada con los principios de la vida misma. El normal desempeño de la naturaleza supone un estado de equilibrio entre sus principales componentes (Mamani, A. y Filippone, M.P, 2018: pp. 9-21).

En lo que conocemos como biósfera esa porción del planeta en la que ocurren los fenómenos de la vida, es fundamental que los procesos bioquímicos y físicos, propios de los organismos que lo habitan dispongan de los nutrientes que necesitan y sean capaces de transformar y reutilizar todo lo que ellos mismos u otros producen. Es lo que expresa el concepto de “biodegradabilidad”. Así como los gases pesados de origen fósil terminan intoxicando la atmósfera, muchas de las moléculas que los productos de síntesis química agregan a las plantas, al suelo o al agua terminan obstaculizando o impidiendo su natural procesamiento y conduciendo en definitiva a las muchas variantes—más o menos graves de lo que llamamos contaminación (Mamani, A. y Filippone, M.P, 2018: pp. 9-21).

La adopción y uso eficaz de bioproductos va imponiéndose actualmente como una de las tecnologías clave para asegurar la sustentabilidad y la productividad de la agricultura. La sustentabilidad en primer lugar, porque su práctica a lo largo de 10.000 años ha ido erosionando los recursos naturales esenciales para los procesos biológicos que la hacen posible; y la productividad por la persistente necesidad de alimentar a una masa humana que sigue creciendo (Mamani, A. y Filippone, M.P, 2018: pp. 9-21).

Esto ha llevado al estudio de los múltiples mecanismos utilizados por agentes de control biológico (ACB) para controlar el crecimiento, desarrollo e infección por organismos fitopatógenos de varios cultivos económicamente importantes, entre estos mecanismos: a) mecanismos de contacto como el hiperparasitismo y la depredación; b) producción de compuestos de bajo peso molecular

con efecto directo sobre el crecimiento del patógeno antibióticos (fenazinas, 2,4-diacetilfloroglucinol, lipopéptidos cíclicos), enzimas líticas (quitinasas, glucanasas, proteasas), productos de desecho no regulados (amoníaco, dióxido de carbono , cianuro de hidróxido) y c) mecanismos indirectos impulsados por la competencia por espacio y nutrientes (consumo de filtrado- exudados, producción de sideróforos, inducción de una respuesta sistémica de las plantas a través de la producción de fitohormonas y patrones moleculares). Estos mecanismos de acción se han observado en cepas microbianas utilizadas como ACB, entre las cuales el género *Bacillus* es ampliamente estudiado por su alta abundancia y diversidad en los agrosistemas (suelo, agua y plantas), mientras que su población es mucho mayor en comparación con otros géneros de microbios, y también por sus diferentes capacidades metabólicas, destacando su capacidad para producir antibióticos y otros metabolitos antimicrobianos y antifúngicos (Villarreal-Delgado, María Fernanda et al., 2018; pp. 98-101).

Por ejemplo, diversos estudios moleculares han revelado que un porcentaje significativo del genoma de cepas del género *Bacillus* está asociado a la producción de metabolitos secundarios asociados al control de fitopatógenos, es decir 8,5 y 4% del genoma de las cepas FZB42 de *B. amyloliquefaciens* y *B. subtilis* 168, respectivamente (Villarreal-Delgado, María Fernanda et al., 2018; pp. 98-101).

Se ha demostrado que una amplia variedad de especies del género *Bacillus* tienen actividad antagonica contra diversos microorganismos fitopatógenos de cultivos agrícolas, como maíz, arroz, frutales y otros. El estudio de esta capacidad de *Bacillus* comenzó con el descubrimiento de la actividad insecticida de las proteínas Cry producidas por *B. thuringiensis*; Actualmente, diversas especies del género *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens* y *B. licheniformis*) son ampliamente estudiadas para reducir la incidencia de enfermedades de importancia agrícola. Entre las principales formas en que estas cepas previenen la aparición y desarrollo de organismos fitopatógenos se encuentran varios mecanismos que incluyen: A) liberación de antibióticos, B) sideróforos, C) enzimas líticas, D) toxinas y E) inducción de resistencia sistémica de las plantas. (NII) (Villarreal-Delgado, María Fernanda et al., 2018; pp. 98-101).

Las especies de *Trichoderma* predominan en los ecosistemas terrestres (bosques o suelos agrícolas), tienen bajos requerimientos de nutrientes, pero tienen un rango de temperatura relativamente amplio para su crecimiento (25–30°C). Además, son altamente adaptables a las condiciones ecológicas, crecen saprofitamente, interactúan con plantas y animales y se desarrollan en una variedad de sustratos, lo que facilita su producción masiva en la agricultura. Por lo tanto, estudiar la diversidad de especies de *Trichoderma* en diferentes hábitats naturales

puede ampliar nuestro conocimiento sobre sus contribuciones biotecnológicas y su importancia ecológica y agrícola (Hernández-Melchor et al., 2019; pp. 100-101).

Varias especies de este género pueden estar asociadas o endógenamente asociadas con la rizosfera de las plantas y, por lo tanto, pueden promover el crecimiento y desarrollo de las plantas a través de la producción de auxinas y giberelinas. También produce ácidos orgánicos (ácido glucónico, ácido fumárico, ácido cítrico) para bajar el pH del suelo y facilitar la solubilización de fosfatos, magnesio, hierro y manganeso, que son esenciales para el metabolismo de las plantas. Además, este género fúngico es importante para las plantas ya que contribuye al control de hongos fitopatógenos, porque tienen propiedades micoparasitarias y antibióticas. Este hongo toma nutrientes de hongos parásitos y materia orgánica y ayuda a descomponerlos. Añadir materia orgánica y compost favorecerá su crecimiento (Hernández-Melchor et al., 2019; pp. 100-101).

Las propiedades antagonicas de *Trichoderma* contra hongos patógenos se basan en la activación de múltiples mecanismos, incluida la competencia por nutrientes y espacio, micoparasitismo, antibióticos, promoción del crecimiento de las plantas e inducción de respuestas de defensa de las plantas. Durante el micoparasitismo, *Trichoderma* secreta una enzima que hidroliza la pared celular del hongo parasitador. Las más conocidas son las proteasas, quitinasas y glucanasas, que provocan la contracción de la membrana plasmática y el desmontaje del citoplasma. También inhiben la germinación de esporas y la elongación del tubo germinativo. Se han estudiado los efectos de varias especies de *Trichoderma* en el control biológico de enfermedades en cultivos agrónomicamente importantes como tomates (*Solanum lycopersicum*), arroz (*Oryza sativa*), maíz (*Zea mays*) y trigo (*Triticum* sp.) (Hernández-Melchor et al., 2019; pp. 100-101).

2.7 Identificación molecular

En los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas de tipificación molecular basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que han supuesto importantes avances en el estudio de las enfermedades infecciosas. La técnica estándar de oro para la identificación de bacterias o hongos es la secuenciación de regiones de ADN con suficiente variabilidad para discriminar una especie de otra. Entre los segmentos más comúnmente amplificados y posteriormente secuenciados se encuentran los genes ribosómicos (16S en el caso de procariotas y 18S en el caso de eucariotas), los espacios entre el acervo génico ribosómico (espacios intergénicos IGS) y los espacios transcritos internos (ITS) del conjunto de genes ribosómicos (Palomino, C. et al. 2014: pp. 535-546).

Cuando los microorganismos a estudiar están muy relacionados, se realizan estudios filogenéticos basados, además de las técnicas anteriores, en otras técnicas moleculares, como las basadas en la amplificación de varios genes (Multilocus) o en fragmentos repetidos no codificantes (REP-PCR) (Palomino, C. et. al. 2014: pp. 535-546).

2.8 Métodos de caracterización e identificación de microorganismos fúngicos

2.8.1 Métodos de caracterización

2.8.1.1 Microscopía de luz

La evaluación de la estructura fúngica para la caracterización morfológica se realiza mediante microscopía óptica fotografiada a aumentos de 20x, 40x, 60x (inmersión en aceite) y 100x (inmersión en aceite) y se comprueba el material utilizado para la tinción y montaje, donde la forma y se determina el tamaño de las conidias (Arias, 2008: p.66: citados en Sanmiguel Chimbo, Josue David, 2021: p. 28).

2.8.1.2 Caracterización macroscópica

Se estableció que las características morfológicas (macroscópicas) de los hongos, luego de la incubación y crecimiento visual, toman en cuenta la apariencia de colonias que crecen en diferentes medios de cultivo (Agar Papa Dextrosa, Agar Nutriente, Agar Harina de Maíz, etc.) y características de rendimiento, se determinaron: forma, elevación, bordes, formación de pigmentos, textura, etc.) (Ilustración 2-1) (Estrada y Ramírez (2019: p.93: citados en Sanmiguel Chimbo, Josue David, 2021: p. 28).

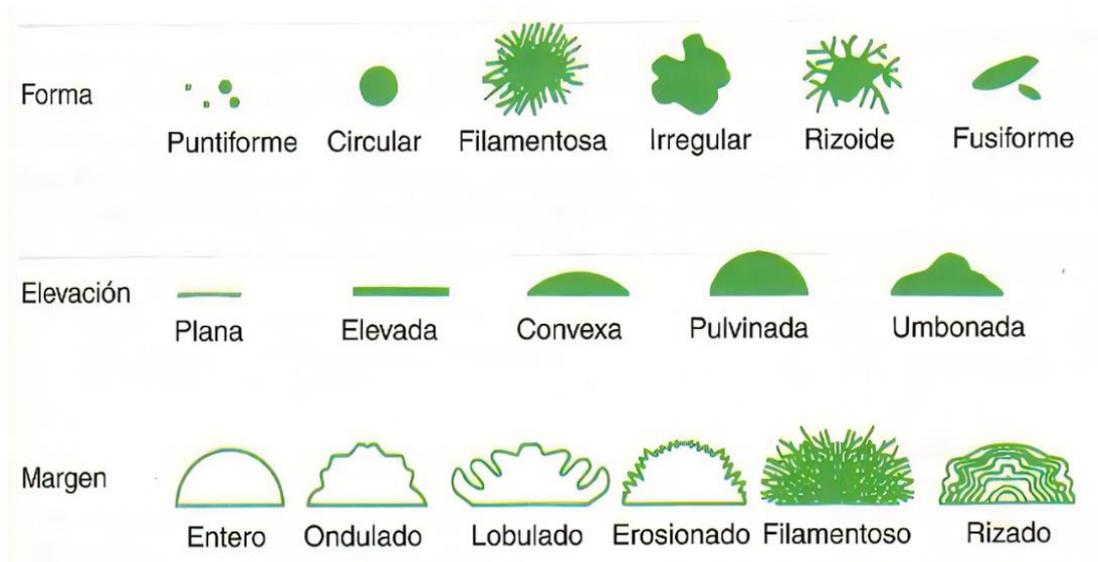


Ilustración 1-2. Morfología y crecimiento de colonias.

Fuente: Madigan, 2009, p. 321.

2.8.1.3 Caracterización microscópica

Estrada y Ramírez (2019: pp.95-96), indican que las características morfológicas (microscópicas) de los hongos, seguidas de incubación, se deben hacer placas de crecimiento de hongos para observaciones microscópicas para determinar las características observadas; además, afirman que las placas están hechas de dos maneras que son:

1) Placa hecha con un punzón:

En condiciones estériles, se coloca una gota de lactoglicerol en un portaobjetos, se toma una pequeña cantidad de lactoglicerol en una pequeña porción del hongo en crecimiento de la placa de Petri con un estilete y se dispersa ligeramente con él, con ayuda de otro estilete tapar con un cubreobjetos y determinar las características morfológicas con ayuda de las características morfológicas se determinan al microscopio, primero con un objetivo de menor aumento y luego con un objetivo de mayor aumento y luego con un objetivo de mayor aumento.

2) Placa realizada con cinta adhesiva:

En condiciones estériles, se quita un trozo de cinta transparente con el pulgar y el dedo anular (la parte adhesiva de la cinta). y los dedos anular (el lado adhesivo de la cinta frente al cultivo fúngico del que se toma la muestra), acercar la cinta al cultivo por el lado adhesivo y ejercer un poco de presión sobre el cultivo con el dedo índice, retirarlo y con ayuda de la otra mano extienda la cinta, péguela bien en un portaobjetos que contenga una gota de lactoglicerol, déjela reposar un minuto

(mientras se tiñen las estructuras) y luego obsérvela al microscopio, primero con el menor aumento objetivo y luego con objetivos de mayor aumento.

3) Placa hecha con cinta adhesiva colocada directamente sobre el tejido vegetal con letreros:

De la muestra de la planta, donde se visualiza el hongo, proceder a retirar la muestra con cinta adhesiva y luego colocarla bien templada sobre un portaobjetos que contenga una gota de azul de lactofenol.

2.8.1.4 Caracterización microscópica por microcultivos

Giraldo y Villa (2016: p.28) Para cada aislamiento fúngico se realiza un microcultivo para registrar las características microscópicas, utilizando la siguiente metodología:

1) Se colocan 2 palos de madera paralelos estériles en una placa de Petri estéril como soporte para 1 portaobjetos estéril. Luego, se corta una porción de medio de cultivo de 1x1 cm con un bisturí estéril y se coloca en el portaobjetos.

2) Luego, se retira un pequeño fragmento del hongo con un asa estéril y se inoculan cuatro puntos en la pieza de agar de 1x1 cm. Se coloca un portaobjetos estéril sobre el agar inoculado y una torunda de algodón humedecida con agua estéril.

3) El microcultivo se incuba durante 3 días a temperatura ambiente. El montaje se realiza en cabina de flujo laminar, donde los portaobjetos de cada microcultivo se colocan individualmente sobre un portaobjetos con una gota de azul de lactofenol y se colocan al microscopio.

4) Se registran datos como ausencia o presencia de septos, pigmentos, peroné, somatogamia, ausencia o presencia de piálidos, clamidosporas, ascas, basidios, esporangios, rizoides, conidióforos y conidios de acuerdo a Barnett y Hunter (1972).

2.8.2 Métodos Moleculares

Más recientemente, está cobrando importancia el uso de métodos basados en la biología molecular, donde se pueden utilizar procedimientos y reactivos para detectar ciertas secuencias de ADN que son específicas de un determinado agente microbiano.

El método que está siendo ampliamente utilizado en los laboratorios de diagnóstico es la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), que generalmente se aplica para la identificación de microorganismos que no pueden ser cultivados por métodos convencionales. A través de este método, la cantidad de ADN se puede aumentar a niveles detectables por electroforesis o sondas de ADN (BOU, Germán, et al., 2011: p. 60).

2.9 Reacción de la cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR se utiliza para sintetizar y amplificar, *in vitro*, secuencias de nucleótidos específicas de las que solo hay un número muy pequeño de copias en una muestra biológica determinada. Fue descrito y nombrado por Mullis et al. en 1987 (aunque el principio general ya había sido establecido por Khorana et al.) Desde entonces, la técnica ha mejorado considerablemente y ha encontrado muchas aplicaciones nuevas. En 1990, en particular, Haase et al. desarrolló la hibridación *in situ*, que combinaba las ventajas y desventajas de la hibridación *in situ* y la PCR, utilizando una suspensión celular, para estudiar el ADN lentiviral (Gerard Morel, y Mireille Raccurt, 2002: p.4).

La PCR es una reacción enzimática en cadena que amplifica una secuencia de ADN específica a partir de una plantilla de ADN determinada. Además del ADN molde, se requieren dos oligonucleótidos o cebadores de aproximadamente 20 nucleótidos de longitud, cuyas secuencias deben complementar al ADN molde. La amplificación se lleva a cabo en presencia de dNTPs como sustrato y la reacción es catalizada por la polimerasa Taq. La secuencia entre las dos regiones complementarias de los cebadores se sintetiza mediante ciclos repetidos que involucran un rango de temperatura, donde el ADN se desnaturaliza, los cebadores se alinean y se produce la polimerización de la secuencia específica o amplicón (Gerard Morel, & Mireille Raccurt, 2002: p.4).

La secuencia sintetizada ahora está disponible como plantilla de ADN. Teóricamente, por cada ciclo que ocurre, la concentración de ADN amplificado se duplica y luego de 30 ciclos, el rendimiento de amplificación para una secuencia específica es de 1×10^9 copias. La PCR logra estos resultados debido a que la reacción en cadena requiere una alineación específica de los dos cebadores con la secuencia complementaria. Una alineación no específica de los cebadores con el ADN molde no provocará un crecimiento exponencial de la secuencia específica, sino una amplificación lineal (Gerard Morel, & Mireille Raccurt, 2002: p.4).

La PCR tiene tres fases: exponencial, lineal y meseta. La fase exponencial se da en la PCR, en la que el producto aumenta exponencialmente siempre que los reactivos no sean limitantes. La fase lineal se caracteriza por un aumento lineal en el producto a medida que los reactivos de PCR se

vuelven limitantes. La PCR eventualmente alcanzará una fase de meseta durante los últimos ciclos y la cantidad de producto no cambia incluso si se usan algunos reactivos (Gerard Morel, & Mireille Raccurt, 2002: p.4).

La región del espaciador transcripcional interno (ITS) se ha utilizado ampliamente para dilucidar las relaciones entre las tasas a niveles intergenéricos e intragenéricos, así como a niveles intraespecíficos en angiospermas. En esta revisión se examina el potencial de la región ITS nrDNA en las gimnospermas, con base en estudios recientes que muestran que, al igual que las angiospermas, este marcador ofrece una resolución adecuada para la inferencia filogenética. También se discuten las ventajas y desventajas relativas de su uso en gimnospermas, dadas sus peculiaridades estructurales (Quijada, G. et al., 1997; pp. 615-617).

La región ITS consta de la subunidad ITS2, 5.8S e ITS1. Las copias de nrDNA en los genomas de las plantas se distribuyen en uno o varios loci cromosómicos llamados Regiones Organizadoras Nucleares (NOR). El número de NOR determina, en cierta medida, la velocidad del proceso de homogeneización. En las angiospermas hay entre uno y dos, mientras que el número de NOR en algunas gimnospermas es de 10 a 12. Las familias de genes repetitivos sufren una rápida homogeneización en su secuencia básica, proceso conocido como coevolución, cuyo principal mecanismo es el cruce y conversión génica desigual. Como resultado, la región ITS es relativamente homogénea dentro del genoma, por lo que se puede decir que una única secuencia caracteriza a un individuo de una determinada especie. La coevolución y la recombinación sexual tienden a promover la uniformidad de STI dentro de los individuos y entre los individuos de las poblaciones, por lo que teóricamente es suficiente muestrear varios individuos para establecer relaciones filogenéticas entre diferentes especies (Quijada, G. et al., 1997; pp. 615-617).

La variación en las secuencias de genes en familias multigénicas y su distribución entre y dentro de las poblaciones está determinada por las tasas de mutación y la influencia de las fuerzas evolutivas (flujo de genes, selección natural, deriva genética y sistemas de apareamiento), que actúan a nivel genético. Sin embargo, el proceso de coevolución, mecanismos genéticos no mendelianos, influye en la variabilidad de las familias multigénicas a nivel molecular. La tasa de homogeneización de unidades repetitivas de nrDNA a través de la coevolución depende del número de copias, el número de loci y cromosomas en los que se encuentran copias de estos genes, la ubicación de los loci en el cromosoma y la tasa de intercambio dentro y entre los cromosomas. Se sabe poco sobre los factores que influyen en la evolución de ITS en las gimnospermas, pero la evidencia encontrada en los pinos sugiere que el número de copias y los loci del nrDNA son más altos que en las angiospermas, por lo que uno esperaría encontrar niveles relativamente bajos de homogeneización. en gimnospermas (Quijada, G. et al., 1997; pp. 615-617).

La región ITS se ha considerado un recurso muy útil para estudios filogenéticos en angiospermas. Hay varias ventajas proporcionadas por el uso de estos marcadores moleculares. Como los ITS están muy representados en el genoma, pueden amplificarse con pequeñas cantidades de ADN. Las secuencias altamente conservadas en la mayoría de los genes nrDNA son extremadamente útiles en el diseño de oligonucleótidos "universales" ("primarios"), que facilitan la amplificación de ITS mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El espaciador interno transcrito es la parte más variada de la región ITS; como flanquean la subunidad 5.8S más conservada, es posible una clara alineación de esta región (Quijada, G. et al., 1997; pp. 615-617).

Una limitación de la utilidad de la ITS en la sistemática angiospermódica es que este locus tiene un número relativamente pequeño de nucleótidos. En las angiospermas, el ITS tiene una longitud de 565 a 700 pares de bases (pb). Como la subunidad 5.8S (163-164 pb) muestra niveles muy bajos de variación de secuencia, solo los 400-535 pb de ITS1 e ITS2 son útiles para la reconstrucción filogenética entre géneros y especies relacionados (Quijada, G. et al., 1997; pp. 615-617).

2.9.1.1 La región ITS como código de barras de los hongos

Cada especie de hongo tiene una región ITS particular, y cuanto más cercana sea la proximidad entre dos hongos, más similar será la secuencia que compone esta región, especialmente en la secuencia 5.8S y más variable en ITS1 e ITS2 (Schoch et al., 2012; citado en Maldonado Bonilla, 2023; p. 7). Las secuencias de la región ITS de dos especies del mismo género son más similares entre sí que las secuencias de dos especies de géneros diferentes, pero las secuencias de dos especies de géneros diferentes de una familia son más similares entre sí que las secuencias de dos especies que son de diferentes géneros, diferentes familias. La diferencia se vuelve más pronunciada cuanto menos relacionadas están las especies, porque más tiempo ha pasado desde el ancestro común hasta el surgimiento de la especie, es decir, su tiempo de divergencia. Esto se refleja en la similitud entre las regiones ITS, lo que llevó a establecer las regiones ITS como el código de barras genético por excelencia de los hongos. Varían en tamaño de 500 a 800 nucleótidos (DeSalle & Goldstein, 2019; citado en Maldonado Bonilla, 2023; p. 7).

2.10 Marcadores moleculares como herramientas en la discriminación de organismos

Los marcadores moleculares son herramientas extremadamente poderosas que complementan las herramientas tradicionales al permitir nuevos enfoques para estudiar y comprender la naturaleza desde diferentes ángulos, basados en el análisis de las diferencias moleculares. Durante décadas, las isoenzimas han sido los marcadores más utilizados en ecología. Sin embargo, ahora es posible

obtener gran cantidad de información para el análisis de patrones y procesos ecológicos a varias escalas espaciales y temporales, como la diversidad genética, la paternidad, el comportamiento animal, la adaptación, etc (Cornejo. A, et al.,2014; pp 14-15).

Se han desarrollado diversas técnicas basadas en el ADN, especiación e interacción. La selección de un marcador apropiado debe considerar la variedad de técnicas, métodos analíticos y otros aspectos prácticos, como el tiempo y el costo de la estandarización, se presentan ejemplos del uso de marcadores en varios campos de investigación como la conservación de especies, filogenia, genética, botánica, estudios de comunidades microbianas, genética de poblaciones, pero especialmente en temas agrícolas y médicos (Cornejo. A, et al.,2014; pp 14-15).

CAPÍTULO III

3. MARCO METODOLÓGICO

3.1 Características del lugar

3.1.1 Localización del laboratorio

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Recursos Naturales de Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

3.1.2 Ubicación geográfica

Longitud: 78° 40' 59'' W

Latitud: 01° 38' 51'' S

Altitud: 2850 m. s. n. m

Fuente: Estación meteorológica ESPOCH, 2021

3.2 Materiales y equipos

3.2.1 Oficina

Computadora, impresora, regla, lápiz, borrador, cuaderno de apuntes, esferos, papelería en general, tijera, regla, internet, marcadores de doble punta.

3.2.2 Laboratorio

3.2.2.1 Material biológico

Tabla 3-2: Colección de hongos filamentosos de aislados de frutos de chonta (*Bactris gasipaes*) utilizadas en el estudio.

Género	Colector	Código	Provincia	Cantón	Comunidad	Año
<i>Geotrichum</i> sp.	Rodrigo Guangasi	HATUN-002	Pastaza	Santa Clara	Jatun Atahualpa	2019
<i>Rhizopus</i> sp.	Rodrigo Guangasi	PUMA-001	Pastaza	Santa Clara	Pueblo Unido	2019
<i>Penicillium</i> sp.	Rodrigo Guangasi	SANCRISBL- 001	Pastaza	Santa Clara	San Cristobal	2019

<i>Fusarium</i> sp.	Rodrigo Guangasi	HATUN-003	Pastaza	Santa Clara	Jatun Atahualpa	2019
<i>Ceratocystis</i> sp.	Rodrigo Guangasi	SANCRISVT- 001	Pastaza	Santa Clara	San Cristobal	2019
<i>Mucor</i> sp.	Rodrigo Guangasi	SANCRISVT- 006	Pastaza	Santa Clara	San Cristobal	2019

Realizado por: Panimbosa, J., 2023

3.2.2.2 Materiales

Cajas Petri de vidrio (90 mm Ø), botellas de vidrio tapa roscable (500 mL y 1000 mL), palillos, sorbetes, puntas para micropipetas de 10, 100 y 1000 µL, gradilla para puntas, papel film, jeringas (10 mL), vasos de precipitación (100 mL), probeta (500 mL), papel absorbente, guantes, cinta masking, papel de aluminio, gafas, microtubos (1,5 mL y 200 µL), rack de microtubos, papel aluminio, fundas plásticas transparente, fundas zipper, cinta, tarrinas, morteros, pistilos, cucharas plásticas, palillos, sorbetes, papel film, puntas para micropipetas (10 µL, 100 µL y 1000 µL).

3.2.2.3 Reactivos

Agua destilada estéril, alcohol al 70%, medio de cultivo Papa dextrosa agar al 3.9% (PDA Difco™), Sabouraud Glucosado Agar al 6% (SGA NEOGEN), etanol, alcohol (70%), sulfato de estreptomicina, chloramphenicol, agua ultrapura estéril, cloroformo alcohol isoamílico (24:1), isopropanol frio, master Mix, 2X (Go Taq® Green), DNA Ladder Bench Top 100 pb (PROMEGA), agua ultrapura estéril, Kit de extracción de ADN (PROMEGA Wizard® Genomic DNA), LE Agarosa (Cleaver Scientific CSL-AG 100), 10X BlueJuice™ Gel Loading Buffer (Invitrogen). primers (EXXTEND), Nuclei Acid Staining Solution (UniSafe Dye) y Tris-Borate-EDTA Buffer (SIGMA).

3.2.3 Principios activos utilizados

Tabla 1-3: Listado de ingredientes activos y nombres comerciales que fueron utilizados.

Nombre comercial	Ingrediente activo	Concentración del ingrediente activo
Bh.B	Extracto de tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>)	80 %
Timorex Gold	Aceite de árbol de té (<i>Melaleuca alternifolia</i>)	223 g/L
Maestro SL	Quitosan Oligosacarina	1,7 %

ARMORY (Producto 1)	<i>Bacillus subtilis</i>	4,8 x 10 ⁹ UFC /g
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	4,1 x 10 ⁹ UFC /g
	<i>Bacillus</i> sp.	4,3 x 10 ⁹ UFC /g
	Materia orgánica	70%
BIOHEALTH TH BS	<i>Trichoderma</i>	9000000 UFC/g
WSG (Producto 2)	<i>Bacillus</i>	18000000 UFC/g
	Extractos húmicos	58%
	Potasio (K ₂ O)	5%
	Extracto de algas	2,3%
	Manitol	2,7%
	Alginato	12%
Fungicida		
TACORA	Tebuconazol	430 g/L

Realizado por: Panimbosa, J., 2023

3.2.4 Equipos

Cámara de flujo laminar (OASIS 48) , auto clave (BIOBASE BKQ-B100II), Destilador de agua (BOECO WS 8000), Incubadora (J.P. SELECTA 2001249), Balanza de precisión (RADWAG AS220.R2), Secador de vidrio (SELECTA 200038), Microondas (PANASONIC 900W), Cámara fotográfica (CANNON), Micropipeta (Eppendorf), Calibrador digital (VERNIER), Balanza de precisión (RADWAG AS220.R2), secador de vidrio (SELECTA 200038), refrigeradora (Durex), ultracongelador (BIOBASE BDF-40V450), microondas (Panasonic 900w), incubadora, destilador de agua (BOECO WS 8000), cámara de flujo laminar vertical (BIOBASE BSC-1500IIA2-X), autoclave (BIOBASE BKQ-B100II), termo-bloque, vortex (QILINBEIER QL-901), centrifuga (EPPENDORF 5424), bioespectrofotómetro (EPPENDORF Basic), termociclador (EPPENDORF Vapo.protect), cuba electroforesis (FISHER SCIENTIFIC FB-SB-710), fuente de poder para electroforesis (FISHER SCIENTIFIC FB300) y transiluminador UV (FISHER SCIENTIFIC 88A).

3.3 Metodología para la determinar de efecto biológico

Se utilizaron dos metodologías: la primera basada la determinación del efecto biológico para los hongos de: *Ceratocystis*, *Mucor*, *Geotrichum*, *Fusarium* y *Rhizopus* se utilizó la metodología de crecimiento micelial; la segunda basada la germinación de esporas para el hongo *Penicillium*.

