



ANTAGONISMO DE *BACILLUS SUBTILIS* VS HONGOS FITOPATÓGENOS PRESENTE EN EL FRUTO DE LA CHIRIMOYA

Ingeniería en Industrias Alimentarias

Presenta(n):

Israel Fortunato Gallardo Mellado

Director de Tesis:

María Rico Martínez

Codirector de Tesis:

Carlos Alberto González Razo



Autorización de presentación de trabajo de titulación

Se autoriza al estudiante **Israel Fortunato Gallardo Mellado** inscrito en la Ingeniería industrias alimentarias del Instituto Tecnológico Superior de Abasolo, con número de control **AS16110091**, a defender su proyecto de trabajo de titulación **“Antagonismo de *Bacillus subtilis* vs hongos fitopatògenos presente en el fruto de la chirimoya”** ante el comité sinodal asignado.

La presente se expide en Abasolo Guanajuato a los 03 de julio de 2023.

M. en C. María Rico Martínez
(Presidente del sínodo)

Dr. Carlos Alberto González
Razo
(Secretario del sínodo)

Dr. Iván Noé Ramos del Villar
(Vocal del sínodo)

Resumen

En la sierra de Pénjamo se encuentra una comunidad llamada El Aguacate, ubicado en el municipio de Pénjamo, Gto., con ubicación geográfica 20°28'0.72" N - 101°47'19" W, lugar donde se cultivan variedad de frutos y el de mayor producción es la chirimoya (*Annona cherimola*) la cual es una fruta que pertenece a la familia *Annonaceae* originaria de Sudamérica o Meso-América, teniendo un gran interés sobre el fruto ya que investigaciones han afirmado un alto valor nutricional sobre la actividad biológica que comprenden al fruto. La comunidad anteriormente mencionada está sufriendo estragos por la aparición de un hongo fitopatógeno que ha modificado las características de la chirimoya, el fruto mencionado previamente, al ser infectado por el hongo aún no identificado, manifiesta deshidratación y la presencia de esporas que recubren la piel externa, esto causa la necrosis de la chirimoya, generando un producto que no puede ser comercializado, es por ello que los agricultores de la comunidad han disminuido la producción del fruto causando pérdidas económicas. La investigación se llevó a cabo para aislar e identificar los hongos fitopatógenos que se encuentran en el fruto de la chirimoya producida en la comunidad El Aguacate, mediante el análisis morfológico de cada cepa. Así también, se propone el análisis de antagonismo de la bacteria *Bacillus subtilis* contra cada uno de los hongos encontrados. Las pruebas por triplicado demostraron la efectividad de la bacteria *Bacillus subtilis* contra los hongos, el efecto encontrado es que evita la proliferación y el crecimiento de estos, con valor $p < 0.05$, por lo que, el uso de esta bacteria podría ser una alternativa como control biológico de los microorganismos fitopatógenos que causan las enfermedades de la chirimoya.

Palabras Clave: Bromatológicas Fitopatógeno Necrosis

Abstract

In the Pénjamo saw is a community called The Avocado, located in the municipality of Pénjamo, Gto., with geographical location 20°28'0.72" N -101°47'19" W, where a variety of fruits are grown and the one with the highest production is the cherimoya (*Annona cherimola*) which is a fruit that belongs to the Annonaceae family native to South America or Meso-America, having a great interest in the fruit since research has affirmed a high nutritional value on the biological activity that comprise the fruit. The aforementioned community is suffering ravages by the appearance of a phytopathogenic fungus that has modified the characteristics of the custard apple, the fruit mentioned previously, when infected by the fungus not yet identified, manifests dehydration and the presence of spores that cover the outer skin, this causes the necrosis of the custard apple, generating a product that can not be marketed, consequently, the inhabitants of The Avocado community have decreased the production of the fruit causing economic losses. The research arises to isolate and subsequently identify the phytopathogenic fungi found in the fruit of the cherimoya produced in The Avocado community, through the morphological analysis of each strain. Likewise, the analysis of antagonism of the bacterium *Bacillus subtilis* against each of the fungi found is proposed. The tests in triplicate demonstrated the effectiveness of the bacterium *Bacillus subtilis* against fungi, the effect found is that it prevents the proliferation and growth of these, with value $p < 0.05$, so the use of this bacterium could be an alternative as a biological control of phytopathogenic microorganisms that cause cherimoya diseases.

Key Words: Bromatological Phytopathogen Necrosis

Índice

RESUMEN	III
ABSTRACT.....	IV
AGRADECIMIENTOS.....	XI
INTRODUCCIÓN	XII
CAPÍTULO I. GENERALIDADES DEL PROYECTO	1
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	2
1.1 OBJETIVOS	2
1.1.1 OBJETIVO GENERAL	2
1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
1.2 HIPÓTESIS	3
1.3 JUSTIFICACIÓN	3
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	4
2. ORIGEN E IMPORTANCIA DE LA CHIRIMOYA.....	5
2.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA CHIRIMOYA	6
2.2 CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS DE LA CHIRIMOYA	6
2.3 CULTIVOS	7
2.4 CONTROL BIOLÓGICO DE HONGOS FITOPATÓGENOS.....	7
2.5 HONGOS FITOPATÓGENOS QUE ATACAN LA CHIRIMOYA	8
2.5.1 <i>LASIODIPLODIA SP</i>	8
2.5.2 <i>COLLETOTRICHUM SP</i>	8
2.5.3 <i>PESTALOTIOPSIS SP</i>	8
2.5.4 <i>FUSARIUM SP</i>	9
2.5.5 <i>CLADOSPORIUM SP</i>	9
2.5.6 <i>RHIZOPUS SP</i>	9
2.5.7 <i>PENICILLIUM SP</i>	9
2.5.8 <i>ASPERGILLUS SP</i>	10
2.6 TÉCNICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE HONGOS FITOPATÓGENOS.....	10
2.6.1 CÁMARA HÚMEDA.....	10
2.6.2 AISLAMIENTO	10

2.7 ALTERNATIVAS PARA DISMINUCIÓN DE PATÓGENOS EN CHIRIMOYA.....	11
2.8 BACTERIA <i>BACILLUS SUBTILIS</i> COMO AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO.....	12
CAPÍTULO III. DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA	13
3. UBICACIÓN GEOGRÁFICA DE LA INVESTIGACIÓN.....	14
3.1 COLECTA DE MUESTRA.....	15
3.2 <i>BACILLUS SUBTILIS</i> Y DISEÑO EXPERIMENTAL	16
3.3 APLICACIÓN (PREPARACIÓN Y COLECTA)	17
3.6 TÉCNICA PARA EL ANTAGONISMO DE <i>BACILLUS SUBTILIS</i> VS HONGO FITOPATÓGENOS.....	17
3.7 VARIABLES A EVALUAR O DE ESTUDIO (PRESENCIA O AUSENCIA DE HONGOS FITOPATÓGENOS).....	18
3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	18
CAPÍTULO IV. RESULTADOS	20
4.1 CRECIMIENTO DE HONGOS FITOPATÓGENOS PRESENTES EN MUESTRA DE FRUTO, HOJA Y SUELO DE CHIRIMOYA.....	20
4.3 ANTAGONISMO DE BACTERIA <i>BACILLUS SUBTILIS</i> VS HONGO FITOPATÓGENO PRESENTE EN EL FRUTO DE LA CHIRIMOYA.	23
4.4 HONGOS FITOPATÓGENOS UTILIZADOS EN EL ANTAGONISMO VS <i>BACILLUS SUBTILIS</i> SEGÚN SU MORFOLOGÍA	31
4.5 CUANTIFICACIÓN DE DATOS OBTENIDOS DEL ANTAGONISMO POR MEDIO DEL SOFTWARE MINITAB .	32
CAPÍTULO V. CONCLUSIÓN.....	35
5.1 CONCLUSIONES	36
BIBLIOGRAFÍAS	37

Índice de tablas

TABLA 1- CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA CHIRIMOYA.....	6
TABLA 2- ANTAGONISMO CON BACTERIA, MUESTRA A	24
TABLA 3- ANTAGONISMO SIN BACTERIA, MUESTRA A	25
TABLA 4- ANTAGONISMO CON BACTERIA, MUESTRA B	26
TABLA 5- ANTAGONISMO SIN BACTERIA, MUESTRA B	27
TABLA 6- ANTAGONISMO CON BACTERIA, MUESTRA C	28
TABLA 7- ANTAGONISMO SIN BACTERIA, MUESTRA C	29
TABLA 8- ANTAGONISMO CON BACTERIA, MUESTRA D	30
TABLA 9- ANTAGONISMO SIN BACTERIA, MUESTRA D	31
TABLA 10. DIÁMETRO DE HONGO (CM) VS DIÁMETRO DE HONGO EN PRESENCIA DE BACILLUS SUBTILIS.....	32
TABLA 11. AGRUPACIÓN DE LAS MEDIAS DE LOS TRATAMIENTOS.....	33

.

