



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología

**Aislamiento y caracterización de cepas nativas de
Bacillus spp y *Trichoderma spp* de la rizosfera de cafeto
con potencial antagonista frente a *Fusarium oxysporum*
del valle de Monzón – Huánuco-Perú**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Bióloga Microbióloga
Parasitóloga

AUTOR

Yohana Lisset DÍAZ CAMEZÁN

ASESOR

Abad FLORES PAUCARIMA

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Díaz, Y. (2019). *Aislamiento y caracterización de cepas nativas de Bacillus spp y Trichoderma spp de la rizosfera de cafeto con potencial antagonista frente a Fusarium oxysporum del valle de Monzón – Huánuco-Perú*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
(Universidad del Perú, Decana de América)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGA MICROBIÓLOGA PARASITÓLOGA
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)**

Siendo las 11:15 horas del 16 de enero de 2019, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al Título Profesional de Bióloga Microbióloga Parasitóloga de YOHANA LISSET DÍAZ CAMEZÁN.

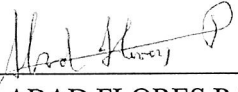
Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 017-EPMP-2018, el titulado expuso su tesis: "AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS NATIVAS DE *Bacillus* spp Y *Trichoderma* spp DE LA RIZÓSFERA DE CAFETO CON POTENCIAL ANTAGONISTA FRENTE A *Fusarium oxysporum* DEL VALLE DE MONZÓN – HUÁNUCO - PERÚ", y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 19....., calificativo: Aprobado con máximos honores.....


Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el Título Profesional de Bióloga Microbióloga Parasitóloga a YOHANA LISSET DÍAZ CAMEZÁN y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 16:35 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 16 de enero de 2019.


Dr. PEDRO CASTELLANOS SANCHEZ
(PRESIDENTE)


Dr. ABAD FLORES PAUCARIMA
(ASESOR)


Mg. FITO SANCHEZ ROJAS
(MIEMBRO)


Mg. JORGE LEON QUISPE
(MIEMBRO)

DEDICATORIA

A Dios por ser mi fuente de inspiración y guía. A mi madre Patricia por su apoyo incondicional, por su amor infinito, comprensión genuina y por sus enseñanzas que encaminaron mi vida.

A mi padre Juan quien con su gran ejemplo de esfuerzo y perseverancia fortaleció mi camino, por sus invaluable consejos que me enseñaron a nunca darme por vencida.

A mis hermanos Katherine, Anarita, José, Mariangela, Crhistian y Andreo quienes con su aliento fortalecieron mi alma y me ayudaron constantemente con sus grandes consejos.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por encaminarme e iluminar mi camino, porque su presencia me acompaña y es mi fortaleza en todo tiempo. A mis padres, Juan y Patricia, por todo su amor, paciencia, dedicación y comprensión por su apoyo constante, por seguir impulsando mis sueños, por ser mi ejemplo a seguir y enseñarme a nunca darme por vencida. Muchísimas gracias por todo lo brindado a mi persona y espero seguir brindándoles muchas más alegrías en el futuro.

A mis hermanos, Katherine, Anarita, José, Mariangela y Christian por todo su cariño y apoyo para seguir avanzando a pesar de las adversidades que se presentaron, por sus consejos y por preocuparse porque siempre tome las mejores decisiones, gracias por soportar mi cansancio y mal humor cada vez que llegaba cansada y estresada.

Al Vicerrectorado de Investigación y Posgrado que por medio del programa de Proyecto de tesis de pregrado, contribuyo a la realización de la tesis.

A mi asesor, Dr. Abad Flores, por darme la oportunidad de formar parte del equipo de investigadores del Laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología, por toda la confianza hacia mi persona durante el tiempo de realización de mi investigación, por su orientación y apoyo en todas las etapas, y por todo el tiempo que me ha brindado para la culminación de este trabajo, por ser ese gran ejemplo de investigador que me impulsa a seguir en este camino del control biológico.

A mis estimados profesores de la Facultad de Ciencias Biológicas, Mg. Tito Sánchez, Dr. Pedro Castellanos, Mg. Elena Quillama, Mg. Jorge León, por todo el apoyo y conocimientos brindados durante mi formación como microbióloga, y sobre todo por

abrirme la puerta de sus laboratorios los cuales me formaron y despertaron mi espíritu investigador.

A mis amigos que me acompañaron en todos estos años de formación Sofía, Karen y Joceline , gracias por todos esos momentos compartidos en toda nuestra estancia académica, por formar parte de esta bonita etapa universitaria y por su compañía en los buenos y malos tiempos.

A mis compañeros tesisistas del laboratorio, Lee, Keny, Diego todos nosotros hemos compartido la misma pasión por la investigación y gracias por apoyarme en esta investigación.

A los caficultores del Monzón quienes contribuyeron con sus conocimientos sobre cafeto para el desarrollo de esta investigación, además por ser una parte de mi inspiración para el desarrollo de esta tesis y de mis futuras investigaciones en cafeto.

Finalmente, gracias a todas las personas que siempre confiaron en mí y que participaron directa o indirectamente en la elaboración esta tesis.

INDICE

| | Pág. |
|---|-------------|
| LISTA DE ABREVIATURAS | I |
| LISTA DE TABLAS | II |
| LISTA DE FIGURAS | III |
| RESUMEN | IV |
| ABSTRACT | |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. MARCO TEORICO | 4 |
| 2.1. Generalidades del cafeto | 4 |
| 2.1.1. Morfología del café | 5 |
| 2.1.2. Producción y exportación de café en el Perú | 7 |
| 2.2 Cultivo de café | 8 |
| 2.2.1. Especies y variedades | 9 |
| 2.2.2. Condiciones agroclimáticas | 9 |
| 2.2.3. Problemática en el cultivo de café | 10 |
| 2.3. Enfermedades fitopatógenas del café | 11 |
| 2.3.1. Pudrición vascular en café. | 11 |
| 2.3.2. <i>Fusarium oxysporum</i> | 12 |
| 2.3.3. Epidemiología | 13 |
| 2.4. Control biológico | 14 |
| 2.4.1. Microorganismos antagonistas empleados en Control biológico | 14 |
| 2.5. Mecanismos de acción de microorganismos antagonistas | |
| 2.5.1. Competencia de nutrientes | 15 |
| 2.5.2. Antibiosis | 16 |
| 2.5.3. Micoparasitismo | 16 |

| | |
|--|----|
| 2.6. Género <i>Bacillus</i> | 16 |
| 2.7. Género <i>Trichoderma</i> | 17 |
| 3. HIPOTESIS Y OBJETIVOS | |
| 3.1 Hipótesis | 19 |
| 3.2 Objetivos | |
| 3.2.1. Objetivo general | 19 |
| 3.2.2. Objetivo específico | 19 |
| 4. METODOS | |
| 4.1. Lugares de muestreo | 20 |
| 4.2. Procedimiento y recolección de muestras | 20 |
| 4.3. Aislamiento del fitopatógeno <i>Fusarium oxysporum</i> | 21 |
| 4.4. Aislamiento de cepas de <i>Bacillus</i> spp | 21 |
| 4.5 Aislamiento de cepas de <i>Trichoderma</i> spp | 22 |
| 4.6. Determinación de la capacidad antagonista de <i>Bacillus</i> frente a <i>Fusarium oxysporum</i> mediante pruebas <i>in vitro</i> . | 22 |
| 4.7. Determinación de la capacidad antagonista de cepas de <i>Trichoderma</i> frente a <i>Fusarium oxysporum</i> mediante pruebas <i>in vitro</i> | 23 |
| 4.8. Caracterización de <i>Bacillus</i> spp con potencial antagonista. | 24 |
| 4.8.1. Caracterización morfológica y microscópica de <i>Bacillus</i> | 24 |
| 4.8.2. Prueba de catalasa | 25 |
| 4.8.3. Movilidad en medio SIM | 25 |
| 4.8.4. Asimilación de citrato | 25 |
| 4.8.5. Hidrólisis de caseína | 25 |
| 4.8.6. Hidrólisis de almidón | 26 |
| 4.8.7. Prueba de Voges Proskauer | 26 |
| 4.8.8. Prueba de utilización de carbohidratos | 26 |
| 4.8.9. Prueba de identificación de <i>Bacillus</i> en Medio Hicrome agar | 27 |
| 4.8.10. Crecimiento de <i>Bacillus</i> a diferentes concentraciones de NaCl | 27 |

| | |
|--|----|
| 4.8.11. Crecimiento de <i>Bacillus</i> a diferentes temperaturas | 27 |
| 4.8.12. Crecimiento de <i>Bacillus</i> a diferentes pH | 27 |
| 4.8.13. Caracterización morfológica y microscópica de especie de <i>Trichoderma</i> | 27 |
| 4.8.14. Caracterización molecular de cepas con mayor actividad antagonista | 28 |
| 4.9 Análisis estadístico | 30 |
| 5. RESULTADOS | |
| 5.1. Aislamiento e identificación de <i>Fusarium oxysporum</i> | 31 |
| 5.2. Aislamiento de cepas <i>Bacillus</i> y <i>Trichoderma</i> con actividad antagonista | 32 |
| 5.3. Pruebas de antagonismo en placa para cepas de <i>Bacillus</i> | 33 |
| 5.4. Pruebas de antagonismo en placa para cepas de <i>Trichoderma</i> | 37 |
| 5.5. Caracterización fenotípica de cepas de <i>Bacillus</i> | 42 |
| 5.5.1. Caracterización morfológica y observaciones microscópicas | 43 |
| 5.5.2. Pruebas Bioquímicas | 45 |
| 5.6. Crecimiento a diferentes concentraciones de pH | 47 |
| 5.7. Crecimiento a diferentes concentraciones de NaCl | 47 |
| 5.8. Caracterización de cepas de <i>Trichoderma</i> | 50 |
| 5.8.1. Caracterización morfológica y observaciones microscópicas cepas de <i>Trichoderma</i> | 50 |
| 5.9. Identificación molecular de cepas con mayor actividad antagonista M3PI .I, B1T, PLS01 y <i>Fusarium oxysporum</i> . | 53 |
| 5.10. Análisis Estadístico | 54 |
| 6. DISCUSIÓN | 59 |
| 7. CONCLUSIONES | 67 |
| 8. RECOMENDACIONES | 68 |
| 9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS | 69 |
| 10. ANEXOS | |