3.3.1 Cálculos para determinar las concentraciones de los productos biológicos a usar en las pruebas de efecto biológico

Para la obtención de la solución madre se realizó de acuerdo a la concentración de los principios activos de cada producto biológico, se muestran a continuación los cálculos:

Cálculo de extracto de tomillo (*Thymus vulgaris*) – 30%:

1% 10 000 ppm
30 % ? = 300 000 ppm

Luego de conseguir la concentración inicial se determinó el volumen del producto biológico de tal manera se obtiene la solución stock en un volumen de 10 mL, se trabajó con la fórmula propuesta por Descroizilles (Bueno et al, 1824; citado en Dialnet, 2018, pp. 185-203):

$$C_i * V_i = C_f * V_f$$

$$V_i = \frac{C_f * V_f}{C_i}$$

$$V_i = \frac{50\,000\text{ ppm} * 10\text{ ml}}{300\,000\text{ ppm}} = 1,66\text{ ml de producto biológico}$$

Dónde:

C_i = Concentración inicial

V_i = Volumen inicial

C_f = Concentración final

V_f = Volumen final

Inmediatamente ya conocida la cantidad de producto biológico para la solución stock, se procede a establecer la cantidad de solvente a utilizar, para lo cual:

$$V_T = V_f + V_s$$

$$10\text{ mL} = 1,66\text{ mL} + V_s$$

$$V_s = 10\text{ mL} - 1,66\text{ mL}$$

$$V_s = 8,34\text{ mL de agua destilada estéril}$$

Dónde:

VT = Volumen total

Vf = Volumen del fungicida

Vs = Volumen del solvente

La solución obtenida es la solución stock; es decir, que su concentración está a 100 ppm y para obtener dosis más pequeñas se realizó la dilución de esta, es decir:

100 ppm = 9,67 mL de agua destilada estéril y 0,33 mL de la solución stock.

10 ppm = 9 mL de agua destilada estéril y 1 mL de la solución 100 ppm.

1 ppm = 9 mL de agua destilada estéril y 1 mL de la solución 10 ppm.

0,1 ppm = 9 mL de agua destilada estéril y 1 mL de la solución 1 ppm.

0,01 ppm = 9 mL de agua destilada estéril y 1 mL de la solución 0,1 ppm.

0 ppm = control

3.3.2 Enmendado del medio de cultivo y ensayo del crecimiento micelial

Para proceder al enmendado del medio se basó en la metodología de Salazar et al, (2012, p. 57), se dispuso 49,5 mL de PDA y 49,5 mL de SGA en un vaso de precipitación, luego se colocó con la micropipeta 500 μ L de la solución de producto biológico de las dosis preparadas, donde se realizó 3 repeticiones por cada dosis, excepto el control en el que solo se colocó medio sin fungicida en cada caja.

3.3.3 Crecimiento micelial

Para el crecimiento micelial de los aislados de *Fusarium* sp., *Rhizopus* sp., *Ceratocystis* sp., *Mucor* sp., *Geotrichum* sp., y *Penicillium* sp., se obtuvieron discos de micelio de 5,13 mm de diámetro con ayuda de sorbetes y se colocaron discos de micelio en las cajas con medio de cultivo enmendado con cada dosis del producto biológico. Las mismas que fueron etiquetadas, selladas con plástico film y llevadas a la incubadora en condiciones de obscuridad a temperatura 25 ± 2 °C hasta que el testigo llenó la caja por completo.

Los datos de crecimiento del micelio de los hongos *Fusarium* sp., *Rhizopus* sp., *Ceratocystis* sp., *Mucor* sp., *Geotrichum* sp., y *Penicillium* sp., se midieron en milímetros (mm) cada 24 h, en los ejes x (ecuatorial) e y (polar) con ayuda de un calibrador digital, y fueron registrados en una matriz de Excel previamente preparada.

3.3.4 Tasa de crecimiento micelial (TCM)

Para la determinación de la TCM de *Fusarium* sp., *Rhizopus* sp., *Ceratocystis* sp., *Mucor* sp., *Geotrichum* sp., y *Penicillium* sp., frente a cada principio activo se tomaron los datos de la medida final (mm) del crecimiento micelial dividido para el número de días que tardó el hongo en llenar la caja Petri del tratamiento control (dosis 0).

$$TCM = \frac{\text{Medida final}}{\text{Número de días}}$$

Fuente: Benítez et al., 2007.

3.3.5 Germinación de esporas

Se realizó el cultivo de *Penicillium* en medio PDA incubado en condiciones de obscuridad a una temperatura de 25 ± 2 °C. En la cabina de flujo laminar se colocó 3 mL de agua destilada estéril en las cajas con medio PDA esporuladas y se procedió a remover suavemente con una espátula de Drigalsky para que se desprendan las esporas del medio de cultivo, obteniendo una suspensión de esporas.

Conjuntamente se preparó tarinas plásticas donde se colocó papel toalla estéril. Además, en cada placa porta objetos se dibujó un círculo con ayuda del lápiz de cera para vidrio y dentro de este se colocó 10 µL de la suspensión de esporas y 10 µL de la solución del producto biológico, luego se colocó la placa en el interior de la tarina con el papel toalla humedecido y se etiquetó según la repetición, dosis y producto, posteriormente se llevó a la incubadora a 25 ± 2 °C por 18 h.

Al finalizar el tiempo, se retiraron las cajas con las placas y en cada una de ellas se aplicó 10 µL de lactoglicerol para detener la germinación. Los datos de germinación se obtuvieron de la cuantificación de 100 esporas germinadas. se consideró una espora germinada aquella que presentó el tamaño de hifa germinativa fuera el doble del tamaño de la espora.

3.3.6 Estimación de la concentración letal 50 (CL₅₀)

De las mediciones del diámetro de la colonia en los ensayos de crecimiento micelial de los hongos y dosis, se realizó la determinación de la Concentración letal 50 mediante la librería EC50 estimator del programa Rstudio.v.4.2.1. Para la estimación de la concentración letal 50 (CL₅₀), de las mediciones del diámetro de la colonia en los ensayos de crecimiento micelial, se usó para

calcular el crecimiento o germinación relativa al testigo por cada dosis de fungicida y por cada aislamiento y calculó usando la regresión de los valores de la inhibición de crecimiento micelial versus el log 10 de la concentración de los productos (Bueno et al, 1824; citado en Dialnet, 2018, pp. 185-203).

3.3.7 Rango de efecto biológico

Para la estimación del rango de efecto biológico se utilizó la escala propuesta por Liu, J. et,al (2020).

Tabla 3-4: Rango de efecto biológico a hongos asociados a pudrición de frutos de chonta (*Bactris gasipaes*).

Efecto biológico	Rango
Muy sensible	<10 µg/ml
Sensible	10-20 µg/ml
Moderadamente resistentes	20-100 µg/ml
Resistencia alta	100-500 µg/ml
Muy alta resistencia	> 500 µg / ml

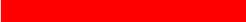
Fuente: Liu, J. et,al (2020)

Realizado por: Panimbosa, J., 2023

3.3.8 Clasificación toxicológica de los productos

Se usó la clasificación de la toxicidad de los plaguicidas según el valor de inhibición sobre el crecimiento de colonias propuesto en Viñuela et al (1993, p.18) que indica que cuando el porcentaje de inhibición de crecimiento es <30% se lo considerara como inofensivo, de 30 a 75% es ligeramente tóxico, de 75 a 90% moderadamente tóxico y mayor a 90% es toxico. Además, se utilizó gráficos de barras para evidenciar los resultados.

Tabla 3-5: Clasificación toxicológica de los productos

Clasificación de la OMS según Peligro	Clasificación del peligro	Color de la banda
Ia - Sumamente peligroso	Muy Tóxico	
Ib- Muy Peligroso	Tóxico	
II- Moderadamente Peligroso	Nocivo	
III- Poco Peligroso	Cuidado	
IV Productos que normalmente no ofrecen peligro		

Fuente: Ulibarry, 2019, p.1

Realizado por: Panimbosa, J., 2023

3.3.9 Metodología

3.4 Identificación molecular

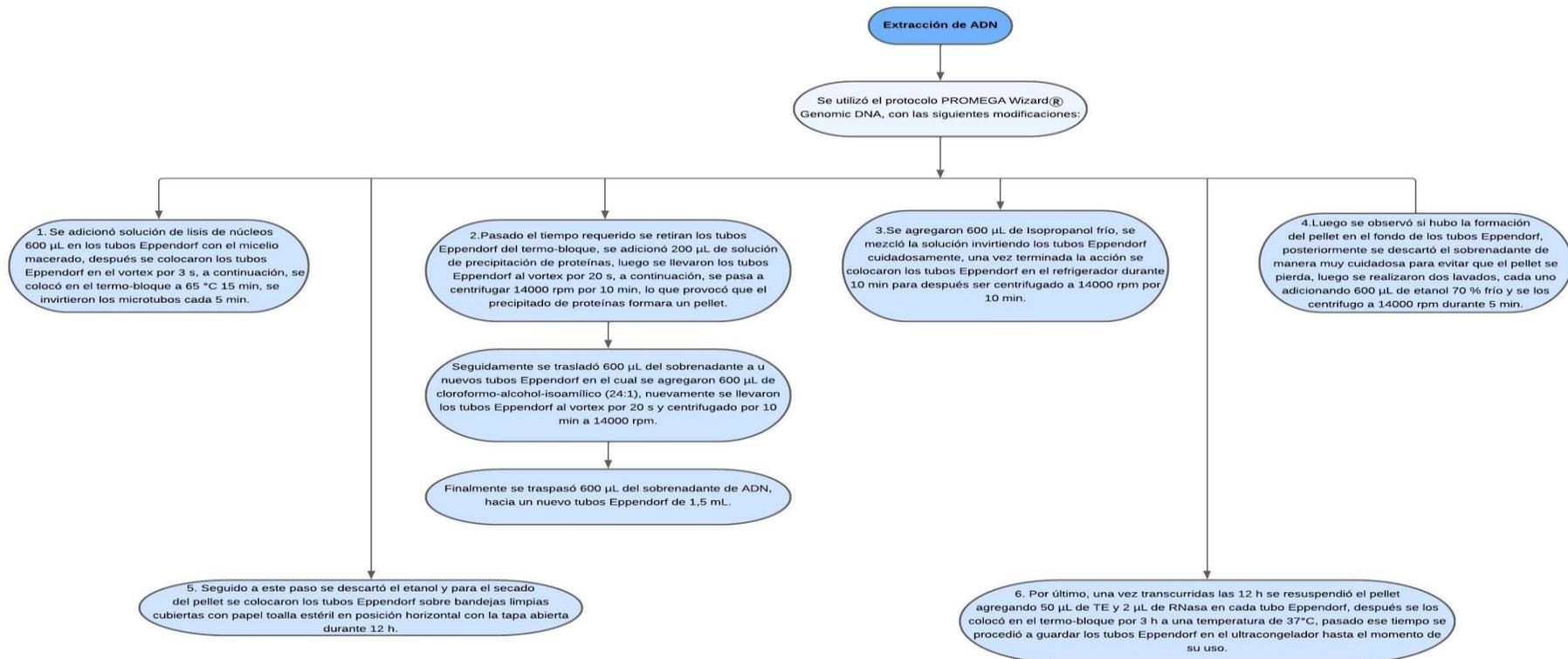


Ilustración 1-3: Protocolo de extracción de ADN

Fuente: PROMEGA (2020)

Realizado por: Panimbosa, J., 2023

3.4.1.1 PCR

Se utilizó la metodología de ampliación en cadena del ADN con los iniciadores ITS1 e ITS4 (Tabla 3-3), para la identificación molecular de los aislados.

Tabla 3-6: Primers usados para PCR.

Código	Secuencia
ITS 1	5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3'
ITS 4	5'-TCCTCCGCTTATTGATARGC-3'

Fuente: White, T. J. et al., 1990

Realizado por: Panimbosa, J., 2022.

Reactivos y cantidades usadas para la reacción de PCR:

- 6,25 µL de Master Mix, 2X Go Taq® Green
- 1 µL (1 pmol) primer (ITS 1)
- 1 µL (1 pmol) primer (ITS 4)
- 2,25 µL de agua ultrapura estéril
- 2 µL (ng / µL) de ADN

Dando un volumen total de 12,5 µL.

Perfil térmico usado para la amplificación por PCR

Desnaturalización inicial 96 °C durante 90 s, y 40 ciclos de las condiciones, 96 °C durante 35 s (desnaturalización), 52 °C durante 55 s (anelamiento), 72 °C durante 70 s (extensión) y finalmente se realizó una última extensión a 72 °C durante 10 min, en el termociclador (Aguilar et al., 2018: p.50).

3.4.1.2 Electroforesis

Se usó un gel del 1% de agarosa al cual se le adicionó 5 µL de un agente intercalante (Nuclei Acid Staining Solution UniSafe Dye), se utilizó la cuba electroforesis (FISHER SCIENTIFIC FB-SB-710), seguido de Tris borato EDTA Buffer (TBE) a una concentración del 10%.

Corrido de la electroforesis con un voltaje de 80 v durante 60 min. Terminada la electroforesis el gel fue colocado sobre el transluminador UV (FISHER SCIENTIFIC 88A) y se procedió a observar si se amplificó el ADN a través de la formación de bandas.

3.4.1.3 Secuenciación y análisis de las muestras secuenciadas

Las muestras fueron secuenciadas solamente con el primer forward con la tecnología SANGER en la empresa MACROGEN KOREA. Una vez llegadas, con el programa Chromas Technelysium versión 2.6.6 se visualizó los electrofotogramas y se omitió la parte inicial y la parte final se verificó la calidad las secuencias se exportan al formato FASTA y con los archivos FASTA resultantes se hizo un alineamiento mediante el algoritmo BLAST del NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica). Para definir la especie asociado se utilizó los siguientes parámetros: % de identidad, %, de cobertura, e-value y que la especie se repita en todas las comparaciones, la secuencia que mayor % de identidad, cobertura y valor e-value más próximo a 0 se escogió.

CAPÍTULO IV

4. MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1 Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial

4.1.1 Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial de hongos asociados a la pudrición de frutos de chonta (*Bactris gasipaes* Kunth).

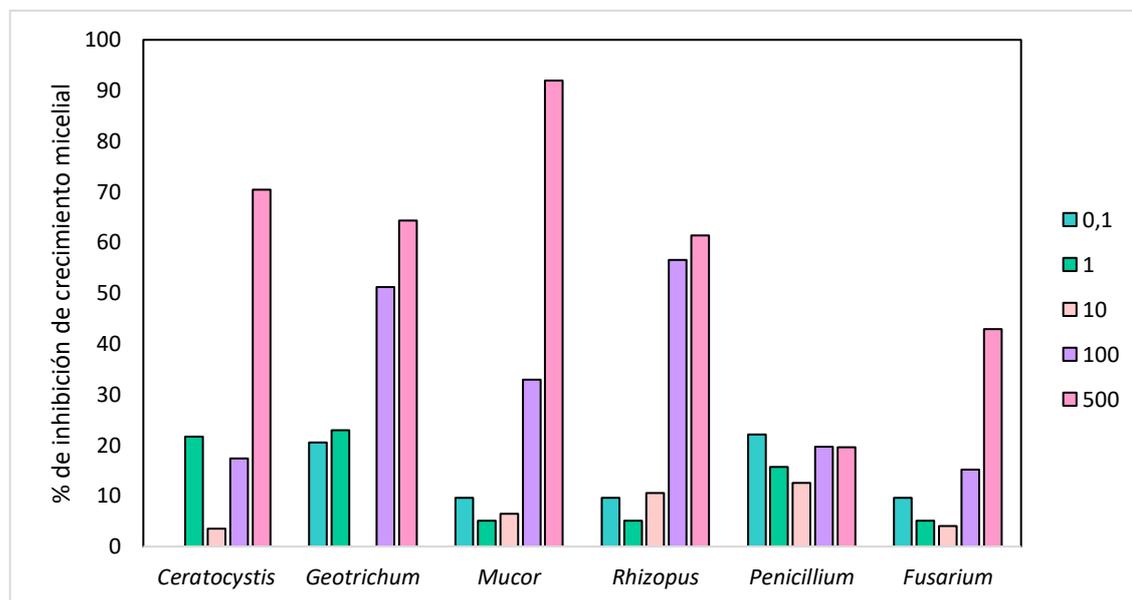


Ilustración 2-4: Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial con extracto de tomillo (*Thymus vulgaris*)

Realizado por: Panimbosa, J., 2023.

Tabla 4-7: Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial de hongos asociados a la pudrición de frutos de chonta (*Bactris gasipaes* Kunth) enmendado con extracto de tomillo (*Thymus vulgaris*).

Cepa	% de inhibición del crecimiento				
	0,1	1	10	100	500
<i>Ceratomyces</i>	0	21,66	3,55	17,38	70,46
<i>Geotrichum</i>	20,56	22,97	0	51,16	64,38
<i>Mucor</i>	9,61	5,1	6,45	32,9	91,95
<i>Rhizopus</i>	9,61	5,07	10,51	56,56	61,4
<i>Penicillium</i>	22,11	15,75	12,54	19,69	19,6
<i>Fusarium</i>	9,61	5,07	4,02	15,2	42,92
Media	11,92	12,60	6,18	32,15	58,45

Realizado por: Panimbosa, J., 2023.

Según la clasificación de toxicidad propuesta por Viñuela et al (1993, p.18), los resultados se clasificaron de la siguiente manera: en la ilustración 4-4 y tabla 4-7, el género *Ceratocystis* presentó en la dosis de 500 ppm una inhibición del 70% ingresó en la categoría como ligeramente tóxico. Para el género *Geotrichum* se presentó en la dosis de 500 ppm una inhibición del 64,38% ingresó en la categoría como ligeramente tóxico, seguida de la dosis 100 ppm una inhibición del 51,16% ingresó en la categoría como ligeramente tóxico. Para el género *Mucor* se presentó en la dosis 500 ppm una inhibición del 91,95% ingresó en la categoría como tóxico. Para el género *Rhizopus* se presentó en la dosis 500 ppm una inhibición del 61,4% ingresó en la categoría como ligeramente tóxico, seguida de la dosis 100 ppm con una inhibición del 56,56% ingresó en la categoría como ligeramente tóxico. Para el género *Penicillium* se presentó en la dosis 0,1 ppm una inhibición del 22,11% que ingresó en la categoría como inofensivo siendo el mayor porcentaje que inhibió el crecimiento micelial. Para el género *Fusarium* se presentó en la dosis 500 ppm una inhibición del 42,92% ingresó en la categoría como ligeramente tóxico.

Tabla 4-8: Test de Tukey al 5% del género *Ceratocystis* con diferentes dosis de extracto de tomillo (*Thymus vulgaris*).

DOSIS	INHIBICIÓN	RANGO DE SIGNIFICANCIA ¹
500	70,446559	a
100	17,388515	b
1	15,872228	b
10	4,470181	bc
0,1	0	c

Realizado por: Panimbosa, J., 2023.

La prueba de Tukey al 5% para CL₅₀ del extracto de tomillo (*Thymus vulgaris*) vs *Ceratocystis* mostró diferencias significativas con un P valor menor a 0,05 (Tabla 4-).

Tabla 4-9: Test de Tukey al 5% del género *Geotrichum* con diferentes dosis de extracto de tomillo (*Thymus vulgaris*).

DOSIS	INHIBICIÓN	RANGO DE SIGNIFICANCIA ¹
500	64,4874442	a
100	51,1530837	ab
1	23,0398278	bc
0,1	20,4167807	bc
10	0,3864096	c

Realizado por: Panimbosa, J., 2023.

La prueba de Tukey al 5% para CL50 del Tomillo vs *Geotrichum* mostró diferencias significativas con un P valor menor a 0,05 (Tabla 4-9).

Tabla 4-10: Test de Tukey al 5% del género *Rhizopus* con diferentes dosis de extracto de tomillo (*Thymus vulgaris*).

DOSIS	INHIBICIÓN	RANGO DE SIGNIFICANCIA ¹
500	61,347606	a
100	56,497307	a
10	10,385511	b
0,1	9,48633	b
1	4,971453	b

Realizado por: Panimbosa, J., 2023.

La prueba de Tukey al 5% para CL50 del Tomillo vs *Rhizopus* mostró diferencias significativas con un P valor menor a 0,05 (Tabla 4-10).

Tabla 4-11: Test de Tukey al 5% del género *Fusarium* con diferentes dosis de extracto de tomillo (*Thymus vulgaris*).

DOSIS	INHIBICIÓN	RANGO DE SIGNIFICANCIA ¹
500	42,820291	a
100	15,093645	b
0,1	9,48633	b
1	6,101215	b
10	4,799701	b

Realizado por: Panimbosa, J., 2023.

La prueba de Tukey al 5% para CL50 del Tomillo vs *Fusarium* mostró diferencias significativas con un P valor menor a 0.05 (Tabla 4-11).

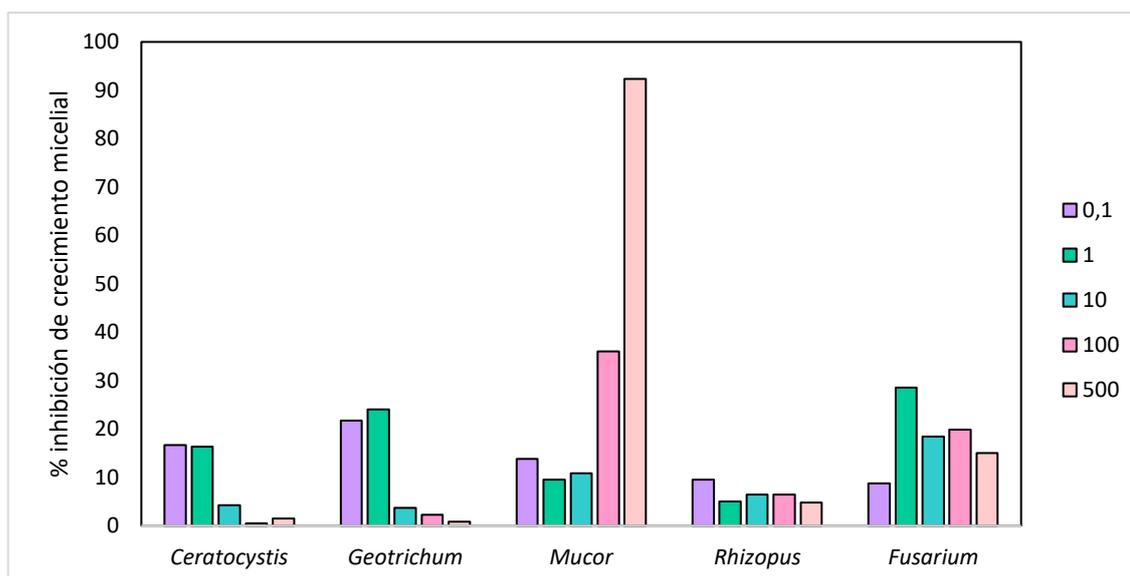


Ilustración 4-5: Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial con producto 2

Realizado por: Panimbosa, J., 2023.

Tabla 4-12: Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial de hongos asociados a la pudrición de frutos de chonta (*Bactris gasipaes* Kunth) enmendado con producto 2.

Cepa	% de inhibición del crecimiento				
	0,1	1	10	100	500
<i>Ceratozystis</i>	16,68	16,37	4,25	0,52	1,53
<i>Geotrichum</i>	21,71	24,09	3,73	2,24	0,84
<i>Mucor</i>	13,82	9,52	10,8	36,02	92,33
<i>Rhizopus</i>	9,57	5,04	6,43	6,43	4,78
<i>Fusarium</i>	8,79	28,54	18,41	19,82	14,98
Media	14,11	16,71	8,72	13,01	22,89

Realizado por: Panimbosa, J., 2023.

En la ilustración 4-5 y tabla 4-12, el género *Ceratozystis* presentó en la dosis de 0,1 ppm una inhibición del 16,68% ingresó en la categoría como inofensivo, siendo la dosis con mayor porcentaje de inhibición de crecimiento micelial. Para el género *Geotrichum* se presentó en la dosis de 1 ppm una inhibición 24,09% ingresó en la categoría como inofensivo siendo la dosis con mayor porcentaje de inhibición de crecimiento micelial. Para el género *Mucor* se presentó en la dosis 500 ppm una inhibición del 92,33% ingresó en la categoría como tóxico, seguida de la dosis 100 ppm con una inhibición del 36,02% ingresó en la categoría como ligeramente tóxico. Para el género *Rhizopus* no superó el 10% de inhibición del crecimiento micelial que ingresó en la categoría en la categoría como inofensivo. Para el género *Fusarium* se presentó en la dosis 1 ppm una inhibición del 28,54% ingresó en la categoría en la categoría como inofensivo.

Tabla 4-13: Test de Tukey al 5% del género *Ceratocystis* con diferentes dosis de producto 2.

DOSIS	INHIBICIÓN	RANGO DE SIGNIFICANCIA ¹
0,1	16,701242	a
1	16,468474	ab
10	4,242403	ab
500	2,861073	ab
100	1,084264	b

Realizado por: Panimbosa, J., 2023.

La prueba de Tukey al 5% para CL50 del producto 2 vs *Ceratocystis* mostró diferencias significativas con un P valor menor a 0,05 (Tabla 4-13).

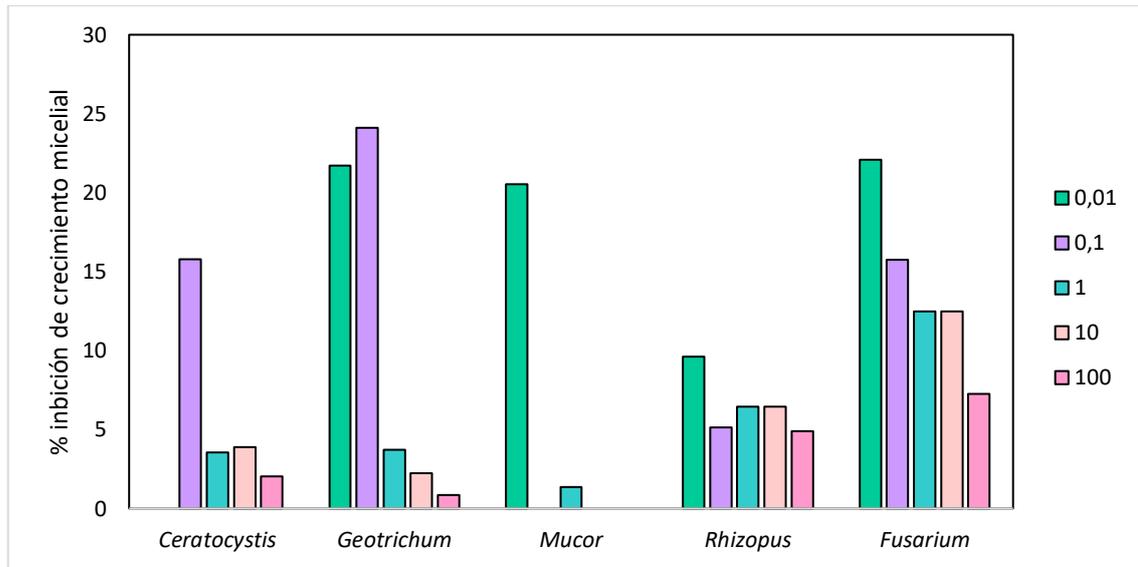


Ilustración 4-6: Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial con quitosán oligosacarina

Realizado por: Panimbosa, J., 2023.

Tabla 4-14: Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial de hongos asociados a la pudrición de frutos de chonta (*Bactris gasipaes* Kunth) enmendado con quitosán oligosacarina.

Cepa	% de inhibición del crecimiento				
	0,01	0,1	1	10	100
<i>Ceratocystis</i>	0	15,78	3,55	3,87	2,02
<i>Geotrichum</i>	21,71	24,09	3,73	2,24	0,84
<i>Mucor</i>	20,53	22,98	1,35	0	0
<i>Rhizopus</i>	9,62	5,15	6,46	6,46	4,9
<i>Fusarium</i>	22,07	15,74	12,49	12,49	7,26
Media	14,79	15,19	5,52	5,01	3,00

Realizado por: Panimbosa, J., 2023.

En la ilustración 4-6 y tabla 4-14, el género *Ceratocystis* presentó en la dosis de 0,1 ppm una inhibición del 15,78% ingresó en la categoría como inofensivo, siendo el mayor porcentaje que inhibió el crecimiento micelial. Para el género *Geotrichum* se presentó en la dosis de 0,1 ppm una inhibición 24,09% ingresó en la categoría como inofensivo. Para el género *Mucor* se presentó en la dosis 0,01 ppm una inhibición del 20,53% ingresó en la categoría como inofensivo. Para el género *Rhizopus* no superó el 10% de inhibición del crecimiento micelial que ingresó en la categoría como inofensivo. Para el género *Fusarium* se presentó en la dosis 0,01 ppm una inhibición del 22,07% ingresó en la categoría como inofensivo.

Tabla 4-15: Test de Tukey al 5% del género *Ceratocystis* con diferentes dosis de quitosan oligosacarina.

DOSIS	INHIBICIÓN	RANGO DE SIGNIFICANCIA ¹
0,1	15,872228	a
1	4,470181	ab
10	3,83575	ab
100	3,352186	ab
0,01	0,00000	b

Realizado por: Panimbosa, J., 2023.

La prueba de Tukey al 5% para CL50 del producto quitosan oligosacarina vs *Ceratocystis* mostró diferencias significativas con un P valor menor a 0,05 (Tabla 4-15).

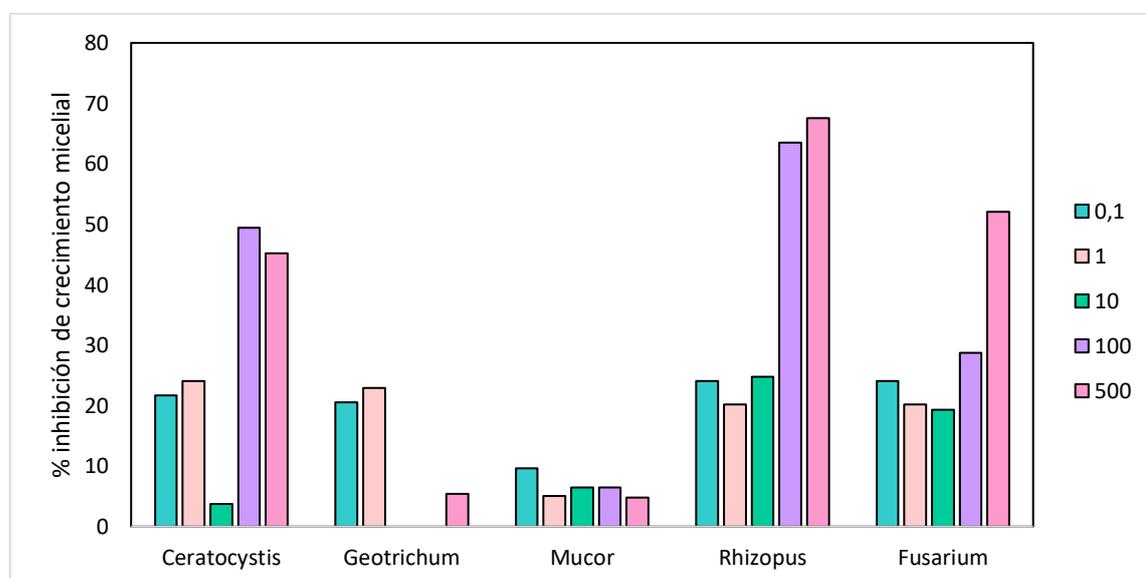


Ilustración 4-7: Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial con aceite de árbol de Té (*Melaleuca alternifolia*)

Realizado por: Panimbosa, J., 2023.