Índice de imágenes

IMAGEN 1- COMUNIDAD EL AGUACATE.....	14
IMAGEN 2- INSTALACIONES DELA UNIVERSIDAD.....	14
IMAGEN 3- ASPECTO DEL FRUTO DAÑADO.....	15
IMAGEN 4- CONSISTENCIA Y TEXTURA DEL SUELO.....	15
IMAGEN 5- HOJA DAÑADA EN ESTADO DE DESHIDRATACIÓN.....	16
IMAGEN 7- HONGOS PRESENTES EN HOJA.....	21
IMAGEN 8- HONGOS PRESENTES EN FRUTO.....	22
IMAGEN 9- HONGOS PRESENTES EN SUELO (TIERRA).....	23
IMAGEN 11- ANTAGONISMO CON BACTERIA DÍA 1 (A).....	24
IMAGEN 12- ANTAGONISMO CON BACTERIA DÍA 2 (A).....	24
IMAGEN 13- ANTAGONISMO CON BACTERIA DÍA 3 (A).....	24
IMAGEN 14- ANTAGONISMO CON BACTERIA DÍA 4 (A).....	24
IMAGEN 15- ANTAGONISMO SIN BACTERIA DÍA 1 (A).....	25
IMAGEN 16- ANTAGONISMO SIN BACTERIA DÍA 2 (A).....	25
IMAGEN 17- ANTAGONISMO SIN BACTERIA DÍA 3 (A).....	25
IMAGEN 18- ANTAGONISMO SIN BACTERIA DÍA 4 (A).....	25
IMAGEN 19- ANTAGONISMO CON BACTERIA DÍA 1(B).....	26
IMAGEN 20- ANTAGONISMO CON BACTERIA DÍA 2 (B).....	26
IMAGEN 21- ANTAGONISMO CON BACTERIA DÍA 3 (B).....	26
IMAGEN 22- ANTAGONISMO CON BACTERIA DÍA 4 (B).....	26
IMAGEN 23- ANTAGONISMO SIN BACTERIA DÍA 1 (B).....	27
IMAGEN 24- ANTAGONISMO SIN BACTERIA DÍA 2 (B).....	27
IMAGEN 25- ANTAGONISMO SIN BACTERIA DÍA 3 (B).....	27
IMAGEN 26- ANTAGONISMO SIN BACTERIA DÍA 4 (B).....	27

IMAGEN 27- ANTAGONISMO CON BACTERIA DÍA 1 (C).....	28
IMAGEN 28- ANTAGONISMO CON BACTERIA DÍA 2 (C).....	28
IMAGEN 29- ANTAGONISMO CON BACTERIA DÍA 3 (C).....	28
IMAGEN 30- ANTAGONISMO CON BACTERIA DÍA 4 (C).....	28
IMAGEN 31- ANTAGONISMO SIN BACTERIA DÍA 1 (C).....	29
IMAGEN 32- ANTAGONISMO SIN BACTERIA DÍA 2 (C).....	29
IMAGEN 33- ANTAGONISMO SIN BACTERIA DÍA 3 (C).....	29
IMAGEN 34- ANTAGONISMO SIN BACTERIA DÍA 4 (C).....	29
IMAGEN 35- ANTAGONISMO CON BACTERIA DÍA 1(D).....	30
IMAGEN 36- ANTAGONISMO CON BACTERIA DÍA 2 (D).....	30
IMAGEN 37- ANTAGONISMO CON BACTERIA DÍA 3 (D).....	30
IMAGEN 38- ANTAGONISMO CON BACTERIA DÍA 4 (D).....	30
IMAGEN 39- ANTAGONISMO SIN BACTERIA DÍA 1 (D).....	31
IMAGEN 40- ANTAGONISMO SIN BACTERIA DÍA 2 (D).....	31
IMAGEN 41- ANTAGONISMO SIN BACTERIA DÍA 3 (D).....	31
IMAGEN 42- ANTAGONISMO SIN BACTERIA DÍA 4 (D).....	31

Índice de graficas

GRAFICA 1- COMPARACIÓN DE LOS DIÁMETROS EN CM DE LOS HONGOS AISLADOS EN PRESENCIA DE LA BACTERIA BACILLUS SUBTILIS (1) Y EN AUSENCIA DE LA MISMA (2).	
.....	34

Agradecimientos

A Dios por darme las fuerzas necesarias para que esta fase de mi vida fuese realizada y cumplida, porque sin Dios uno pierde las esperanzas y los sueños.

A mi padre **Israel Fortunato Gallardo Campuzano**, que desde el cielo me ha estado apoyando y nunca me ha dejado caer, por el soy quien soy en este momento y sé que él está muy orgulloso por las metas que he logrado.

A mi familia por apoyarme durante toda mi carrera universitaria, ya que sin su ayuda esto no hubiese sido posible, es por ello que agradezco cada minuto invertido en mi persona, porque hoy si puedo decir que todos los sacrificios que hicieron fue por un bien para mí.

A mis maestros **María Rico Martínez** y **Carlos Alberto Gonzales Razo** que estuvieron apoyándome durante todo el transcurso de mi proyecto de investigación, ya que sin ellos todo esto no hubiese sido posible.

Introducción

La chirimoya (*Annona cherimola*.) es un árbol caducifolio que pertenece al género *Annona* y a la familia *Annonaceae*, su origen corresponde a los continentes de América. Tomando como eslabones a los andes peruanos y montañas de Ecuador ya que en ellas se señalaron los primeros indicios de este fruto, sin embargo, existen investigaciones que señalan las zonas andinas de Chile y Colombia como influyentes de su origen. Dentro de Ecuador existen dos sectores en los cuales aún se produce chirimoya de una manera silvestre, señalándolos como probablemente centros de biodiversidad (Valencia , Balslev, & Paz, 1993). Estudios han revelado que esta fruta posee un alto valor nutricional ya que al ser digestiva y nutritiva tiene un alto contenido en agua. Por otro lado, es pobre en grasas y proteínas lo que la convierte en un fruto moderado y alto en valor calórico esto debido al contenido grande de azúcares. Es importante señalar que este fruto contiene vitamina C y potasio ayudando a la prevención de varias enfermedades al poseer efecto laxante y garantizar efectos a la digestión (Barriga, 1992).

Por otro lado, este fruto es muy importante dentro de la industria alimentaria debido al uso en diversas áreas ya que, al ser un alimento con una cantidad de pulpa grande, favorece el proceso de elaboración de yogurt, jugos, cremas y productos saborizados.

Sin embargo, esta fruta es muy difícil de procesar dentro de la elaboración de productos alimenticios esto a causa de la alta oxidación fenólica y a la tendencia al oscurecimiento de la misma, lo cual limita el uso radical dentro de la cocina y la industria alimentaria (Gutiérrez, 2001).

Por otro lado, existen varios factores por el cual la chirimoya no puede en ocasiones desarrollarse y como consecuencia no se pueda cosechar, uno de los más importantes y que está afectando a la comunidad el Aguacate son las enfermedades causadas por insectos y microorganismos principalmente. Alrededor del mundo se han identificado 106 insectos, 91 hongos, 5 nematodos, 2 bacterias y virus que afectan drásticamente a la chirimoya (Nava Díaz , Osada Kawasoe, Rendón Sánchez, & Ayala Escobar, 2000).

Dicho lo anterior se propone identificar cuáles son los hongos fitopatógenos para posteriormente utilizar la bacteria *Bacillus subtilis* como antagonista, esto para observar si evita la proliferación de los hongos.

CAPÍTULO I. Generalidades del proyecto

1. Planteamiento del problema

Actualmente suscita un fenómeno que ha causado que el fruto de la chirimoya no se desarrolle por completo lo que ocasiona su descomposición. Este problema se presenta en la comunidad de El Aguacate ubicado en la sierra de Pénjamo Guanajuato como un área natural protegida, con ubicación geográfica 20°28'0.72'' N y 101°47'19'' W. Los pobladores de esta localidad se dedican a la agricultura, entre los productos que se obtienen están frutas como la lima, limón, café, guayaba y en mayor medida la chirimoya. Esta comunidad es rica en recursos naturales ya que pasan dos afloramientos naturales (dos ojos de agua) estos tienen la particularidad de que durante todo el año corre agua aun siendo tiempos de sequía, por esta razón, los pobladores aprovechan este recurso para establecer sus huertas familiares. La producción de la mayor parte de los frutos producidos, entre ellos la chirimoya, se da a un costado de los nacimientos naturales de agua. Sin embargo, los árboles de chirimoyo se encuentran infectados por microorganismos fitopatógenos, causando pérdidas económicas ya que solo se alcanza a rescatar un 40% de frutos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo general

Evaluar el antagonismo que presenta la bacteria *Bacillus subtilis* vs hongos fitopatógenos presentes en el fruto de la chirimoya previamente aislados y analizados morfológicamente cada una de las cepas.

1.1.2 Objetivos específicos

- Aislar hongos fitopatógenos en muestras de hoja, fruto y suelo del árbol de chirimoyo (*Annona cherimola*).
- Analizar el antagonismo sobre los hongos fitopatógenos, utilizando la bacteria *Bacillus subtilis* como tratamiento en condiciones in vitro.

1.2 HIPÓTESIS

La bacteria *Bacillus Subtilis* presenta antagonismo contra hongos fitopatógenos aislados del árbol de la chirimoya (*Annona cherimola*), de forma que no los deja desarrollarse in vitro.