LISTA DE ABREVIATURAS

- JNC: Junta Nacional de Café
- MINAGRI: Ministerio de Agricultura y Riego
- VRAEM: Valle de los ríos Apurímac, Ene y Mantaro
- OIC : Organización Internacional del Café
- PBI: Producto Bruto Interno
- PICR : Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial
- msnm: Metros sobre el nivel del mar
- L: Litro
- mL: Mililitro
- μ L: Microlitro
- kg: Kilogramos
- mg: Miligramos
- μ g: Microgramo
- mm: Milímetros
- UFC: Unidades Formadoras de Colonia
- v/v: Volumen sobre Volumen
- AAC: Agar Almidón Caseína
- APD: Agar Papa Dextrosa
- AN : Agar Nutricio
- SIM: Sulfuro Indol para Movilidad.
- ANOVA: Análisis de Varianza
- NCBI: National Center for Biotechnology Information
- EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
- PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
- rpm : Revolución por minuto

LISTA DE TABLAS

| | Pág. |
|---|-------------|
| Tabla 1. Coordenadas geográficas de los lugares de muestreo. | 20 |
| Tabla 2. Cepas de <i>Bacillus</i> spp, y <i>Trichoderma</i> spp. aisladas de la rizósfera de <i>Coffe arábica</i> . | 32 |
| Tabla 3. Porcentaje de inhibición y tasa de crecimiento micelial del aislamiento de <i>Fusarium oxysporum</i> por la actividad antagonista de <i>Bacillus</i> spp al décimo día de enfrentamiento. | 33 |
| Tabla 4. Porcentaje de inhibición y tasa de crecimiento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i> , por las cepas de <i>Trichoderma</i> spp al séptimo día de enfrentamiento dual. | 37 |
| Tabla 5. Interacción entre de cepas de <i>Trichoderma</i> spp y <i>Fusarium oxysporum</i> | 41 |
| Tabla 6. Características morfológicas de colonias de cepas de <i>Bacillus</i> spp con actividad antagonista. | 46 |
| Tabla 7. Interacción entre de cepas de <i>Trichoderma</i> spp y <i>Fusarium oxysporum</i> | 49 |
| Tabla 8. Características morfológicas de colonias de cepas de <i>Bacillus</i> con actividad antagonista. | 50 |
| Tabla 9. Resultados de la identificación molecular de las cepas M3PI .I, B1T, PLS01 y <i>Fusarium oxysporum</i> | 54 |
| Tabla 10. Análisis de varianza (ANOVA) para el porcentaje de inhibición de <i>Fusarium oxysporum</i> frente a cepas de <i>Trichoderma</i> spp. | 55 |
| Tabla 11. Resultados de la prueba de comparaciones múltiples de medias de Tukey. | 56 |
| Tabla 12. Resultados de análisis de varianza (ANOVA) de la variable crecimiento de <i>Fusarium oxysporum</i> frente a <i>Bacillus</i> . | 57 |
| Tabla 13. Resultados de la prueba de comparaciones múltiples de medias de Tukey | 57 |

LISTA DE FIGURAS

| | Pág. |
|--|------|
| Figura 1. Fenología del cafeto | 5 |
| Figura 2. Composición de la cereza de café | 6 |
| Figura 3. Evolución de la producción de café en el Perú (1999-2016) | 8 |
| Figura 4. Síntomas de la marchitez causados por <i>Fusarium oxysporum</i> . | 12 |
| Figura 5. Características macroscópicas, micelio aéreo de <i>Fusarium oxysporum</i> en agar APD. | 31 |
| Figura 6. Medida de radios de crecimiento de <i>Fusarium oxysporum</i> frente a las cepas de <i>Bacillus</i> antagonistas en pruebas “ <i>in vitro</i> ” a los 5, 7 y 10 días. T1: MT1.I, T2: MT1.II, T3: MT2.I, T4: MT2.II, T5: MT3.P3, T6:MT7, CP: Testigo (<i>Fusarium oxysporum</i>). | 34 |
| Figura 7. Porcentaje de inhibición micelial en cultivos duales de <i>Fusarium oxysporum</i> con cepas antagonista de <i>Bacillus</i> spp s a los 7,5 y 10 días T1: MT1.I, T2: MT1.II, T3: MT2.I, T4: MT2.II, T5: MT3.P3, T6:MT7, CP: Testigo (<i>Fusarium oxysporum</i>). | 35 |
| Figura 8. Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i> de cepas de <i>Bacillus</i> spp frente a <i>Fusarium oxysporum</i> (FUS) a los 10 días de enfrentamiento. A: Cepa MT1.II+ Fus, B: Cepa MT3.P3+ Fus, C: Cepa MT7.III+ Fus, D: Cepa MT1.I +Fus. E: MT2.II+Fus F: MT2.I +Fus. G: Cepa de <i>Fusarium oxysporum</i> sin enfrentamiento. | 36 |
| Figura 9. Medida de radios de crecimiento de <i>Fusarium oxysporum</i> en presencia de las cepas antagonistas de <i>Trichoderma</i> en prueba “ <i>in vitro</i> ” a los 3, 5 y 7 días de evaluación. T1: M3PI.I I, T2: MT5.A, T3: MT14.E, T4: MT12.A, T5: TL7.R, T6: MT24.1, T7: B1-T, T8: PLSO1, T9: MTS.1CP: Testigo (<i>Fusarium oxysporum</i>). | 38 |
| Figura 10. Porcentaje de inhibición del fitopatógeno <i>Fusarium oxysporum</i> por cepas antagonistas de <i>Trichoderma</i> en pruebas “ <i>in vitro</i> ” a los 3 ,5 y 7 días T1: M3PI.I I, T2: MT5.A, T3: MT14.E, T4: MT12.A, T5: TL7.R, T6: MT24.1, T7: B1-T, T8: PLSO1, T9: MTS.1 CP: Testigo (<i>Fusarium oxysporum</i>). | 39 |

| | |
|--|----|
| Figura 11. Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i> de cepas de <i>Trichoderma</i> spp frente a <i>Fusarium oxysporum</i> a los 7 días de enfrentamiento. A: Cepa TL7.R, B: Cepa MT3.P3, C: Cepa MT14.E, D: Cepa M3PI.I, E: Cepa MT24.I, F: Cepa MT12, A, G: Cepa MT5.A, H: Cepa PIMO.I. | 40 |
| Figura 12. Interacción entre de cepas de <i>Trichoderma</i> spp y <i>Fusarium oxysporum</i> . A: control, B: <i>Trichoderma</i> sobrecrece a <i>F. oxysporum</i> , C: <i>Trichoderma</i> sp y <i>F.oxysporum</i> se inhiben mutuamente D: <i>Trichoderma</i> sp rodea al micelio de <i>F. oxysporum</i> . | 41 |
| Figura 13. Morfología de las colonias de cepas de <i>Bacillus</i> en medio Agar nutriticio. A: MT3.P3, B: MT2.II, C: MT7.III, D: MT1.II, E: MTI.I F: MT2.1. | 42 |
| Figura 14. Morfología microscópicas de cepas de <i>Bacillus</i> con actividad antagonista, las 6 cepas muestran tinción gran positiva. A: MT2.I, B: MT1.II, C: MT3.P3, D: MT1.I, E: MT2.II, F: MT7.III. Aumento: 100X. | 43 |
| Figura 15. A: Actividad proteolítica (positiva) de las 6 cepas de <i>Bacillus</i> en medio con Agar leche, B: Actividad amilolítica (positiva) de las 6 cepas de <i>Bacillus</i> en medio con Agar Almidón revelada con lugol, C: Actividad de gelatinasa (positiva) 6 cepas de <i>Bacillus</i> en Medio Frazier. 1: MT2.I, 2: MT1.I, 3: MT1.II 4: MT3.P3, 5: MT2.II, 6: MT7.III. | 44 |
| Figura 16. Diferenciación de especies de <i>Bacillus</i> en medio Hicrome Bacillus. A: MT2.I, B: MT1.I, C: MT1.II D: MT3.P3, E: MT2.II, F: MT7.III. | 45 |
| Figura 17. Prueba de asimilación de citrato para las cepas de <i>Bacillus</i> , las cepas A: MT1.I, B: MT2.I, C: MT2.II y F: MT7.II muestran citratos positivos; C: MT1.II, D: MT3.P3 son citrato negativo. | 46 |
| Figura 18. Prueba de asimilación y utilización de carbohidratos. | 46 |
| Figura 19. . Crecimiento de cepas de <i>Bacillus</i> en concentración de NaCl al 5% (A). Crecimiento de cepas de <i>Bacillus</i> en concentración de NaCl al 7 % (B). Crecimiento de cepas de <i>Bacillus</i> en concentración de NaCl al 10% (C). | 48 |
| Figura 20. Morfología colonial de las 9 Cepas de <i>Trichoderma</i> sp con actividad | 51 |

antagonista a los 7 días de crecimiento A: M3PI.I, B: B1.T, C: MTS.I, D: MT5.A,
E: MT12.A, F: PLS01, G: TL7.R, H: MT24.I, F: MT14.e.