Tabla 4-16: Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial de hongos asociados a la pudrición de frutos de chonta (*Bactris gasipaes* Kunth) enmendado con aceite de árbol de Té (*Melaleuca alternifolia*).

Cepa	% de inhibición del crecimiento				
	0,1	1	10	100	500
<i>Ceratocystis</i>	21,67	24,09	3,75	49,47	45,24
<i>Geotrichum</i>	20,56	22,97	0	0	5,45
<i>Mucor</i>	9,61	5,1	6,45	6,45	4,84
<i>Rhizopus</i>	24,05	20,23	24,8	63,49	67,56
<i>Fusarium</i>	24,05	20,23	19,35	28,74	52,04
Media	19,99	18,52	10,87	29,63	35,03

Realizado por: Panimbosa, J., 2023.

En la ilustración 4-7 y tabla 4-16, el género *Ceratocystis* presentó en la dosis de 100 ppm con una inhibición del 49,47% ingresó en la categoría como ligeramente tóxico, seguida de la dosis 500 ppm con una inhibición del 45,24% ingresó en la categoría como ligeramente tóxico. Para el género *Geotrichum* se presentó en la dosis de 1 ppm una inhibición 22,97% ingresó en la categoría como inofensivo. Para el género *Mucor* no superó el 10% de inhibición del crecimiento micelial qué % ingresó en la categoría como inofensivo. Para el género *Rhizopus* se presentó en la dosis de 500 ppm con una inhibición del 67,5% ingresó en la categoría como ligeramente tóxico, seguida de la dosis 100 ppm con una inhibición del 63,49% ingresó en la categoría como ligeramente tóxico. Para el género *Fusarium* se presentó en la dosis 500 ppm una inhibición del 52,04% ingresó en la categoría como ligeramente tóxico.

Tabla 4-17: Test de Tukey al 5% del género *Ceratocystis* con diferentes dosis de aceite de árbol de Té (*Melaleuca alternifolia*).

DOSIS	INHIBICIÓN	RANGO DE SIGNIFICANCIA ¹
100	49,417947	ab
500	45,229057	ab
1	24,25475	ab
0,1	21,538442	ab
10	3,703833	b

Realizado por: Panimbosa, J., 2023.

La prueba de Tukey al 5% para CL50 del Te versus *Ceratocystis* mostró diferencias significativas con un P valor menor a 0,05 (Tabla 4-17).

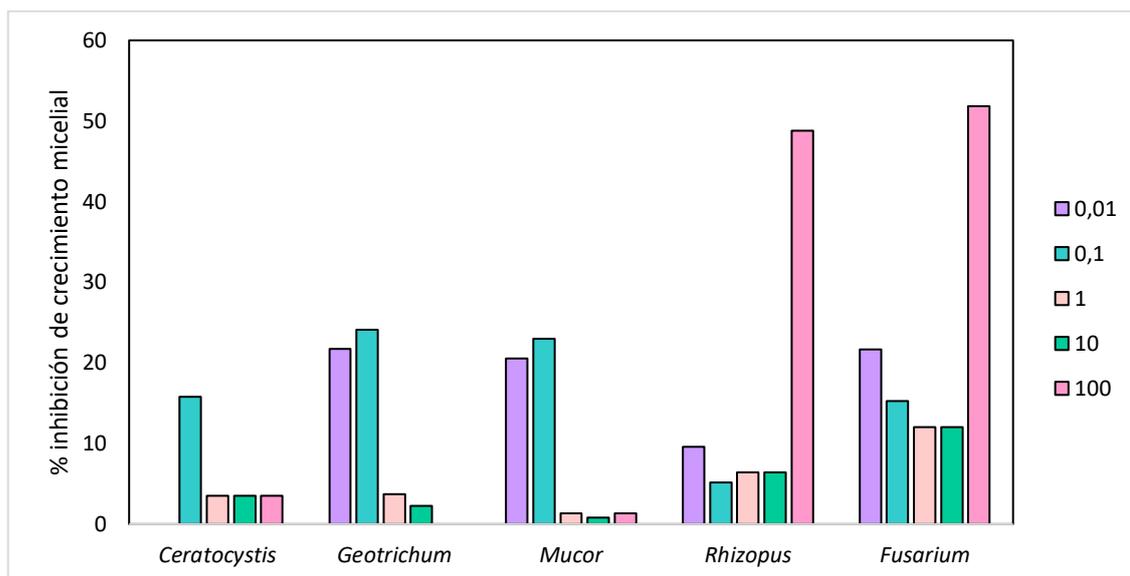


Ilustración 4-8: Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial con *Bacillus*
Realizado por: Panimbosa, J., 2023.

Tabla 4-18: Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial de hongos asociados a la pudrición de frutos de chonta (*Bactris gasipaes* Kunth) enmendado con *Bacillus*.

Cepa	% de inhibición del crecimiento				
	0,01	0,1	1	10	100
<i>Ceratozystis</i>	0	15,78	3,55	3,55	3,55
<i>Geotrichum</i>	21,71	24,09	3,73	2,24	0
<i>Mucor</i>	20,53	22,98	1,35	0,82	1,35
<i>Rhizopus</i>	9,62	5,15	6,46	6,46	48,79
<i>Fusarium</i>	21,66	15,29	12,03	12,03	51,84
Media	14,70	16,66	5,42	5,02	21,11

Realizado por: Panimbosa, J., 2023.

En la ilustración 4-8 y tabla 4-18, el género *Ceratozystis* presentó en la dosis de 0,1 ppm con una inhibición del 15,78% ingresó en la categoría como inofensivo. Para el género *Geotrichum* se presentó en la dosis de 0,1 ppm una inhibición 24,09% ingresó en la categoría como inofensivo. Para el género *Mucor* se presentó en la dosis de 0,1 ppm una inhibición 22,98% ingresó en la categoría como inofensivo. Para género *Rhizopus* se presentó en la dosis de 500 ppm con una inhibición del 48,79% ingresó en la categoría como ligeramente tóxico. Para el género *Fusarium* se presentó en la dosis 500 ppm una inhibición del 51,84% ingresó en la categoría como ligeramente tóxico.

Tabla 4-19: Test de Tukey al 5% del género *Fusarium* con diferentes dosis de *Bacillus*.

DOSIS	INHIBICIÓN	RANGO DE SIGNIFICANCIA ¹
0,1	15,863928	a
1	9,3766	a
10	5,563953	a
100	0,00000	a
500	0,00000	a

La prueba de Tukey al 5% para CL50 de *Bacillus* vs *Fusarium* mostró diferencias significativas con un P valor menor a 0,05 (Tabla 4-19).

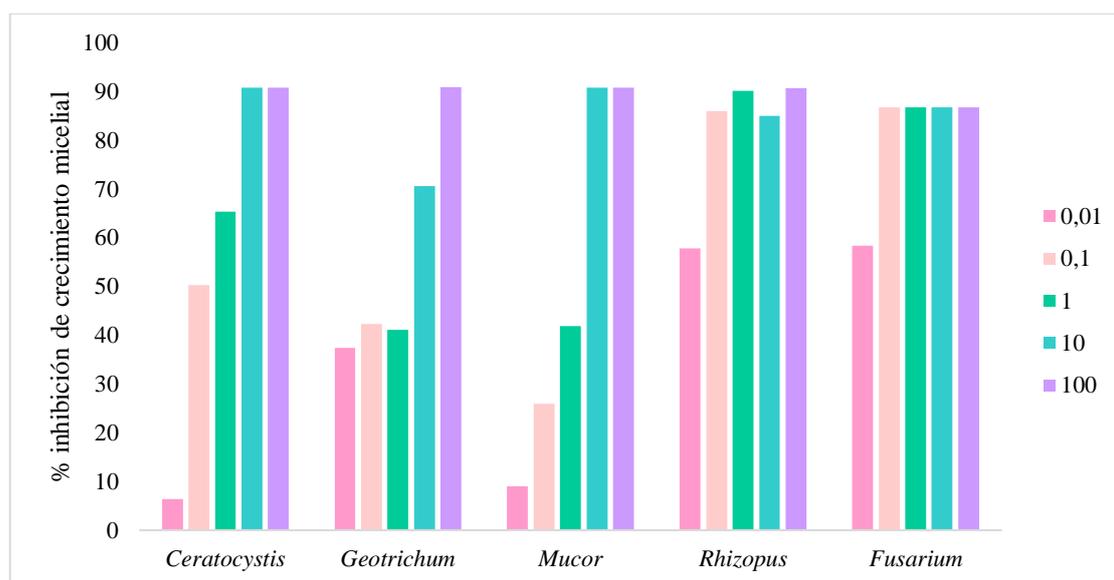


Ilustración 4-9: Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial con tebuconazol

Realizado por: Panimbosa, J., 2023.

Tabla 4-20: Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial de hongos asociados a la pudrición de frutos de chonta (*Bactris gasipaes* Kunth) enmendado con tebuconazol.

Cepa	% de inhibición del crecimiento				
	0,01	0,1	1	10	100
<i>Ceratozystis</i>	6,41	50,30	65,30	90,80	90,80
<i>Geotrichum</i>	37,42	42,35	41,11	70,6	90,88
<i>Mucor</i>	9,02	25,88	41,83	90,8	90,8
<i>Rhizopus</i>	57,82	85,94	90,16	85,05	90,71
<i>Fusarium</i>	58,38	86,76	86,76	86,76	86,76
	33,81	58,25	65,03	84,80	89,99

Realizado por: Panimbosa, J., 2023.

En la ilustración 4-9 y tabla 4-20, el género *Ceratocystis* presentó en la dosis de 0,01 ppm con una inhibición del 26,87% ingresó en la categoría como inofensivo. Para el género *Geotrichum* se presentó en la dosis de 100 ppm una inhibición 90,88% ingresó en la categoría como tóxico. Para el género de *Mucor* se presentó en las dosis de 10 y 100 ppm con una inhibición 90,8% ingresó en la categoría como tóxico. Para género *Rhizopus* se presentó en la dosis de 100 ppm con una inhibición del 90,71% ingresó en la categoría como tóxico, seguida de la dosis 10 ppm con una inhibición del 85,05% ingresó en la categoría como moderadamente tóxico, en la dosis 1 ppm con una inhibición del 90,16% ingresó en la categoría como tóxico, a continuación de la dosis 0,1 ppm con una inhibición del 85,94% ingresó en la categoría como moderadamente tóxico y por último la dosis 0,01 con una inhibición del 57,82% ingresó en la categoría como ligeramente tóxico. Para el género *Fusarium* se presentó en la dosis 100 ppm una inhibición del 86,76% ingresó en la categoría como moderadamente tóxico, seguida de las dosis 0,1; 1 y 10 ppm con una inhibición del 86,76% ingresó en la categoría como moderadamente tóxico y en la dosis 0,01 ppm con una inhibición del 58,38% ingresó en la categoría como ligeramente tóxico.

Tabla 4-21: Test de Tukey al 5% del género *Ceratocystis* con diferentes dosis de tebuconazol.

DOSIS	INHIBICIÓN	RANGO DE SIGNIFICANCIA ¹
10	90,799334	ab
100	90,799334	ab
1	65,717307	b
0,1	50,318897	c
0,01	6,34467	d

Realizado por: Panimbosa, J., 2023.

La prueba de Tukey al 5% para CL50 de Tebuconazol vs *Ceratocystis* mostró diferencias significativas con un P valor menor a 0,05 (Tabla 4-21).

Tabla 4-22: Test de Tukey al 5% del género *Geotrichum* con diferentes dosis de tebuconazol.

DOSIS	INHIBICIÓN	RANGO DE SIGNIFICANCIA ¹
100	90,86917	a
10	70,66333	a
0,1	42,31948	a
1	41,09054	a
0,01	37,3679	a

Realizado por: Panimbosa, J., 2023.

La prueba de Tukey al 5% para CL50 de Tebuconazol vs *Geotrichum* mostró diferencias significativas con un P valor menor a 0,05 (Tabla 4-22).

Tabla 4-23: Test de Tukey al 5% del género *Mucor* con diferentes dosis de tebuconazol.

DOSIS	INHIBICIÓN	RANGO DE SIGNIFICANCIA ¹
10	90,799788	a
100	90,799788	a
1	41,797813	b
0,1	25,834674	c
0,01	8,936871	d

Realizado por: Panimbosa, J., 2023.

La prueba de Tukey al 5% para CL50 de Tebuconazol vs *Mucor* mostró diferencias significativas con un P valor menor a 0,05 (Tabla 4-23).

Tabla 4-24: Test de Tukey al 5% del género *Rhizopus* con diferentes dosis de tebuconazol.

DOSIS	INHIBICIÓN	RANGO DE SIGNIFICANCIA ¹
100	90,70437	a
1	90,12193	a
0,1	85,91297	a
10	84,99912	a
0,01	57,65493	a

Realizado por: Panimbosa, J., 2023.

La prueba de Tukey al 5% para CL50 de Tebuconazol vs *Rhizopus* mostró diferencias significativas con un P valor menor a 0,05 (Tabla 4-24).

Tabla 4-25: Test de Tukey al 5% del género *Fusarium* con diferentes dosis de tebuconazol.

DOSIS	INHIBICIÓN	RANGO DE SIGNIFICANCIA ¹
0,1	86,7813	a
1	86,7813	a
10	86,7813	a
100	86,7813	a
0,01	58,38557	b

Realizado por: Panimbosa, J., 2023.

La prueba de Tukey al 5% para CL50 de Tebuconazol versus *Fusarium* mostró diferencias significativas con un P valor menor a 0,05 (Tabla 4-25).

4.2 Concentración letal (CL₅₀)

4.2.1 Concentración letal 50 (CL₅₀) de extracto de tomillo (*Thymus vulgaris*) para los hongos asociados a pudrición de frutos de chonta (*Bactris gasipaes* Kunth).

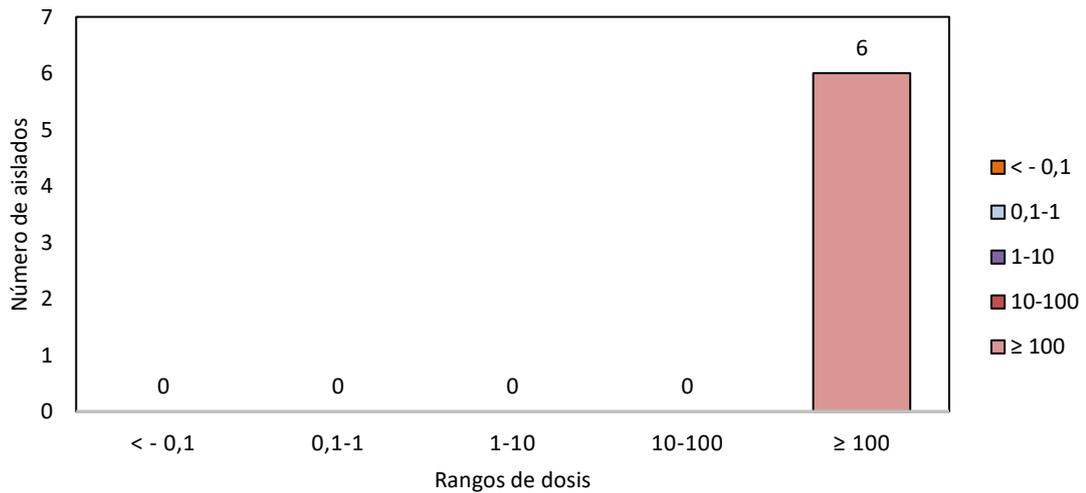


Ilustración 4-10: CL₅₀ de hongos asociados a pudrición de frutos de chonta (*Bactris gasipaes* Kunth) de extracto de tomillo (*Thymus vulgaris*).

Realizado por: Panimbosa, J., 2023.

Las concentraciones letales 50 (CL₅₀) del extracto de tomillo (*Thymus vulgaris*) para los géneros *Ceratocystis*, *Mucor*, *Geotrichum*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Rhizopus* alcanzaron rangos mayores a 100 ppm (Ilustración 4-10).

4.2.2 Concentración letal 50 (CL₅₀) de producto 2 para los hongos asociados a pudrición de frutos de chonta (*Bactris gasipaes* Kunth).

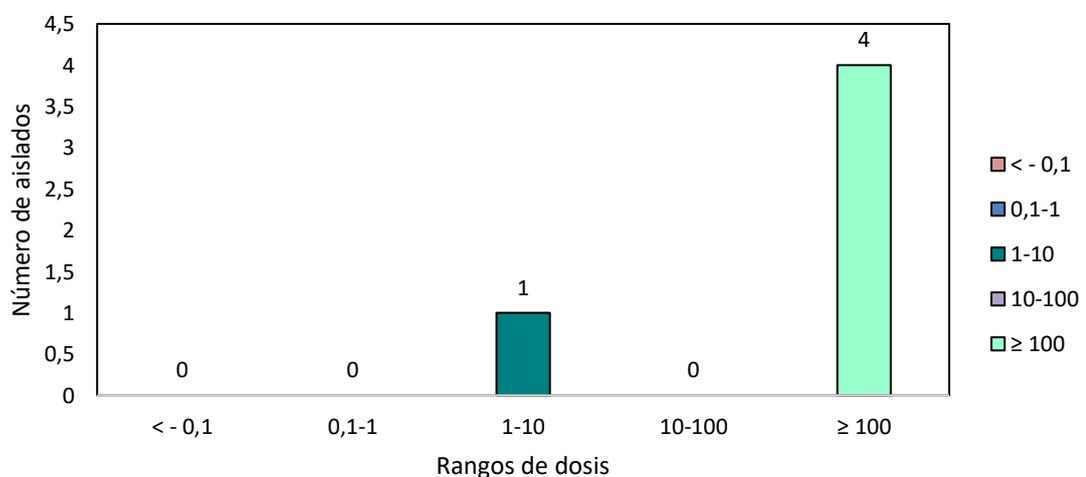


Ilustración 4-11: CL₅₀ de hongos asociados a pudrición de frutos de chonta (*Bactris gasipaes* Kunth) de producto 2.

Realizado por: Panimbosa, J., 2023.

Las concentraciones letales 50 (CL₅₀) del producto 2 para los géneros *Ceratocystis Geotrichum*, *Fusarium* y *Rhizopus* alcanzaron rangos mayores a 100 ppm, en el caso del género *Mucor* los rangos estuvieron entre 1-10 ppm (Ilustración 4-11).

4.2.3 Concentración letal 50 (CL₅₀) de quitosán para los hongos asociados a pudrición de frutos de chonta (*Bactris gasipaes* Kunth).

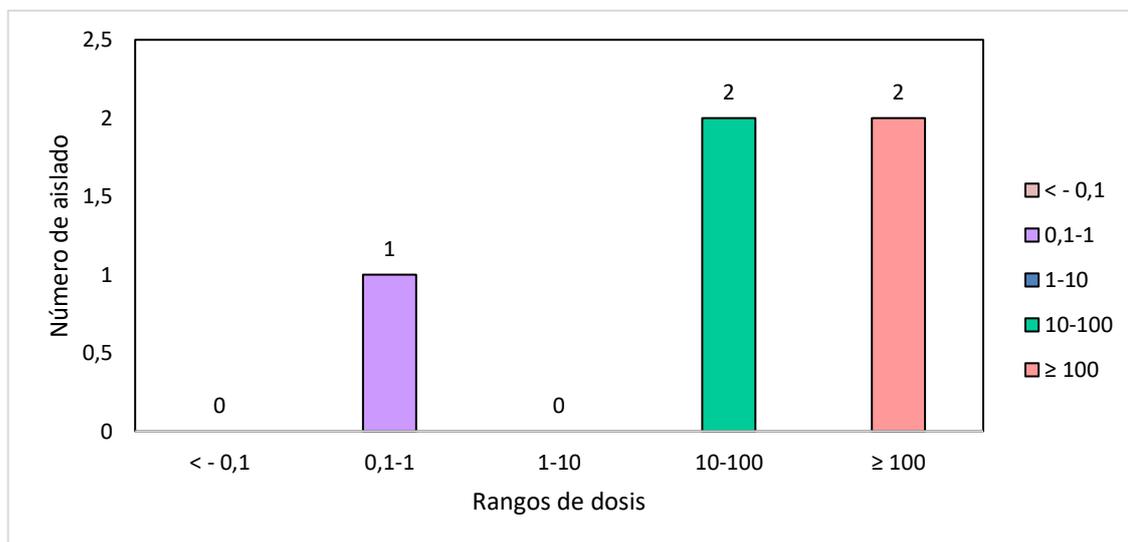


Ilustración 4-12: CL₅₀ de hongos asociados a pudrición de frutos de chonta (*Bactris gasipaes* Kunth) de quitosán.

Realizado por: Panimbosa, J., 2023.

Las concentraciones letales 50 (CL₅₀) del quitosán oligosacarina para los géneros *Ceratocystis* y *Geotrichum*, los rangos estuvieron entre 10 -100 ppm, para los géneros *Fusarium* y *Rhizopus* alcanzaron rangos mayores a 100 ppm y en el caso del género *Mucor* los rangos estuvieron entre 0,1-1 ppm (Ilustración 4-12).

4.2.4 Concentración letal 50 (CL₅₀) de árbol de Té (*Melaleuca alternifolia*) para los hongos asociados a pudrición de frutos de chonta (*Bactris gasipaes* Kunth).

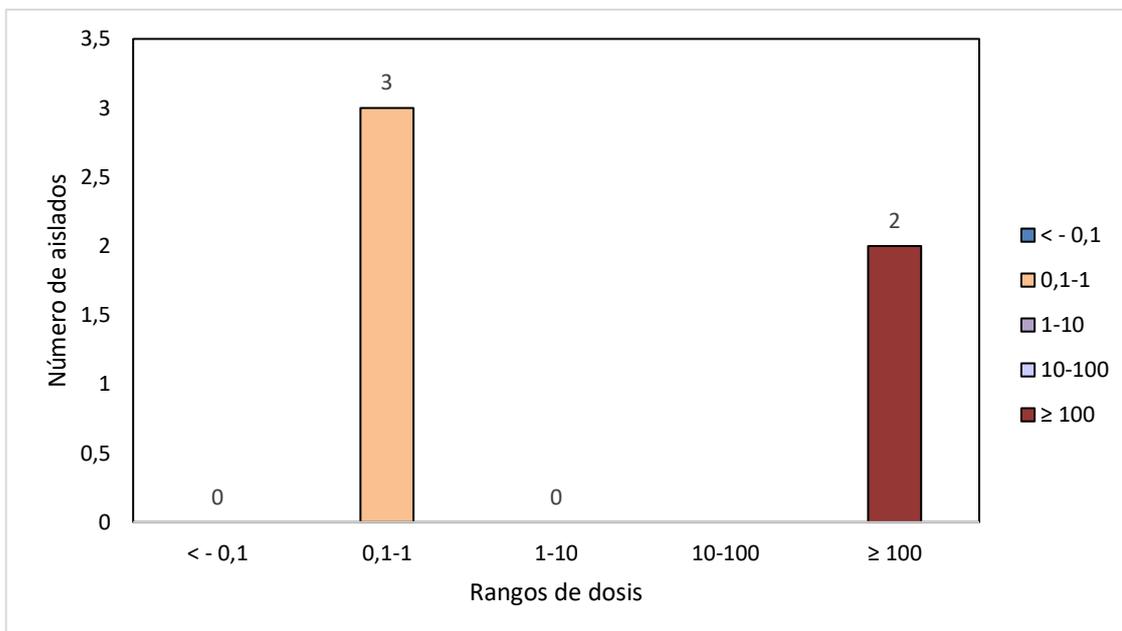


Ilustración 4-13: CL₅₀ de hongos asociados a pudrición de frutos de chonta (*Bactris gasipaes* Kunth) de árbol de Té (*Melaleuca alternifolia*).

Realizado por: Panimbosa, J., 2023.

Las concentraciones letales 50 (CL₅₀) de árbol de Té (*Melaleuca alternifolia*) para los géneros *Geotrichum*, *Fusarium* y *Rhizopus* los rangos estuvieron entre 0,1-1 ppm, en los géneros *Ceratocystis* y *Mucor* alcanzaron rangos mayores a 100 ppm (Ilustración 4-13).

4.2.5 Concentración letal 50 (CL₅₀) de *Bacillus* para los hongos asociados a pudrición de frutos de chonta (*Bactris gasipaes* Kunth).

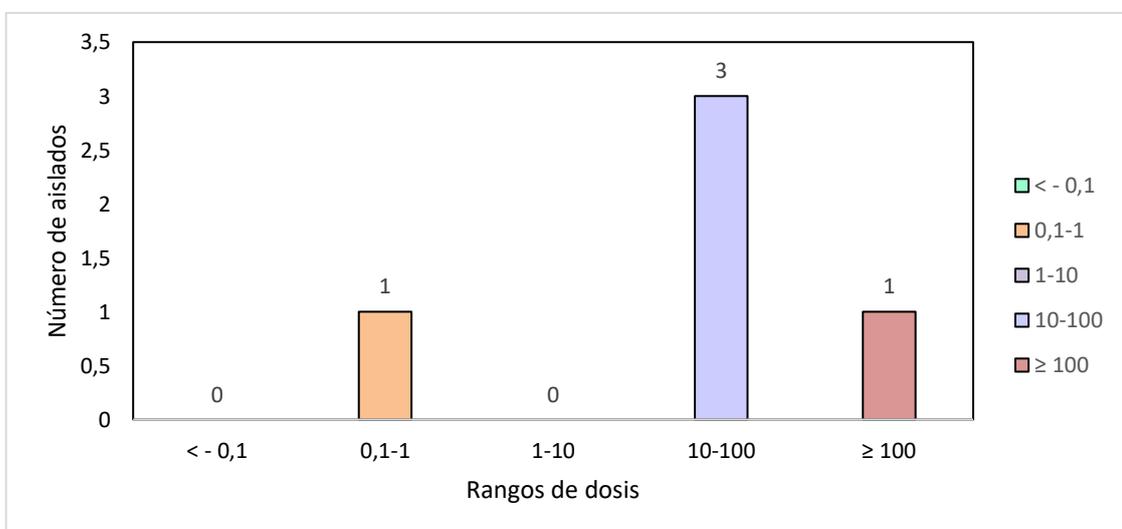


Ilustración 4-14: CL₅₀ de hongos asociados a pudrición de frutos de chonta (*Bactris gasipaes* Kunth) de *Bacillus*.

Realizado por: Panimbosa, J., 2023.

Las concentraciones letales 50 (CL₅₀) de *Bacillus* para el género *Ceratocystis* alcanzó rangos mayores a 100 ppm, para los géneros *Geotrichum*, *Fusarium* y *Rhizopus* los rangos estuvieron 10-100 ppm. Para el género *Mucor* los rangos estuvieron entre 0,1-1 ppm (Ilustración 4-14).

4.2.6 Concentración letal 50 (CL₅₀) de tebuconazol para los hongos asociados a pudrición de frutos de chonta (*Bactris gasipaes* Kunth).

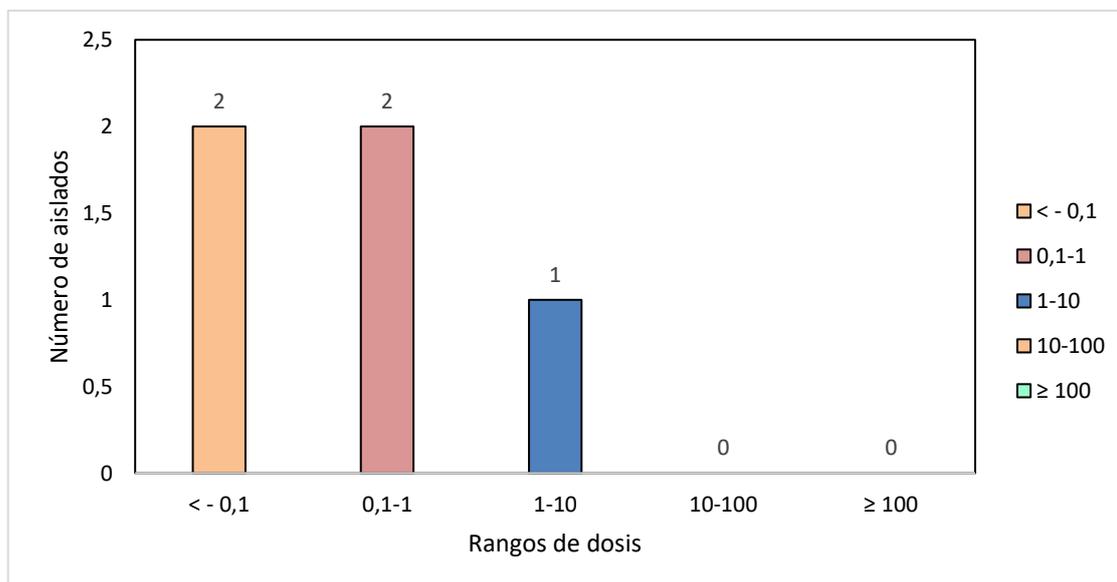


Ilustración 4-15: CL₅₀ de hongos asociados a pudrición de frutos de chonta (*Bactris gasipaes* Kunth) de tebuconazol.