1.3 JUSTIFICACIÓN

Los agricultores desde hace 7 años han tenido una disminución en la producción de la fruta de chirimoya ya que ha sufrido enfermedades que evitan su madurez y cosecha, por lo tanto, es necesario que exista una alternativa que ayude a atacar este problema como la aplicación de la bacteria *Bacillus subtilis* esperando que ayude a controlar los hongos y bacterias que tiene el fruto ya que a causa de estos fenómenos los agricultores han tenido pérdidas de hasta un 40% de la producción total. La bacteria *Bacillus subtilis* a comparación de otros fungicidas tiene la cualidad de inhibir o evitar el crecimiento de la germinación de esporas, promueve la secreción de fitohormonas y provee una clase de barrera física que ayuda para que los patógenos no se establezcan sobre la superficie de los tejidos.

CAPÍTULO II. Marco teórico

2. Origen e importancia de la chirimoya en México

Annona cherimola, conocida con el nombre popular de chirimoya o chirimoyo es un fruto climatérico el cual puede encontrarse en distintos países, demostrando su origen en el continente americano principalmente en Mesoamérica (desde México hasta Panamá) (Cerdas Araya, Umaña Rojas, & Castro Retana, 2006).

Sin embargo, existen investigaciones que afirman el origen en los Valles Andianos, donde fluye el conocido río Marañón entre Perú, Colombia y Bolivia antes de llegar al Ecuador, pobladores que se encuentran en centro y Sudamérica, han consumido de generación en generación este fruto debido a la gran cantidad de propiedades medicinales que la conforman (Cuevas, González Fernández, & Hueso Martín, 2014).

Se caracteriza por desarrollarse en climas tropicales y subtropicales además cuenta con 119 géneros y más de 2000 especies (Jonas Ochse, Soule, Dijkman, & Wehlburg, 1991). Datos revelan que actualmente dentro del territorio mexicano no se ha dado un incremento radical dentro del rendimiento de la chirimoya, ya que datos arrojan que la superficie sembrada es muy baja alcanzando a cultivar según datos promedios del 2009 a 2013, 114.4 hectáreas en el estado de Morelos y estado de México, Michoacán e Hidalgo, alcanzando una producción de 577.5 toneladas y un rendimiento de 6.4 t ha⁻¹, obteniendo ganancias de 2,436.4 millones de pesos. Se ha observado que la chirimoya puede lograr posicionarse como una fruta muy consumida a nivel internacional, esto debido a la gran cantidad de propiedades que la conforman, ya que como se ha mencionado, estudios han demostrado la gran efectividad que tiene este fruto frente a enfermedades que atacan al sistema inmunológico de las personas (Nava Díaz , Osada Kawasoe, Rendón Sánchez, & Ayala Escobar, 2000).

2.1 Clasificación taxonómica de la chirimoya

La chirimoya es un fruto que pertenece a la familia *Annonaceae*, con más de 140 géneros distribuidos en diversas partes del mundo principalmente en zonas tropicales y templadas (Jonas Ochse, Soule, Dijkman, & Wehlburg, 1991). Es importante conocer la clasificación ordenada y jerárquica que comprende a este fruto (tabla 1).

Tabla 1- Clasificación taxonómica de la chirimoya.

CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA	
Reino:	Plantae
División:	<i>Magnoliophyta</i>
Clase:	<i>Magnoliopsida</i>
Orden:	Magnoliales
Familia:	<i>Annonaceae</i>
Género:	<i>Annona</i>
Especie:	<i>Annona cherimola</i> Mill.

(yothi B, Venkatesh, Chakrapani , & Roja , 2011)

2.2 Características botánicas de la chirimoya

El árbol: Es erecto con poca producción y desarrollo perteneciente a la familia de las anonáceas con apariencia expansiva conforme a la densidad de su arbusto.

Flores: posee hojas alternas las cuales están alternas y por consecuencia forman ovoide a elíptica u ovoide a lanceonada pocamente velluda, resaltando su parte verde oscuro en la parte superior y aterciopelada en la parte inferior

Altura: tiene una altura de 5 a 9 metros correspondientemente, con su ramificación cubierta densamente de bellos.

Propagación:

- Semilla
- Injerto

Longevidad: 15 años y comienza a producir fruto a los 3 o 4 años.

Forma tamaño y peso: forma cordiforme o cónica, de 10 a 20 cm de longitud y más de 10 cm de

Ancho y un peso promedio entre 150 y 500 gramos.

Descripción de la pulpa: blanca, jugosa y carnosa, con un agradable aroma y un delicioso sabor semiácido.

(Vega, 2013).

2.3 Cultivos

Los géneros y familias a las que pertenece la chirimoya pueden desarrollarse a una gran escala debido a las condiciones climatológicas que le favorecen al desarrollo del fruto, entre algunas de sus propiedades están las características hermafroditas de la flor y su comportamiento dicogamoprotogíneo, el cual provoca el cruce entre individuos o selecciones, así como la propagación de semillas las cuales al ser analizadas indican un alto grado de variación genética (Georje, 1984).

2.4 Control biológico de hongos fitopatógenos

Los microorganismos antagonistas que tienen la capacidad de ejercer un efecto de control biológico sobre diferentes patógenos de interés y que se han empleado para el control de diversas enfermedades en frutos y vegetales son bacterias, levaduras y hongos (Hernández-Lauzardo, Bautista-Baños, Velázquez-del Valle, & Hernández-Rodríguez, 2006). El concepto de control biológico se emplea muy comúnmente en el campo de la biología, más notable aun en la entomología y patología vegetal. En entomología, se ha usado para describir el uso de insectos predadores vivos, nematodos entomopatógenos o patógenos microbiales para suprimir o eliminar poblaciones de diferentes plagas de insectos. En patología vegetal, el término se emplea al uso de antagonistas microbiales que controlen enfermedades, así como al uso de patógenos de hospederos específicos para controlar melazas (Pal, 2006). El control biológico en fitopatología ha buscado la introducción y establecimiento generalmente de solo un aislamiento de determinada

cepa antagónica que, en grandes cantidades, es introducido en el suelo contra uno o varios fitopatógenos con origen en el suelo (Virgilio, 2009).

2.5 Hongos fitopatógenos que atacan la chirimoya

2.5.1 *Lasiodiplodia sp*

La especie tipo del género *Lasiodiplodia* es un hongo descrito por primera vez, por Saccardo, alrededor de 1890, afectando frutos de cacao (*Theobromae cacao*) en Ecuador (Crous & Palm, 1999). Este hongo es cosmopolita y tiene un amplio rango de hospederos, incluidos monocotiledóneas, dicotiledóneas y gimnospermas, especialmente de los trópicos y subtrópicos. Es un hongo pleomórfico y ubicuo, por lo cual ha tenido más de un sinónimo (Abdollahzadeh, Javadi, Mohammadi Goltapeh, Zare, & Phillips, 2010).

2.5.2 *Colletotrichum sp*

Es una especie de hongo que está distribuido por todo el mundo, ya que ataca gran variedad de plantas las cuales están constituidas en regiones tropicales y subtropicales (Pérez Castro, Saquero, & Beltrán Herrera, 2003). Ataca principalmente pecíolos, tallo y hoja las cuales presentan puntos rojizos ocasionando que crezca de forma irregular provocando así la necrosis total de la hoja (Jiménez, Campo, & López, 2009).

2.5.3 *Pestalotiopsis sp*

Esta clase de hongo patógeno se caracteriza por presentar conidias con cinco células, apéndices apicales y basales por lo que las células medias presentan diferente patrón de pigmentación (Jeewon, Liew, Simpson, Hodgkiss, & Hyde, 2003). Su presencia radica en climas tropicales. Este hongo por lo regular se encuentra en estado anamorfo ó imperfecto a las cuales solo 20 especies de las 235 descritas hasta ahora se les conoce su estado teleomorfo ó perfecto *Pestalosphaeria* (Maharachchikumbura, Guo, Chukeatirote, & Bahkali, 2011).

2.5.4 *Fusarium sp*

Es un tipo de hongo patógeno que tiene la capacidad de atacar las plantas cuando estas carecen de una disfuncionalidad, además de que pueden sobrevivir en materia orgánica (Michielse & Rep, 2009). Esta clase de hongo tiene la habilidad de propagarse por medio de suelos ya infectados, agua de escorrentía y almácigo infectado, además tiene la particularidad de sobrevivir durante mucho tiempo en el suelo debido a sus estructuras de resistencia denominadas clamidosporas, lo que vuelve inefectiva la rotación de cultivos a corto plazo (Lacy, Berger, Gilbertson, & Little, 1996).

2.5.5 *Cladosporium sp*

La clase de este tipo de hongos pertenece a la clase Deuteromycetes, orden *Moniliales*, familia *Dematiaceae*, son hongos imperfectos del tipo *Cladosporium* es *C. herbarum* su fase perfecta o teleomorfo es *Mycosphaerella tassiana* Johans (Mahmoud & Mohsen , 2017), y según (Kirk,, Cannon, & Minter, 2008), pertenece a la clase Ascomycetes, subclase Dothyeomycetidade, orden *Mycosphaerellales*, familia *Mycosphaerellaceae*.