Figura 21. Crecimiento Radial de cada cepa de *Trichoderma* spp durante 5 días en Agar APD. 52

Figura 22. Características microscópicas de las cepas nativas de *Trichoderma* a un aumento de 10x y 40X. con tinción azul de lactofenol A: MT12, B: TL7R, C: MT5.A, D: MT14.e, F: B1T, G: M3PI.I 53

Figura 23. Electroforesis de fragmentos amplificados por PCR de los genes región ITS 1 e ITS 4 de cepas M3PI.I, B1T, PLS01, MT1.F de rizósfera de cafeto. 54

RESUMEN

El café (*Coffea arábica*, L.) es uno de los principales productos de la canasta agroexportadora peruana, hecho que ha contribuido con el desarrollo económico y social del Perú. Sin embargo este se ve afectado por enfermedades fúngicas como la pudrición vascular causado por *Fusarium oxysporum*, reduciendo el sistema radicular en más de 90% afectando la producción y calidad.

El presente trabajo tiene como objetivo aislar cepas nativas de *Bacillus* y *Trichoderma* de rizósfera de café con capacidad antagonista frente a *Fusarium oxysporum* que puedan utilizarse en programa de Manejo Integrado de Plagas del Café, en el Distrito de Monzón- Región Huánuco.

Se logró aislar 30 cepas de *Bacillus* ssp. y 20 cepas de *Trichoderma* spp las mismas que fueron evaluadas por su capacidad antagonista frente al patógeno *F. oxysporum*, siguiendo la metodología de enfrentamiento directo dual en el medio Agar Papa Dextrosa . Se realizó pruebas bioquímicas, caracterización macroscópica y microscópica a las cepas con actividad antagonista y se identificó por claves taxonómicas. Las 9 cepas de *Trichoderma*: (M3PI.I, B1.T, MTS.I, MT5.A, MT12.A, PLSO1, TL7.R, MT24.I, MT14.e) y 6 cepas de *Bacillus*: (MT1.I, MT1.II, MT2.I, MT2.II, MT7, MT3P3) con actividad antagonista; siendo la cepa M3PI.I la que alcanzo 80 % de actividad de inhibición del fitopatogeno. Las cepas con mayor actividad antagonista (MT3P3, B1.T, MTS.I) fueron identificadas molecularmente como *Trichoderma* sp, *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma* sp respectivamente. Las cepas aisladas de *Bacillus* sp y *Trichoderma* sp, podrían consideradas como potenciales biocontroladores de pudrición vascular en café representando una nueva vía de trabajo en pro de una agricultura sostenible.

Palabras clave: Café, control biológico, *Bacillus* spp, *Trichoderma* spp, *Fusarium oxysporum*

ABSTRACT

Coffee (*Coffea arábica*, L.) is one of the main products of the Peruvian agro-export basket, a fact that has contributed to the economic and social development of Peru. However, this has been affected by fungal diseases such as vascular nutrition by *Fusarium oxysporum*, reducing the root system by more than 90%, affecting production and quality.

The objective of this work is to isolate the native *Bacillus* and *Trichoderma* strains of rhizosphere of coffee with antagonistic capacity against a *Fusarium oxysporum* that can be found in an Integrated Coffee Pest Management program in the Monzón-Huánuco Region.

The antagonist capacity of 30 strains of *Bacillus* spp. and 20 strains of *Trichoderma* spp against *F. oxysporum*, following the methodology of dual direct confrontation in PDA medium, where the radius of growth of the colony and the percentage of inhibition are evaluated. Biochemical tests, morphological and microscopic characterization of the strains with antagonistic activity were performed and identified for taxonomic keys. The 9 strains of *Trichoderma*: M3PI.I, B1.T, MTS.I, MT5.A, MT12.A, PLSO1, TL7.R, MT24.I, MT14.ey 6 strains of *Bacillus*: MT1.I, MT1. II, MT2.I, MT2.II, MT7, MT3P3 were found to have antagonistic activity. Being the M3PI.I strain I achieved greater antagonistic activity with 80%. The strains with greater antagonist activity MT3P3, B1.T, MTS.I were identified molecularly as *Trichoderma* sp, *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma* sp respectively. The strains of *Bacillus* sp and *Trichoderma* sp, are considered as biocontrollers of vascular rot in coffee to represent a new way of working towards sustainable agriculture.

Keyeords: Coffee, Biologic control, *Bacillus* spp, *Trichoderma* spp, *Fusarium oxysporu*

INTRODUCCION

El café (*Coffea arabica*, L.) es uno de los principales productos agrícolas de exportación en el Perú, existiendo alrededor de un millón de familias involucradas que producen 5×10^6 quintales y exportan con generación de divisas de 2 714 millones de dólares, se calcula asimismo que existen más de 1.8 millones de hectáreas de producción, en 210 distritos rurales ubicados en 47 provincias de 10 departamentos de un total de veinticuatro que conforman el Perú (Junta Nacional del café, 2015).

La producción de café se ve afectada en su rendimiento y calidad final de producción debido al ataque de una diversidad de organismos fitopatógenos fundamentalmente hongos y bacterias siendo los primeros el grupo principal de agentes causales de enfermedades en plantas, debido a su diversidad como por las pérdidas que originan a nivel económico (Benítez *et al.*, 1998).

Uno de los fitopatógenos que viene afectando las plantaciones de cafeto ocasionando pérdidas económicas es el hongo ***Fusarium oxysporium***, provocando fusariosis o marchitez vascular (Gonsalvez & Ferreira, 2001). Este hongo afecta en las distintas etapas del cafeto, en etapa de germinación es uno de los agentes causales del mal del almácigo "damping off" (volcamiento), y en etapa de producción provoca pudrición vascular, pudiendo reducir el sistema radicular de las plantas en más de 90%, afectando la producción y la calidad del cafeto hasta en un 55% en vivero (Craft *et al.*, 1996 ; Mora, 2001).

La Fusariosis del cafeto "Root rot", produce una desintegración o pudrición de parte o todo el sistema radicular de la planta (Agrios, 1988), causando obstrucción de los vasos que permiten la circulación vegetal. Esta ha sido reportada en

semilleros y viveros de café causando daño irreversible que puede ocasionar pérdidas de plantas hasta el 50% (Procafe, 1997).

La persistencia de varias especies de hongos fitopatógenos tales como *Fusarium*, *Phytophthora*, *Botrytis*, *Sclerotinia* y *Rhizoctonia* ha aumentado durante los últimos años debido a los cambios que se han presentado en las prácticas agrícolas, principalmente por el uso excesivo de compuestos químicos, por la contaminación que ocasiona su empleo, con efectos perjudiciales como la emergencia de patógenos resistentes a fungicidas, desaparición de microorganismos benéficos y deterioro en la salud de productores y consumidores (Pérez, 2004).

El control de plagas y las enfermedades fitopatógenos son uno de los aspectos más importantes en la producción agrícola, es por ello que el empleo de agentes de control biológico en los últimos años constituye una alternativa eficiente y ecológica, permitiendo una reducción en la aplicación de fungicidas químicos y por lo tanto un control más eficiente de fitopatógenos causantes de enfermedades, minimizando el impacto sobre el medio ambiente y pérdidas económicas al ser incorporados a los programas de manejo integrado de plagas. En este sentido, una estrategia promisorio es la utilización de microorganismos antagonistas de fitopatógenos que desplazan a estos de una manera natural denominada control biológico (Benítez *et al.*, 2004).

El género *Trichoderma* es el antagonista más utilizado para el control de hongos fitopatógenos, debido a su ubicuidad, a su facilidad para ser aislados y cultivados, a su crecimiento rápido en un gran número de sustratos y sobre todo que no atacan a plantas superiores (Pavizas *et al.*, 1982). Estos actúan como hiperparásitos competitivos que producen metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas. En recientes investigaciones han demostrado que los hongos del

género *Trichoderma* son agentes efectivos de control biológico contra hongos fitopatógenos como *Rhizoctonia solani* Kuhn (Rincón *et al.*, 1992), *Fusarium oxysporum* (Datnoff Le *et al.*, 1995), entre otros.

El género *Bacillus* tiene la capacidad de producir auxinas y sustancias antagónicas contra diversos hongos fitopatógenos (Wipps *et al.*, 2001), este género presenta características como las endosporas que le confiere resistencia a la desecación y al calor, es por eso que es un candidato ideal para formular productos estables y utilización en la biotecnología agrícola (Liu *et al.*, 2006).