Realizado por: Panimbosa, J., 2023.

Las concentraciones letales 50 (CL₅₀) de tebuconazol para el género *Mucor* los rangos estuvieron entre 1-10 ppm, para los géneros *Ceratocystis* y *Geotrichum* los rangos estuvieron entre 0,1-1 ppm y para los géneros *Fusarium* y *Rhizopus* alcanzaron rangos menores a 0,1 ppm (Ilustración 4-15).

Tabla 4-26: Rango de efecto biológico de los géneros en diferentes productos.

Principio activo	Género	CL ₅₀ (ppm)	Efecto biológico
Extracto de tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>)	<i>Ceratocystis</i>	306,07	Resistencia alta
	<i>Geotrichum</i>	135,46	Resistencia alta
	<i>Mucor</i>	156,68	Resistencia alta
	<i>Rhizopus</i>	132,19	Resistencia alta
	<i>Penicillium</i>	172375716,87	Muy alta resistencia
	<i>Fusarium</i>	404,82	Resistencia alta
Producto 2	<i>Ceratocystis</i>	327,98	Resistencia alta

	<i>Geotrichum</i>	321,90	Resistencia alta
	<i>Mucor</i>	3,88	Muy sensible
	<i>Rhizopus</i>	867414,87	Muy alta resistencia
	<i>Fusarium</i>	1515,56	Muy alta resistencia
Quitosan oligosacarina	<i>Ceratocystis</i>	88,68	Moderadamente resistentes
	<i>Geotrichum</i>	52,70	Moderadamente resistentes
	<i>Mucor</i>	0,36	Muy sensible
	<i>Rhizopus</i>	9859,52	Muy alta resistencia
	<i>Fusarium</i>	731,05	Resistencia alta
árbol de Té (<i>Melaleuca alternifolia</i>)	<i>Ceratocystis</i>	126,74	Resistencia alta
	<i>Geotrichum</i>	0,39	Muy sensible
	<i>Mucor</i>	1034524,91	Muy alta resistencia
	<i>Rhizopus</i>	0,14	Muy sensible
	<i>Fusarium</i>	0,25	Muy sensible
<i>Bacillus</i>	<i>Ceratocystis</i>	111,06	Resistencia alta
	<i>Geotrichum</i>	52,70	Moderadamente resistentes
	<i>Mucor</i>	0,25	Muy sensible
	<i>Rhizopus</i>	54,77	Moderadamente resistentes
	<i>Fusarium</i>	16,47	Moderadamente resistentes
Tebuconazol	<i>Ceratocystis</i>	0,18	Muy sensible
	<i>Geotrichum</i>	0,46	Muy sensible
	<i>Mucor</i>	1,10	Muy sensible
	<i>Rhizopus</i>	0,003	Muy sensible
	<i>Fusarium</i>	0,001	Muy sensible

Realizado por: Panimbosa, J., 2023

Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que las CL_{50} obtenidas mediante la TCM de los hongos asociados a pudrición de frutos de chonta (*Bactris gasipaes*), difieren con cada uno de los principios activos y concentraciones utilizadas, los cuales al ser categorizados según la escala de sensibilidad propuesta por Liu, J. et,al (2020), resultaron de la siguiente manera: al utilizar extracto de tomillo (*Thymus vulgaris*) el género (*Penicillium*) ingresó en la categoría de “Muy alta resistencia” ($> 500 \mu\text{g/mL}$) y cinco géneros (*Ceratocystis*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Fusarium*) ingresaron en la categoría de “Resistencia alta” ($100\text{-}500 \mu\text{g/mL}$); en el caso del producto 2 dos géneros (*Rhizopus*, *Fusarium*) ingresaron en la categoría de “Muy alta resistencia” ($> 500 \mu\text{g/mL}$); con respecto al quitosan oligosacarina, el género (*Rhizopus*) ingresó en la categoría “Muy alta resistencia” ($> 500 \mu\text{g/mL}$), el género (*Fusarium*) ingresó en la categoría de "Resistencia alta" ($100\text{-}500 \mu\text{g/mL}$), seguido de dos géneros (*Ceratocystis*, *Geotrichum*) ingresaron en la categoría "Moderadamente resistentes" ($20\text{-}100 \mu\text{g/mL}$) y el género (*Mucor*) ingresó en la categoría "Muy sensible" ($< 10\mu\text{g/mL}$); en tanto que para el árbol de Té (*Melaleuca alternifolia*) el género (*Mucor*) ingresó en la categoría "Muy alta resistencia" ($> 500 \mu\text{g/mL}$), tres géneros (*Ceratocystis*, *Rhizopus*, *Fusarium*) ingresaron en la categoría "Resistencia alta" ($100\text{-}500 \mu\text{g/mL}$) y el género (*Geotrichum*) ingresó en la categoría "Muy sensible" ($< 10\mu\text{g/mL}$); por otro

lado, con relación a *Bacillus* el género (*Ceratozystis*) ingresó en la categoría de "Resistencia alta" (100-500 µg/mL), tres géneros (*Geotrichum*, *Rhizopus*, *Fusarium*) ingresaron en la categoría "Moderadamente resistentes" (100-500 µg/mL) y finalmente, en el caso de tebuconazol los cinco géneros (*Ceratozystis*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Fusarium*) ingresaron en la categoría "Muy sensible" (< 10µg/mL) (Tabla 4-26).

4.3 Germinación de esporas

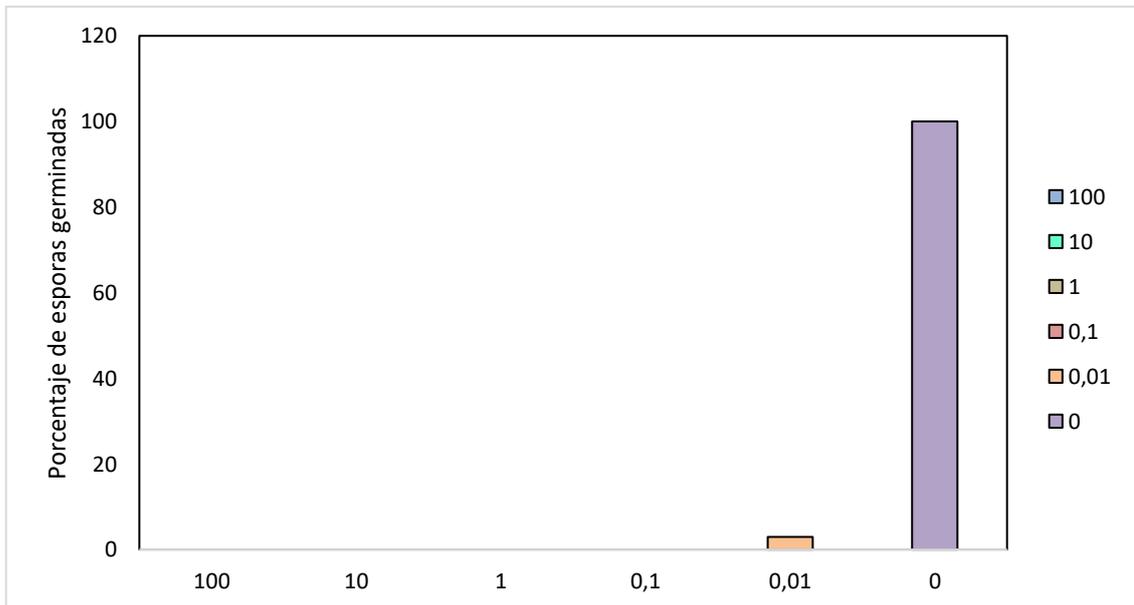


Ilustración 4-16: Porcentaje de germinación de esporas de *Penicillium* en diferentes dosis de producto 2.

Realizado por: Panimbosa, J., 2023.

Penicillium frente al producto 2, presentó 3 esporas germinadas en la dosis 0,01 ppm, con inhibición del 97% y en las dosis (0,1; 1; 10; 100 ppm) la inhibición fue del 100% (Ilustración 4-16),

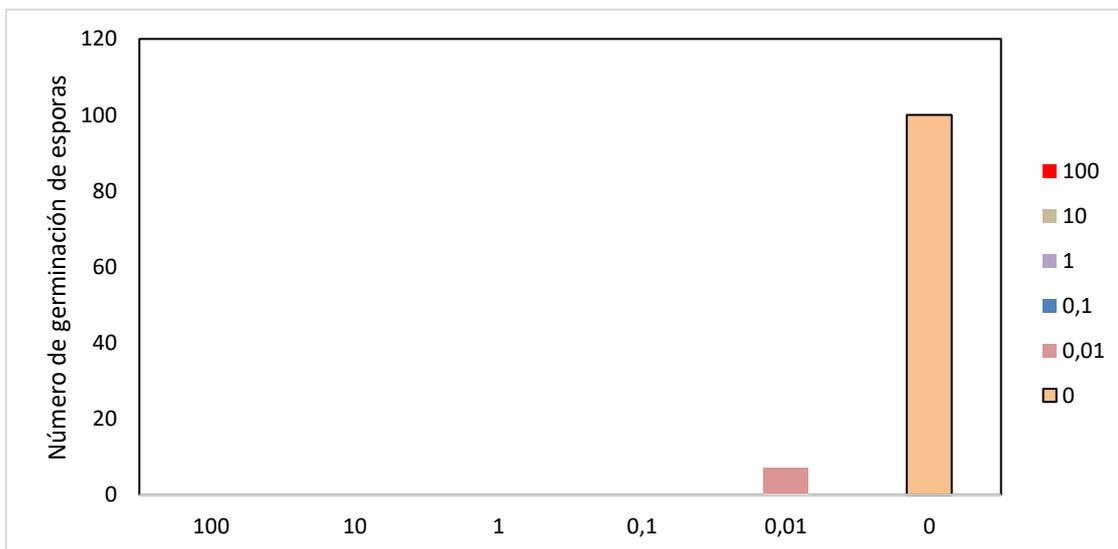


Ilustración 4-17: Porcentaje de germinación de esporas de *Penicillium* en diferentes dosis de Aceite de árbol de Té (*Melaleuca alternifolia*)

Realizado por: Panimbosa, J., 2023.

Penicillium frente a Aceite de árbol de Té (*Melaleuca alternifolia*) presentó 7 esporas germinadas en la dosis de 0,01 ppm con una inhibición del 93 % y en las dosis (0,1; 1; 10; 100 ppm) la inhibición fue del 100% (Ilustración 4-17).

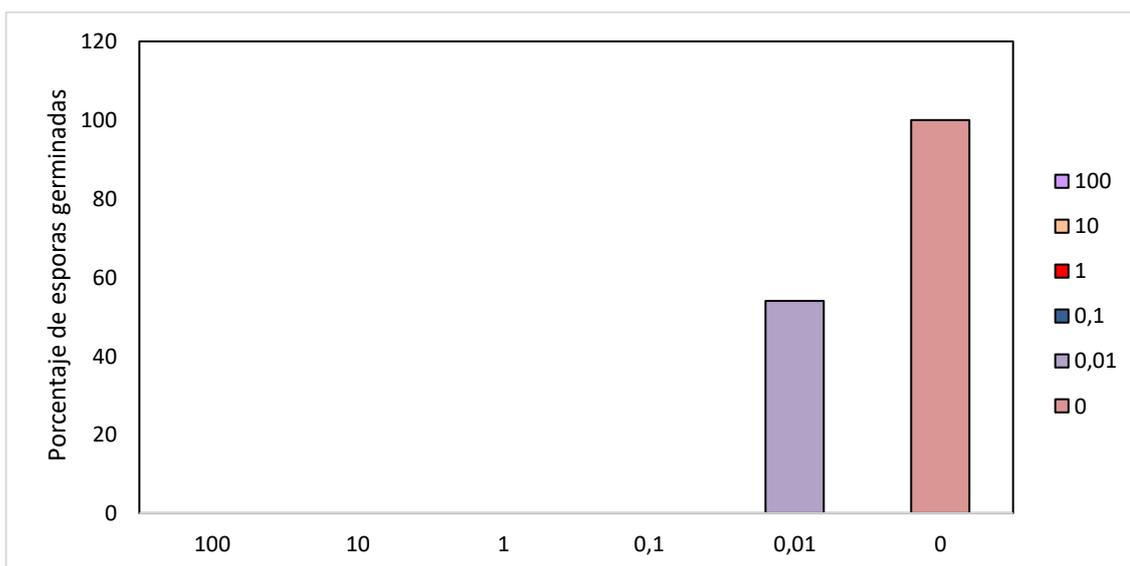


Ilustración 4-18: Porcentaje de germinación de esporas de *Penicillium* en diferentes dosis de quitosán oligosacarina.

Realizado por: Panimbosa, J., 2023.

de *Penicillium* frente a quitosán oligosacarina presentó 54 esporas germinadas en la dosis de 0,01 ppm con una inhibición del 46% y en las dosis (0,1; 1; 10; 100 ppm) la inhibición fue del 100% (Ilustración 4-18).

Tabla 4-27: Test de Tukey al 5% con diferentes dosis de quitosan oligosacarina.

Dosis	Sin germinar	Rango de significancia ¹
0,1	100	a
1	100	a
10	100	a
100	100	a
0,01	0	b

Realizado por: Panimbosa, J., 2023.

La prueba de Tukey al 5% para CL50 de producto Quitosan oligosacarina vs *Ceratocystis* mostró diferencias altamente significativas con un P valor menor a 0,05 (Tabla 4-27).

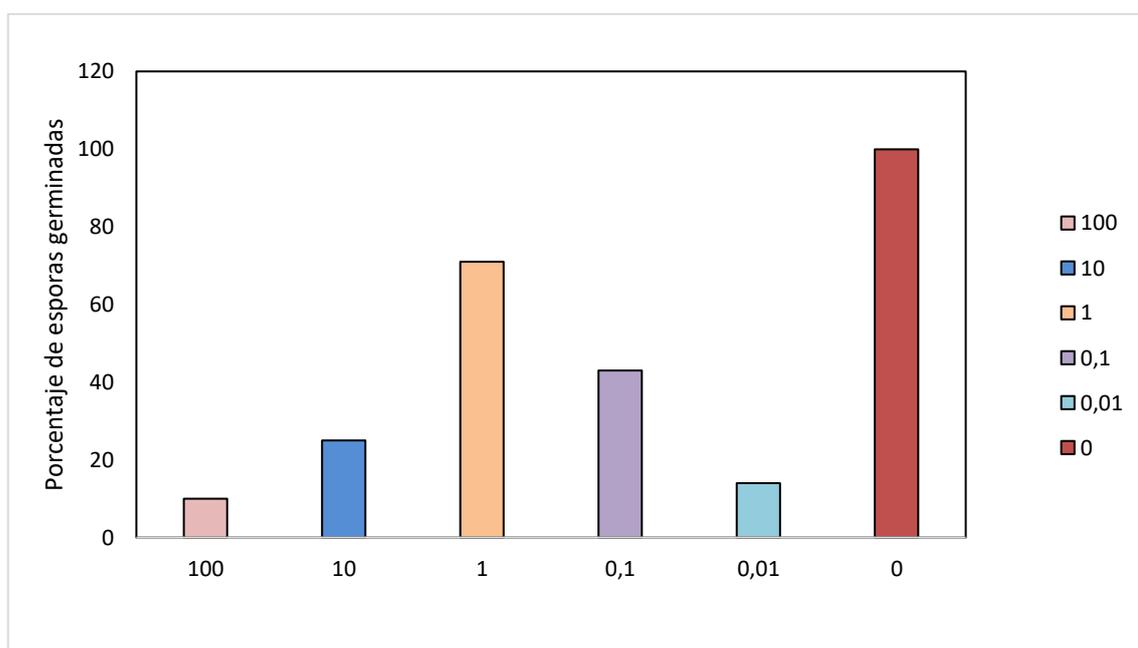


Ilustración 4-19: Porcentaje de germinación de esporas de *Penicillium* en diferentes dosis de *Bacillus*.

Realizado por: Panimbosa, J., 2023.

Penicillium frente a *Bacillus* presentaron esporas germinadas en la dosis 0,01 ppm presentó 14 esporas con una inhibición del 86%, en la dosis 0,1 ppm presentó 43 esporas con una inhibición del 57%, en la dosis 1 ppm presentó 71 esporas con una inhibición del 29%, dosis 10 ppm 25 esporas con una inhibición del 75% y en la dosis 100 ppm presentó 10 esporas con una inhibición del 90 % (Ilustración 4-19).

Tabla 4-28: Test de Tukey al 5% con diferentes dosis de *Bacillus*.

DOSIS	SIN GERMINAR	RANGO DE SIGNIFICANCIA ¹
100	90	a
0,01	85,6667	a
10	75,3333	ab
0,1	55,3333	abc
1	27	bc

Realizado por: Panimbosa, J., 2023

La prueba de Tukey al 5% para CL50 de producto *Bacillus* vs *Penicillium* mostró diferencias altamente significativas con un P valor menor a 0,05 (Tabla 4-28).

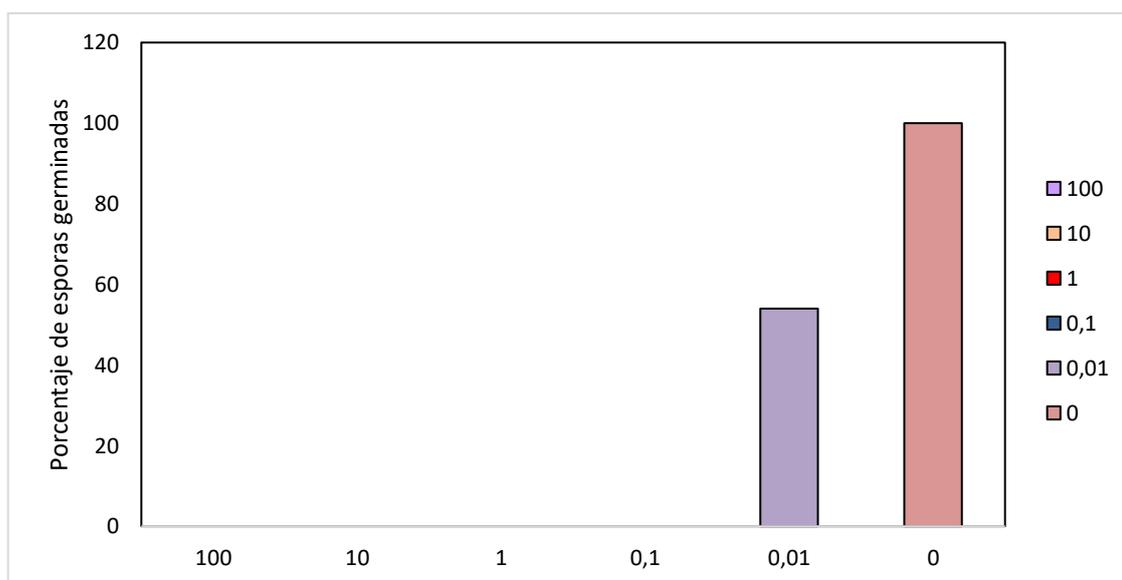


Ilustración 4-20: Porcentaje de germinación de esporas de *Penicillium* en diferentes dosis de tebuconazol.

Realizado por: Panimbosa, J., 2023.

Penicillium frente a tebuconazol presentó 54 esporas germinadas en la dosis de 0,01 ppm con una inhibición del 46% y en las dosis (0,1; 1; 10; 100 ppm) la inhibición fue del 100% (Ilustración 4-20).

Tabla 4-29: Test de Tukey al 5% con diferentes dosis de tebuconazol.

DOSIS	SIN GERMINAR	RANGO DE SIGNIFICANCIA ¹
0,1	100	a
1	100	a
10	100	a
100	100	a

0,01

0

b

Realizado por: Panimbosa, J., 2023.

La prueba de Tukey al 5% para CL50 de producto tebuconazol vs *Ceratocystis* mostró diferencias altamente significativas con un P valor menor a 0,05 (Tabla 4-29).

4.4 Identificación molecular

Tabla 4-30: Identificación molecular mediante análisis BLASTn de las cepas del género *Penicillium*, *Mucor*, *Ceratocystis* y *Geotrichum* alineadas con especies de la base de datos del NCBI

Código	Género identificado morfológicamente	Región	Tamaño de nucleótidos	Especies identificadas	Porcentaje de identidad	Porcentaje de Cobertura	E-value	Accesión	Origen geográfico
D	<i>Penicillium</i>		818	<i>Penicillium purpureogenum</i>	99,79%	100 %	0	MK911693.1	Latvia
A	<i>Mucor</i>	ITS 1F	261	<i>Mucor nidicola</i>	95,77 %	99 %	0	KX421453.1	Brasil
Ceys	<i>Ceratocystis</i>		460	<i>Ceratocystis paradoxa</i>	100%	100 %	0	MG706124.1	China
4	<i>Geotrichum</i>		261	<i>Geotrichum candidus</i>	100 %	100 %	0	MH725580.1	China

Realizado por: Panimbosa, J, 2023.

De acuerdo con el gen amplificado ITS1 en la base de datos del NCBI se obtuvo que el género *Penicillium* (D) correspondió a la especie *Penicillium purpureogenum* con un 99,79% de identidad con la cepa de la accesión MK911693.1 que correspondió al uso potencial del hongo *Penicillium purpureogenum* para remover iones de cadmio, plomo, mercurio y arsénico de soluciones acuosas. La biosorción de iones de metales pesados alcanzó el equilibrio en 4 h. La unión de iones de metales pesados por *Penicillium purpureogenum* dependía claramente del pH del país de Latvia (DI, Ridván et al., 2003: p. 2039); el género *Mucor* (A) correspondió a la especie *Mucor nidicola* con un 95,77% de identidad con la cepa de la accesión KX421453.1 que correspondió al hongo mucoraleano, que fue aislado por primera vez de un nido de avispas en Massachusetts, EE.UU., y luego reportado en el estado de Paraná, Brasil, como un hongo entomopatógeno recolectado de insectos en cultivos de fresa. Este trabajo reporta la primera ocurrencia de *M. nidicola* del suelo en el Nordeste brasileño. Esta especie se distingue de otras por producir esporangióforos erectos, no ramificados, y una vez ramificados, columelas globosas a subglobosas, y esporangiosporas principalmente elipsoidales, pero con algunas irregulares y variables en tamaño y forma del país de Brasil (Lima, Diogo Xavier, et al., 2020: p. 165.); el género *Ceratocystis* (Ceys) corresponde a la especie *Ceratocystis paradoxa* con un 100% de identidad con la cepa de la accesión MG706124.1 que correspondió al primer reporte de pudrición del ronco en Palma de Aceite causada por *Ceratocystis paradoxa* se dio en Hainan, China, las áreas del tronco afectadas presentaban una decoloración oscura y un líquido marrón rojizo o de color óxido que sangraba por diferentes puntos. Los tejidos del tallo debajo de las lesiones se pudrieron y se volvieron de color amarillo parduzco a negro. Las plantas afectadas murieron dentro de los 3 a 4 meses posteriores a la aparición de los primeros síntomas en el tallo del país de China (Tang, Qh, et al., 2014: p. 1282); el género *Geotrichum* (4) corresponde a la especie *Geotrichum candidus* con un 100% de identidad con la cepa de la accesión MH725580.1 que correspondió a la búsqueda de las características de la distribución espacial de la población fúngica en leches de fermentación microbiana para la cría de cerdos, la cría de cerdos en el sistema de lecho de fermentación microbiana es un nuevo método de cría respetuoso con el medio ambiente. Los microorganismos son críticos para la desodorización y descomposición de los excrementos porcinos. Las con la base de Instalaciones Modernas Agrícolas de Fuqing, de la Academia de Ciencias Agrícolas de Fujian del país de China (Xiao et al., 2018: p. 6). El rango de porcentaje de cobertura fue de 99% a 100%, por lo tanto, se puede decir que presentaron una cobertura satisfactoria.

4.5 Discusión

Los resultados obtenidos en el presente estudio determinaron que los aislados evaluados mostraron un comportamiento diferente a la gran parte de productos, tanto biológicos como químico. En el caso del extracto de tomillo (*Thymus vulgaris*) se observó una actividad biológica sobre *Fusarium* presentándose en la dosis 500 ppm una inhibición del 42,92% del crecimiento micelial, estos resultados realizados no concuerdan con otros estudios previamente realizados con extracto de tomillo en donde se observó una mayor inhibición del crecimiento de *Fusarium* spp. in vitro con un porcentaje de inhibición en el día 7 del 74% (Liscano, 2007, p. 56). Para *Rhizopus* se presentó en la dosis 500 ppm una inhibición del 61,4%, seguida de la dosis 100 ppm con una inhibición del 56,56%, se obtuvo los mismos resultados que menciona Velázquez-del Valle, Miguel Gerardo et al. (2008), donde el extracto de tomillo (*Thymus vulgaris*) tuvo un efecto fungicida sobre el crecimiento micelial del 70% y la germinación de *Rhizopus stolonifer* en condiciones in vitro siendo un agente causal de pudriciones postcosecha. Para la cepa de *Penicillium* se presentó en la dosis 0,1 ppm una inhibición del 22,11%, siendo mayor porcentaje que inhibió el crecimiento micelial, estos resultados realizados no concuerdan con otros estudios previamente realizados donde se demostró que el extracto de tomillo (*Thymus vulgaris*) resultó ser eficaz en el control del hongo *Penicillium digitatum* ya que existe una inhibición de la formación de colonias muy evidente frente al testigo, el extracto de tomillo como fungicidas in vitro indicó que, a los siete días de la inoculación, el 59% y el 100% de las cepas de *Penicillium digitatum*, fueron controladas (Ramos-García et al., 2010: p. 49). Para *Mucor* se presentó en la dosis 500 ppm una inhibición del 91,95%, estos resultados realizados concuerdan con otros estudios previamente realizados en otros estudios según Klaric et al. (2007), el extracto de tomillo (*Thymus vulgaris* L.), cuyo componente principal es el p-cimeno (36,5 %) y el timol (33,0 %), mostraron alta actividad fúngica contra *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Mucor* y *Rhizopus*. Para *Geotrichum* se presentó en la dosis de 500 ppm una inhibición 64,38%, seguida de la dosis 100 ppm una inhibición del 51,16%, donde se concuerda con otros estudios previamente realizados donde el efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Geotrichum candidum*, donde menciona Foltinová, D. (2019: p. 2); que los aceites esenciales que tienen la actividad antifúngica más fuerte incluyen los aceites de clavo, orégano, canela y tomillo, esta afirmación también se ha confirmado que el aceite esencial de tomillo mostró una actividad antifúngica del 100% independientemente del día de cultivo. Para la cepa de *Ceratocystis* presentó en la dosis de 500 ppm una inhibición del 70%, no se pudo realizar una comparación debido a que no se han realizado estudios con este hongo y producto.

El principio activo del producto 2 (*Trichoderma*, *Bacillus*, Extractos húmicos, Potasio (K₂O), se observó una actividad biológica sobre *Ceratocystis* presentándose en la dosis de 0,1 ppm una inhibición del 16,68%, siendo la dosis con mayor porcentaje de inhibición de crecimiento micelial. En otros estudios realizados no concuerdan con los resultados obtenidos, ya que las propiedades antifúngicas de las cepas de *Trichoderma* contra *Ceratocystis paradoxa* se confirmaron cuando se usaron filtrados de cultivos de *Trichoderma* para controlar *C. paradoxa*, el alto valor de porcentaje de inhibición del peso del crecimiento micelial registrado al 80 % de concentración de metabolitos indica que un alto porcentaje de filtrado de cultivo hace que la inhibición sea más eficaz, también informaron que *C. paradoxa* fue inhibida en altas concentraciones de 100% y 70% de los metabolitos por *T. polysporum* y *T. viride*, respectivamente. Según los valores de porcentaje de inhibición del peso del crecimiento micelial, *Trichoderma* mostró el mejor efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *C. paradoxa*. Se ha informado que los filtrados de especies de *Trichoderma* exhiben actividades antifúngicas (Eziashi et al., 2007: citado en Rahman, M. et al., 2009: p. 284). Para la cepa de *Fusarium* presentó en la dosis 1 ppm una inhibición del 28,54%, siendo la dosis con mayor porcentaje de inhibición de crecimiento micelial pero no sobrepasa el 50% inhibición. Los resultados obtenidos no concuerdan con otros estudios similar, donde menciona Belanche et al. (2016) que las algas, aplicadas como extracto, reducían la actividad celulolítica del hongo *F. oxysporum* f. sp. *Vasinfectum*, corroborando que los resultados obtenidos reducen el crecimiento del hongo *Fusarium*. *Penicillium* tuvo actividad biológica en la dosis 0,01 ppm, con una inhibición del 97% y en las dosis (0,1; 1; 10; 100 ppm) la inhibición fue del 100%, estudios realizados muestran que esta cepa también mostró el mayor efecto protector in vivo contra *Penicillium digitatum*, resultado esperado considerando el papel de estas enzimas en el control biológico, *Trichoderma* mostró los valores más altos de desempeño antagonista in vitro y actividades enzimáticas (Ferreira et al., 2020: pp. 716-717). Cabe mencionar que este estudio no es sensibilidad in vitro ya que no se pudo encontrar información sobre esta cepa y producto. Los potenciales antagonistas de *Trichoderma* se probaron contra 13 patógenos de la pudrición de la fruta en condiciones in vitro y revelaron los resultados de que el porcentaje de inhibición de los hongos de prueba resultó ser más del 50% antagonista sobre el control. Para la cepa de *Mucor* presentó en la dosis 500 ppm una inhibición del 92,33%, seguida de la dosis 100 ppm con una inhibición del 36,02%, seguido de la cepa de *Geotrichum* presentó en la dosis de 1 ppm una inhibición 24,09% siendo la dosis con mayor porcentaje de inhibición de crecimiento micelial pero no sobrepasa el 50% inhibición y para la cepa de *Rhizopus* esta no superó el 10% de inhibición, los resultados obtenidos, no se pudo realizar una comparación ya que no existen estudios in vitro con este producto, pero si estudios de antagonismo donde inhibió el crecimiento micelial, en el caso de *Fusarium oxysporum* (83,34%), *Cladosporium cladosporioides* (78%) y *Mucor* sp (78%) mostraron actividad

antagonista significativa por *Trichoderma* seguido de otros. Pero se encontró altamente inhibido el crecimiento radial respecto al control, estos resultados son similares a los obtenidos en sensibilidad in vitro. Entre los tres patógenos de la pudrición de la fruta, solo *Geotrichum candidum* mostró una mejor inhibición por las especies de *Trichoderma*. La especie de *Trichoderma* inhibió significativamente el crecimiento micelial de hongos fitopatógenos (Rajkonda et al., 2011; citado en Bhale, 2020: pp. 94-96). Los resultados indicaron que el tratamiento con la formulación de emulsión inversa de *T. harzianum* protegió la fruta de la infección por los principales patógenos postcosecha (*Rhizopus stolonifer*, *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum*) de las frutas (uva, pera, manzana, fresa y kiwi) probado por hasta dos meses y redujo los diámetros de las lesiones por descomposición hasta en un 86% y es un tratamiento prometedor para prolongar la vida útil postcosecha de la fruta fresca (Batta, 2007; citado en Bhale, 2020: pp. 94-96), en cambio *Rhizopus* no tuvo actividad biológica en estudios demuestran antagonismo controlaron al hongo protegiendo al fruta de la producción y para *Geotrichum* no hubo inhibición ce crecimiento micelial donde no se concuerdan con los estudios ya mencionados. Según Wang et al. (2008) verificaron, in vitro, que las florotaninas extraídas de extracto de algas (*Ascophyllum nodosum*) redujeron la fermentación ruminal, la degradación celulolítica y proteica del forraje ensayado.