2.5.6 *Rhizopus sp*

Esta clase de hongo fitopatogeno tiene la capacidad de sobrevivir durante meses en los suelos, sus esporas se diseminan en el aire y al encontrar las condiciones favorables germinan y se desarrollan. Los frutos más afectados son aquellos que ya maduros por lo que son más susceptibles a contraer una infección (Lisker, Keren-Shacham, Sarig, & Ben-Arie, 1996), los efectos que causa este hongo se presentan después de la cosecha y empacado de los productos.

2.5.7 *Penicillium sp*

Este tipo de hongo se caracteriza por la formación de conidios en una estructura ramificada semejante a un pincel que termina en células conidiógenas llamadas

fiálides (Webster & Weber, 2007). Este se encuentra dividido en grupos o subgéneros de acuerdo a la morfología de los pinceles aunque también se tiene en cuenta la velocidad de crecimiento. La serie *Monoverticillata* o subgénero *Aspergilloides* comprenden a todos los penicilios monoverticilados (Kozakiewicz, Bridge, & Paterson, 1993).

2.5.8 *Aspergillus* sp

Es un hongo que está distribuido a lo largo de toda naturaleza debido a la extensa gama de sustratos, su identificación se da por medio de sus características morfológicas, sin embargo, a nivel especie se complica su identificación. Este contiene características fenotípicas se recomienda el llamado enfoque polifásico, basado en la utilización de caracteres morfológicos en combinación con características bioquímicas y moleculares para dar perfiles de especies mucho más detallados (Pitt & Samson, 2007).

2.6 Técnicas para la identificación de hongos fitopatógenos

2.6.1 Cámara húmeda

Consiste en colocar la muestra enferma en una bolsa de nylon o un recipiente con un trozo de algodón embebido en agua. Es necesario mantener el recipiente cerrado a temperatura ambiente, hasta que se visualice el signo del hongo. La muestra a colocar en el recipiente debe estar limpia para que los resultados no se vean alterados por posibles contaminantes (Dominique, 2015).

2.6.2 Aislamiento

Consiste en limpiar con un algodón embebido en alcohol 70% el tejido vegetal enfermo, realizar pequeños cortes de la zona de avance de la infección, donde el patógeno está en activo desarrollo. Los trozos son esterilizados con una solución de hipoclorito al 1% durante 1 minuto, enjuagados con agua destilada estéril y sembrados en placas de petri con medios de cultivos específicos para hongos, la

mayoría de las veces estos medios contienen sustancias bacteriostáticas para inhibir el crecimiento de bacterias contaminantes. Las placas son incubadas en estufa a 20 o 25°C por 4 a 5 días, posteriormente a partir de los trozos sembrados se verá el micelio del hongo, en función de los tipos de micelio desarrollados será el número de repiques a realizar para llegar a obtener un cultivo puro. El repique consiste en extraer del borde de la colonia un trozo de agar con micelio, sembrarlo en otra placa de petri conteniendo medio nutritivo para hongos, pero sin sustancias bacteriostáticas, e incubar las placas a 20 o 25°C durante el tiempo que demore la formación de las estructuras reproductivas necesarias para la identificación del hongo (Rubio, 2016).

2.7 Alternativas para disminución de patógenos en chirimoya

Aplicación de fungicidas químicos: Estos son productos químicos utilizados para eliminar o evitar el desarrollo de los hongos que atacan a los cultivos; son empleados en la agricultura (Hamlen & Power, 1999). Algunos de ellos se describen a continuación:

- Polisulfuro de calcio: detiene la germinación de esporas de los hongos.
- Oxiclóruo de cobre: afecta procesos en el desarrollo del hongo y detiene la germinación de esporas.
- Tiabendazol: de amplio espectro para el control de enfermedades que afectan al cultivo durante la siembra y almacenamiento.
- Tebuconazole: elimina la germinación de las esporas, detiene el desarrollo temprano del hongo, evita la propagación de la enfermedad, evita la síntesis del ergosterol e impide la formación de la pared celular fúngica (Ponce Vélez & Lanza Espino, 2016).

Tratamientos térmicos: Los tratamientos de desinfección con calor se han propuesto como una posibilidad, debido a que son relativamente fáciles de aplicar, no dejan residuos químicos y suelen ser eficaces en el control de hongos (Sosa Morales, Garcia, & López Malo, 2009). Los tratamientos térmicos contra los patógenos se aplican a frutas recién cosechadas durante tiempos relativamente cortos, ya que los

hongos causantes del deterioro se encuentran en la superficie o en las capas celulares que están directamente bajo la piel de los productos frescos. Las formas de aplicación son varias: tratamientos por vapor, con aire caliente e hidrotérmicos (inmersión de los frutos en agua caliente por corto tiempo) (Hansen & Johnson, 2007).

Aplicación de aceites esenciales: Estas pueden ser encontradas en gran variedad de vegetales, las sustancias que son extraídas de él pueden encontrarse distribuidas en todo el vegetal como en raíces, tallos, hojas, flores y frutos (Vásquez Ribeiro, Alva, & Marreros Valles, 2001). De tal modo se tiene el trabajo desarrollado por (García Camarillo, y otros, 2006), en el cual se demostró la capacidad antifúngica de los aceites esenciales de canela y orégano sobre *Aspergillus flavus*.

2.8 Bacteria *Bacillus subtilis* como agente de control biológico

El uso de esta bacteria ha causado la disminución de pesticidas químicos, y ha propiciado un gran interés en ella, ya que dentro de sus características destacan propiedades antifúngicas, supresores efectivos contra diversos Fitopatógenos como *Fusarium*, *Pythium*, *Phytophthora* y *Rhizoctonia*.

Por otro lado, es necesario resaltar que esta bacteria al ser Gram positiva tiene la habilidad de producir metabolitos primarios o secundarios con amplio espectro antibiótico y lipopeptidos. Estos metabolitos son capaces de eliminar algunos patógenos incluyendo especies de *Fusarium*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Septoria*, y *Verticillium*. Dentro de los compuestos producidos por *Bacillus subtilis*, se incluyen la surfactina, fengicina, iturina A, B, y C, micosubtilinas, y bacilomicinas, biosurfactantes activos de membrana con potentes actividades antimicrobianas (Ariza & Sánchez Ligia , 2012).

CAPÍTULO III. Desarrollo de la metodología

3. Ubicación geográfica de la investigación

La presente investigación se llevó a cabo en la comunidad El Aguacate municipio de Pénjamo con ubicación geográfica $20^{\circ}28'0.72''$ N y $101^{\circ}47'19''$ W (imagen1). Se realizaron los estudios y pruebas correspondientes en las instalaciones de laboratorio de química general en el Instituto Tecnológico Superior de Abasolo con ubicación geográfica $20^{\circ}26'23.1''$ N y $101^{\circ}32'43.6''$ W (imagen 2).



Imagen 1- Comunidad El Aguacate



Imagen 2- Instalaciones de la universidad

3.1 Colecta de muestra

- Se recolectó el fruto del árbol de la chirimoya tomando como base aquel que estuviese seco y momificado (imagen 3).



Imagen 3- Aspecto del fruto dañado.

- Se excavó a una distancia de 10 cm del tallo del árbol y posteriormente se extrajo la tierra a una profundidad de 5 cm, observando su consistencia y color (imagen 4).



Imagen 4- Consistencia y textura del suelo.

- Para su colecta se tomó aquellas hojas que tuvieran irregularidades conforme a la estructura dañada que la compone, es decir el color y las manchas presentes (imagen 5).



Imagen 5- Hoja dañada en estado de deshidratación.

3.2 *Bacillus subtilis* y diseño experimental

Se utilizó la bacteria *Bacillus subtilis*, la cual, se obtuvo mediante la siembra y aislamiento del grano de maíz que realizó el ingeniero Juan de Jesús Aguirre García durante el desarrollo de su tesis en el Instituto Tecnológico Superior de Abasolo, para concluir su carrera como ingeniero en alimentos, recolectando las muestras de la comunidad Gomes de Orozco, municipio de Abasolo Guanajuato, realizando una secuenciación y obteniendo como resultado *Bacillus subtilis sub. subtilis*.

Las muestras de suelo, hoja y fruto se sembraron en placas con medio PDA, para, posteriormente aislar hongos mediante resiembra de hifas en cajas nuevas. Una vez aislados los hongos se sembraron en presencia de la bacteria *Bacillus subtilis* realizando pruebas por triplicado con cada una de las cepas de hongos obtenidas.

El diseño experimental se desarrolló utilizando como variable el tipo de hongo aislado, el cual se confrontan con la bacteria *Bacillus subtilis* y como variable de respuesta el diámetro del hongo. Para ello se llevó un control biológico, sembrando

el hongo en ausencia de bacteria con la finalidad de observar el crecimiento que desarrolla frente a la bacteria. Cada tratamiento se realizó por triplicado.

3.3 Aplicación (preparación y colecta)

Se llevó a cabo la siembra en placa de las muestras de hoja, fruto y suelo colectado de los huertos de chirimoya. El medio de cultivo que se utilizó fue agar PDA, una vez que se desarrollaron los diversos microorganismos en cada una de las cajas se procedió a aislar las colonias y hongos que presentaron morfologías y colores diferente, resemebrando en placas nuevas con medio, para ello se realizó el procedimiento siguiente.