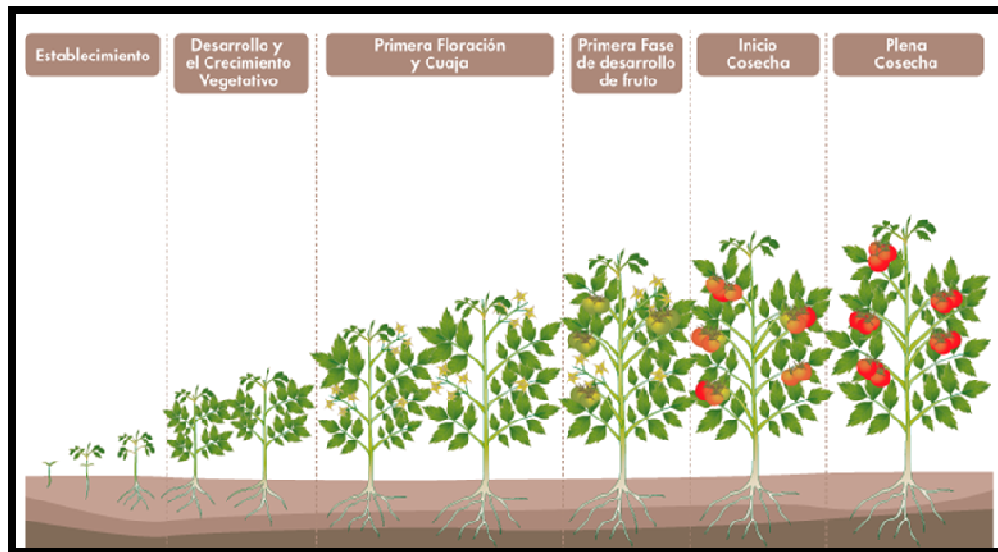
Es por ello que se planteó esta investigación con el fin de obtener agentes biológicos como antagonistas activos para el control de *Fusarium oxysporum* y otros hongos fitopatógenos que pueden ser una alternativa para reducir pérdidas en la caficultura nacional. Esta tesis contribuye al desarrollo de una agricultura sostenible, empleando microorganismos nativos como las cepas de *Bacillus* spp y *Trichoderma* spp que constituyen potenciales antagonistas ante este fitopatógeno, representando una nueva vía de trabajo en pro de una agricultura más sostenible y eficiente claramente beneficiosa para la sociedad y los productores agrícolas de café.

2. MARCO TEORICO

2.1. Generalidades del café (*Coffea arabica*)

El café fue introducido por los inmigrantes europeos, que se instalaron en la selva central (Junín y Cerro de Pasco), posteriormente su cultivo se extendió por todo el país, debido a la existencia de microclimas, suelos y alturas que el Perú cuenta con excelentes condiciones para producir café. Se cultiva entre los 800 - 2000 m.s.n.m. Durante los últimos años la caficultura se ha posicionado como la principal actividad agrícola lícita en los valles de la selva del país, los mayores rendimientos se obtienen en departamentos como Amazonas, San Martín y Cajamarca, donde el café se posesiona como el cultivo alternativo más importante frente a la coca, constituyéndose en su mayoría como el principal sustento económico de las familias (Agrobanco, 2007).

El café que se produce en Perú es de especie arábica, entre las variedades que se cultivan tenemos a Típica, Caturra, Catimores y Borbón. Es importante conocer la fenología del cafeto (Figura 1) para poder saber el tiempo de aplicación de cualquier biocontrolador o biofertilizante y hacer un correcto cuidado del cafeto. En concordancia con las tendencias actuales, algunos grupos de agricultores se han especializado y trabajan en café orgánico y otros cafés especiales, reconocidos por su perfil y características peculiares como su calidad de taza, acidez y sabor balanceado que se ajusta muy bien a los microclimas, la temperatura y la estricta altura. Por otra parte la mayor parte de la producción del café peruano se destina a la exportación, ya que sólo entre el 6 y el 10% de ésta se consume en el mercado interno (Ávila *et al* .,2007).



Fuente: Ministerio de Agricultura, 2003

Figura 1. Fenología del café.

Morfología del café

Se le conoce como cafeto o planta productora de café a un arbusto que crece en la región tropical, perteneciente a la familia de las rubiáceas. Abarca 500 géneros y 8.000 especies. Uno de esos géneros es el *Coffea*, que lo constituyen árboles, arbustos, y bejucos, y comprende unas 10 especies civilizadas, es decir, cultivadas por el hombre y 50 especies silvestres (Centeno, 2016).

Los granos de café o semillas están contenidos en el fruto del arbusto (Figura. 2), los cuales en estado de madurez toman un color rojizo y se les denomina "cereza". Cada una de ellas consiste en una piel exterior que envuelve una pulpa dulce. El fruto del cafeto cuyas semillas tostadas y molidas se utilizan para el consumo humano, está compuesto de cinco partes de afuera hacia dentro, que son: la pulpa, el mucílago, una cubierta dura denominada pergamino o cáscara, una cubierta más delgada llamada película y finalmente el grano o almendra que es la parte del fruto, que una vez tostada y molida se utiliza para la producción de la bebida del café.

El cafeto tiene una raíz principal que penetra verticalmente en suelos sin limitaciones físicas, hasta profundidades de 50 centímetros. De esta raíz salen otras raíces gruesas que se extienden horizontalmente y sirven de soporte a las raíces delgadas o absorbentes, llamadas también raicillas. El tallo o tronco y las ramas primarias forman el esqueleto del cafeto (Arcila *et al.*, 2004).

Las flores del cafeto son pequeñas, tubulosas y blancas independiente de la densidad de siembra, una flor de café posee los cuatro tipos de estructuras que caracterizan a una flor completa y perfecta: dos estructuras estériles que son el cáliz y la corola, y dos estructuras fértiles que son los carpelos y los estambres (Arcila *et al.*, 2004). En las ramas, un par de hojas aparece cada 15 ó 20 días aproximadamente, las hojas duran en un cafetal alrededor de un año. La duración de las hojas se reduce con la sequía, con las altas temperaturas y con una mala nutrición (Rincon *et al.*, 1992).

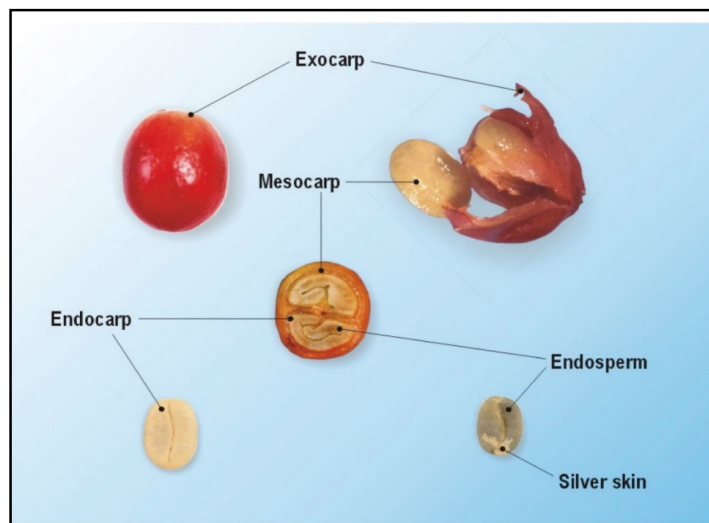


Figura 2. Composición de la cereza de café. Fuente: SCAA, 2014.

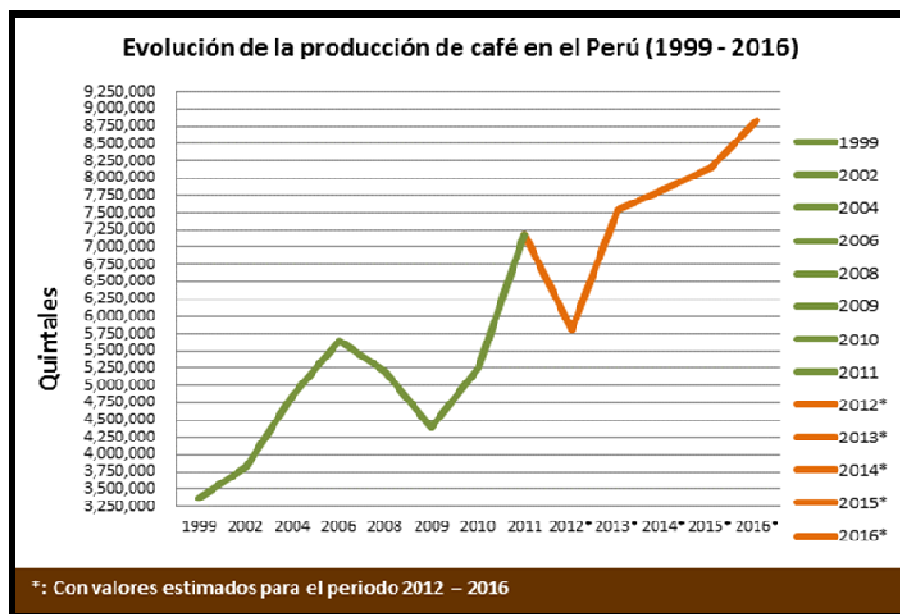
2.1.1. Producción y exportación de café en el Perú

El café es el principal producto agrícola de exportación, siendo de suma importancia en la economía nacional, su producción directa genera 54 millones de jornales al año, a los que se suman 5 millones de jornales generados por los servicios de comercio, industria y transporte, que participan en la cadena productiva del café, mostrando una tendencia de crecimiento en cuanto a volumen de producción y exportación. El Perú participa en el mercado mundial del café con el 3% de la producción, con un valor de exportación que supera los US\$ 1,500 millones. La gran importancia económica y social del cafeto, sirve de sustento a 223 mil familias de pequeños productores, distribuidas en 338 distritos rurales, 68 provincias y 17 regiones (Junta Nacional del Café, 2015).