Asimismo, el principio activo quitosan oligosacarina, no presentó actividad biológica en todas las dosis en las que se trabajó (0,01, 0,1, 1, 10, 100 ppm) ya que sus tasas de crecimiento micelial son considerablemente altas en todos los géneros *Mucor*, *Ceratocystis*, *Geotrichum*, *Fusarium* y *Rhizopus* no superaron más del 30 % de inhibición, para la cepa de *Penicillium* presentó actividad biológica en las dosis (0,1; 1; 10; 100 ppm) la inhibición fue del 100%. Estos resultados no concuerdan con estudios realizados donde mencionan que la actividad antifúngica del quitosan en el crecimiento micelial y la esporulación de los hongos *Rhizopus stolonifer* y *Mucor* spp. variaron de acuerdo a la concentración de quitosan aplicada, donde se obtuvieron una respuesta diferente dependiendo del género. El crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer* se redujo en comparación con el testigo que invadió la caja a las 48 h de incubación (86 mm). El menor crecimiento micelial se presentó con la concentración de 2.0 mg mL⁻¹ (32.9 mm), se obtuvo un porcentaje de inhibición del 61.7%. En el caso de *Mucor* spp. no presentó inhibición de crecimiento, en otros estudios demuestran las diferencias en el crecimiento con relación al tratamiento testigo se observaron a partir de la aplicación de 1.0 mg mL⁻¹ de quitosan; el menor crecimiento micelial se obtuvo con la concentración de 2.0 mg mL⁻¹ (23.2 mm) la cual presentó un 52.1% de inhibición. A mayores concentraciones de este polímero, el efecto de inhibición es mayor, coincidiendo con estudios reportados anteriormente (Bautista-Baños et al., 2004, 2005; El Ghaouth et al., 1992 b; citado en Hernández-Lauzardo, et al., 2007: p. 4). La esporulación de *Rhizopus stolonifer* y *Mucor* spp. disminuyó al incrementarse las concentraciones de quitosan, no concordando con los

resultados obtenidos (Bautista-Cerón, 2004: citados en Hernández-Lauzardo, et al., 2007: p. 4). Los resultados con quitosano no concuerdan con estudios realizados donde demuestran que el quitosano disminuye el crecimiento micelial, de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium sambucinum* y *Fusarium graminearum* en un 88.4, 89.0 y 89.8% respectivamente en condiciones in vitro, demostrando que el quitosano es una alternativa a los fungicidas sintéticos para el control de la pudrición seca de los tubérculos y el marchitamiento por *Fusarium* (Mejdoub-Trabelsi et al., 2020: p.20). Además, la aplicación de quitosano inhibió el crecimiento del micelio y la germinación de esporas de *Fusarium oxysporum* y la patogenicidad de *Fusarium oxysporum* se redujo después de tratarse con quitosano (Ren, J. et al., 2021). Estos resultados no concuerdan con estudios realizados donde al aplicarse quitosano en *Geotrichum* tuvieron resultados con un crecimiento micelial de 10,5% solo inhibió el 12,95%, seguido de la concentración al 2,0% con el 42,12%. Sin embargo, las concentraciones de 1,0 y 1,5% fueron las que presentaron mayor porcentaje de inhibición con 63,19 y 62,49%, respectivamente. Además, este estudio mencionó que se apreció el micelio con decoloración y pérdida de crecimiento radial respecto al control esto se debe a que al aumentar la concentración aumenta el efecto de inhibición (Rodríguez-Guzmán. et al. 2022: pp. 5-6). En el caso de *Ceratocystis* tampoco inhibe el crecimiento micelial, estudio reportado por otros autores como Xing et al., (2018) quien realizó un estudio aplicando quitosano al 0.5% logrando inhibir el desarrollo del crecimiento micelial de *Ceratocystis fimbriata*, donde también se observaron alteraciones en la morfología de las hifas de *Ceratocystis fimbriata*, El principal efecto atribuido al quitosano su carácter catiónico, donde los grupos amino con carga positiva interactúan con las cargas negativas de la pared celular fúngica, provocando alteraciones en la permeabilidad de la pared celular fúngica. membrana plasmática, afectando su funcionalidad, como el ingreso de macromoléculas vitales para su desarrollo (Chávez-Magdaleno et al., 2018; Keet et al., 2021; citados en Rodríguez-Guzmán. et al. 2022: pp. 5-6). En el estado de Nayarit, México se ha reportado que la actividad del quitosano puede depender de sus características físico-químicas como peso molecular, grado de desacetilación, concentración y fuente. Asimismo, algunos hongos tienen quitina en su pared celular, lo que los hace menos susceptibles. Finalmente, se sabe que los hongos tienen una variedad de mecanismos de evasión o defensa frente a condiciones que no son favorables para su desarrollo (Varlamov et al., 2020). Los resultados obtenidos coinciden con lo reportado en *Penicillium digitatum*, refieren al estrés del hongo causado por el quitosano en altas dosis. Respuesta análoga obtuvieron Bautista-Baños et al. (2004) quienes no observaron producción de esporas en los hongos *Fusarium oxysporum*, *Penicillium digitatum* y *Rhizopus stolonifer* al tratarlos con quitosano a las concentraciones de 2,5 y 3%.

Por otro lado, la actividad biológica del aceite de árbol de Té (*Melaleuca alternifolia*) sobre *Penicillium* tuvo actividad biológica en la dosis de 0,01 ppm con una inhibición del 93 % y en las

dosis (0,1; 1; 10; 100 ppm) la inhibición fue del 100%. Estudios realizados concuerdan con Silva et al, (2015) donde menciona, que el producto Árbol de Té puro, presenta un control del 76,33% sobre *Penicillium* spp, llegando a conservar la calidad de la fruta y por ende su peso, así mismo, nos indica que el producto tiene una alta acción antifúngica en los patógenos como *Fusarium* spp, *Verticillium theobromae*, *Colletotrichum musae*, *Gloeosporium musarum*, y *Ceratocystis paradoxa* (Vademécum,2016). Para *Ceratocystis* su inhibición en el estudio realizado es del 49,47%, no concuerdan con los estudios mencionados. Para *Rhizopus* presentó en la dosis de 500 ppm con una inhibición del 67,5%, seguida de la dosis 100 ppm con una inhibición del 63,49%, los resultados obtenidos concuerdan con otros estudios donde mostraron 58,7% y 56,75% de inhibición contra *Rhizopus stolonifer* respectivamente. Esto indica que el aceite de árbol de té presenta potencial antifúngico contra hongos fitopatógenos, sirviendo como base para realizar estudios de mayor orden (Arnhold, S., et al. 2019: p. 6). Para *Mucor* no superó el 10% de inhibición de crecimiento micelial, no se pudo realizar una comparación debido a que no se han encontrado estudios relacionados con este hongo y el producto biológico utilizado. Para *Geotrichum* presentó en la dosis de 1 ppm una inhibición 22,97% siendo la dosis con mayor porcentaje de inhibición de crecimiento micelial, los estudios in vitro de *Geotrichum* con aceite de árbol de té son escasos y únicamente existen reportes de in vitro de extractos Acuosa de Especies contra *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Geotrichum candidum*, *Trichoderma* spp., *Penicillium digitatum* y *Aspergillus niger* por lo que no se puede realizar comparaciones con el producto utilizado en este estudio con varios autores, el presente estudio sería de los primeros en realizarse con dicho producto biológico, sin embargo, los resultados con extracto acuoso de orégano confirma tener gran actividad biológica fungistática y fungicida tanto para la especie de *Fusarium oxysporum* como para *Aspergillus niger*, mostrando inhibición total a 200 ppm, mientras que para *A. alternata*, *Geotrichum candidum*, *Trichoderma* spp. y *Penicillium digitatum* a partir de 250 ppm (Cáceres Rueda de León, Isaura et al., 2013: p. 110). Para la cepa de *Fusarium* presentó en la dosis 500 ppm una inhibición del 52,04%, estos resultados no concuerdan con los resultados obtenidos en otros estudios donde mostraron que todos los ingredientes activos mostraron inhibición sobre el crecimiento del aislado de *Fusarium oxysporum*, la que sin embargo presentó variaciones dependientes del ingrediente activo y la dosis utilizada. Benomyl, Tiofanato metil y Difenconazole inhibieron en un 100% el crecimiento del hongo en cada una de las tres dosis utilizadas, mientras que Pyraclostrobin y Aceite de árbol del té (*Melaleuca alternifolia*) fueron los menos eficientes en el control del patógeno inhibiendo menos del 10% (Osorio Céspedes et al., 2014: p. 15).

Finalmente, *Bacillus*, resulto tener actividad biológica frente a *Fusarium* presentándose en la dosis 500 ppm una inhibición del 51,84%; en la cepa de *Penicillium* tuvo actividad biológica en las dosis (0,01 ppm con 86%; 0,1 ppm con 57%; 10 ppm con 75%; 100 ppm con 90%); Para la

cepa de *Ceratocystis* presentó en la dosis de 0,1 ppm con una inhibición del 15,78% siendo la dosis con mayor porcentaje de inhibición de crecimiento micelial. Para la cepa de *Geotrichum* presentó en la dosis de 0,1 ppm una inhibición 24,09% siendo la dosis con mayor porcentaje de inhibición de crecimiento micelial. Para la cepa de *Mucor* presentó en la dosis de 0,1 ppm una inhibición 22,98% siendo la dosis con mayor porcentaje de inhibición de crecimiento micelial. En el caso de la cepa de *Rhizopus* presentó en la dosis de 500 ppm con una inhibición del 48,79%. Estos resultados concuerdan con los estudios realizados por Caldeira et al., (2007) reporta que una cepa de *Rhizopus* sp. fue sensible al sobrenadante libre de células de *Bacillus amyloliquefaciens*. En el caso de *Fusarium* concuerdan con estudios realizados donde mencionan que el crecimiento del extracto metabólico de *Bacillus* spp. el crecimiento fue de 3.01 cm y el testigo fue de 3.86 cm al respecto Araiza y Sánchez, (2012) reportan un efecto positivo del extracto metabólico de una cepa de *Bacillus subtilis* inhibiendo a *Fusarium* sp. entre un 70 y 100 % también sugiere que este efecto se debe a que los metabolitos de *Bacillus* spp. interactúa con las moléculas de colesterol para romper la membrana citoplasmática del hongo, creando canales transmembranales que permiten la liberación de iones vitales como el K⁺. *Bacillus subtilis* demostró ser eficaz para el control biológico in vitro, mostrando zonas de inhibición incluso antes del contacto directo con el patógeno, lo que puede atribuirse al efecto de la antibiosis, caracterizado por la producción de metabolitos volátiles liberados por la bacteria, además de la competencia por los nutrientes y el espacio, lo que interfiere con el crecimiento de los aislados de *Ceratocystis fimbriata*, este estudio no concuerdan debido a no tuvo actividad biológica en esta misma cepa. Según Kim et al. (2008), el efecto inhibitor de bacterias, como *Bacillus subtilis*, puede atribuirse a la producción de enzimas hidrolíticas que son capaces de degradar la pared celular y afectar la producción de lipopéptidos (LPP), lo que interfiere directamente con el crecimiento micelial de la planta, hongos patógenos. En sus estudios, Seema y Devaki (2012) informaron que las cepas de *Bacillus subtilis* podían inhibir un 50 % el crecimiento del micelio de *Rizoctonia solani* cinco días después de emparejar los cultivos. Según estos autores, la acción de los antibióticos, como Iturin A y Surfactin, puede haber influido en el crecimiento del micelio y el color de la colonia del patógeno. Lee et al. (2008) encontraron que en pruebas de confrontación de 12 colonias de *Bacillus subtilis*, aisladas de diferentes lugares de la rizósfera, sobre aislamientos de *Phytophthora capsici*, cinco colonias, presentaron máxima inhibición del patógeno con zonas de inhibición de 11,5 mm, 11 mm, 11,5 mm, 12 mm y 12 mm, respectivamente. Las mismas colonias fueron eficientes en el control biológico de *P. citrophthora*, *P. citricola* y *Colletotrichum coccodes* (Mezzomo R, et al. 2019: pp. 6-7). No se encontró estudios in vitro de *Bacillus* con antifúngico en *Penicillium*, sin embargo estos resultados concuerdan con estudios antagónicos, *Bacillus subtilis* ejercen un efecto antagónico sobre estos hongos, lo que resulta de importancia en la prevención de enfermedades, pues presentan una alta

velocidad de crecimiento que les permite alcanzar rápidamente el estado estacionario y comenzar a producir metabolitos secundarios con actividad antifúngica de algunos patógenos (Sosa Pech et al., 2012; Tejera et al., 2012). Principalmente la respuesta de antagonismo de la bacteria está asociada con la síntesis de lipopéptidos como iturina, surfactina, fengicina y bacilomina (Ariza et al., 2012). Li X et al. (2016), menciona que las placas de cultivo dual de *Bacillus amyloliquefaciens* con *Mucor* y *Rhizopus* spp estaban cubiertas de vegetación y también mostraban una pequeña zona de inhibición en *Mucor* sp. dejó de crecer y finalmente murió el día 14, el aislado de *B. amyloliquefaciens* demostró ser eficaz para controlar los patógenos in vitro, lo que indica que puede usarse para controlar diferentes patógenos de hongos, *Mucor* no tuvo inhibición de crecimiento micelial, además, no se encontró estudios de sensibilidad, pero si hubo estudios de antagonismo pero no concuerdan con los resultados obtenidos para este hongo. El estudio realizado por Soto et al., (2018), concuerdan que *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus polymyxa*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas syringae*, *Candida membranifaciens*, *Candida utilis*, *Cryptococcus laurentii*, *Pienibacillus i.*, microorganismos antagonistas como *membranifaciens*, *Rhodosporidium paludigenum*, Se ha informado que *Saccharomyces cerevisiae*, *Aureobasidium pullulans*, *Nodulisporium* spp. y *Trichoderma* spp son muy efectivos para combatir enfermedades como *Geotrichum citri-aurantii*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, que es un problema en los frutos de limón. Hong et al. (2014) *B. amyloliquefaciens* en su estudio investigando las posibilidades de combatir las enfermedades de moho y pudrición ácida causadas por *Penicillium digitatum*, *P. italicum* y *Geotrichum citri-aurantii* en frutos de mandarina por *Bacillus amyloliquefaciens* HF-01, bicarbonato de sodio (SBC) y aplicaciones de agua (HW) Informaron que aplicaciones como + 2% SBC y/o 45 °C HW (2 minutos) previnieron la aparición de enfermedades (podredumbre) a una tasa muy alta del 80% en comparación con la aplicación de control, y la efectividad de la aplicación fue tan efectiva como la aplicación química. En un estudio reciente, se determinó la actividad antifúngica de aislados bacterianos antagonistas de especies de *Bacillus* aisladas de diferentes materiales de compost, individualmente y en combinación con productos de boro, en condiciones de laboratorio (in vitro) y semicomerciales (semi-in vivo) contra *Geotrichum citri-aurantii* (Gedik, 2019: citado en SOYLU, Soner, et al. 2022: p. 188), estos estudios no concuerdan con los resultados obtenidos.

En el caso del producto químico tebuconazol tuvo un efecto inhibitorio sobre las cepas de *Rhizopus*, *Ceratocystis* y *Mucor*, en la dosis correspondiente a 10 y 100 ppm, de igual manera con las cepas *Fusarium* y *Rhizopus* quienes tuvieron mayor efecto inhibitorio en las dosis menores y mayores correspondientes a 0,01, 0,1, 1, 10 y 100 ppm, las cepas *Geotrichum*, *Mucor* y *Ceratocystis* no tuvieron efecto inhibitorio en todas las dosis (0,01, 0,1, 1, 10 y 100 ppm), para *Penicillium* el efecto inhibitorio en todas las dosis fue del 100%. Resultados similares fueron

reportados por Pérez-Rodríguez, Luis Roberto et al. (2019), los cuales demostraron que Tebuconazol tiene un efecto inhibitorio hacia *Fusarium* spp., que pertenece al código 3, del grupo de los fungicidas inhibidores de la metilación (DMI), el cual está reportado por la FRAC como de mediano riesgo de generar resistencia por varias especies de hongos. En las dosis altas, medianas y bajas generó una mayor eficacia en el control con más del 92% del porcentaje de inhibición de crecimiento micelial (PICM) en *Fusarium* spp. (Yossen y Conles, 2014, p. 4). Los resultados concuerdan Velázquez-del Valle, Miguel Gerardo et al. (2008), donde el tebuconazol controla la pudrición blanda causada por *Rhizopus stolonifer* un 81, 69 y 79.2%. Existen estudios en donde los tratamientos con tebuconazol resultan ser mejores en la inhibición de crecimiento del microorganismo *Geotrichum candidum* que fue del 80 y 86% (Rodríguez, M., Calvo et al., 2019, p.3). Del producto químico tebuconazol mostró una inhibición del 100 % en *Ceratocystis fimbriata* en todas las concentraciones 0,05 %, 0,10 % y 0,15 %, respectivamente (Gururaj, Sunkad, et al. 2017: p. 113), los resultados que se obtuvo para las cepas de *Geotrichum* y *Ceratocystis* inhibieron el crecimiento micelial en dosis mayores a 10 ppm, no concuerdan en su totalidad con los autores mencionados anteriormente donde la inhibición fue del 100% en todas sus dosis. El DMI-imidazol imazalil se ha utilizado durante muchos años, específicamente para el control de las caries por *Penicillium*. Se obtuvo un amplio rango de concentraciones efectivas para inhibir el crecimiento de *Penicillium* en un 50% para los ocho fungicidas DMI-triazol evaluados. En las comparaciones de los fungicidas más efectivos (es decir, ciproconazol, propiconazol, metconazol y tebuconazol), las concentraciones inhibitorias medias del 50 %, las concentraciones inhibitorias fueron similares para ciproconazol, propi-conazol y metconazol y más altas para tebuconazol (Mckay, et al., 2012: pp. 91-93). Estos estudios demuestran que tebuconazol inhibió el crecimiento micelial corroborando con los resultados obtenidos. Con el hongo *Mucor* no se pueden encontrar estudios realizados con tebuconazol para su comparación con otros autores, sin embargo, existen estudios utilizando a tiabendazol, donde mencionan que las cepas probadas fueron resistentes al tiabendazol, donde mostró un efecto sinérgico sobre *Rhizopus* sp. *Mucor* sp fue el único hongo resistente al fungicida probado (Maldonado et al. 2005: p. 55-56).

Ceratocystis paradoxa es un organismo celular; Eucariota; Opisthokonta; Hongos; Dikarya; Ascomycota; saccharomyceta; Pezizomycotina; leotiomyceta; sordariomyceta; Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Microaescalas; Ceratocystidaceae; Thielaviopsi. Asociada a la podredumbre de la base, puede ser una enfermedad grave del material de siembra de pinya y puede resultar en un establecimiento deficiente de las plantas. *Ceratocystis paradoxa* puede pudrir toda la pieza de material de siembra y las piezas afectadas generalmente son descartadas por los productores. Sin embargo, cuando hay una descomposición parcial de la base (culata), el material no puede descartarse y cuando se planta el crecimiento se reducirá severamente debido a la

reducción de las reservas de carbohidratos en los tallos infectados y la destrucción de algunas iniciales de la raíz. La infección se produce a través de heridas producidas cuando se retiran los materiales de siembra de la planta madre (Anderson, J.M., et al., 2022: p. 246).

Mucor nidicola es un organismo celular; Eucariota; Opisthokonta; Hongos; Fungi incertae sedis; Mucoromycota; Mucoromycotina; Mucoromicetos; Mucorales; Mucorineae; Mucoráceas; Mucor. Asociado a la pudrición blanda de frutos de papaya en precosecha y postcosecha por lo que afectan el rendimiento y la calidad de los frutos en porcentajes aun no estimados, causante principal de las alteraciones más frecuentes en frutas y hortalizas, especialmente las referidas al aspecto físico, valor nutricional, características organolépticas y dificultad de conservación, así como de las alergias e intoxicaciones en los consumidores, debido a que producen estructuras especializadas que se depositan sobre el producto, penetran, invaden y eventualmente colonizan masivamente el tejido para causar daño y posteriormente segregar sustancias, como consecuencia de su metabolismo secundario (Fitenborg et al., 1996; citado en Trigos et al., 2008: p.126).

Geotrichum candidus es un organismo celular; Eucariota; Opisthokonta; Hongos; Dikarya; Ascomycota; saccharomyceta; Saccharomycotina; Saccharomycetes; Saccharomycetales; Dipodascaceae; Geotrichum. Asociada a la pudrición blanda de los frutos, donde se produce desintegración de los tejidos, tanto de la epidermis como de la pulpa. Los frutos afectados exhalan un fuerte olor a fermentación y rancidez. En condiciones de alta humedad relativa se evidencia la presencia de un micelio blanco de aspecto yesoso, usualmente no filamentoso como en el caso de otros patógenos frecuentes en postcosecha. Este hongo además presenta una fase de tipo levaduriforme, caracterizada por un crecimiento unicelular con multiplicación por yemación, que se observa macroscópicamente como un desarrollo mucoso (Pinilla, B., 2005: p. 2).

Penicillium purpurogenum es un organismo celular; Eucariota; Opisthokonta; Hongos; Dikarya; Ascomycota; saccharomyceta; Pezizomycotina; leotiomyceta; Eurotiomicetos; Eurotiomycetidae; Eurotiales; Trichocomaceae; Talaromyces; Talaromyces sect. Talaromyces. Es un hongo filamentoso de pudrición blanda presente en muestras de suelos. Este hongo es un patógeno de las plantas, secretor de múltiples enzimas hemicelulolíticas que son producidas para hidrólizar la pared celular vegetal e incorporar los productos a su metabolismo. Sus sistemas celulolíticos y xilanolíticos han sido descritos en detalle. Este hongo aeróbico produce una serie de enzimas que degradan el xilano (Lifeder, 2020: p.1).

El sector agrícola ha crecido considerablemente como respuesta a la creciente demanda de la población. Como consecuencia de ello, la producción de alimentos se ha convertido en una

contribución importante al agotamiento de los recursos naturales y al cambio climático. El Informe de síntesis de cambio climático del Panel Intergubernamental del Cambio Climático (IPCC) de 2007 estima que los impactos directos de la agricultura contribuyen con aproximadamente el 13.5 % de las emisiones antropogénicas de gases efecto invernadero (GEI) a nivel mundial (Karel et al., 2020: citado en Martínez-Blanco et al., 201: p. 1).

Los tratamientos con fungicidas utilizados tradicionalmente en el control postcosecha de frutos presentan diferentes riesgos en cuanto al impacto ambiental causando una serie de problemas tales como: erosión, compactación, salinización; agotamiento de nutrientes, contaminación del aire, suelo, agua, deforestación, agotamiento de las aguas subterráneas y desechos tóxicos que estos generan, inclusive causan daños a la salud de los seres humanos quienes están expuestos a manipular productos químicos sin ningún equipo de seguridad. Otros problemas que trae el uso de estos fungicidas es que las enfermedades se vuelven más resistentes a ciertos productos, donde los agricultores utilizan más agroquímicos en altas dosis a las que está estipulado en la concentración del producto para controlar la enfermedad o la plaga.

La contaminación ambiental constituye un problema grave a nivel mundial dada las repercusiones que ésta tiene, es por ello que se deben buscar alternativas más sostenibles que reemplacen al uso de productos químicos reduciendo así el consumo y teniendo productos de calidad y cantidad que mejorar la calidad de vida de la población y contribuyen positivamente al ambiente.

Los productos biológicos son una alternativa sostenible ante el uso de productos químicos, ya que estos se obtienen a partir de organismos vivos o sus derivados, tales como hongos, bacterias, material vegetal, enzimas, entre otros, mediante herramientas biotecnológicas permiten generar bioestimulantes, biofertilizantes, biocontroladores, bioestabilizadores, entre otros productos que tienen propiedades benéficas para el suelo, como para la protección de los cultivos y el medio ambiente.

De ahí, que se incite a los agricultores a practicar una agricultura más sostenible que permita satisfacer todas las necesidades de la sociedad: ambiental, social y económica. En este sentido, las plantaciones frutícolas, aunque en menor medida, también tienen sus contribuciones, pues requieren de cantidades de insumos químicos y transporte de los productos, que pueden contribuir a determinados impactos ambientales.

Los frutos de chonta (*Bactris gasipaes* Kunth) se considera un recurso vegetal de importancia económica para la región al ser una de las plantas más útiles para las zonas rurales y pueblos

indígenas de la Amazonía ecuatoriana, siendo un símbolo de identidad cultural, abundancia y alimentación.

Además, la incorporación de esta especie a través de los sistemas agroforestales ayuda a la construcción de resiliencia en el contexto ambiental, social y económico de las comunidades donde la chonta (*Bactris gasipaes* Kunth) constituye un símbolo de fertilidad y abundancia. Esta palma presenta asociaciones positivas con los procesos de adaptación a los impactos del cambio climático (Valencia et al., 2015: pp.18-22).

4.6 Comprobación de la hipótesis

Mediante el estudio realizado se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna que menciona que los extractos vegetales y bioinsumos reducen el crecimiento de las diferentes especies de hongos identificados molecularmente de los frutos de Chonta (*Bactris gasipaes*) de la provincia de Pastaza.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

- Los productos biológicos que inhibieron el crecimiento de hongos asociados a pudrición de frutos de chonta (*Bactris gasipaes* Kunth) en los géneros *Ceratocystis*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Fusarium* y *Rhizopus* en el extracto de tomillo (*Thymus vulgaris*) inhibe el crecimiento en dosis de 100 y 500 ppm; en la cepa de *Mucor* en el producto 2 (extractos de algas, *Trichoderma*, materia orgánica) inhibe el crecimiento en dosis de 500 ppm, en la cepa de *Penicillium* su inhibición fue del 100% en todas las dosis (0,01; 0,1; 1; 10; 100 ppm), en las cepas de *Fusarium* y *Rhizopus*; en el producto de aceite de árbol de Té (*Melaleuca alternifolia*) inhibe el crecimiento en dosis de 100 y 500 ppm, en la cepa de *Penicillium* su inhibición fue del 100% en todas las dosis (0,01; 0,1; 1; 10; 100 ppm); en la cepa de *Fusarium* en el producto de *Bacillus* inhibe el crecimiento en dosis de 500 ppm, en la cepa de *Penicillium* su inhibición fue mayor al 50% en las dosis (0,01; 0,1; 10; 100 ppm); en la cepa de *Penicillium* su inhibición fue del 100% en las dosis (0,1; 1; 10; 100 ppm).
- Los productos biológicos que no inhibieron el crecimiento de hongos asociados a pudrición de frutos de chonta (*Bactris gasipaes* Kunth) en la cepa de *Penicillium* en el producto de extracto de tomillo (*Thymus vulgaris*) su inhibición es menor al 50% en todas sus dosis, en las cepas de *Ceratocystis*, *Geotrichum*, *Rhizopus* y *Fusarium* en el producto 2 (*Trichoderma*, *Bacillus*, Extractos húmicos, Potasio (K₂O), Extracto de algas, Manitol y Alginato) su inhibición es menor al 50% en todas sus dosis, en las cepas de *Ceratocystis*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Rhizopus* y *Fusarium* en el producto de quitosán oligosacarina su inhibición es menor al 50% en todas sus dosis, en las cepas de *Ceratocystis*, *Geotrichum* y *Mucor* en el producto de aceite de árbol de Té (*Melaleuca alternifolia*) su inhibición es menor al 50% en todas sus dosis, en las cepas de *Ceratocystis*, *Geotrichum*, *Mucor* y *Rhizopus* en el producto de *Bacillus* su inhibición es menor al 50% en todas sus dosis.
- El producto químico tebuconazol inhibió el crecimiento de hongos asociados a pudrición de frutos de chonta (*Bactris gasipaes* Kunth) en las cepas de *Geotrichum*, *Mucor*, *Rhizopus* y *Fusarium* en todas sus dosis (0,01; 0,1; 1; 10; 100 ppm) y *Rhizopus* en dosis (0,01, 0,1, 100 ppm), en la cepa de *Penicillium* su inhibición fue del 100% en las dosis (0,1; 1; 10; 100 ppm).
- El producto químico tebuconazol no inhibió el crecimiento de hongos asociados a pudrición de frutos de chonta (*Bactris gasipaes* Kunth) en la cepa de *Ceratocystis* en todas sus dosis (0,01; 0,1; 1; 10; 100 ppm).