- ✓ Se desinfectó la campana de flujo laminar y se encendió el mechero.
- ✓ A continuación se introdujeron los medios de cultivo PDA y la muestra a sembrar, utilizando las pinzas las cuales antes de tomar una muestra debían ser esterilizadas en el mechero para evitar la contaminación de la muestra.
- ✓ Después se extrajo una pequeña muestra del fruto dañado y posteriormente se sembró en el medio de cultivo. Este proceso se realizó igual para las dos muestras restantes haciéndolas por triplicado.
- ✓ Por ultimo ya estando sembradas las muestras se sellaron con cinta para posteriormente dejarlas incubar a temperatura ambiente
- ✓ Para el óptimo crecimiento de los fitopatógenos y así observar los hongos que estaban presentes en cada muestra.

Una vez que hubo desarrollo de microorganismos, en un medio estéril (mecheros y área desinfectada) se tomó una muestra con asa bacteriológica de cada colonia y hongo que visualmente se veía diferente y se transfirió cada cepa a una placa diferente con medio PDA.

3.6 Técnica para el antagonismo de *Bacillus subtilis* vs hongo fitopatógenos

Se preparó el trabajo en donde se estuvo trabajando, se desinfectó para que quede libre de microorganismos que puedan alterar las muestras.

Con mecheros se crea un ambiente libre de microorganismos, estos con la finalidad de que al destapar las muestras no se vayan a contaminar.

Se colocaron las cajas Petri de forma invertida para el mejor manejo y Se esterilizó el asa por medio del mechero, este debe tornarse color rojo, ya una vez esterilizada el asa se tomó la caja Petri que contiene la bacteria y se distribuyó de manera uniforme en una placa con medio PDA, a ésta misma placa se le colocó en el centro una muestra de un hongo a analizar, por último se sellaron con cinta y se dejó incubar durante 4 días. Como control, se sembró una muestra del hongo en el centro de una placa con medio PDA.

Se volvió a repetir todo el procedimiento con otros 4 hongos más. Una vez que se dejaron incubar las muestras, se midió el diámetro de crecimiento de los hongos sembrados en las cajas Petri con medio.

3.7 Variables a evaluar o de estudio (Presencia o ausencia de hongos fitopatógenos)

Tamaño de la colonia del microorganismo calculado en cm, utilizando como control biológico el hongo fitopatógeno aislado sin bacteria, el cual se estará midiendo con una regla cada 24 horas en un lapso de 4 días, observando los cambios que presentan el hongo frente al antagonismo de la bacteria *Bacillus subtilis*.

3.8 Análisis estadístico

El software que se utilizó en esta investigación para la cuantificación de datos obtenidos fue Minitab, en el cual se evaluaron los tratamientos A1 y A2 (Diámetro del hongo aislado 1 en presencia de *Bacillus subtilis* y diámetro del hongo aislado 1, respectivamente), B1 y B2 (Diámetro del hongo aislado 2 en presencia de *Bacillus subtilis* y diámetro del hongo aislado , respectivamente), C1 y C2 (Diámetro del hongo aislado 3 en presencia de *Bacillus subtilis* y diámetro del hongo aislado 3, respectivamente), D1 y D2 (Diámetro del hongo aislado 4 en presencia de *Bacillus subtilis* y diámetro del hongo aislado 4, respectivamente), mediante un análisis de varianza y comparación en parejas de Tukey. Siendo el software Minitab a través

del cual se realizó el diagnóstico y se obtuvieron las gráficas de los resultados obtenidos sobre el crecimiento de los hongos fitopatógenos.

CAPÍTULO IV. Resultados

4.1 Crecimiento de hongos fitopatógenos presentes en muestra de fruto, hoja y suelo de chirimoya

A continuación se observa el crecimiento que los hongos fitopatógenos desarrollaron en las diferentes muestras inoculadas dentro de la cual se desarrollaron con mayor frecuencia en hoja de chirimoya, siendo esta una de las partes más contaminadas del árbol.

Dentro de la muestra de hoja (imagen 7) se identificaron hongos fitopatógenos uno de ellos fue *Colletotrichum gloeosporioides* el cual es un invasor oportunista de material vegetal dañado o muerto, este llega a sus más graves proporciones cuando está expuesto a condiciones de alta humedad o temperatura. Este hongo causa manchas irregulares sobre las hojas y como consecuencia aparecen puntos oscuros negros. Además llegan a observarse manchas necróticas sobre la hoja (Pérez Castro, Saquero, & Beltrán Herrera, 2003).

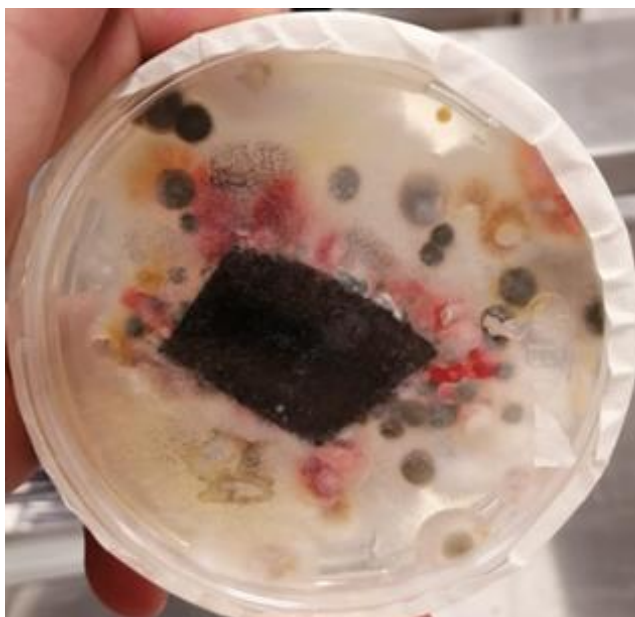


Imagen 6- Hongos presentes en hoja.

Como se puede observar en el fruto (imagen 8) se identificaron de igual manera una variedad de hongos fitopatógenos dentro los cuales se presenta *Botrytis sp* el cual causa la una cantidad muy grande de micelio gris y conidióforos largos y ramificados, dando como resultado lesiones necróticas, y pudrición blanda. Este microorganismo puede aparecer durante toda la fase del ciclo de cultivo afectando a todas las partes que conforman a la planta (Calle, 2019).

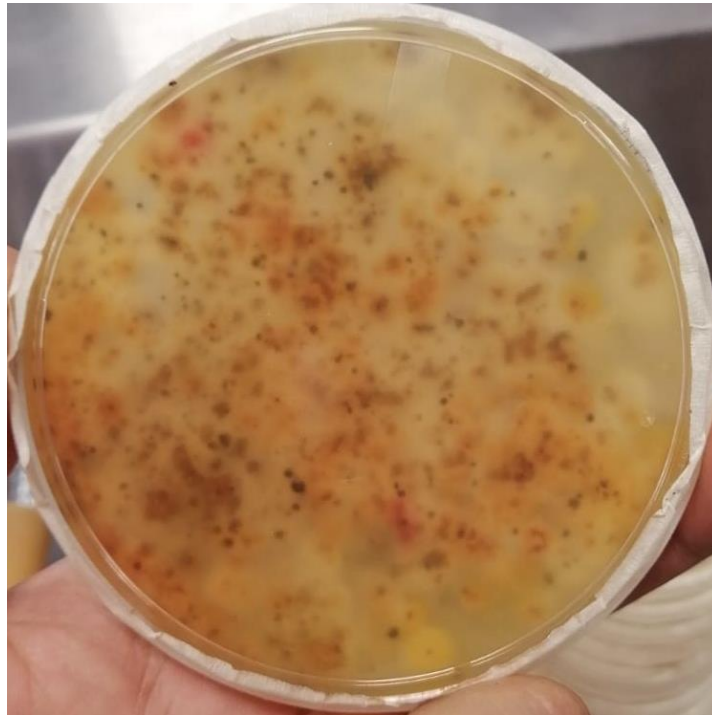


Imagen 7- Hongos presentes en fruto.

Por ultimo en la muestra de suelo (imagen 9), como en las muestras anteriores se observan gran variedad de hongos fitopatógenos dentro de los cuales se presentaba *Phytophthora* provocando la marchites de decadencia del fruto y sus raíces, esto debido a la resistencia que presenta este microorganismo sobre las condiciones a las que se encuentre expuesto ya que puede sobrevivir durante varios años en el suelo dentro de las cepas superficiales (Soto Plancarte, y otros, 2017) .



Imagen 8- Hongos presentes en suelo (tierra).

4.3 Antagonismo de bacteria *Bacillus subtilis* vs hongo fitopatógeno presente en el fruto de la chirimoya.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos sobre la inoculación de las muestras de hongos en presencia de la bacteria y sin presencia de bacteria. Se hacen pruebas en ausencia de bacteria para observar cuales son los cambios que presentan las muestras que si tienen la bacteria, esto se fue cuantificando cada 24 horas durante un lapso de 4 días, las muestras anteriormente mencionadas fueron etiquetadas alfabéticamente realizando cinco pruebas con y sin bacteria.

En las muestras inoculadas que se presentan a continuación (tabla 2), se observa que en el centro se encuentra asilada una muestra de hongo junto con la bacteria *Bacillus subtilis*, realizado estas pruebas por triplicado. Para esto se realizó un promedio de cada día para el crecimiento del hongo ante la bacteria, dando como resultado lo siguiente.