La producción de café en el país (Fig. 3) se concentra en los departamentos de Junín, Cajamarca, San Martín, Amazonas, Cusco. Cabe destacar que en estos departamentos concentran el 90.43% de la producción nacional, teniendo el resto del país una participación de 9.57%. La región con mayor superficie cosechada es Junín con 89,351 hectáreas (Ministerio de Agricultura y Riego, 2013). El Perú es hoy en día, es un referente a nivel mundial de cafés especiales, siendo el segundo productor y exportador de café orgánico a nivel mundial, además de ser el principal abastecedor de EE.UU. de café especial bajo el sello de Fair Trade (Comercio Justo), abarcando el 25% de este mercado (Agrobanco, 2008).

A nivel de exportación Alemania, EE.UU, Holanda, Bélgica y Francia son los cinco países donde se exporta el 74 % de café peruano. Sus compradores son medianos y grandes tostadores, cada vez más interesados en nuestro producto, que se viene distinguiendo por la calidad de taza (aroma, cuerpo y sabor), similar y hasta mejor que la de los cafés centroamericanos. Los factores ambientales (microclimas y altitud de

plantaciones) y un mejor manejo de pos cosecha han sido determinantes para lograr la confianza del mercado (Agrobanco, 2008).



Fuente: MINAGRI 2015. www.minagri.gob.pe

Figura 3. Evolución de la producción de café en el Perú (1999-2016).

2.2. Cultivo de café (*Coffea arabica*)

Coffea arabica fue descrito por primera vez por Linneo en 1753. Las variedades más conocidas son: Típica y Bourbon, pero a partir de éstas se han desarrollado muchas cepas y cultivos diferentes, como son el Caturra (Brasil, Colombia), el Mundo Novo (Brasil), el Tico (América Central), el San Ramón enano y el Jamaican Blue Mountain. El café arábica se cultiva en toda Latinoamérica, en África Central y Oriental, en la India y un poco en Indonesia (Convenio internacional de café, 2013).

El café es un cultivo permanente, producido por el árbol del cafeto. Estos arbustos requieren una temperatura elevada entre (20° a 25° C) y una humedad atmosférica importante. Es una planta de semisombra, que hay que proteger de los vientos y de las temperaturas bajas.

La primera cosecha de un árbol de café se produce alrededor de los 2 años, tomando hasta 2 o 3 años más que el árbol alcance su nivel óptimo de producción. Los árboles pueden producir frutos de calidad hasta 20 años, posteriormente la calidad del fruto declinará. La cosecha de café es altamente intensiva en mano de obra, porque crece en zonas montañosas y porque en las mismas ramas de un árbol maduro hay capullos, frutos verdes, amarillos y maduros floreciendo todos al mismo tiempo (Anamuro, 2015).

2.2.1. Especies y Variedades

Las dos especies más importantes de café desde el punto de vista económico son el *Coffea arabica* (Café Arábica) – que abarca más del 60% de la producción mundial – y el *Coffea canephora* (Café Robusta). Los cafés del Perú son de la especie *C. arabica*, que se comercializa bajo la categoría "otros suaves". Las variedades que se cultivan son principalmente Typica, Caturra, Catimor y Bourbon (World Coffee Research, 2016).

2.2.2. Condiciones agroclimáticas

El clima de las áreas donde se cultiva café es variable según las zonas cafetaleras, debido a la combinación de diversos factores; entre los cuales tenemos, altitud, nubosidad, precipitación, radiación solar, etc. Los factores climáticos considerados como los más determinantes para un buen desarrollo de las plantaciones de café son la temperatura y la precipitación. Las temperaturas medias exigidas para un mejor crecimiento y desarrollo de las variedades de café cultivado, están en el rango de 18 a 22 °C, este factor climático incide en el desarrollo fenológico del cultivo. Las plantaciones ubicadas en zonas con temperaturas medias máximas y mínimas que están por encima y debajo del rango indicado, probablemente se vean influenciadas su crecimiento vegetativo, floración y desarrollo del fruto (Ministerio de Agricultura y Riego, 2003).

El comportamiento de la precipitación redonda su importancia por ser la fuente de abastecimiento de agua para la humedad del suelo. Es importante que las precipitaciones tengan una buena distribución para satisfacer los requerimientos de agua de la planta en las etapas de floración, llenado de grano y cosecha. La cantidad requerida por el café para un buen crecimiento y desarrollo es de 1,600 a 1,800 mm/año. Las zonas cafetaleras que presentan estas características de precipitación son Valle de los ríos Apurímac, Ene y Mantaro, Quillabamba, Villa Rica, Oxapampa, Lamas y Tocache. Las zonas con una precipitación menor a 1600 mm/año se ven afectadas en el rendimiento y en la calidad del producto. Es importante mencionar que ha existido una variación del clima en estos últimos años, marcada por una variabilidad de temperaturas y lluvias. Se han observado, por ejemplo, temperaturas elevadas debido a veranos prolongados y lluvias en épocas no adecuadas (Ministerio de Agricultura y Riego, 2003).

2.2.3. Problemática en el cultivo de café

La caída en la productividad del café, se debe principalmente a tres factores: enfermedades fitopatógenos, envejecimiento de los cafetos e impactos climáticos.

Las enfermedades fitopatógenos ocurren a través de la semilla, las plántulas o ser parte de lo que ya existe en el campo y se manifiestan de manera cíclica, ocasionando pérdidas del 10 al 50% de la producción, con fuertes impactos negativos en la baja calidad del grano, pérdida del rendimiento, incremento en el uso de plaguicidas tóxicos, y aumento de los costos de sanidad del cultivo (Junta Nacional del Café, 2015)

Otros tipos de enfermedades son causadas por agentes adversos del ambiente, que pueden ser condiciones extremas o sub-óptimas de temperatura, humedad, luz, nutrición etc. Éstas a la vez, pueden presentarse en situaciones complejas y que favorezcan algunos patógenos secundarios, es necesario indicar que, para que pueda

darse una enfermedad, es necesario que exista un material de café susceptible, el agente causal y las condiciones ambientales favorables (Benítez *et al.*, 2000).

La antigüedad de los cafetales peruanos es de 30 y 40 años, cuando lo usual es que solo llegue a 20 años, es por ello que esta situación viene afectando la calidad del café, es importante mencionar que en toda la fase de producción-comercialización existen muchos intermediarios. Además, en la mayoría de los casos, el productor primario no es quién da el valor agregado a su producción, sino que se han desarrollado mercados secundarios para las distintas fases de su comercialización como pueden ser secado, lavado, tostado, envazado, distribución y exposición en punto de venta (Ministerio de Agricultura y Riego, 2003).

Otra de las dificultades en la producción de café, ha sido mantener adecuados niveles de rendimientos, es decir alcanzar una adecuada productividad. El incremento en la producción de café, ha ido acompañado del incremento en el número de hectáreas trabajadas, en tanto el nivel de productividad por hectárea no alcanza, en promedio, los estándares internacionales. Los factores medio ambientales afectan tanto la calidad como la productividad del café.

2.3. Enfermedades fitopatógenos del café

2.3.1. Pudrición vascular en café

La marchitez vascular producida por *Fusarium oxysporum*, es una enfermedad de gran importancia (Hartman & Fletcher, 1991), ya que causa pudrición radical y lesiones necróticas extensivas en el cuello y base del tallo, marchitez y muerte. Las lesiones necróticas con frecuencia ascienden hasta 30 cm a partir del cuello de la planta, las cuales mueren generalmente al inicio de la maduración de los frutos, causando la pérdida total de la producción (Jarvis, 1988). Debido a que no se permite que llegue agua a la parte aérea de la planta se observan síntomas de marchitez. Los síntomas

comienzan con un amarillento de las hojas más viejas, color que luego se extiende a todas las hojas. Este amarillamiento aparece de un solo lado de la hoja o rama. Las hojas afectadas se marchitan y mueren, aunque permanezcan adheridas al tallo. Para la determinación de marchitez vascular, se realiza cortes diagonales de una rama afectada y se observa si hay una decoloración marrón en la parte interna del tallo (Fig.4), lo cual es un síntoma diagnóstico de la presencia de este hongo (Ortiz, 2012).



Fuente: Elliott, 2010

Figura 4. Síntomas de la marchitez causados por *Fusarium oxysporum* Corte transversal (C) y longitudinal (D) del tallo mostrando necrosis del tejido vascular (xilema).

2.3.2. *Fusarium oxysporum*

El género *Fusarium* sp. es un patógeno distribuido ampliamente a nivel mundial (en más 32 países) y afecta a más de 80 cultivos de café de importancia comercial.

Fusarium oxysporum es una especie de hongo causante de la pudrición vascular en café y se caracteriza por ubicarse en el tejido xilemático de las plantas, coloniza los conductos xilemáticos de la planta, bloqueando y tapando los vasos, lo que determina la aparición de síntomas de marchitamiento de hoja, amarilleo y eventualmente necrosis y muerte total de la planta (Rico *et al.*, 2001).