- Se identificaron molecularmente los hongos asociados a pudrición de frutos de chonta (*Bactris gasipaes* Kunth) los cuales fueron: *Ceratocystis paradoxa*, *Mucor nidicola*, *Geotrichum candidus* y *Penicillium purpurogenum*.

RECOMENDACIONES

- Realizar más estudios de efecto biológico utilizando más productos diferentes a los utilizados en este estudio para el control de las especies ya identificadas como: *Ceratocystis paradoxa*, *Mucor nidicola*, *Geotrichum candidus* y *Penicillium purpurogenum*.
- Utilizar biocontroles como *Trichoderma* spp., efectivos agentes de control biológico de enfermedades como alternativa para reducir el impacto ambiental.
- Utilizar más aislados de frutos de chonta (*Bactris gasipaes* Kunth) provenientes de diferentes zonas de producción para una mejor evaluación de su comportamiento.
- Se sugiere probar otras metodologías y primers para identificar a nivel de especie los géneros que todavía que no se han podido identificar molecularmente.

GLOSARIO

Agar Sabouraud: Contiene glucosa y peptona modificada, pH ácido para favorecer el crecimiento de los hongos y evitar la contaminación por bacterias; en este medio se cultivan hongos saprófitos y patógenos (Bustillos, 2016, p. 1).

Cepa: Población de una especie que desciende de una sola célula (Arenas, 2011, p. 23).

CL50 (Concentración letal 50): Es la concentración, obtenida por estadística, de una sustancia de la que puede esperarse que produzca la muerte, durante la exposición o en un plazo definido después de ésta, del 50% de los animales expuestos a dicha sustancia durante un periodo determinado. El valor de la CL50 se expresa en peso de sustancia por unidad de volumen de aire normal (miligramos por litro, mg/L) (Uc-peraza, 2012: pp.13-140).

Cultivo: Población de microorganismos que crece en un medio (Carrillo, 2013, p. 315).

Electroforesis: La electroforesis es una técnica para separación de biomoléculas según su movilidad y naturaleza (generalmente ácidos nucleicos o proteínas) en un campo eléctrico sobre una matriz porosa, cuya composición depende de la biomolécula a analizar (Ryan y Ray, 2017, pp. 80-125).

Especie: Cepas estrechamente relacionadas (>97% homología en la secuencia del ARN-r 16S, >70% hibridación genómica) y suficientemente diferentes de otras para ser reconocidas como una unidad inequívoca (González et al., 2013, p. 1).

Espora: Estructura de diseminación formada por los hongos (Arenas, 2011, p. 34).

Gen: Segmento de ADN que constituye una unidad de información genética (Ryan y Ray, 2017, pp. 80-125).

Género: Grupo de especies estrechamente relacionadas (Ryan y Ray, 2017, pp. 80-125).

Lisis: Rotura o desintegración de células (D'Arcy et al., 2001: p.2).

Micelio: Aparato vegetativo de los hongos, en el que aparecen los conidióforos o las esporas de resistencia, formado por filamentos más o menos agrupados denominados hifas (Andrés, 2015, p. 377).

Patógeno: Es todo agente que puede producir enfermedad o daño a la biología de un huésped, sea animal o vegetal (Pío Font Quer, 2010: p.1003).

Síntoma: Reacciones o alteraciones internas o externas que sufre una planta como resultado de su enfermedad (Peña et al., 2015: p.11).

BIBLIOGRAFÍA

ANDERSON, J.M., DEAN, J.R. & PEGG, K.G. Phosphonate applied as a pre-plant dip controls *Ceratocystis paradoxa* base rot of pineapple planting material. *Planta de Australasia Pathol.* **51**, 245–249 (2022). <https://doi.org/10.1007/s13313-022-00852-1>

AGUILAR DOROTEO, L., ZÁRATE SEGURA, P.B., VILLANUEVA ARCE, R., YÁÑEZ FERNÁNDEZ, J., GARÍN AGUILAR, M.E., GUADARRAMA MENDOZA, P.C. y VALENCIA DEL TORO, G., Utilización de marcadores ITS e ISSR para la caracterización molecular de cepas híbridas de *Pleurotus djamor*. *Revista Iberoamericana de Micología* [en línea], 2018, vol. 35, no. 1, pp. 49-55. [Consulta: 6 abril 2023]. DOI <https://doi.org/10.1016/j.riam.2017.06.003>. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-iberoamericana-micologia-290-articulo-utilizacion-marcadores-its-e-issr-S113014061730116X>.

ANDRÉS, A. *Plantas leñosas ornamentales: control de enfermedades producidas por hongos y cromistas*. España: Ediciones Mundi Prensa. 2015, pp. 11-12.

ANITHA KARUN, SV RAMESH, MK RAJESH, V. NIRAL, R. et al. *Conservación y utilización de la diversidad genética en el coco (Cocos nucifera L.)*. [en línea]. 10^{ma} ed. Lugar New York, EE. UU: Anales de Botánica, 2015. [Consulta: 24 octubre 2022]. Disponible en: <https://doi.org/10.3732/ajb.1500164>

ARENAS, G. *Micología Médica Ilustrada. Historia de la Micología. Reproducción de los hongos*. México: McGraw-Hill Interamericana, 2011, p. 13.

ARIZA, Y., & SÁNCHEZ, L. (2012). Determination of secondary metabolites from *Bacillus subtilis* with effect biological control on *Fusarium* sp. *Nova*, 10(18), 149-155.

ARNHOLD, S., et al. FA1 *Evaluación de la actividad antifúngica de extractos hidroetanólicos de hojas de Passiflora edulis Sims (Passifloraceae)*. FARMACOLOGÍA -ACTIVIDAD BIOLÓGICA. 2019.[en línea]. S.l.: [Consulta: 19 febrero 2023]. Disponible en: <https://dominguezia.org/volumen/articulos/33107.pdf>.

BHALE, UDHAV NARBA. Conflicto antagónico de *Trichoderma harzianum* contra patógenos de la pudrición de frutos. *Revista africana de ciencias biológicas*, 2020, vol. 2, n° 4, pág. 92-98.

BELANCHE, A., RAMOS-MORALES, E., & NEWBOLD, C. J. (2016). In vitro screening of natural feed additives from crustaceans, diatoms, seaweeds and plant extracts to manipulate rumen fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(9), 3069-3078.

BENÍTEZ, J. BENTLEY, P. BUSTAMANTE, L-C. SÁNCHEZ, AND L. CORRALES. "Aislamiento de los microorganismos cultivables de la rizosfera de *Ornithogalum umbellatum* y evaluación del posible efecto biocontrolador en dos patógenos del suelo", *NOVA*, vol. 5, pp. 147-153, 2007.

BOU, GERMÁN, et al. "Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología". *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* [en línea], 2011, vol. 29, no 8, p. 601-608. [Consulta: 18-01-2023]. ISSN 0213-005X. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0213005X11001571>

BUSTILLOS, D. Medios de Cultivos Naturales, 2016. Recuperado de: <https://es.scribd.com/document/312323810/Medios-de-Cultivo-Naturales>

BORKAR, SG y YUMLEMBAM, RA. *Enfermedades fúngicas de las plantas de cultivo*. [en línea]. Prensa CRC 1ª ed. Nueva Delhi: Prensa CRC, 2016, pp. 16-22. [Consulta: 19 octubre 2022]. Disponible: <https://doi.org/10.1201/9781315367972>.

CACERES RUEDA DE LEON, ISAURA et al. *Actividad Antifúngica in vitro de Extractos Acuáticos de Especies contra Fusarium oxysporum, Alternaria alternata, Geotrichum candidum, Trichoderma spp., Penicillium digitatum y Aspergillus niger*. *Rev. mex. fitopatol* [en línea]. 2013, vol.31, n.2 [citado 2023-02-21], pp.105-112. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092013000200003&lng=es&nrm=iso>. ISSN 2007-8080.

CALDEIRA, A. T., FEIO, S. S., ARTEIRO, J. S., & ROSEIRO, J. C. (2007). *Bacillus amyloliquefaciens* CCMI 1051 in vitro activity against wood contaminant fungi. *Annals of microbiology*, 57(1), 29-33.

CARRILLO, W. (2013). Lisozima: Actividad antibacteriana y alergenicidad. Actualización en *Nutrición*, 14(4). Recuperado de: http://www.revistasan.org.ar/pdf_files/trabajos/vol_14/num_4/RSAN_14_4_314.pdf

CELIS, ÁLVARO et al. Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia Piperaceae. Una revisión. *Agron. colombo*. [en línea]. 2008, vol.26, n.1 [citado el 06-04-2023], pp.97-106. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99652008000100012&lng=en&nrm=iso>. ISSN 0120-9965.

CORNEJO, A.; SERRATO, A.; RENDÓN, B.; & ROCHA MUNIVE, G. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos* [en línea]. Número de edición si no es la primera. Delegación Coyoacán-México: 1ª ed., 2014. [Consulta: 29 diciembre 2022]. Disponible en: [/https://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4_uibd.nsf/770DBBBD5ADF759505257D4900580FE6/\\$FILE/HerramientasMolecularesAplicadasEcolog%C3%ADa.pdf](https://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4_uibd.nsf/770DBBBD5ADF759505257D4900580FE6/$FILE/HerramientasMolecularesAplicadasEcolog%C3%ADa.pdf)

CORPOICA. “*El cultivo de chontaduro (Bactris gasipaes H.B.K)*” [en línea]. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. Colombia. 1996. p. 10. [Consulta: 10 julio 2020]. Disponible en: <http://bibliotecadigital.agronet.gov.co/bitstream/11348/4909/2/El%20cultivo%20de%20chontaduro.pdf>

D'ARCY, C. J.; EASTBURN, D. M.; & SCHUMANN, G. L. “*Illustrated Glossary of Plant Pathology*”. *The Plant Health Instructor*. The American Phytopathological Society (APS).2001, pp.1-6. [Consulta: 26 noviembre 2022]. Disponible en: <https://www.apsnet.org/edcenter/resources/illglossary/Pages/default.asp>

ESTRADA, G.; & RAMÍREZ, C. *Micología General* [en línea]. Manizales, Caldas – Colombia: Centro Editorial Universidad Católica de Manizales, 2019. pp. 95-96 [Consulta: 22 septiembre 2022]. ISSN 978-958-52337-1-3. Disponible en: http://www.ucm.edu.co/wpcontent/uploads/libros/Micologia_general.pdf

FERREIRA, FLAVIA VANINA, et al. *Eficacia de cepas de Trichoderma aisladas de la rizósfera de cítricos para el control de Alternaria alternata, Colletotrichum gloeosporioides y Penicillium digitatum A21 resistentes a pirimetanil en poscosecha de naranjas (Citrus sinensis L.(Osbeck)*. *Revista de microbiología aplicada*, 2020, vol. 129, n° 3, pág. 712-727.

FOLTINOVÁ, D. INHIBITORY EFFECT OF ESSENTIAL OILS ON THE GROWTH OF GEOTRICHUM CANDIDUM. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*.

2019. vol. 9, no. Special issue, pp. 380-384. DOI <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2019.9.special.380-384>.

GARCIA-MATEOS, M. R. et al. *Extractos vegetales para el control de Colletotrichum gloeosporioides in vitro, en periodo de floración y poscosecha del fruto de Carica papaya.* Polibotánica [en línea]. 2021, n.51 [citado 2022-12-05], pp.213-228. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-27682021000100213&lng=es&nrm=iso>. Epub 06-mayo-2021. ISSN 1405-2768. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.51.14>.

GERARD MOREL, & MIREILLE RACCURT. *PCR/RT-PCR in situ* [en línea]. Washington-USA: Prensa CRC, 2002, 1ª ed. [Consulta: 22 septiembre 2022]. Disponible en: <https://doi.org/9780429118241>.

GIRALDO NARANJO, Sara Jein; & VILLA RAMOS, Andrés Felipe. *Caracterización morfológica y metabólica de los hongos filamentosos asociados a la rizósfera de plantas arvenses en la zona cafetera* [en línea] (Trabajo de titulación). (Bacteriólogo) Universidad Católica de Manizales, Facultad de Salud. Manizales-Colombia. 2016. p. 28. [Consulta: 2020-07-12]. Disponible en: <http://repositorio.ucm.edu.co:8080/jspui/bitstream/handle/10839/1320/Sara%20Jein%20Giraldo%20Naranjo.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

GONZÁLEZ, L. *Introducción a la fitopatología.* (Tercera reimp.) Costa Rica, 2013, IICA. Recuperado de: <https://bit.ly/2H4DfZA>

GUERRERO R, RISCO G, CEVALLOS O, VILLAMAR R, PEÑAHERRERA S. *Extractos vegetales: una alternativa para el control de enfermedades en el cultivo de cacao (Theobroma cacao).* RIINN [en línea]. 22 de febrero de 2021 [citado 6 de abril de 2023];8(1). Disponible en: <https://revistas.unicordoba.edu.co/index.php/rii/article/view/232>

GURURAJ, SUNKAD, et al. *Evaluación in vitro de fungicidas contra Ceratocystis fimbriata Ell. y Halst. causando marchitez en la granada.* Archivos de plantas, 2017, vol. 17, nº 1, pág. 111-114.

HENDERSON, A., GALEANO, G., & BERNAL, R. *Field Guide to the Palms of the Americas* [en línea]. 2^{da} ed. Nueva Jersey, EE. UU: Princeton University Press, 2019. [Consulta: 25 octubre 2022]. Disponible en:

https://www.academia.edu/11592258/Field_Guide_to_the_Palms_of_the_Amerias.

HERNANDEZ-LAUZARDO, Ana Niurka et al. *Actividad Antifúngica del Quitosano en el Control de Rhizopus stolonifer (Ehrenb.: Fr.) Vuill. y Mucor spp. Rev. mex. fitopatol* [en línea]. 2007, vol.25, n.2 [citado 2023-02-19], pp.109-113. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092007000200003&lng=es&nrm=iso>. ISSN 2007-8080.

HERNANDEZ-MELCHOR, DULCE JAZMÍN; FERRERA-CERRATO, RONALD Y ALARCON, ALEJANDRO. *Trichoderma: IMPORTANCIA AGRÍCOLA, BIOTECNOLÓGICA, Y SISTEMAS DE FERMENTACIÓN PARA PRODUCIR BIOMASA Y ENZIMAS DE INTERÉS INDUSTRIAL. Chil. j. agric. anim. sci.* [online]. 2019, vol.35, n.1 [citado 2023-04-06], pp.98-112. Disponible en: <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0719-38902019000100098&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0719-3882. <http://dx.doi.org/10.4067/S0719-38902019005000205>.

HONG, P., HAO, W., LUO, J., CHEN, S., HU, M., ZHONG, G. (2014). *Combination of hot water, Bacillus amyloliquefaciens HF-01 and sodium bicarbonate treatments to control postharvest decay of mandarin fruit.* *Postharvest Biology and Technology* 88: 96-102.

KAREL et al. Evaluación del impacto ambiental del cultivo de la pitahaya, Cantón Palora, Ecuador. *TecnoL.*, Medellín, v. 23, n. 49, pág. 92-107, diciembre de 2020. Disponible en <http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-77992020000300092&lng=en&nrm=iso>. acceso el 20 de marzo de 2023. <https://doi.org/10.22430/22565337.1621>.

KLARIC, M., et al. *Actividad antifúngica del aceite esencial de tomillo (Thymus vulgaris L.) y timol contra mohos de viviendas húmedas.* *Letras en microbiología aplicada.* 2007, vol. 44, nº 1, pág. 36-42.

LIFEDER. 2020. *Penicillium: características, morfología, hábitat, reproducción.* Recuperado de: <https://www.lifeder.com/penicillium-genero/>.

LIMA, Diogo Xavier, et al. A new occurrence of *Mucor nidicola* (Madden, Stchigel, Guarro, Sutton et Starks) (Mucorales, Mucoromycota) in the Upland Rainforest of the Brazilian Northeast and first report as a saprobe in soil. *Check List*, 2020, vol. 16, no 1, p. 163-167.

LI X ET AL. (2016) Antifungal Activity of Isolated *Bacillus amyloliquefaciens* SYBC H47 for the Biocontrol of Peach Gummosis. *PLoS ONE* 11(9): e0162125. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162125>

MALDONADO et al. Aislamiento, identificación y sensibilidad a antifúngicos de hongos patógenos y no patógenos del limón. *Revista Iberoamericana de Micología*, 2005, vol. 22, no 1, p. 57-59.

MALDONADO BONILLA, L. D., SÁNCHEZ ESPINOSA, A. C. Y VILLARRUEL ORDAZ, J. L. Identificación de hongos mediante códigos de barras de ADN. *CIENCIA ergo-sum*, 31(1). [en línea], 2023, (México) 31(1), p. 7. [Consulta: 6 abril 2023]. ISSN: 2395-8782. Disponible en: <file:///C:/17956-73-83583-1-10-20230207.pdf>

MAMANIDE MARCHESE, A. y FILIPPONE, M.P. Bioinsumos: componentes claves de una agricultura sostenible. *Rev. agron. noroeste arg.* [en línea]. 2018, vol.38, n.1 [citado 2022-10-25], pp.9-21. Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2314-369X2018000100001&lng=es&nrm=iso. ISSN 0080-2069.

MCKAY et al. Toxicidad y potencial de resistencia de fungicidas seleccionados a *Galactomyces* y *Penicillium spp.* causando pudriciones de frutos postcosecha de cítricos y otros cultivos. *Enfermedad de las plantas*, 2012, vol. 96, n° 1, pág. 87-96.

MEJDOUB-TRABELSI, B. et al. Effect of chitosan for the control of potato diseases caused by *Fusarium species*. *Journal of Phytopathology*. (2020). 168(1): pp. 18-27.

MEZZOMO R, PIVETA G, LAZAROTTO M, WALKER C, MACIEL CG, MUNIZ MF, et al. *Biological Control of Ceratocystis fimbriata by Bacillus subtilis on Acacia mearnsii Seedlings*. *Floresta Ambient* [en línea]. 2019; 26 (Floresta Ambient., 2019 26(4)): e20160195. Available from: <https://doi.org/10.1590/2179-8087.01951>

MEXZON, R. Manejo integrado de los artrópodos perjudiciales en el cultivo del pejibaye (*Bactris gasipaes* H.B.K.). In Curso Internacional sobre pejibaye para palmito. (Universidad de Costa Rica. Julio de 1995.

MONTÚFAR, R.; & ROSAS, J. *Capítulo 3. Chontaduro/Chontilla* [en línea]. En: Palmas Ecuatorianas: biología y uso sostenible (Editores. Valencia R, Montúfar R, Navarrete H, Balslev H.). Publicaciones del Herbario de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, 2013. pp. 63-89. [Consulta: 23 octubre 2022]. ISSN 978-9942-13-263-5. Disponible en: https://issuu.com/juanlorenzo/docs/palmas_ecuador

MORA URPI, J. El pejibaye (*Bactris gasipaes* H.B.K.): Origen, biología floral y manejo agronómico. In; Palmeras poco utilizadas de América Tropical. Informe de la Reunión Oonsulta FAO - CATIE. Turrialba, Costa Rica, 1983.

OJEDA, HENRY. *Evaluación de la eficiencia de la gallinaza sobre el ahijado y calidad comercial del tallo de palmito Bactris gasipaes* [en línea] (Trabajo de titulación). (Ingeniero Agropecuario) Escuela Politécnica del Ejército, Sangolqui, Ecuador. 2004. pp. 46-47. [Consulta: 23 octubre 2022]. Disponible en: <http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/21000/2584/T-ESPEIASA%20I002615.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

OSORIO CÉSPEDES, Hugo Nicolás; SANDOVAL BRIONES, Claudio; NÚÑEZ ABARCA, Fernanda Beatriz. Efecto inhibitorio in vitro de cinco ingredientes activos sobre un aislado de *Fusarium oxysporum* obtenido de sandía. 2014.

PALOMINO-CAMARGO, CAROLINA Y GONZALEZ-MUNOZ, YUNIESKY. *Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones.* *Rev. Perú. med. exp. salud pública* [en línea]. 2014, vol.31, n.3 [citado 2022-10-25], pp.535-546. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342014000300020&lng=es&nrm=iso. ISSN 1726-4634.

PAVA, O.J., CE. CASTILLO y A.O. GONZALEZ, 1981. Consideraciones ecológicas preliminares sobre aspectos de interés fitosanitario de la palma de chontaduro *Bactris gasipaes* H.B.K. en algunas regiones de los departamentos de Valle y Chocó. Tesis. F-ocultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia. Palmira.

PEÑA, E. *Plagas y enfermedades del chontaduro (Bactris gasipaes)*. [en línea]. 1996. [citado: 2022, diciembre 12] Disponible en: <http://hdl.handle.net/20.500.12324/31941>

PEÑA, EDUARDO. *Plagas y enfermedades del chontaduro. Investigador*. [en línea]. Centro de Investigación El Mira, Tumaco. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA). Colombia. 2000. p. 75-76. [Consulta: 21 octubre 2022]. Disponible en: https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/17779/42371_46142.pdf?sequence=1&isAllowed=y

PEREZ-RODRIGUEZ, LUIS ROBERTO et al. Sensibilidad in vitro de hongos fitopatógenos causantes de enfermedades en fresa a controladores biológicos y fungicidas, en el estado de Guanajuato, México. *Acta univ* [en línea]. 2019, vol.29 [citado 2023-02-18], e2339. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-62662019000100215&lng=es&nrm=iso. Epub 11-Sep-2020. ISSN 2007-9621. <https://doi.org/10.15174/au.2019.2339>

PÍO FONT QUER. *Diccionario de Botánica*. 2a Ed. Balderas, México D.F.: Ediciones Península S.A., 2010. ISBN: 968186283X, pp.1-1124

ADRIÁN QUIJADA, GUADALUPE MÉNDEZ-CÁRDENAS, SOL ÚRTIZ-GARCÍA y ELENA R. ÁLVAREZ-BUYLLA. La Región De Los ITS Del ADN Ribosomal Del Núcleo (Nradn), Fuente De Caracteres Moleculares En La Sistemática De Las Gimnospermas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 60. [en línea], 1997, (México), pp: 159-168. [Consulta: 6 abril 2023]. Disponible en: DOI: 10.17129/botsoci.1527

RAHMAN, M. et al. Screening of Trichoderma isolates as a biological control agent against Ceratocystis paradoxa causing pineapple disease of sugarcane. *Mycobiology*, 2009, vol. 37, no 4, p. 277-285.

RAMOS-GARCÍA et al. *Compuestos antimicrobianos adicionados en recubrimientos comestibles para usos en productos hortofrutícolas*. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 2010. 28: pp. 44- 57

REN, J., et al. (2021). *Chitosan is an effective inhibitor against potato dry rot caused by Fusarium oxysporum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 113, 101601. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2021.101601>

RYAN, K Y RAY, C. “*Sherris. Microbiología médica*”, McGraw Hill [en línea] (2017). 6(1) [Consulta: 25 de noviembre 2022]. Disponible en: <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2169§ionid=162978735>

RIASCOS-ORTIZ, DONALD et al. *Reconocimiento de hongos con potencial benéfico asociados a la rizósfera de chontaduro (Bactris gasipaes HBK) en la región Pacífico del Valle del Cauca, Colombia. Acta Agron.* [en línea]. 2011, vol.60, n.4 [citado el 22-10-2022], pp.319-327. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-28122011000400004&lng=en&nrm=iso>. ISSN 0120-2812.

DI, RIDVÁN; YILMAZ, NALAN; DENIZLI, ADIL. Biosorción de iones de cadmio, plomo, mercurio y arsénico por el hongo *Penicillium purpurogenum*. *Separation Science and Technology*, 2003, vol. 38, n° 9, pág. 2039-2053.

RIVAS, JORGE. *Determinación de los avances de la biotecnología aplicada a la propagación de Bactris gasipaes Kunth (Chontaduro) en Colombia* [en línea] (Trabajo de titulación). (Especialista en Biotecnología) Universidad Nacional Abierta y A Distancia, Quibdó - Choco, Colombia. 2019. p. 24. [Consulta: 2020-07-12]. Disponible en: <https://repository.unad.edu.co/bitstream/handle/10596/25554/jirivash.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

RODRÍGUEZ, M., CALVO et al. 2019. S.l.: [Consulta: 19-02-2023], p. 9. Disponible en: https://aph.aphorticultura.pt/wp-content/uploads/2019/10/efecto_de_fungicidas_triazoles_sobre_el_crecimiento_miceliar_de_geotrichum_candidum_en_melocot%C3%B3n_%E2%80%98crimson_lady%E2%80%99.pdf.

RODRÍGUEZ-GUZMÁN. et al. Aplicación de sustancias de quitosano y GRAS en el control de *Geotrichum candidum* aislado de frutos de tomate (*Lycopersicon esculentum L.*) en el estado de Nayarit, México: Ensayos in vitro. rmiq [en línea]. 28Aug.2022 [citado 19/02/2023];21(3): Bio2790. Disponible en: <http://www.rmiq.org/ojs311/index.php/rmiq/article/view/2790>

ROZMAN, Nur Amiera Syuhada Binti, et al. Eficacia antimicrobiana del tejido de algodón tratado con extracto de *Penicillium amestolkiae* elv609 para el cuidado de heridas diabéticas. *Micobiología*, 2017, vol. 45, n° 3, pág. 178-183. Disponible en: <https://doi.org/10.5941/MYCO.2017.45.3.178>

SANMIGUEL CHIMBO, JOSUE DAVID. *Caracterización de microorganismos fúngicos asociados a los frutos de chonta (Bactris gasipaes kunth)*, en cinco localidades de la provincia de Orellana. [en línea]. (Trabajo de titulación). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Agronomía, Riobamba-Ecuador. 2021. pp. 28-30. [Consulta: 18-01-2023]. Disponible en: <http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/15660/1/13T00944.pdf>.

SOSA PECH et al. 2012. *Actividad antagónica in vitro de aislados de la clase Bacilli de la península de Yucatán contra cuatro hongos fitopatógenos*. *Universidad y Ciencia* 28(3):279-284.

SOTO, F., TRAMON, C.P., AQUEVEQUE, P.M., DE BRUIJN, J. (2018). Antagonist microorganisms that inhibit the development of post-harvest pathogens in lemons (*Citrus limon* L.). *Chilean Journal of Agricultural and Animal Sciences* 34 (2): 173-184.

SOYLU, SONER, et al. *Geotrichum citri-aurantii*'nin sebep olduğu turuncgil ekşi çürüklük hastalığının biyolojik mücadelesinde endofit bakterilerin biyokontrol potansiyellerinin belirlenmesi. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2022, vol. 19, no 1, p. 177-191.

SUAREZ-CONTRERAS et al. *Identificación molecular de hongos filamentosos y su potencial biotecnológico*. *Rev.Bio.Agro* [en línea]. 2022, vol.20, n.1 [citado el 22-10-2022], pp.194-206. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612022000100194&lng=en&nrm=iso. Epub 30 de diciembre de 2021. ISSN 1692-3561. <https://doi.org/10.18684/bsaa.v20.n1.2022.1914>.

TANG, QH, et al. Primer informe de la pudrición del corazón de la palma de Pindo causada por *Ceratocystis paradoxa* en China. *Enfermedad de las plantas*, 2014, vol. 98, n° 9, pág. 1282-1282.

TEJERA et al. 2012. *Antagonismo de Bacillus spp. frente a hongos fitopatógenos del cultivo del arroz (Oryza sativa L.)* *Rev. Protección Vegetal* 2: 117-122.

TEWARI, N., VASUDEVAN, P. y GUHA, B.K., 2005. Study on biosorption of Cr (VI) by *Mucor hiemalis*. *Biochemical Engineering Journal* [en línea], vol. 23, no. 2, pp. 185-192.

[Consulta: 9 abril 2023]. DOI <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.01.011>. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1369703X0500015X#preview-section-recommended-articles>.

TRIGOS, ÁNGEL; RAMIREZ, KARINA Y SALINAS, ALEJANDRO. Presencia de hongos fitopatógenos en frutas y hortalizas y su relación en la seguridad alimentaria. *Rev. Mex. Mic* [online]. 2008, vol.28, n.spe [citado 2023-04-11], pp.125-129. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-31802008000300015&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0187-3180

UC-PERAZA, RUSSELL GIOVANNI Y DELGADO-BLAS, VÍCTOR HUGO. Determinación de la concentración letal media (CL50) de cuatro detergentes domésticos biodegradables en *Laeonereis culveri* (Webster 1879) (Polychaeta: Annelida). *Rev. Int. Contam. Ambient* [online]. 2012, vol.28, n.2 [citado 2023-04-11], pp.137-144. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992012000200004&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0188-4999.

ULLOA, MIGUEL; & HANLIN, RICHARD. *Nuevo Diccionario Ilustrado de Micología*. Saint Paul, Minnesota-United States of America: The American Phytopathological Society, 2006. ISBN: 9780890543412, pp.1-237

VALENCIA, RENATO; ASTRORGA, DIANA; AYALA, MICHAEL. Et al. “*La Chonta, el arte de la domesticación (Proyecto CHONTA)*”. *Nuestra ciencia* [en línea], 2021, (Quito, Ecuador) volumen (23), pp. 18-22. [Consulta: 15 septiembre 2022]. Disponible en: <https://www.puce.edu.ec/wp-content/uploads/2021/10/Revista-Nuestra-Ciencia-23.pdf>.