Día 1: 4.2mm

Día 2: 5.6mm

Día 3: 5.4mm

Día 4: 5.4mm

Tabla 2- Antagonismo con bacteria, muestra A

A	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
A1	4mm	8mm	1cm	1cm
A1.1	4mm	5mm	5mm	8mm
A1.2	3mm	6mm	7mm	9mm
A1.3	4mm	4mm	6mm	8mm
A1.4	6mm	5mm	8mm	1cm

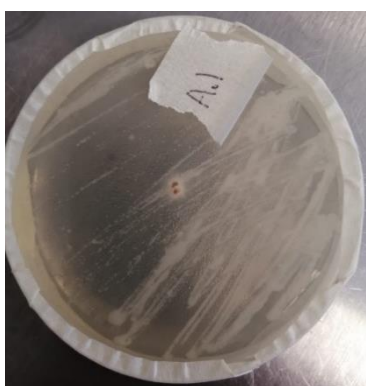


Imagen 9- Antagonismo con bacteria día 1 (A)



Imagen 10- Antagonismo con bacteria día 2 (A)



Imagen 11- Antagonismo con bacteria día 3 (A)



Imagen 12- Antagonismo con bacteria día 4 (A)

En las muestras inoculadas que se presentan a continuación (tabla 3), se observa que en el centro se encuentra asilada una muestra de hongo realizando estas pruebas por triplicado. Para esto se realizó un promedio de cada día para observar el desarrollo del hongo, dando como resultado lo siguiente.

Día 1: 6.2mm

Día 2: 2.38cm

Día 3: 3.42cm

Día 4: 4.2cm

Tabla 3- Antagonismo sin bacteria, muestra A

A	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
A2	5mm	2cm	3cm	4.2cm
A2.1	1cm	2.9cm	3.8cm	4.4cm
A2.2	6mm	2.2cm	3.2cm	4cm
A2.3	5mm	2.2cm	3.3cm	4cm
A2.4	5mm	2.6cm	3.8cm	4.4cm



Imagen 13- Antagonismo sin bacteria día 1 (A)



imagen 14- Antagonismo sin bacteria día 2 (A)



Imagen 15- Antagonismo sin bacteria día 3 (A)



imagen 16- Antagonismo sin bacteria día 4 (A)

En las muestras inoculadas que se presentan a continuación (tabla 4), se observa que en el centro se encuentra asilada una muestra de hongo junto con la bacteria *Bacillus subtilis*, realizado estas pruebas por triplicado. Para esto se realizó un promedio de cada día para observar la disminución del hongo ante la bacteria, dando como resultado lo siguiente.

Día 1: 3.6mm

Día 2: 4.2mm

Día 3: 4.2mm

Día 4: 4.2mm

Tabla 4- Antagonismo con bacteria, muestra B

B	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
B1	3mm	4mm	4mm	4mm
B1.1	4mm	4mm	4mm	4mm
B1.2	5mm	5mm	5mm	5mm
B1.3	3mm	5mm	5mm	5mm
B1.4	3mm	3mm	3mm	3mm



Imagen 17- Antagonismo con bacteria día 1(B)



Imagen 18- Antagonismo con bacteria día 2 (B)



Imagen 19- Antagonismo con bacteria día 3 (B)



Imagen 20- Antagonismo con bacteria día 4 (B)

En las muestras inoculadas que se presentan a continuación (tabla 5), se observa que en el centro se encuentra asilada una muestra de hongo realizando estas pruebas por triplicado. Para esto se realizó un promedio de cada día para observar el desarrollo del hongo, dando como resultado lo siguiente.

Día 1: 6.8mm

Día 2: 1.8cm

Día 3: 1.24cm

Día 4: 1.42cm

Tabla 5- Antagonismo sin bacteria, muestra B

B	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
B2	5mm	1cm	1.2cm	1.2
B2.1	6mm	1.2cm	1.3cm	1.4cm
B2.2	1cm	1.3cm	1.5cm	1.7cm
B2.3	9mm	1cm	1.2cm	1.3cm
B2.4	4mm	9mm	1cm	1.5cm



Imagen 21- Antagonismo sin bacteria día 1 (B)



Imagen 22- Antagonismo sin bacteria día 2 (B)



Imagen 23- Antagonismo sin bacteria día 3 (B)



Imagen 24- Antagonismo sin bacteria día 4 (B)

En las muestras inoculadas que se presentan a continuación (tabla 6), se observa que en el centro se encuentra asilada una muestra de hongo junto con la bacteria *Bacillus subtilis*, realizado estas pruebas por triplicado. Para esto se realizó un promedio de cada día para observar la disminución del hongo ante la bacteria, dando como resultado lo siguiente.

Día 1: 3mm

Día 2: 1.34cm

Día 3: 1.28cm

Día 4: 1.58cm

Tabla 6- Antagonismo con bacteria, muestra C

C	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
C1	2mm	1.3cm	1cm	1cm
C1.1	3mm	1.5cm	1.4cm	1.7cm
C1.2	3mm	1.4cm	1.5cm	1.8cm
C1.3	4mm	1.2cm	1.2cm	2cm
C1.4	3mm	1.3cm	1.3cm	1.4cm

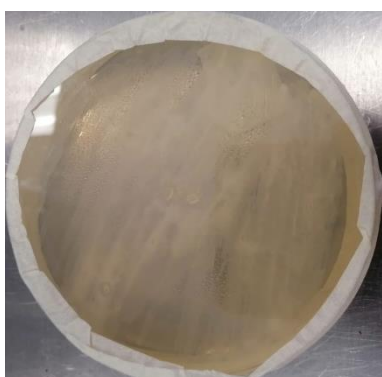


Imagen 25- Antagonismo con bacteria día 1 (C)



Imagen 26- Antagonismo con bacteria día 2 (C)



Imagen 27- Antagonismo con bacteria día 3 (C)



Imagen 28- Antagonismo con bacteria día 4 (C)

En las muestras inoculadas que se presentan a continuación (tabla 7), se observa que en el centro se encuentra asilada una muestra de hongo realizando estas pruebas por triplicado. Para esto se realizó un promedio de cada día para observar el desarrollo del hongo, dando como resultado lo siguiente.

Día 1: 5mm

Día 2: 3.1cm

Día 3: 5.38cm

Día 4: 6.96cm

Tabla 7- Antagonismo sin bacteria, muestra C

C	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
C2	1cm	2.9cm	5.5cm	7cm
C2.1	3mm	3.4cm	5.7cm	7.3cm
C2.2	3mm	2.9cm	5cm	6.5cm
C2.3	5mm	3.3cm	5.6cm	7.3cm
C2.4	4mm	3cm	5.1cm	6.7cm

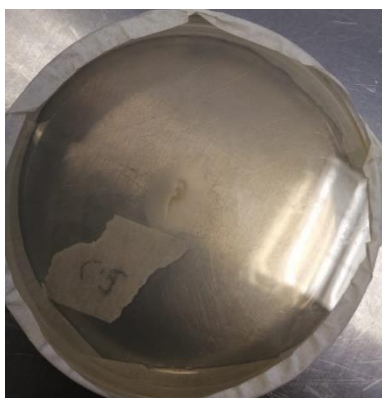


Imagen 29- Antagonismo sin bacteria día 1 (C)

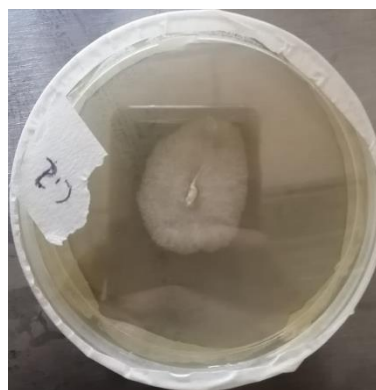


Imagen 30- Antagonismo sin bacteria día 2 (C)



Imagen 31- Antagonismo sin bacteria día 3 (C)



Imagen 32- Antagonismo sin bacteria día 4 (C)

En las muestras inoculadas que se presentan a continuación (tabla 8), se observa que en el centro se encuentra asilada una muestra de hongo junto con la bacteria *Bacillus subtilis*, realizado estas pruebas por triplicado. Para esto se realizó un promedio de cada día para observar la disminución del hongo ante la bacteria, dando como resultado lo siguiente.