Existen diversas especies del género *Fusarium*, sin embargo las más relevantes para los cultivos de son *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani*. Morfológicamente las

colonias de *Fusarium* en medio PDA varían a medida que el cultivo envejece, así, en los cultivos jóvenes una tonalidad rosa pálida, y los más envejecidos con una coloración púrpura. A nivel microscópico se observa microconidias con su forma redonda típica, constituidas por una o dos células; y, las macroconidias en forma de media luna, integradas por tres a cinco células (Agrios, 1998)

2.3.3. Epidemiología

El hongo puede estar en la semilla y en los suelos. En el caso del suelo pueden sobrevivir en forma de clamidosporas por más de 10 años, dependiendo del clima, el hongo puede ser diseminado a largas distancias en el suelo adherido a la maquinaria agrícola, partes de plantas infectadas y en el agua de riego. La enfermedad es favorecida por temperaturas entre 25 y 32 °C y humedad alta del suelo (Manzo, 2013).

Las clamidosporas de *Fusarium*, germinan y penetran a través de las heridas que se forman al emerger las raíces laterales o penetran directamente al tejido joven en la zona de elongación. El micelio avanza intercelularmente y alcanza la región del xilema. El hongo se desarrolla en las traqueidas, vasos y las células parenquimatosas.

El micelio se ramifica y produce microconidias, las cuales se desprenden y son arrastradas hacia arriba por la corriente de savia, vuelven a germinar, producen más micelio y microconidias (Manzo, 2013)

El hongo patógeno excreta enzimas pectolíticas que destruyen la lámina del parénquima del xilema. Las células parenquimatosas mueren y se tornan de color café, lo cual se observa como un anillo cuando se corta el tallo transversalmente (Figura. 4). El hongo excreta toxinas, como la lycomarasmina que causa necrosis en las nervaduras de las hojas. Una segunda toxina es el ácido fusárico que además de marchitez produce manchas acuosas en las hojas y coloración café en el tejido vascular. Ambas toxinas fijan metales pesados como el fierro y el cobre, lo cual afecta

la permeabilidad de las membranas celulares e inhibe las reacciones enzimáticas. El efecto combinado de las toxinas, el taponamiento por el hongo, la formación de tilosis y el taponamiento por el gel formado por la mezcla de los productos pectolíticos degradados y los contenidos celulares, probablemente contribuyan al marchitamiento de plantas afectadas por el patógeno (Dita *et al*, 2013).

2.4. Control Biológico

Consiste en el empleo o utilización de enemigos naturales como patógenos, depredadores y parasitoides, con el propósito de mantener las poblaciones. Su objetivo es la reducción de la intensidad o las actividades productoras de enfermedades de un patógeno o parásito, lograda mediante la manipulación del ambiente, del hospedero o de los antagonistas del patógeno o plaga que se quiere controlar. La mayoría de hongos fitopatógenos tienen antagonistas biológicos o enemigos naturales que se pueden emplear como estrategia de lucha en un programa de control biológico. Aunque el control biológico no pretende reemplazar completamente los sistemas de control químico, puede ser utilizado junto con otras técnicas de control como parte de un manejo integrado de plagas (IPM) (Rubio & Ferreres, 2005).

2.4.1. Microorganismos antagonistas empleados en control biológico

Los microorganismos antagonistas (bacterias, levaduras y hongos), tienen la capacidad de ejercer un efecto de biocontrol sobre diferentes fitopatógenos de interés agrícola, por ello son empleados para controlar diversas enfermedades en frutos y vegetales (De Costa, 2005).

Los microorganismos que son usados como antagonistas deben cumplir con las siguientes características: a) capacidad para colonizar rápidamente la superficie de la

planta y de persistir en ellas de manera efectiva, b) mayor habilidad que el patógeno para adquirir los nutrientes, y c) capacidad de sobrevivencia bajo diferentes condiciones ambientales (Wisniewski & Wilson, 1992). Por otra parte, se deben considerar otras características específicas del microorganismo antagonista, siendo las más importantes: su estabilidad genética, efectividad a bajas concentraciones, no exigente en requerimientos nutricionales, capacidad de sobrevivir a las condiciones adversas del medio ambiente, efectividad para un amplio rango de microorganismos patógenos en una variedad de plantas, capacidad de reproducirse en medios de crecimiento económicos, que se mantenga en una formulación durante un largo período de vida, que sea fácil de aplicar sin producción de metabolitos secundarios que causen daños a la salud humana, resistente a los fungicidas y compatible con los procedimientos comerciales y no patogénico sobre el hospedero (Wilson & Wisniewski, 1989).

Es importante comprender el mecanismo de acción de los antagonistas para un mejor uso de los mismos, y para la selección de nuevos antagonistas efectivos. Hasta ahora, los conocimientos sobre los mecanismos de acción involucran: la antibiosis, producción de enzimas líticas, parasitismo, competencia por los nutrientes y espacio e inducción de resistencia. Cabe destacar que en general más de un mecanismo puede estar implicado en el efecto de biocontrol (Janisiewicz & Korsten, 2002).

2.5. Mecanismos de acción de microorganismos antagonistas

2.5.1. Competencia por nutrientes y espacio

La competencia surge cuando al menos dos organismos requieren la misma cosa y el uso por uno reduce la cantidad disponible para el otro. La competencia puede ser por los sitios de infección, donde la ocupación de dichos sitios por un microorganismo impide la colonización por otro o bien por determinados nutrientes. En la competencia por nutrientes o bien un microorganismo posee un mecanismo de absorción mejor o

posee enzimas extracelulares más activos, de forma que uno obtiene más nutrientes y crece, mientras que el otro no obtiene nutrientes suficientes para crecer (Eziyyani, 2006).

2.5.2. Antibiosis

Este es un mecanismo por el cual un organismo con capacidad antagonista inhibe a otro microorganismo a través de enzimas líticas o metabolitos, los cuales dañan los polímeros estructurales produciendo un efecto adverso en una etapa de su desarrollo, afectar el crecimiento de las células, actividad metabólica y diferenciación.

Generalmente los antibióticos existen en ambientes naturales y que son activos y que pueden ser usados en control biológico de plagas (Rubio & Fereres, 2005).

2.5.3. Micoparasitismo

El micoparasitismo es definido como el uso del patógeno como alimento por su antagonista, en el que generalmente están implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasas, celulasas y glucanasas y proteasas que lisan o digieren la pared celular de los hongos patógenos. Las hifas del micoparásito se enrollan alrededor del hospedador y en determinados puntos penetran en él atravesando la pared y membrana celulares, en otros casos el micoparásito se enrolla alrededor del hospedador y produce su muerte sin haber evidencia de que agujeree la pared celular (Rubio & Fereres, 2005).

2.6. Género *Bacillus*

El género *Bacillus* pertenece a la familia Bacillaceae, es un género que hoy en día incluye más de 60 especies de bacilos, una de sus principales cualidades de este género por la cual son muy estudiados, es su potencial capacidad para producir antibióticos, pudiendo servir como antifúngicos, para proteger a plantas de enfermedades producidas por hongos (Hernández *et al.*, 2004) . Son Gram positivos,

quimiheterotrofos, movilidad flagelar por flagelos insertados en forma períttrica. Son anaerobios o aerobios facultativos, catalasa positiva. Las células bacterianas de este género tienen un amplio tamaño que varía 0,5 a 2,5 μm x 1,2-10 μm , son formadores de endosporas lo que le permite ser resistente a los efectos letales del calor, sequedad, congelación, radiación y químicos tóxicos. Este género se encuentra comúnmente en suelos y plantas donde tienen un papel importante en ciclo del carbono y el nitrógeno (Koneman, 2001).

Entre las especies más representativas del genero *Bacillus* de importancia para el control de enfermedades fitopatógenos se encuentran *B. alkalophilus*, *B. anthracis*, *B. azotoformans*, *B. brevis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. firmus*, *B. insolitus*, *B. lincheniformis*, *B. polymyxa* y *B. turingiensis*, entre otros (Bergeys, 2000).

2.7. Género *Trichoderma*

El género *Trichoderma* pertenece a la sub división Deuteromicetes, orden Hyphomycetes, cuyo estado sexual o telomorfo correspondería a un hongo Ascomycotina productor de peritecios (Alexopoulos, 1996). Posee conidiophoros hialinos, erectos o arrastrados, más o menos cónicos. Al final del conidiophoro se agrupan en forma de pelota las conidias, posee conidias suaves, verdes, subglobosas a cortas ovoides, sus colonias son de rápido crecimiento, con micelio compacto y coloración de blanco a verde. Comúnmente forma clamidiosporas intercaladas, raramente terminales, son globosas a elipsoidales, hialinas y de pared suave, también presentan phialides simples o en grupos (Cook, 1989).

Se caracterizan por presentar o no un estado sexual determinado, por ser anaerobio facultativo que se encuentra naturalmente en un número importante de suelos agrícolas. Existen más de 30 especies, todas con efectos benéficos para la agricultura y otras ramas. Este hongo se encuentra ampliamente distribuido en el mundo, y se

presenta en diferentes de zonas y hábitat, especialmente en aquellos que contienen materia orgánica o desechos vegetales en descomposición, así mismo en residuos de cultivos, especialmente en aquellos que son atacados por otros hongos (Bernal, 2000). Del mismo modo, el hongo *Trichoderma* actúa como agente de control biológico, disminuyendo o eliminando la necesidad de tratar con fungicidas químicos (Mora, 2001).

Sus metabolitos y su resistencia a la inhibición por otros microorganismos le dan la posibilidad de sobrevivir en muchos nichos ecológicos (Papavizas, 1985).