VARLAMOV et al. (2020). Chitin/chitosananditsderivatives: fundamental problems and practicalapproaches. *Biochemistry* (Moscow) 85(1),154-176.<https://doi.org/10.1134/S0006297920140084>

VARGAS, E. 1992. *La marchitez del pejibaye*. Una nueva enfermedad en Costa Rica. Serie Técnica Pejibaye. Pejibaye, Vol IV, No.1. pp 1 - 2.

VELAZQUEZ-DEL VALLE, MIGUEL GERARDO et al. Estrategias de Control de *Rhizopus stolonifer* Ehrenb. (Ex Fr.) Lind, Agente Causal de Pudriciones Postcosecha en Productos Agrícolas. *Rev. mex. fitopatol* [online]. 2008, vol.26, n.1 [citado 2023-01-18], pp.49-55.

Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092008000100008&lng=es&nrm=iso>. ISSN 2007-8080

VILLARREAL-DELGADO, MARÍA FERNANDA et al. El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Rev. mex. fitopatol* [online]. 2018, vol.36, n.1 [citado 2023-04-06], pp.95-130. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-330920180001000095&lng=es&nrm=iso>. ISSN 2007-8080. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>.

WANG, Y., XU, Z., BACH, S. J., & MCALLISTER, T. A. (2008). Effects of phlorotannins from *Ascophyllum nodosum* (brown seaweed) on in vitro ruminal digestion of mixed forage or barley grain. *Animal Feed Science and Technology*, 145(1-4), 375-395.

XIAO RONGFENG, LIU BO, ZHU YUJING, RUAN CHUANQING, LIU GUOHONG, WANG JIEPING. Spatial distribution characteristics of fungal population in microbial fermentation bed for pig rearing[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2018, 26(4): 493-504. doi: [10.13930/j.cnki.cjea.170904](https://doi.org/10.13930/j.cnki.cjea.170904)

XING et al. (2018). *Fungicidal effect of chitosan via inducing membrane disturbance against Ceratocystis fimbriata.* *Carbohydrate Polymers* 192, 95-103. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.03.053>

YOSSEN, V., & CONLES, M. *Eficacia de fungicidas utilizados in vitro para el control de Fusarium oxysporum y F. proliferatum, agentes causales de la marchitez del orégano en Argentina.* *Ind. rev. agrico Tucumán* [en línea]. 2014, vol.91, n.1 [citado 2023-02-10], pp.19-25. Disponible en: <http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-30182014000100003&lng=es&nrm=iso>. ISSN 1851-3018

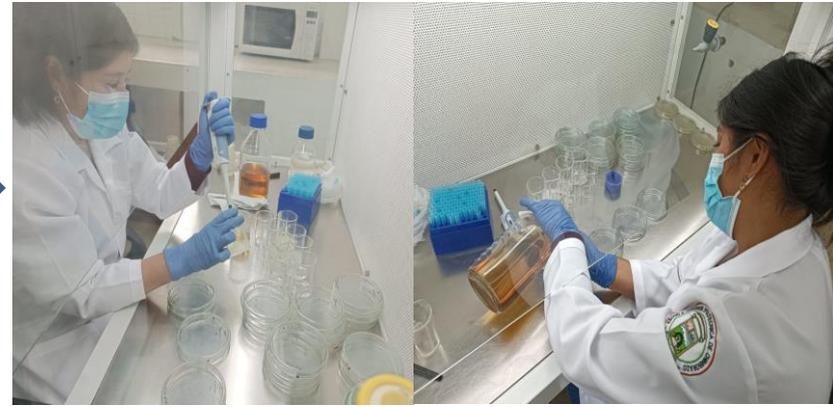


ANEXOS

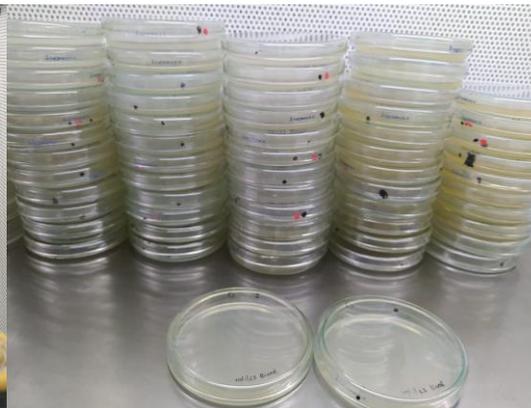
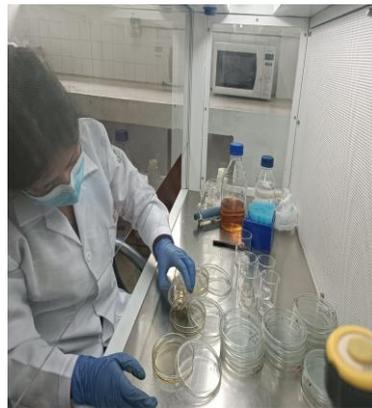
ANEXO A: PREPARACIÓN DEL MEDIOS DE CULTIVOS PDA Y SGA, CON BIOPRODUCTOS CON SUS RESPECTIVAS DOSIS.



1. Preparación de solución stock



2. Enmendados del medio



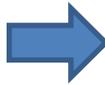
3. Cajas dispensadas con medio enmendados



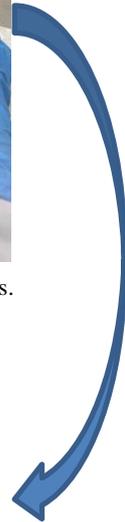
ANEXO B: SIEMBRA DE LOS DISCOS DE MICELIO CON *Fusarium* sp., *Rhizopus* sp., *Ceratocystis* sp., *Mucor* sp., *Geotrichum* sp. y *Penicillium* sp., EN LAS CAJAS PETRI ENMENDADO CON BIOPRODUCTOS.



1. Se transfiere los discos con ayuda de palillos al medio PDA y SDA envenenado.



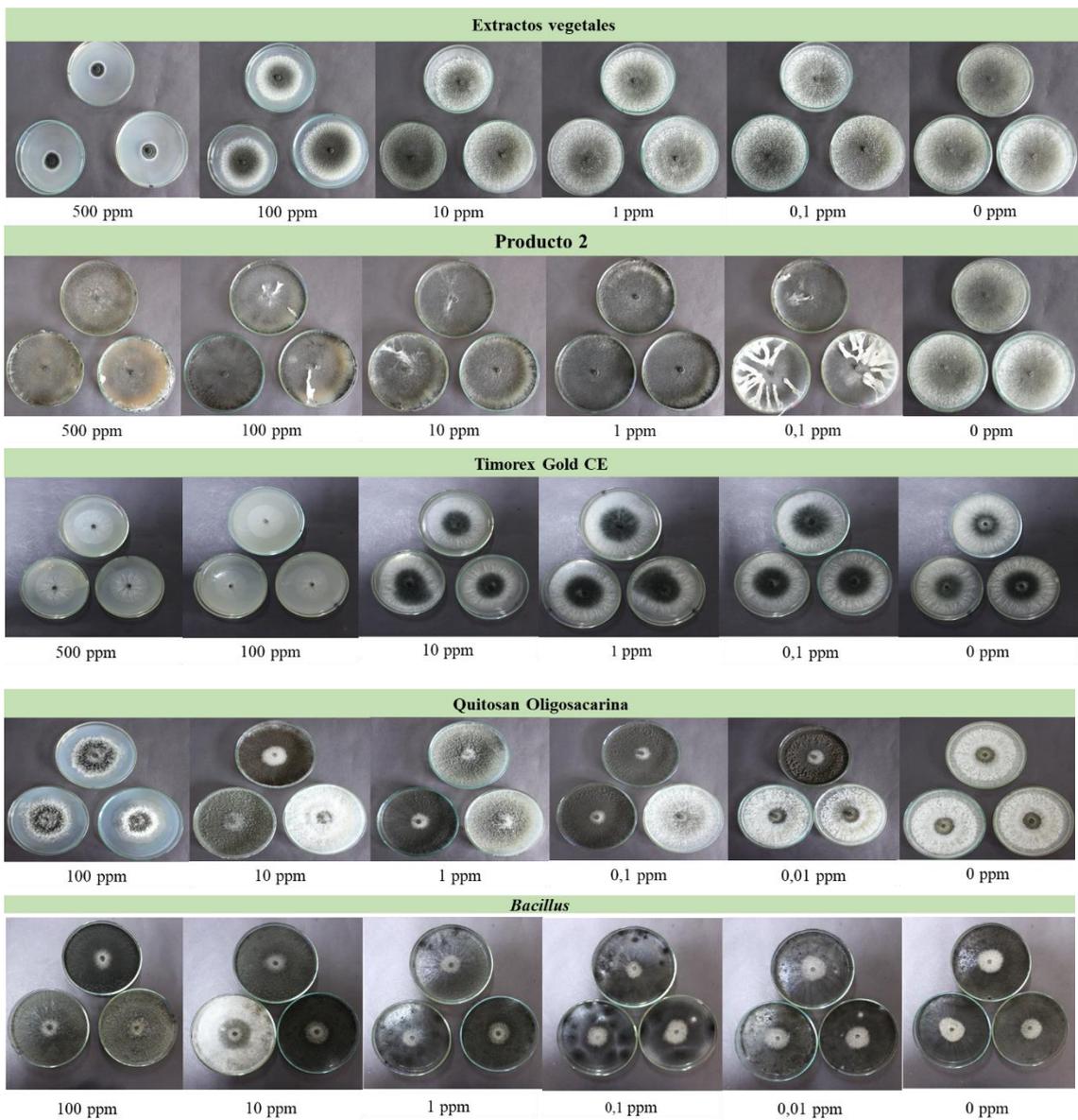
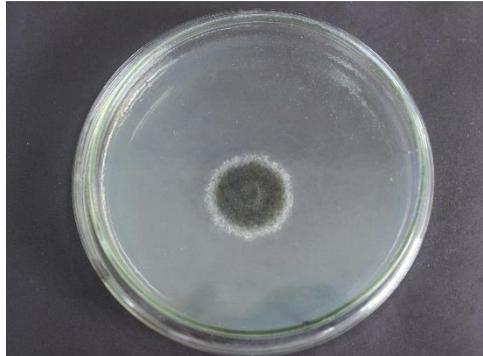
2. Se etiqueta a cada una de las cepas.

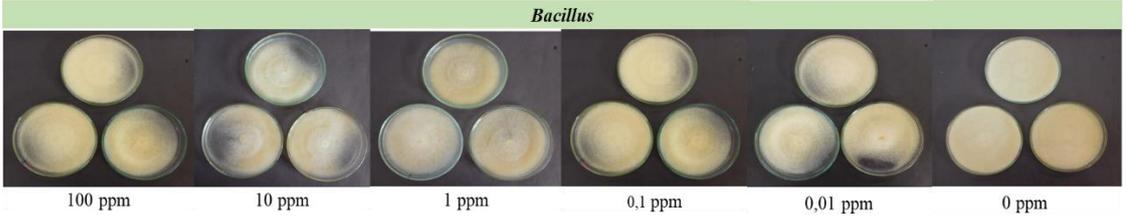
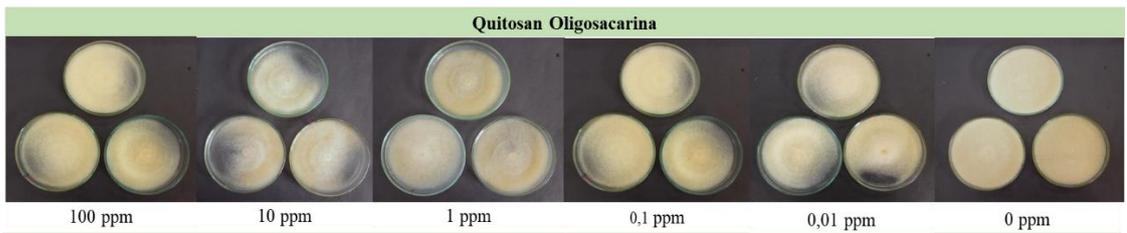
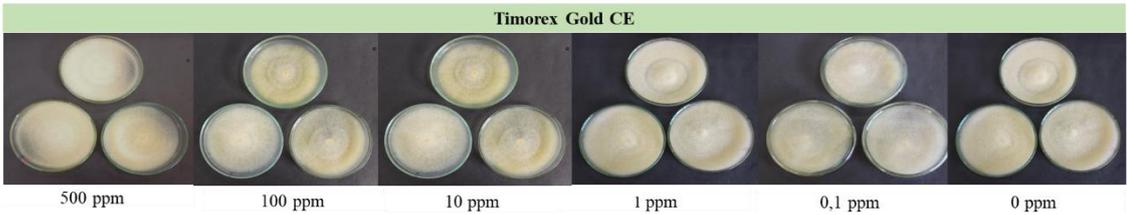
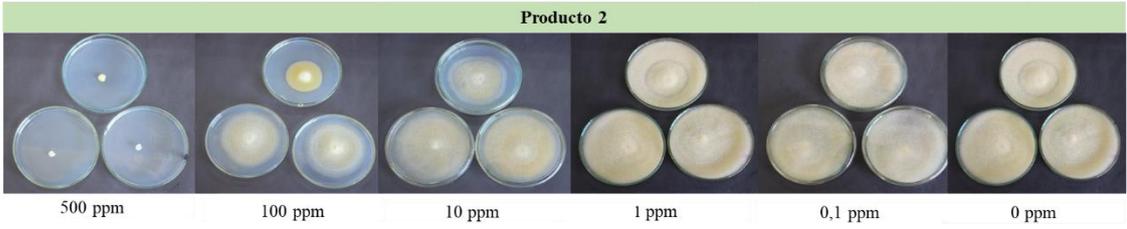
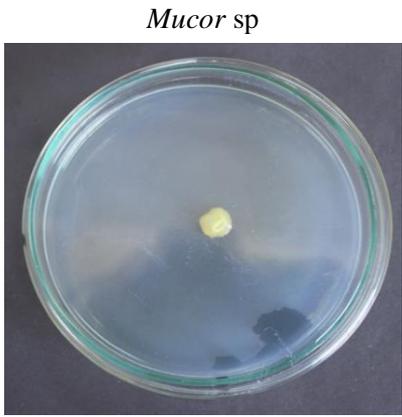
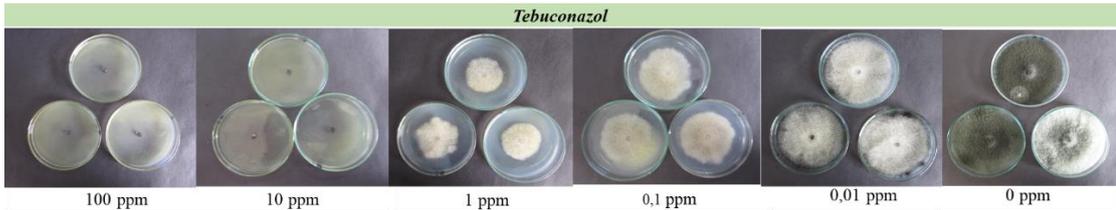


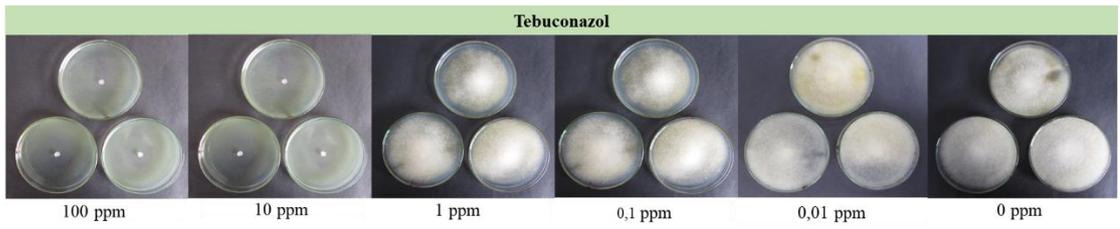
3. Se sella con papel film.

ANEXO C: CRECIMIENTO DE LOS AISLADOS *Fusarium* sp., *Rhizopus* sp., *Ceratocystis* sp., *Mucor* sp., *Geotrichum* sp., y *Penicillium* sp. EN LOS DISTINTOS BIOPRODUCTOS.

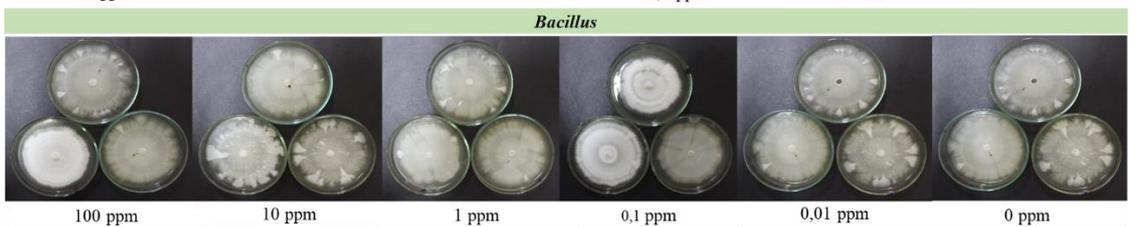
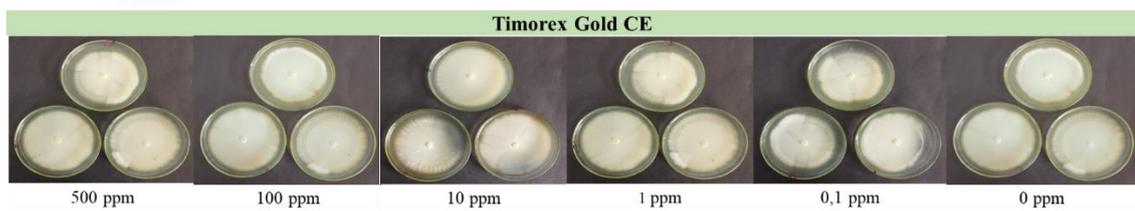
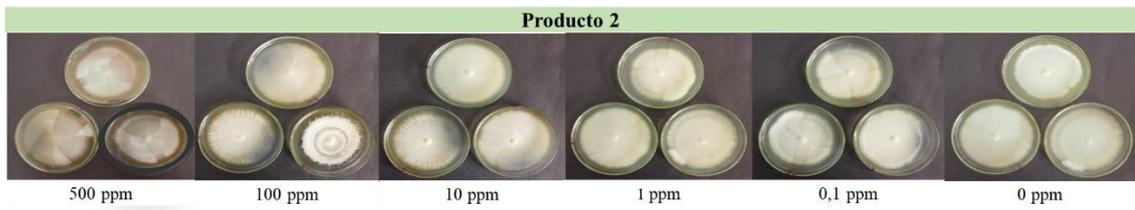
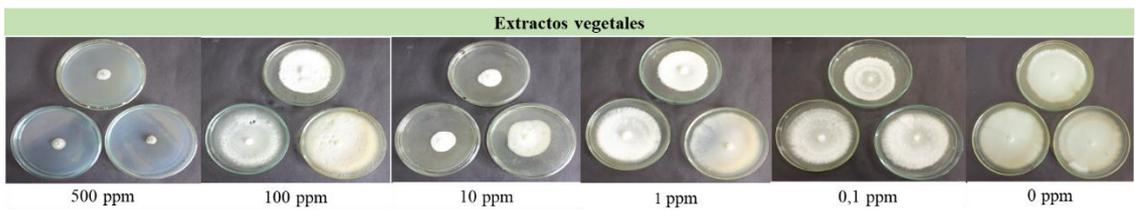
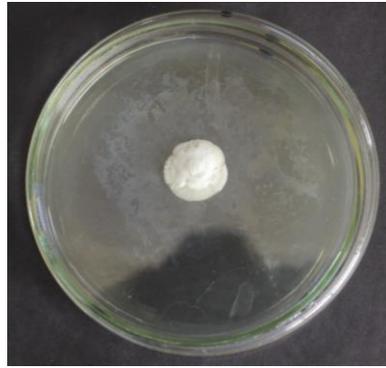
Ceratocystis sp.

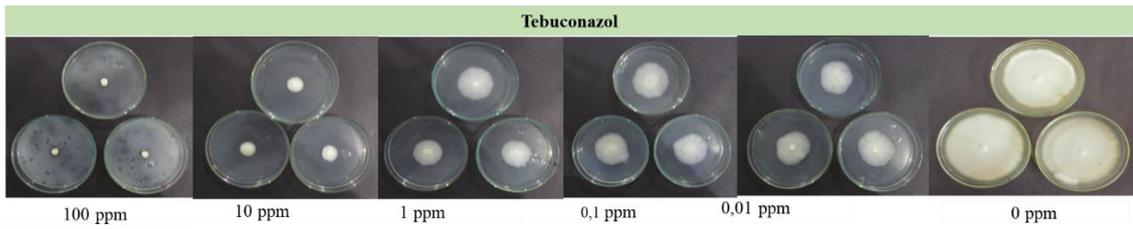




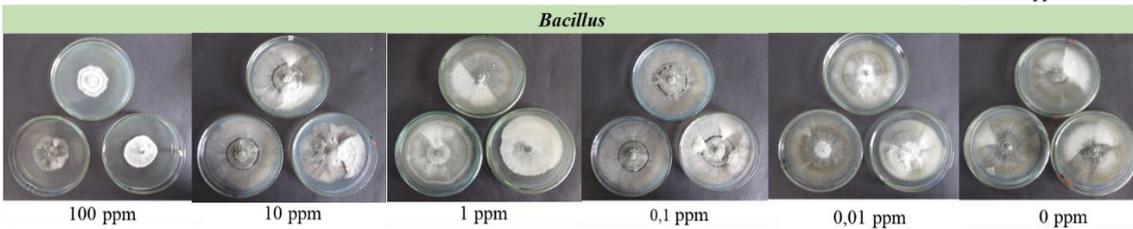
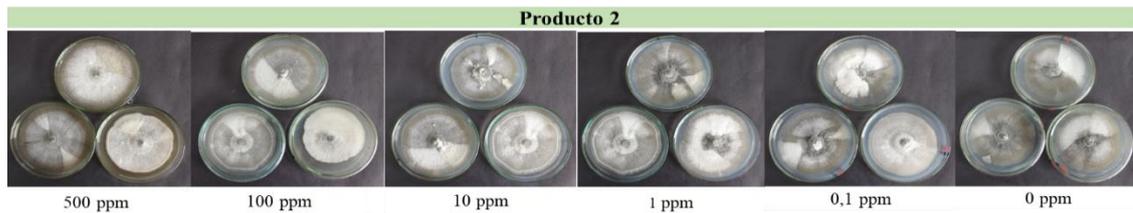


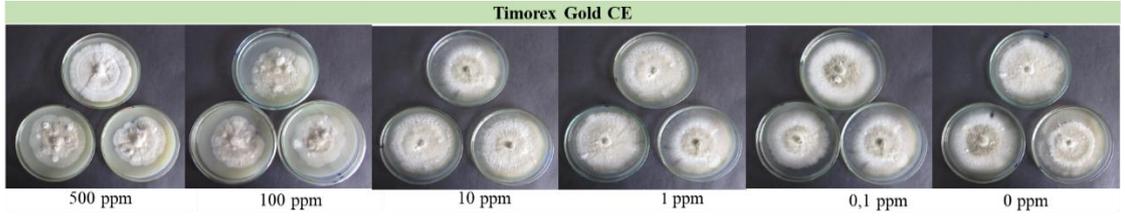
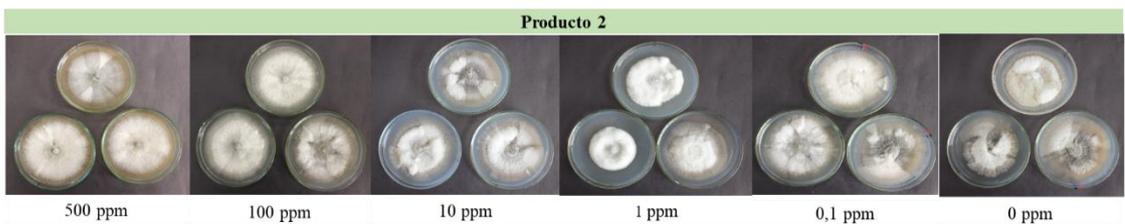
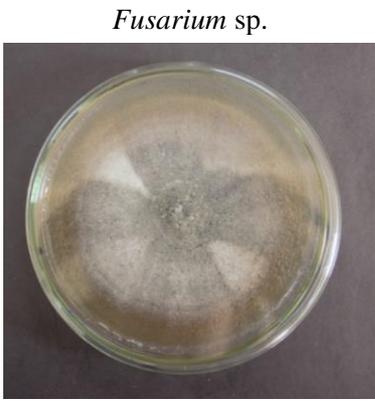
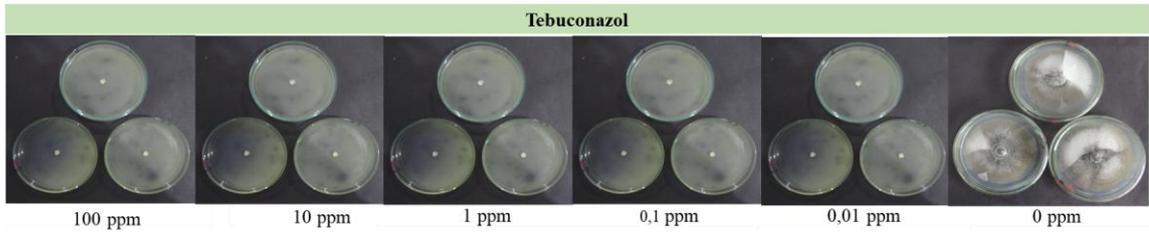
Geotrichum sp.

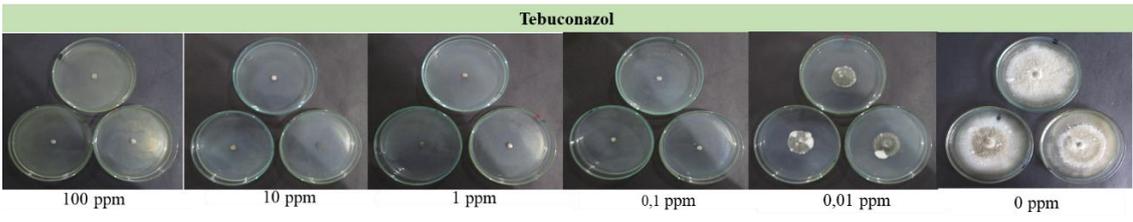




Rhizopus sp.







Penicillium sp.