Día 1: 3.8mm

Día 2: 1.28cm

Día 3: 1.36cm

Día 4: 1.38cm

Tabla 8- Antagonismo con bacteria, muestra D

D	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
D1	4mm	1.2cm	2cm	2cm
D1.1	4mm	1.3cm	1.2cm	1cm
D1.2	4mm	1.4cm	1cm	1.5cm
D1.3	3mm	1.1cm	1.2cm	1cm
D1.4	4mm	1.4cm	1.4cm	1.4cm

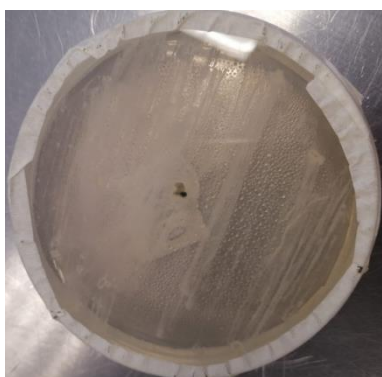


Imagen 33- Antagonismo con bacteria día 1(D)



Imagen 34- Antagonismo con bacteria día 2 (D)



Imagen 35- Antagonismo con bacteria día 3 (D)

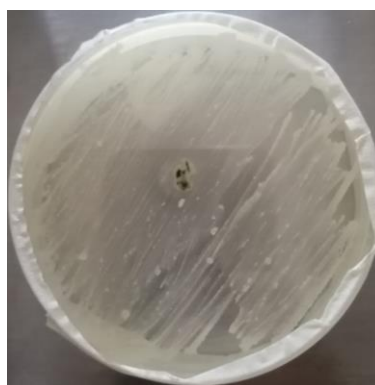


Imagen 36- Antagonismo con bacteria día 4 (D)

En las muestras inoculadas que se presentan a continuación (tabla 7), se observa que en el centro se encuentra asilada una muestra de hongo realizando estas pruebas por triplicado. Para esto se realizó un promedio de cada día para observar el desarrollo del hongo, dando como resultado lo siguiente.

Día 1: 4.4mm

Día 2: 2.44cm

Día 3: 3.84cm

Día 4: 6.4cm

Tabla 9- Antagonismo sin bacteria, muestra D

D	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
D2	5mm	2.4cm	2.9cm	6.6cm
D2.1	5mm	2.5cm	3.5cm	6.5cm
D2.2	4mm	2.5cm	5.2cm	6.9cm
D2.3	4mm	2.5cm	3.8cm	4.9cm
D2.4	4mm	2.3cm	3.8cm	5.3cm

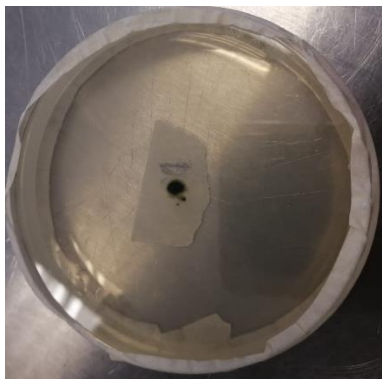


Imagen 37- Antagonismo sin bacteria día 1 (D)



Imagen 38- Antagonismo sin bacteria día 2 (D)



Imagen 39- Antagonismo sin bacteria día 3 (D)



Imagen 40- Antagonismo sin bacteria día 4 (D)

4.4 Hongos fitopatógenos utilizados en el antagonismo vs *Bacillus subtilis* según su morfología

Muestra A: *Verticillioides*, posee macroconidios en forma de hoz, las cuales forman una superficie dorsal y ventral casi paralela, de pared delgada con una célula basal o pie distinto y una célula apical que por lo regular es alargada (Nelson, 1992).

Muestra B: *Aspergillus oryzae*, tiene filamentoso hialino, saprofito, perteneciente al filo Ascomycota. Se presenta formado por hifas hialinas septadas y puede tener reproducción sexual (Terebiznik, 1998).

Muestra C: *Fusarium spp*, posee características microscópicas. La fiálide es generalmente fina, en forma de botella; simple o ramificada; cortas o largas; monofialídica (estas emergen esporas de un poro de la fiálide) o polifialídica (de varios poros) (Tapia & Amaro, 2014).

Muestra D: *Colletotrichum*, conidióforos poco desarrollados. Poseen setas escasas, principalmente en medio de cultivo. Células conidiogénicas cilíndricas, ligeramente agrupadas, produciendo conidios sucesivamente a partir de un locus. Formación de conidios secundarios (Gunnell & Gubler, 1992).

4.5 Cuantificación de datos obtenidos del antagonismo por medio del software Minitab

El software que se utilizó fue Minitab, a través del cual se realizó el análisis de varianza donde se plantearon las siguientes hipótesis:

H0 (Hipótesis Nula) = Todas las medidas son iguales.

H1 (Hipótesis Alternativa) = Por lo menos una medida es diferente.

Se realizó el análisis de antagonismo a 8 muestras diferentes, obteniendo los resultados que se muestran a continuación (tabla 10) en la cual se observa que el valor de P es menor a 0.05, por lo que se rechaza la H0 y se acepta la H1, es por ello que al menos uno de los tratamientos es diferente.

Tabla 10. Diámetro de hongo (cm) VS Diámetro de hongo en presencia de *Bacillus subtilis*.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	7	222.078	31.7254	191.69	0.000

Error	32	5.296	0.1655
Total	39	227.374	

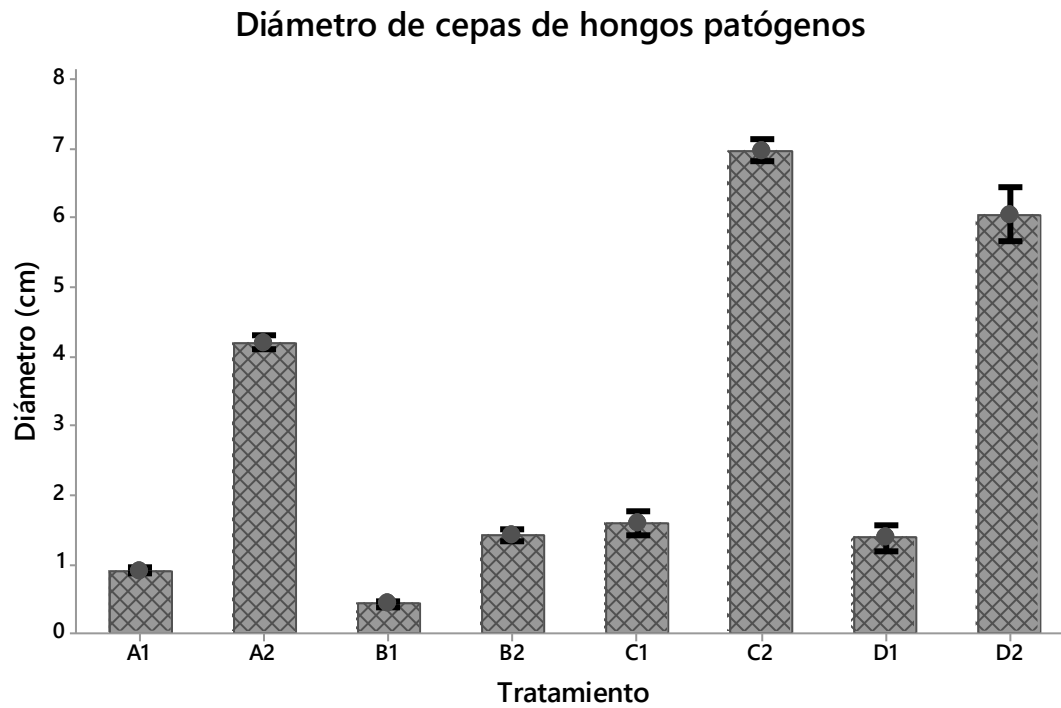
S = 0.406817 R-cuad. = 97.67% R-cuad. (ajustado)= 97.16% R-cuad. (pred)= 96.36%

Se realizó la agrupación de las medias de los tratamientos utilizando el método de Tukey, con la finalidad de identificar cual e los tratamientos es diferente; donde obtuvieron los siguientes resultados (tabla 11).

Tabla 11. Agrupación de las medias de los tratamientos.

Tratamiento	N	Media	Agrupación
C2	5	6.960	A
D2	5	6.040	B
A2	5	4.2000	C
C1	5	1.580	D
B2	5	1.4200	D
D1	5	1.380	D
A1	5	0.9000	D E
B1	5	0.4200	E

De acuerdo a la tabla 11, se observa que el diámetro de los hongos aislados es menor cuando se encuentra en contacto con la bacteria *Bacillus subtilis*, los cuales corresponden a los tratamientos A1, B1, C1 Y D1 (grafica 1).



Grafica 1- Comparación de los diámetros en cm de los hongos aislados en presencia de la bacteria *Bacillus subtilis* (1) y en ausencia de la misma (2).

Capítulo V. Conclusión

5.1 Conclusiones

- El antagonismo que presenta la bacteria *Bacillus subtilis*, ante las muestras de hoja, fruto y suelo de chirimoya inhiben el crecimiento de la muestra del hongo fitopatógeno aislado A2 hasta un 78.57%. por lo que la bacteria ayuda al control biológico del hongo.
- El antagonismo que presenta la bacteria *Bacillus subtilis*, ante las muestras de hoja, fruto y suelo de chirimoya inhibe el crecimiento de la muestra del hongo fitopatógeno aislado B2 hasta un 70.42%. por lo que la bacteria ayuda al control biológico del hongo.
- El antagonismo que presenta la bacteria *Bacillus subtilis*, ante las muestras de hoja, fruto y suelo de chirimoya inhibe el crecimiento de la muestra del hongo fitopatógeno aislado C2 hasta un 77.29%. por lo que la bacteria ayuda al control biológico del hongo.
- El antagonismo que presenta la bacteria *Bacillus subtilis*, ante las muestras de hoja, fruto y suelo de chirimoya inhibe el crecimiento de la muestra del hongo fitopatógeno aislado D2 hasta un 77.15%. por lo que la bacteria ayuda al control biológico del hongo.