Se Indica que existen varias especies de *Trichoderma* involucradas en el control biológico: *Trichoderma viride*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma lignorum*, *Trichoderma longibrachiatum*, etc. (Howell, 2003).

3. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESIS

Las cepas de *Bacillus* sp y *Trichoderma* sp presentes en la rizósfera de café (*Coffe arabica*) presentan actividad antagonista frente a *Fusarium oxysporum* fitopatógeno causante de pudrición vascular.

- **Variables independientes:** *Bacillus* sp , *Trichoderma* sp, *Fusarium oxysporum*.
- **Variables dependientes:** Actividad antagonista de cepas de *Bacillus* y *Trichoderma* frente a *Fusarium oxysporum*

3.2. OBJETIVOS

3.2.1. Objetivo general

- Aislar cepas nativas de *Bacillus* sp y *Trichoderma* sp de la rizósfera de café con capacidad antagonista frente a *Fusarium oxysporum* que puedan utilizarse en programa de Manejo Integrado de Plagas del Café, cultivados en el Distrito de Monzón- Región Huánuco.

3.2 .2. Objetivos específicos

- Aislar y caracterizar la cepa de *Fusarium oxysporum* agente causal de la pudrición vascular.
- Determinar la actividad antagonista *in vitro* de cepas de *Bacillus* spp y *Trichoderma* spp frente a *Fusarium oxysporum*.
- Seleccionar cepas del género *Bacillus* y *Trichoderma* nativos que muestren el mayor porcentaje de inhibición micelial frente a *Fusarium oxysporum*.
- Caracterizar fenotípicamente las cepas con mayor actividad antagonista frente a *Fusarium oxysporum*.
- Identificar a nivel molecular de cepas con mayor actividad antagonista

4. MÉTODOS

4.1. Lugares de muestreo.

El muestreo se realizó en ocho campos de cultivo de café, considerando su altitud ubicados desde los 1100 msnm hasta 1700 msnm caserío de Tazopampa, en el Distrito de Monzón, región de Huánuco, Perú. (Tabla 1).

Tabla 1. Coordenadas geográficas de los lugares de muestreo.

| N° | CAMPOS DE CULTIVO | ESTE | NORTE | ALTITUD (m.s.n.m) |
|----|-------------------|--------|---------|-------------------|
| 1 | ZONA1 | 343320 | 897610 | 1700 |
| 2 | ZONA 2 | 343324 | 897635 | 1694 |
| 3 | ZONA 3 | 343580 | 897622 | 1577 |
| 4 | ZONA 4 | 343715 | 8976123 | 1490 |
| 5 | ZONA 5 | 34900 | 8976100 | 1300 |
| 6 | ZONA 6 | 344401 | 8975791 | 1200 |
| 7 | ZONA 7 | 335853 | 8975937 | 1135 |
| 8 | ZONA 8 | 339578 | 8972022 | 1079 |

4.2. Procedimiento de recolección de muestras.

Las muestras de suelos fueron tomadas a partir de cafetales donde no se había aplicado plaguicidas en el follaje en el último año. Se muestrearon 8 hectáreas de cultivo de cafeto, de cada hectárea se tomó cinco submuestras de forma aleatoria (40 en total), cada submuestra fue mezclada para obtener dos muestras por hectárea (16 muestras). Estas muestras fueron seleccionadas utilizando un patrón de recorrido en zig-zag (Carrillo *et al.*, 1995). Cada muestra fue recolectada individualmente en bolsas ziploc y aspersadas con agua destilada estéril para mantener la humedad y conservadas en un lugar fresco hasta su utilización. Finalmente fueron trasladadas al laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos

4.3. Aislamiento del agente patógeno

A partir del material vegetal como raíces y parte basal del tallo de cafeto, se seleccionaron plantas con síntomas típicos de la enfermedad como marchitamiento vascular, amarillamiento, reducción de crecimiento, debilidad, necrosis y muerte de la planta. Estas fueron examinadas y posteriormente procesadas con el fin de detectar el agente causal de la infección.

Para el aislamiento del hongo fitopatógeno se tomó tallos de plantas de café que presentaban necrosis del sistema vascular; luego en condiciones totalmente asépticas y bajo una cámara de flujo laminar se sometió a una desinfección preliminar con agua estéril, cada muestra se cortó en pequeños trozos de 1 cm, los cuales fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 1 % (V/V) durante un minuto con agitación permanente, pasado este tiempo se sumergió en etanol al 70% (V/V) durante 30 segundos, posteriormente las muestras fueron lavadas tres veces con agua destilada estéril, para eliminar los excesos del desinfectante y luego secadas con papel toalla estéril y en condiciones de esterilidad se colocaron en placas petri con agar papa dextrosa (APD). Estas placas fueron incubadas a 28°C durante 7 días (Constanza *et al.*, 2012).

4.4. Aislamiento de cepas de *Bacillus* spp.

Se tomó 1 g de tierra de cada muestra, con raíces de cafeto y se realizaron diluciones decimales seriadas hasta 10^{-6} en solución salina (0,85% V/V NaCl), a partir de la muestra problema se tomó los dos últimos tubos 10^{-5} y 10^{-6} se sometió a un shock térmico a 80°C por 15min, para eliminar formas vegetativas de las bacterias y favorecer la concentración de las esporas de *Bacillus* sp, se enfrió con agua de caño, posteriormente se sembró 0.1 mL por disseminación en medio Agar Nutricio (AN) utilizando la espátula de Drigalski estéril y finalmente fueron incubados a 30°C por

24-48h a pH =7.0±0.2. De las placas de AN con crecimiento se tomaron muestras de las colonias con características diferentes y se pasaron a placas con AN para su selección. Se le realizó una observación microscópica con tinción de Gram para comprobar la pureza y determinar las características microscópicas de los mismos, así como la presencia de esporas. Los aislados puros se conservaron en tubos con agar nutritivo suplementado con glicerol al 15 % (V/V) (Badia *et al.*, 2011).

4.5. Aislamiento de cepas *Trichoderma* spp.

A partir de muestras de tierra de café, se realizó diluciones seriadas de 10^{-1} - 10^{-3} , Monzón (2001). Luego se sembró por triplicado alícuotas de 0,1 ml de cada dilución por diseminación en las superficies de placas Petri con Agar Papa Dextrosa (PDA) y fueron incubados a $28.0 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Los aislamientos de *Trichoderma* spp fueron sembrados en agar PDA e incubados a $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 4-5 días. La identificación de los aislamientos se realizó utilizando como ayuda el método descrito por (Gilchrist *et al.*, 2005), y claves propuestas por Samuels *et al.* (2007) también se realizó la identificación molecular de las cepas con mayor actividad antagonista.

4.6. Determinación de la capacidad antagonista de cepas de *Bacillus* sp. frente a *Fusarium oxysporum* mediante pruebas *in vitro*

La determinación de la capacidad antagonista se realizó por el método directo enfrentamiento dual (Bell *et al.*, 1982). Esta prueba consistió en el desarrollo simultáneo del hongo antagonista y el patógeno en placas petri con medio APD, todo bajo las mismas condiciones: en placas Petri de 90mm de diámetro se sembró los hongos y frente a ella se colocó un disco de 5 mm de diámetro del hongo fitopatógeno, como control se usó una placa con el medio APD sembrada sólo con el hongo. Todas las placas se incubaron a $28^{\circ}\text{C} \pm 2$ durante 7 días. Para obtener los discos de hongos,

éstos se sembraron en medio APD y se incubo a 28°C ± 2 durante 7 días, luego se realizó perforaciones en la parte central de la colonia con un obturador estéril de 5mm de diámetro. Se determinó el tipo de antagonismo de acuerdo a la escala de Bell (Bell *et al.*, 1982). El porcentaje de inhibición del crecimiento micelial se calculó empleando siguiente fórmula 1:

$$\text{PICR} = ((R1-R2) / R1) * 100$$

Donde:

R1: radio mayor (radio patógeno testigo)

R2: radio menor (radio del patógeno enfrentado con el antagonista)

4.7. **Determinación de la capacidad antagonista de cepas de *Trichoderma spp* frente a *Fusarium oxysporum* mediante pruebas *in vitro*.**

Las pruebas de enfrentamiento se realizaron en medio PDA a pH 5,5 , se colocó en un extremo de la placa Petri un disco de Agar de 4 mm de diámetro con cultivo de *Fusarium oxysporum*, y en el extremo opuesto otro disco de 4 mm con cultivo de *Trichoderma sp* a una distancia de 5 cm aproximadamente entre ellos (Howell, 2003); posteriormente se incubo bajo las mismas condiciones del antagonista durante 10 días, se realizó mediciones a los 3,5, 7 y 10 días del crecimiento radial del micelio de la colonia de los hongos.