ANEXO D: CONCENTRACIÓN LETAL 50 (CL₅₀)

Extracto de tomillo (*Thymus vulgaris*)

Principio activo	Género	Estimate	Std. Error	Lower	Upper	Media
Extractos vegetales	<i>Ceratocystis</i>	315,208	122,36432	-74,20704	704,6287	306,07
Extractos vegetales	<i>Ceratocystis</i>	306,1085	78,95651	54,83368	557,3834	
Extractos vegetales	<i>Ceratocystis</i>	296,8906	42,84142	160,5501	433,2311	
Extractos vegetales	<i>Geotrichum</i>	195,9005	145,03444	-265,6639	6,574648+02	135,46
Extractos vegetales	<i>Geotrichum</i>	91,48785	202,13194	-551,7862	734,76619	
Extractos vegetales	<i>Geotrichum</i>	118,9846	95,1515036	-183,8263	421,7955	
Extractos vegetales	<i>Mucor</i>	171,6101	3,18E+01	70,35757	272,8626	156,679
Extractos vegetales	<i>Mucor</i>	188,3526	2,99E+01	93,07046	283,6347	
Extractos vegetales	<i>Mucor</i>	110,0743	10,22129	77,54557	142,603	
Extractos vegetales	<i>Rhizopus</i>	115,9263	74,43811	-90,6869	322,5395	132,1893
Extractos vegetales	<i>Rhizopus</i>	133,2788	86,11123	-122,505	389,0627	
Extractos vegetales	<i>Rhizopus</i>	147,3628	74,6775	-89,97633	384,7019	
Extractos vegetales	<i>Penicillium</i>	517122780	10	517127800	517127800	172375716,87
Extractos vegetales	<i>Penicillium</i>	4369,226	9476,57236	-25789,46	34527,91	
Extractos vegetales	<i>Penicillium</i>	1,37133	44,81366	-141,2457	143,9884	
Extractos vegetales	<i>Fusarium</i>	248,8085	164,30466	-470,5518	968,1688	404,82
Extractos vegetales	<i>Fusarium</i>	236,3561	200,35488	-437,5976	910,3098	
Extractos vegetales	<i>Fusarium</i>	729,2857	112,9034	375,5508	1073,109	

Aceite de árbol de Té (*Melaleuca alternifolia*)

Principio_activo	Género	Estimate	Std. Error	Lower	Upper	Media
Aceite de árbol de Té (<i>Melaleuca alternifolia</i>)	<i>Ceratocystis</i>	28,76772	59,7935746	-161,522123	219,0576	126,74
Aceite de árbol de Té (<i>Melaleuca alternifolia</i>)	<i>Ceratocystis</i>	0,4474189	18,1940945	-57,4543098	58,34915	
Aceite de árbol de Té (<i>Melaleuca alternifolia</i>)	<i>Ceratocystis</i>	351,0157	248,568854	-440,041305	1142,073	
Aceite de árbol de Té (<i>Melaleuca alternifolia</i>)	<i>Geotrichum</i>	0,8861032	NaN	NaN	NaN	0,39
Aceite de árbol de Té (<i>Melaleuca alternifolia</i>)	<i>Geotrichum</i>	0,021191	0,1825101	-0,5596375	0,6020195	
Aceite de árbol de Té (<i>Melaleuca alternifolia</i>)	<i>Geotrichum</i>	0,2699117	10,0664363	-31,7659813	32,3058	
Aceite de árbol de Té (<i>Melaleuca alternifolia</i>)	<i>Mucor</i>	33,122	NaN	NaN	NaN	1034524,91
Aceite de árbol de Té (<i>Melaleuca alternifolia</i>)	<i>Mucor</i>	3102611	NaN	NaN	NaN	
Aceite de árbol de Té (<i>Melaleuca alternifolia</i>)	<i>Mucor</i>	930,6218	3196,71611	-9242,75552	11104	
Aceite de árbol de Té (<i>Melaleuca alternifolia</i>)	<i>Rhizopus</i>	0,2344227	4,9884498	-15,6410508	16,1099	0,14
Aceite de árbol de Té (<i>Melaleuca alternifolia</i>)	<i>Rhizopus</i>	0,03940601	0,239131	-0,7216155	0,8004276	
Aceite de árbol de Té (<i>Melaleuca alternifolia</i>)	<i>Fusarium</i>	0,4721099	9,4400082	-29,5702092	30,51443	0,25
Aceite de árbol de Té (<i>Melaleuca alternifolia</i>)	<i>Fusarium</i>	0,02399726	0,2489118	-0,7681511	0,8161456	

Producto 2

Principio_activo	Género	Estimate	Std. Error	Lower	Upper	Media
Producto 2	<i>Ceratocystis</i>	11,6116	257,312035	-807,2701	830,4933	327,98
Producto 2	<i>Ceratocystis</i>	0,7817258	17,895742	-56,17051	57,73396	
Producto 2	<i>Ceratocystis</i>	971,5411	NaN	NaN	NaN	
Producto 2	<i>Geotrichum</i>	1,724466	956,377864	-3041,897	3045,346	321,90
Producto 2	<i>Geotrichum</i>	0,699952	22,503625	-70,91663	72,31653	
Producto 2	<i>Geotrichum</i>	963,2851	6345,94628	-19232,35	21158,92	
Producto 2	<i>Mucor</i>	7,356895	149,286882	-467,7404	482,4542	3,88
Producto 2	<i>Mucor</i>	0,3940285	12,772545	-40,25391	41,04197	
Producto 2	<i>Rhizopus</i>	101,3036	NaN	NaN	NaN	867414,871
Producto 2	<i>Rhizopus</i>	2601353	10	2601321	2601385	
Producto 2	<i>Rhizopus</i>	790,3087	4596,25675	-13843,48	15424,1	
Producto 2	<i>Fusarium</i>	4546,65	67655,76	-210764,2	219857,5	1515,56
Producto 2	<i>Fusarium</i>	0,02031771	0,9403218	-2,972206	3,012841	
Producto 2	<i>Fusarium</i>	0,02166061	21,690012	-5,356712	5,400033	

Bacillius

Principio_activo	Género	Estimate	Std. Error	Lower	Upper	Media
<i>Bacillius</i>	<i>Ceratocystis</i>	221,852553	848,3745	-2478,054	2921,759	111,055657
<i>Bacillius</i>	<i>Ceratocystis</i>	0,25876186	4,686066	-14,65439	15,17192	
<i>Bacillius</i>	<i>Geotrichum</i>	0,1258615	4,242601	-13,37599	13,62771	52,7047205
<i>Bacillius</i>	<i>Geotrichum</i>	0,2548545	8,891225	-28,04099	28,5507	

<i>Bacillus</i>	<i>Geotrichum</i>	157,733445	23786,99	-75543,07	75858,54	
<i>Bacillus</i>	<i>Mucor</i>	0,04879334	1,633926	-5,15109	5,248676	0,24514213
<i>Bacillus</i>	<i>Mucor</i>	0,00417563	0,02988187	-0,0909218	0,09927306	
<i>Bacillus</i>	<i>Mucor</i>	0,68245742	24,79607	-78,2297	79,59461	
<i>Bacillus</i>	<i>Rhizopus</i>	34,5465627	49,55755	-123,1677	192,2608	54,7732523
<i>Bacillus</i>	<i>Rhizopus</i>	41,9042274	NaN	NaN	NaN	
<i>Bacillus</i>	<i>Rhizopus</i>	87,8689668	25,46675	6,822397	168,9155	
<i>Bacillus</i>	<i>Fusarium</i>	47,63812	35,04685	-87,36152	135,7079	16,4721638
<i>Bacillus</i>	<i>Fusarium</i>	1,77786	2,880309	-9,091668	9,24119	
<i>Bacillus</i>	<i>Fusarium</i>	0,00051141	9,881748	29,69399	92,49025	

Quitosan oligosacarina

Principio_activo	Género	Estimate	Std. Error	Lower	Upper	Media
Quitosan Oligosacarina	<i>Ceraatocystis</i>	0,01031775	0,3830214	-1,208627	1,229263	88,68
Quitosan Oligosacarina	<i>Ceraatocystis</i>	134,2839	173,1311	-4,166964	685,2643	
Quitosan Oligosacarina	<i>Ceraatocystis</i>	131,7317	115,3173	-235,2593	498,7228	
Quitosan Oligosacarina	<i>Geotrichum</i>	0,1258615	4,242601	-13,37599	13,62771	52,70
Quitosan Oligosacarina	<i>Geotrichum</i>	0,2548545	8,891225	-28,04099	28,5507	
Quitosan Oligosacarina	<i>Geotrichum</i>	157,7334	23786,99	-75543,07	75858,54	
Quitosan Oligosacarina	<i>Mucor</i>	0,02048912	0,7081861	-2,233275	2,274253	0,36
Quitosan Oligosacarina	<i>Mucor</i>	0,9937636	6,444488	-19,51547	21,503	
Quitosan Oligosacarina	<i>Mucor</i>	0,06519831	1,467853	-4,606164	4,73656	
Quitosan Oligosacarina	<i>Rhizopus</i>	292,6211	1788,469	-5399,084	5984,326	9859,52
Quitosan Oligosacarina	<i>Rhizopus</i>	29119,2	510528,5	-1,5956E+12	1653849	
Quitosan Oligosacarina	<i>Rhizopus</i>	166,7395	338,6248	-910,9157	1244,395	

Quitosan Oligosacarina	<i>Fusarium</i>	2190,6	48506,07	-152177,5	156558,4	731,05
Quitosan Oligosacarina	<i>Fusarium</i>	2,537805	77,99701	-245,6835	250,7591	
Quitosan Oligosacarina	<i>Fusarium</i>	0,00041266	0,03739661	-245,6835	0,1194254	

Tebuconazol

Principio_activo	Género	Estimate	Std. Error	Lower	Upper	Media
Tebuconazol	<i>Ceratocystis</i>	0,1755219	0,1108576	-0,1772766	0,5283205	0,18
Tebuconazol	<i>Ceratocystis</i>	0,1455605	0,09770795	-0,1653898	0,4565109	
Tebuconazol	<i>Ceratocystis</i>	0,2164727	0,1390075	-0,2259112	0,6588566	
Tebuconazol	<i>Geotrichum</i>	0,4888731	0,6628465	-1,6206	2,598347	0,46
Tebuconazol	<i>Geotrichum</i>	0,4319665	0,7590755	-1,983751	2,84768	
Tebuconazol	<i>Geotrichum</i>	0,457855	0,6636937	-1,654315	2,570025	
Tebuconazol	<i>Mucor</i>	0,852033787	0,6371129	-1,188453	2,866702	1,10
Tebuconazol	<i>Mucor</i>	1,268879652	0,7942675	-1,311305	3,744123	
Tebuconazol	<i>Mucor</i>	1,188320066	0,6446007	-0,8932475	3,209567	
Tebuconazol	<i>Rhizopus</i>	0,000308067	0,00059646	-0,001590134	0,002206268	0,00
Tebuconazol	<i>Rhizopus</i>	0,000724106	0,00176261	-0,004885321	0,0063335321	
Tebuconazol	<i>Rhizopus</i>	0,006830644	0,00930268	-0,022774629	3,6436E-02	
Tebuconazol	<i>Fusarium</i>	0,000391782	0,00091074	-0,002506597	0,00329016	0,0013
Tebuconazol	<i>Fusarium</i>	0,000166391	0,00016639	0,000210536	0,00083641	
Tebuconazol	<i>Fusarium</i>	0,002715111	0,00271511	0,006353965	0,02293626	

ANEXO E: ANÁLISIS DE VARIANZA PARA CONCENTRACIÓN LETAL 50 (CL₅₀)

Extracto de tomillo (*Thymus vulgaris*)

Ceratocystis

Fuentes de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadro medio	Valor de F	PR(>F)
Dosis	4	9590	2397.4	86,11	0,000000105
Error	10	278	27.8		

Geotrichum

Fuentes de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadro medio	Valor de F	PR(>F)
Dosis	4	7908	1977.1	10.15	0,00151
Error	10	1949	194.9		

Mucor

Fuentes de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadro medio	Valor de F	PR(>F)
Dosis	4	35.7	8.93	0.272	0.89

Error	10	328.6	32.86
--------------	----	-------	-------

Rhizopus

Fuentes de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadro medio	Valor de F	PR(>F)
Dosis	4	9318	2329.5	82.55	0,000000128
Error	10	282	28.2		

Penicillium

Fuentes de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadro medio	Valor de F	PR(>F)
Dosis	4	170.7	42.67	0.62	0,659
Error	10	688.5	68.85		

Fusarium

Fuentes de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadro medio	Valor de F	PR(>F)
Dosis	4	2956.3	739.1	18.84	0,000119
Error	10	329.3	39.2		

Aceite de árbol de Té (*Melaleuca alternifolia*)

Ceratocystis

Fuentes de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadro medio	Valor de F	PR(>F)
Dosis	4	4195	1048.7	7.896	0.00386
Error	10	1328	132.8		

Geotrichum

Fuentes de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadro medio	Valor de F	PR(>F)
Dosis	4	1402	350.6	2.529	0.107
Error	10	1387	138.7		

Mucor

Fuentes de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadro medio	Valor de F	PR(>F)
Dosis	4	35.7	8.93	0.272	0.89
Error	10	328.6	32.86		

Rhizopus

Fuentes de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadro medio	Valor de F	PR(>F)
-----------------------------	---------------------------	--------------------------	---------------------	-------------------	------------------

Dosis	4	542.2	135.55	1.943	0.18
Error	10	697.8	69.78		

Fusarium

Fuentes de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadro medio	Valor de F	PR(>F)
Dosis	4	542.3	135.57	1.915	0.184
Error	10	707.8	70.78		

Bacillus

Ceratocystis

Fuentes de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadro medio	Valor de F	PR(>F)
Dosis	4	421.1	105.28	3.151	0.0642
Error	10	334.1	33.41		

Geotrichum

Fuentes de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadro medio	Valor de F	PR(>F)
Dosis	4	1451	362.7	2.804	0.0848
Error	10	1294	129.4		

Mucor

Fuentes de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadro medio	Valor de F	PR(>F)
Dosis	4	1502	375.5	2.719	0.091
Error	10	1381	138.1		

Rhizopus

Fuentes de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadro medio	Valor de F	PR(>F)
Dosis	4	4144	1035.9	18.59	0.000127
Error	10	557	55.7		

Fusarium

Fuentes de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadro medio	Valor de F	PR(>F)
Dosis	4	3379	844.6	7.539	0.00455
Error	10	1120	112.0		

Tebuconazol

Ceratocystis

Fuentes de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadro medio	Valor de F	PR(>F)
Dosis	4	14698	3675	316	0.000000178
Error	10	116	12		

Geotrichum

Fuentes de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadro medio	Valor de F	PR(>F)
Dosis	4	6559	1639.8	151.3	0.00000000672
Error	10	108	10.8		

Mucor

Fuentes de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadro medio	Valor de F	PR(>F)
Dosis	4	16960	4240	378.2	0.000000000729
Error	10	112	11		

Rhizopus

Fuentes de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadro medio	Valor de F	PR(>F)
-----------------------------	---------------------------	--------------------------	---------------------	-------------------	------------------

Dosis	4	2275.9	569.0	30.97	0.0000131
Error	10	183.7	18.4		

Fusarium

Fuentes de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadro medio	Valor de F	PR(>F)
Dosis	4	1935.2	483.8	32.66	0.0000103
Error	10	148.1	14.8		

Quitosan oligosacarina

Ceratocystis

Fuentes de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadro medio	Valor de F	PR(>F)
Dosis	4	438.8	109.71	3.814	0.0391
Error	10	287.7	28.77		

Geotrichum

Fuentes de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadro medio	Valor de F	PR(>F)
Dosis	4	1451	362.7	2.804	0.0848

Error	10	1294	129.4
--------------	----	------	-------

Mucor

Fuentes de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadro medio	Valor de F	PR(>F)
Dosis	4	1570	392.4	2.872	0.0802
Error	10	1366	136,6		

Rhizopus.

Fuentes de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadro medio	Valor de F	PR(>F)
Dosis	4	36.4	9.09	0.24	0.909
Error	10	378.4	37.84		

Fusarium.

Fuentes de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadro medio	Valor de F	PR(>F)
Dosis	4	364.0	91.00	1.068	0.421
Error	10	8851.5	85.18		

PRODUCTO 2

Ceratocystis

Fuentes de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadro medio	Valor de F	PR(>F)
Dosis	4	706.2	176.56	5.351	0,0144
Error	10	329.9	32.99		

Geotrichum

Fuentes de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadro medio	Valor de F	PR(>F)
Dosis	4	1451	362.7	2.804	0.0848
Error	10	1294	129.4		

Mucor

Fuentes de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadro medio	Valor de F	PR(>F)
Dosis	4	1502	375.5	2.719	0,091
Error	10	1381	138.1		

Rhizopus

Fuentes de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadro medio	Valor de F	PR(>F)
Dosis	4	35.7	8.93	0.272	0.89
Error	10	328.6	32.86		

Fusarium

Fuentes de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadro medio	Valor de F	PR(>F)
Dosis	4	369.2	92.31	1.177	0.378
Error	10	783.9	78.39		

ANEXO F: ANALISIS DE VARIANZA DE GERMINACIÓN DE ESPORAS *Penicillium*

Producto 2

Fuentes de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadro medio	Valor de F	PR(>F)
Dosis	5	25000	5000	1.737e+31	<2e-16
Error	12	0	0		

Bacillus

Fuentes de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadro medio	Valor de F	PR(>F)
Dosis	5	19158	3832	8.832	0.00103
Error	12	5206	434		

Quitosam oligoacarina

Fuentes de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadro medio	Valor de F	PR(>F)
Dosis	4	4000	8000	2,703x10 ³¹	2x10 ⁻¹⁶
Error	10	0	0		

Aceite de árbol de Té (*Melaleuca alternifolia*)

Fuentes de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadro medio	Valor de F	PR(>F)
Dosis	5	25000	5000	1.737e+31	<2e-16
Error	10	287.7	28.77		

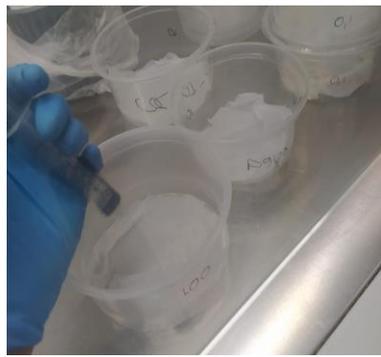
TEBUCONAZOL

Fuentes de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadro medio	Valor de F	PR(>F)
Dosis	5	40000	8000	2.703e+31	<2e-16
Error	12	0	0		

ANEXO G: GERMINACIÓN DE ESPORAS



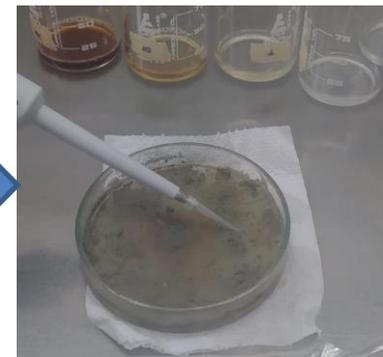
1. Preparación de solución stock



2. Colocación de papel toalla y humedecimiento.



3. Círculo en el porta objetos con el lápiz



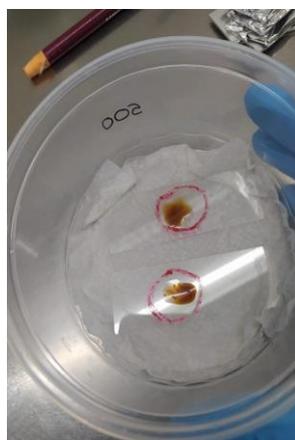
4. Colocación de 3 ml agua destilada estéril en la caja de Petri



9. Cuento de esporas



8. Se etiqueta y se lleva a incubar a temperatura $25 \pm ^\circ\text{C}$



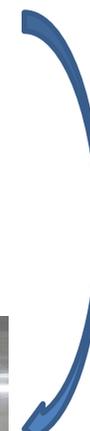
7. Colocación las placas dentro de las tarinas



6. Añadir $10 \mu\text{l}$ de solución stock

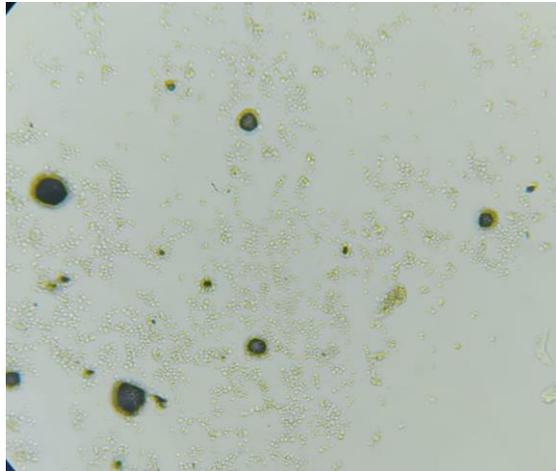


5. Añadir $10 \mu\text{l}$ de solución con esporas



ANEXO I: ESPORAS GERMINADAS SEGÚN LOS BIOPRODUCTOS Y FUNGICIDA EN ESTUDIO

Quitosan Oligosacarina



Esporas sin germinar

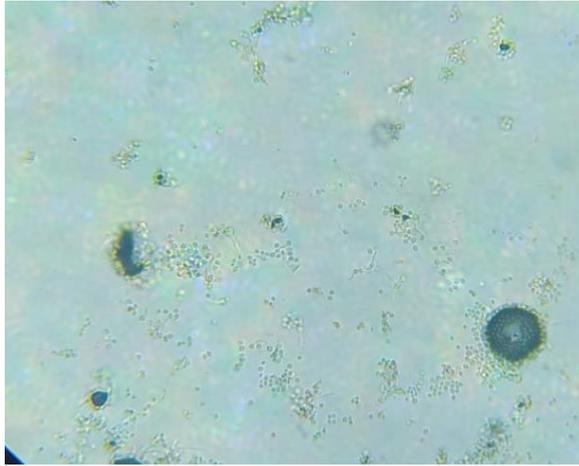
Género	dosis	repetición	Germinadas	Sin germinar
<i>Penicillium</i>	100	1	0	100
<i>Penicillium</i>	100	2	0	100
<i>Penicillium</i>	100	3	0	100
<i>Penicillium</i>	10	1	0	100
<i>Penicillium</i>	10	2	0	100
<i>Penicillium</i>	10	3	0	100
<i>Penicillium</i>	1	1	0	100
<i>Penicillium</i>	1	2	0	100
<i>Penicillium</i>	1	3	0	100
<i>Penicillium</i>	0,1	1	0	100
<i>Penicillium</i>	0,1	2	0	100
<i>Penicillium</i>	0,1	3	0	100
<i>Penicillium</i>	0,01	1	78	22
<i>Penicillium</i>	0,01	2	56	44
<i>Penicillium</i>	0,01	3	28	72
<i>Penicillium</i>	0	1	100	0
<i>Penicillium</i>	0	2	100	0
<i>Penicillium</i>	0	3	100	0

Aceite de árbol de Té (*Melaleuca alternifolia*)



Esporas sin germinar

Género	dosis	repetición	Germinadas	Sin germinar
<i>Penicillium</i>	100	1	0	100
<i>Penicillium</i>	100	2	0	100
<i>Penicillium</i>	100	3	0	100
<i>Penicillium</i>	10	1	0	100
<i>Penicillium</i>	10	2	0	100
<i>Penicillium</i>	10	3	0	100
<i>Penicillium</i>	1	1	0	100
<i>Penicillium</i>	1	2	0	100
<i>Penicillium</i>	1	3	0	100
<i>Penicillium</i>	0,1	1	0	100
<i>Penicillium</i>	0,1	2	0	100
<i>Penicillium</i>	0,1	3	0	100
<i>Penicillium</i>	0,01	1	3	97
<i>Penicillium</i>	0,01	2	0	100
<i>Penicillium</i>	0,01	3	19	81
<i>Penicillium</i>	0	1	100	0
<i>Penicillium</i>	0	2	100	0
<i>Penicillium</i>	0	3	100	0



Esporas germinadas y sin germinar

Género	dosis	repetición	Germinadas	Sin germinar
<i>Penicillium</i>	500	1	0	100
<i>Penicillium</i>	500	2	0	100
<i>Penicillium</i>	500	3	0	100
<i>Penicillium</i>	100	1	0	100
<i>Penicillium</i>	100	2	0	100
<i>Penicillium</i>	100	3	0	100
<i>Penicillium</i>	10	1	0	100
<i>Penicillium</i>	10	2	0	100
<i>Penicillium</i>	10	3	0	100
<i>Penicillium</i>	1	1	0	100
<i>Penicillium</i>	1	2	0	100
<i>Penicillium</i>	1	3	0	100
<i>Penicillium</i>	0,1	1	0	100
<i>Penicillium</i>	0,1	2	9	91
<i>Penicillium</i>	0,1	3	0	100
<i>Penicillium</i>	0	1	100	0
<i>Penicillium</i>	0	2	100	0
<i>Penicillium</i>	0	3	100	0

Bacillus



Esporas germinadas y sin germinar

Género	dosis	repetición	Germinadas	Sin germinar
<i>Penicillium</i>	100	1	9	91
<i>Penicillium</i>	100	2	10	90
<i>Penicillium</i>	100	3	11	89
<i>Penicillium</i>	10	1	13	87
<i>Penicillium</i>	10	2	30	70
<i>Penicillium</i>	10	3	31	69
<i>Penicillium</i>	1	1	23	77
<i>Penicillium</i>	1	2	90	10
<i>Penicillium</i>	1	3	100	0
<i>Penicillium</i>	0,1	1	87	13
<i>Penicillium</i>	0,1	2	32	68
<i>Penicillium</i>	0,1	3	11	89
<i>Penicillium</i>	0,01	1	10	90
<i>Penicillium</i>	0,01	2	7	93
<i>Penicillium</i>	0,01	3	26	74
<i>Penicillium</i>	0	1	100	0
<i>Penicillium</i>	0	2	100	0
<i>Penicillium</i>	0	3	100	0

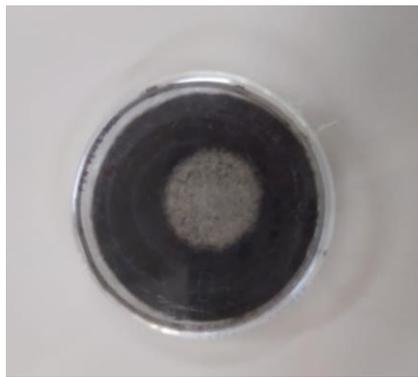
Tebuconazol



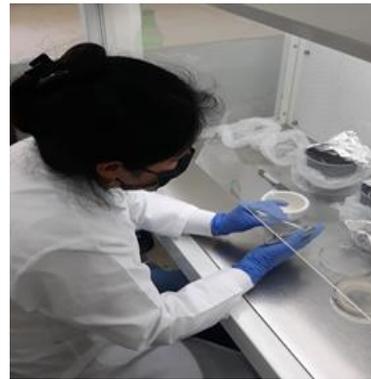
Esporas sin germinar

Género	dosis	Repetición	Germinadas	Sin germinar
<i>Penicillium</i>	100	1	0	100
<i>Penicillium</i>	100	2	0	100
<i>Penicillium</i>	100	3	0	100
<i>Penicillium</i>	10	1	0	100
<i>Penicillium</i>	10	2	0	100
<i>Penicillium</i>	10	3	0	100
<i>Penicillium</i>	1	1	0	100
<i>Penicillium</i>	1	2	0	100
<i>Penicillium</i>	1	3	0	100
<i>Penicillium</i>	0,1	1	0	100
<i>Penicillium</i>	0,1	2	0	100
<i>Penicillium</i>	0,1	3	0	100
<i>Penicillium</i>	0,01	1	78	22
<i>Penicillium</i>	0,01	2	56	44
<i>Penicillium</i>	0,01	3	28	72
<i>Penicillium</i>	0	1	100	0
<i>Penicillium</i>	0	2	100	0
<i>Penicillium</i>	0	3	100	0

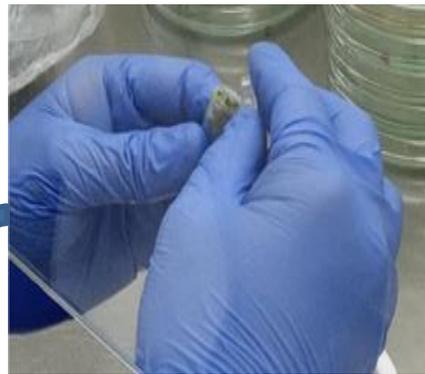
ANEXO I: EXTRACCIÓN DE ADN (LISIS FÍSICA).



1. Aislado cultivado en PDA



2. Cosecha de micelio



4. Colocación de micelio macerado en tubos Eppendorf de 15 mL

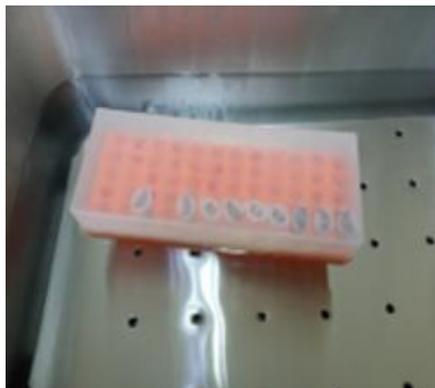


3. Macerado de micelio con N líquido

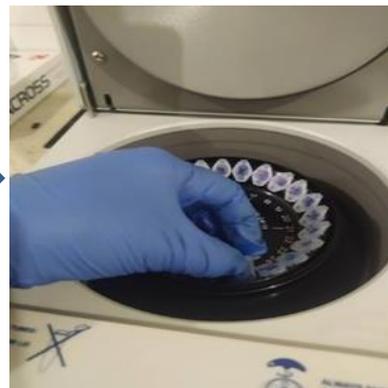


5. Muestras almacenadas a -40°C

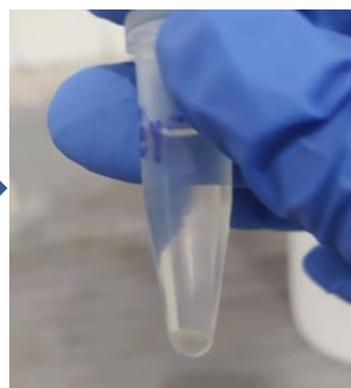
ANEXO J: EXTRACCIÓN DE ADN (LISIS QUÍMICA).



1. Incubado a 65°C en baño maría



2. Centrifugar a 14000 ppm.



3. Formación de pellet



4. Colocación en el vortex



8. Secado de pellet por 12 h



7. Formación de pellet



6. Añadir Isopropanol



5. Añadir clorofórmo-
alcohol-isoamílico

ANEXO K: CUANTIFICACIÓN DE ADN

NOMBRE	CÓDIGO	Ng/μl	A260/A280	A260/230
<i>Fusarium</i> spp.	Fsr	568,7	1,76	1,35
<i>Fusarium</i> spp.	Fsr1	422,8	1,54	0,86
<i>Penicillium</i> spp.	T.T	494,7	1,57	1,19
<i>Rhizopus</i> spp.	Rhp	258,0	1,60	0,96
<i>Geotrichum</i> spp.	GIHM	192,7	1,18	0,86
<i>Mucor</i> spp.	GG67	1308,7	2,00	1,79
<i>Ceratocystis</i> spp.	Ceys	103,9	1,46	1,49

ANEXO L: PCR Y ELECTROFORESIS.



1. ADN extraído



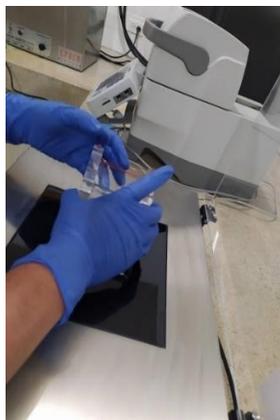
2. Master mix para PCR



3. Microtubos colocados en el termociclador



4. Productos PCR



9. Colocación del gel de agarosa en el transiluminador



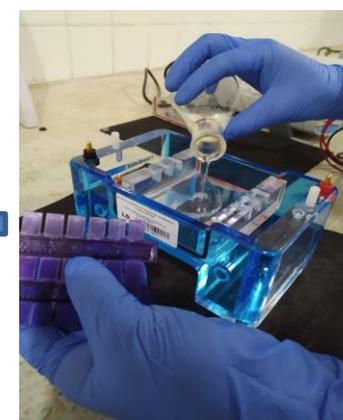
8. Electroforesis



7. Colocación de muestras preparadas con loading Buffer en la cuba



6. Productos PCR pipeteados con loading Buffer



5. Colocación de gel de agarosa al 1% y pocillos

ANEXO M: GEL DE AGAROSA REVELADO.

Nº	Código	Nombre
1		Control
2	2	<i>Geotrichum</i>
3	3	<i>Fusarium</i>
5	4	<i>Rhizopus</i>
6	5	<i>Ceratocystis</i>
7	6	<i>Mucor</i>
10	7	<i>Penicillium</i>





epoch

Dirección de Bibliotecas y
Recursos del Aprendizaje

UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y
DOCUMENTAL

REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 29 / 06 / 2023

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)
Nombres – Apellidos: Johanna Lucia Panimbosa Moposita
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: RECURSOS NATURALES
Carrera: RECURSOS NATURALES RENOVABLES
Título a optar: INGENIERA EN RECURSOS NATURALES RENOVABLES
f. responsable: Ing. Cristhian Fernando Castillo Ruiz



1132-DBRA-UTP-2023