Bibliografías

- Abdollahzadeh, J., Javadi, A., Mohammadi Goltapeh, E., Zare, R., & Phillips, A. J. (2010). Filogenia y morfología de cuatro nuevas especies de *Lasiodiplodia* de Irán. Iran: Naturalis.
- Ariza , Y., & Sánchez Ligia , M. (2012). Determinación de metabolitos secundarios a partir de *Bacillus subtilis* efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. Scielo, 149-155.
- Barriga, H. G. (1992). Flora medicinal de Colombia: Botánica médica. Colombia: Tercer Mundo.
- CALLE, P. F. (2019). CONTROL BIOLÓGICO DEL MOHO GRIS (*Botrytis cinerea*) EN CULTIVOS DE FRESA (*Fragaria vesca* L.) MEDIANTE HONGOS FILAMENTOSOS ANTAGONISTAS". UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA SEDE CUENCA, España.
- Cerdas Araya, M. d., Umaña Rojas, G., & Castro Retana, J. J. (2006). MANUAL DE MANEJO POS COS ECHA DE ANONA (*Annona cherimola*, Milj). UNIVERSIDAD DE COSTA RICA, COSTA RICA.
- Crous, P. W., & Palm, M. E. (1999). Reevaluación de los géneros anamorfos *Botryodiplodia*, *Dothiorella* y *Fusicoccum*. Universidad de Stellenbosch, Sudáfrica.
- Cuevas, J., González Fernández, M., & Hueso Martín, J. J. (2014). CHERIMOYA AND LOQUAT. UNESCO-EOLSS, 1-14.
- Dominique, M. (2015). Fitopatología . Unknown, 50-62.
- García Camarillo, E. A., Quezada Viay, M. Y., Moreno Lara, J., Sánchez Hernández, G., Moreno Martínez, E., & Pérez Reyes, M. C. (2006). Actividad Antifúngica de Aceites Esenciales de Canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) y Orégano (*Origanum vulgare* L.) y su Efecto sobre la Producción de

Aflatoxinas en Nuez Pecanera [*Carya illinoensis* (F.A. Wangenh) K. Koch].
Revista Mexicana de Fitopatología, 8-12.

- Georje, A. P. (1984). Frutas de árboles tropicales para Australia. Australia: Departamento de Industrias Primarias de Queensland.
- Gunnell, P. S., & Gubler, W. D. (1992). Taxonomía y morfología de especies de *colletotrichum* patógenas a la fresa. *Micólogo*, 157-165.
- Gutiérrez, M. F. (2001). Efecto de las Condiciones Ambientales y de los Insectos en la Polinización Natural del Chirimoyo. PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO, Chile.
- Hamlen, R. A., & Power, R. J. (1999). Distribución de las respuestas de sensibilidad al *cymoxanil* en poblaciones globales de *Phytophthora infestans*. *Ciencia de los plaguicidas*, 101-103.
- Hansen, J. D., & Johnson, J. A. (2007). TRATAMIENTOS TÉRMICOS PARA EL CONTROL DE PLAGAS POSTCOSECHA: TEORÍA Y PRÁCTICA. CAB Internacional, 363.
- Hernández-Lauzardo, A. N., Bautista-Baños, S., Velázquez-del Valle, M. G., & Hernández-Rodríguez, A. (2006). Uso de Microorganismos Antagonistas en el Control de Enfermedades Postcosecha en Frutos. *Scielo*, 0185-3309.
- Jeewon, R., Liew, E. C., Simpson, J. A., Hodgkiss, J., & Hyde, K. D. (2003). Importancia filogenética de los caracteres morfológicos en la taxonomía de especies de *Pestalotiopsis*. *Mol Phylogenet Evol*, 372-83.
- Jiménez, Y. M., Campo, R. O., & López, L. L. (2009). Caracterización Morfológica de aislamientos de *Colletotrichum* spp. causantes de la antracnosis del ñame *Dioscorea alata* L. *Fitopatología colombiana*, 0120-0143.
- Jonas Ochse, J., Soule, M. J., Dijkman, M. J., & Wehlburg, C. (1991). Cultivo y mejoramiento de plantas tropicales y subtropicales. México: Limusa.

- Kirk, P. M., Cannon, P. F., & Minter, D. W. (2008). Diccionario de hongos de Ainsworth & Bisby. Diccionario de Fung de Bisby, 771.
- Kozakiewicz, Z., Bridge, P. D., & Paterson, R. M. (1993). PENIMAT: un esquema informatizado de identificación de especies terverticiladas de *Penicillium*. Inglaterra: Elsevier.
- Lacy, M. L., Berger, R. D., Gilbertson, R. L., & Little, E. L. (1996). Desafíos actuales en el control de enfermedades del apio. Enfermedad de las plantas, 1084-1091.
- Lisker, N., Keren-Shacham, Z., Sarig, Z., & Ben-Arie, R. (1996). La biología y patología del hongo *Rhizopus stolonifer*, causa de la enfermedad del moho negro de las uvas de mesa en Israel. Plant pathology, 1099-1109.
- Maharachchikumbura, S., Guo, L. D., Chukeatirote, E., & Bahkali, A. (2011). Pestalotiopsis: morfología, filogenia, bioquímica y diversidad. Diversidad fúngica, 167-187.
- Mahmoud , Z., & Mohsen , I. (2017). Detección de la biota bacteriana y fúngica asociada con *Oreochromis niloticus* en el lago Manzala y su impacto en la salud humana. Salud masculina, 608-419.
- Michielse , C. B., & Rep, M. (2009). Actualización del perfil del patógeno: *Fusarium oxysporum*. Planta Mol Pathol, 311-24.
- Nava Díaz , C., Osada Kawasoe, S., Rendón Sánchez, G., & Ayala Escobar, V. (2000). Organismos asociados a Hirimoyo (*Annona cherimola* Mill.) en Michoacán, México. Agrociencia, 217-226.
- Nelson, P. E. (1992). Taxonomía y biología de *Fusarium moniliforme*. Micopatología, 29-36.
- Pal, K. K. (2006). Control biológico de patógenos vegetales. Universidad, OARDC, Wooster, OH, Wooster.

- Pérez Castro, L. M., Saquero, M. J., & Beltrán Herrera, J. D. (2003). Caracterización morfológica y patogénica de *Colletotrichum* sp. como agente causal de la antracnosis en ñame *Dioscorea* sp. Colombiana de Biotecnología, 24-35.
- Pitt, J. I., & Samson, R. A. (2007). Consideraciones nomenclaturales al nombrar especies de *Aspergillus* y sus teleomorfos. Estudios Mycol, 67-70.
- Ponce Vélez, G., & Lanza Espino, G. (2016). Plaguicidas organofosforados en lagunas costeras del Golfo de México. Red Internacional de Acción sobre Plaguicidas, 35.
- Rubio, P. G. (2016). AISLAMIENTO Y CULTIVO DE MICROORGANISMOS ASOCIADOS A ONCOIDES DE MANANTIALES HIDROTERMALES DE SANTISPAC, BAHÍA CONCEPCIÓN, B.C.S., MÉXICO. Centro de investigaciones biológicas del noroeste, s.c., Baja california sur.
- Sosa Morales, M. E., Garcia, H. S., & López Malo, A. (2009). *Colletotrichum gloeosporioides* interfaz crecimiento-no-crecimiento después de tratamientos de microondas seleccionados. Revista de Protección de Alimentos, 1427-33.
- Soto Plancarte, A., Rodríguez Alvarado, G., Fernández Pavía, Y. L., Pedraza Santos, M. E., López Pérez, L., Díaz Celaya, M., & Fernández Pavía, S. P. (2017). Protocolos de aislamiento y diagnóstico de *Phytophthora* spp. enfoque aplicado a la investigación. Scielo, 1867-1880.
- Tapia, C., & Amaro, J. (2014). Género *Fusarium*. Revista chilena de infectología, 0716-1018.
- Terebiznik, M. R. (1998). Alfa-amilasa de *Aspergillus oryzae* : estudios de producción por fermentación en sustrato sólido, purificación y estabilización. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.
- Valencia , R., Balslev, H., & Paz, G. (1993). Alta diversidad alfa arbórea en el Ecuador amazónico. Ecuador: Chapman & Hall.

- Vázquez Ribeiro, O., Alva, A., & Marreros Valles, J. (2001). EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE JENGIBRE (*Zingiber officinale*). *Amazónica de Investigación Alimentaria*, 38-42.
- Vega, M. E. (2013). CHIRIMOYA (*Annona cherimola* Miller), FRUTAL TROPICAL Y SUB-TROPICAL DE VALORES PROMISORIOS. *Cultivos Tropicales*, 52-63.
- Virgilio, M. M. (2009). *Bacillus thuringiensis* como agente de control biológico del complejo de la marchitez del chile (*Capsicum annuum* L.). *SciELO*, 1851-5657.
- Webster, J., & Weber, R. (2007). *Introducción a los hongos*. Inglaterra: Cambridge University Press.
- yothi B, A. J., Venkatesh, k., Chakrapani , P., & Roja , R. (2011). Potencial fitoquímico y farmacológico de *Annona cherimola*-A Revisión. *Revistas* 439-447.