La capacidad antagonista de las cepas nativas de *Trichoderma sp* se comprobó de distintas formas: primero midiendo el grado de micoparasitismo de cada antagonista, el cual se determinó por la escala que proponen (Ezziyyani *et al.*, 2004). Segundo por la evaluación de competencia por nutrientes y espacio, la cual se obtuvo a partir de las medidas de los radios de crecimiento de cada patógeno y antagonistas en cultivo dual,

junto con sus respectivos testigos y tercero, por el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) (Ezziyani *et al.*, 2004). El porcentaje de inhibición del crecimiento micelial se calculó empleando la fórmula 1 ya señalada:

4.8. Caracterización de cepas de *Bacillus* con mayor potencial antagonista.

4.8.1. Caracterización morfológica y observaciones microscópicas.

Para la identificación de cepas de *Bacillus* spp con mayor actividad antagonista, se realizó una caracterización cultural en Agar Nutritivo y Caldo nutritivo, estas fueron caracterizadas morfológicamente siguiendo las instrucciones dadas por Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2001. Las placas fueron incubadas a 28°C por 24-48 horas. Se realizaron observaciones microscópicas mediante coloración Gram y tinción de esporas (técnica de Shaeffer-Ffulton), para esta última se preparó un frotis y se adiciono colorante verde de malaquita hasta cubrir el portaobjetos, luego colocó éste cerca de la flama del mechero y se calentó sin hervir durante 10 min, evitando que se seicara; se enjuagó con agua destilada y luego se tiñó con safranina durante 1 min, finalmente se enjuagó y se dejó secar. Esta tinción permitió observar la presencia de endosporas bacterianas, ya que los constituyentes de esta estructura retienen fuertemente el colorante verde de malaquita al 7.6% tomando un color verde, y posteriormente se tiñe con safranina al 0,25% para que de un contraste a la célula bacteriana (Ventura, 2007).

4.8.2. Prueba de la catalasa

La catalasa es una enzima que tienen la mayoría de las bacterias, cuya función es catalizar la ruptura del agua oxigenada, liberando oxígeno al ambiente.

En esta prueba se tomó un portaobjeto y se depositó un inóculo de las bacterias a examinar, sobre éstas se depositó una gota de agua oxigenada, la reacción es positiva si existe liberación de burbujas.

4.8.3. Movilidad en Medio SIM

La prueba de movilidad se realizó inoculando por picadura cada cepa de *Bacillus* en un tubo con medio SIM (Sulfuro, Indol, Movilidad). La prueba se consideró positiva si el microorganismo crecía más allá del área de la picadura.

4.8.4. Asimilación de citrato

Nos permitió determinar si las cepas de *Bacillus* sp son capaces de utilizar el citrato como única fuente de energía y carbono. Se sembró un inóculo de la cepa bacteriana a estudiar en tubos que contenían agar citrato de Simmons inclinado, se dejaron incubar a 28°C por 24 horas. La reacción fue considerada positiva si el medio de cultivo cambia del color verde original a azul (Ventura *et al.*, 2007).

4.8.5. Hidrolisis de caseína

La caseína es la proteína de la leche que le confiere el color blanco, cuando la caseína es hidrolizada desaparece el color blanco alrededor del crecimiento microbiano.

Se utilizó placas con medio agar leche, en estas se inocularon cada cepa de *Bacillus* y posteriormente se incubaron durante 24 h a 28 °C. La prueba se consideró positiva cuando se apreciaron halos claros alrededor de las colonias (Ventura *et al.*, 2007).

4.8.6. Hidrólisis de almidón

El resultado de esta prueba permite observar si la cepa bacteriana en estudio es capaz de utilizar el almidón, secretando amilasas para la degradación de éste (Valenzuela, 2003). Las cepas de *Bacillus* se sembraron en placas con medio Agar almidón, posteriormente se incubaron a 28°C por 24-48 horas, pasado el tiempo de incubación se agregó a cada placa solución de Lugol, la reacción fue considerada positiva cuando se observa un halo claro (transparente) alrededor de la cepa y fue negativa cuando se mantiene la coloración azul- negro alrededor del crecimiento de las cepas, esto significa que el almidón está presente y no fue hidrolizado.

4.8.7. Prueba de Voges Proskauer

Con esta prueba fue posible observar si las cepas de *Bacillus* realizan una fermentación fórmica de tipo butilenglicol o llamada de tipo *Areobacter aerogenes* (Valenzuela, 2003). Se sembró un inóculo de cada cepa de *Bacillus* en tubos con medio MRVP, se incubaron a 28°C ± 2°C por 24 horas, luego se agregó a cada tubo 0,6ml de alfa naftol al 5% en alcohol etílico y 0,2ml de hidróxido de potasio al 40%. Se esperaron 10 minutos para ver si la reacción es o no positiva, si el contenido del tubo se torna color rojo, la reacción es considerada positiva.

4.8.8. Prueba de utilización de carbohidratos

En esta prueba se utilizaron distintos azúcares: glucosa, manitol, lactosa, arabinosa y xilosa, para determinar la capacidad de las bacterias a fermentar a los carbohidratos (Ventura, 2007).

Para esto se sembró las cepas de *Bacillus* sp, en un medio base más 1% de los azúcares mencionados anteriormente, con el indicador púrpura de bromocresol, durante 24 a 48 horas a 23 °C ± 2°C. Reacción positiva se denota por un cambio de color de púrpura a amarillo y negativa se mantiene el color original del medio.

4.8.9. Prueba de identificación de *Bacillus* en medio HiCrome *Bacillus* Agar

El medio HiCrome *Bacillus* Agar es recomendada para el aislamiento y la diferenciación de especies de *Bacillus* sp a partir de un cultivo mixto por método cromogénico. Este contiene manitol que sirve como el hidrato de carbono fermentable, cuya fermentación puede ser detectada por el indicador rojo de fenol.

4.8.10. Crecimiento de *Bacillus* a diferentes concentraciones de NaCl.

Las cepas de *Bacillus* spp fueron sembradas en tubos con caldo nutritivo (AN) suplementado con diferentes concentraciones de NaCl (5, 7, 10%), además se sembró un control de las cepas en caldo nutritivo. Estas fueron incubadas a 30°C por 24-48h. La evaluación se realizó observando si hay crecimiento en el fondo del tubo, turbidez o formación de película.

4.8.11. Crecimiento de *Bacillus* a diferentes temperaturas.

Las cepas de *Bacillus* spp fueron sembradas en caldo Nutritivo por duplicado, se incubo a 25 °C, 30 °C, 37 °C se realizó lecturas cada 24 horas durante 3 días, se usó un control a 28 °C.

4.8.12. Crecimiento de *Bacillus* sp a diferentes pH.

Las cepas de *Bacillus* sp fueron sembradas en caldo Nutritivo por duplicado, estas fueron incubadas a pH 5, 7 y 9 a 30 °C por 24-48h. En cada caso se usó el control de pH.

4.8.13. Caracterización morfológica y microscópica de especies de *Trichoderma* sp.

La identificación de las especies de *Trichoderma* sp se realizó en medio APD, por sus características macroscópicas y microscópicas. La caracterización de la morfología de

las colonias se realizó tomando en cuenta los siguientes parámetros: color de anverso, reverso y tinción del medio, textura de la colonia (algodonosa, lanosa, imbricada, arenosa, pulverulenta, flocosa), disposición del micelio (superficial, inmersa o ambas), presencia o ausencia de anillos (sí o no), presencia o ausencia de exudados en gotas en la colonia (sí o no).

Se midió el radio de cada cepa de *Trichoderma* cada 24 horas durante 7 días, dependiendo de la velocidad de crecimiento de los aislados, para comparar la velocidad de crecimiento de las cepas de *Trichoderma* con respecto al fitopatógeno.

La identificación micromorfológica se realizó mediante microcultivos en APD con el uso del microscopio óptico a 40x, en función de la morfología de los hongos (Gams & Bisett, 1998) y las claves de Barnett & Barry (2006).

4.8.14. Caracterización molecular de cepas con mayor actividad antagonista.

A. Extracción de ADN (Doyle & Doyle, 1990)

Se realizaron la extracción de ADN para 3 cepas con mayor actividad antagonista y del patógeno. La extracción de ADN consistió básicamente de tres etapas. La primera etapa de lisis celular, la segunda de purificación y la tercera de recuperación.

- **Lisis celular**

Se sembró cada cepa antagonista en un matraz de 50ml conteniendo 20 ml de caldo nutritivo pH 5.5 y se incubaron 3 días a 150 RPM. La biomasa se filtró en papel Whatman N° 1, luego se secó en horno a 37 °C durante 72 horas. Se recuperó la biomasa filtrada con ayuda de un estilete y se colocó en tubos eppendorf de 1.5 ml, luego se lavó 3 veces agregando 500 µl de una solución de 80% de metanol y 20% de buffer Tris-EDTA 20:1 (v/v) y se homogenizó por inversión. Posteriormente, se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y el precipitado se secó a temperatura ambiental. Se tomó 90 µL de la biomasa precipitada y luego se agregó 150 µL de buffer de lisis de levaduras (1M

sorbitol, 0.1M EDTA pH=7,4, 0,1% B-mercaptoethanol, 50 unidades de liticasa). Se disgregó las hifas con ayuda de un estilete punta roma, luego fue incubada a 30 °C, mínimo 1 hora. Se agregó 295 µl de buffer Tris-EDTA (10:1) y luego 5 µl proteinasa K, se disgregó las hifas una vez más y se incubó a 60 °C durante una noche.

- **Purificación del ADN**

A la suspensión se agregó 500 µL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se homogenizó durante 2 minutos, luego se centrifugó a 13000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente, se recuperó el sobrenadante y se colocó en tubos nuevos.

Posteriormente, se agregó un volumen equivalente al paso anterior de isopropanol frío (v/v), se homogenizó e incubó a -20 °C por 2 horas. Cumplido el tiempo de incubación se centrifugó a 13000 rpm por 20 minutos a 4 °C y se descartó el sobrenadante.

- **Recuperación del ADN**

Se agregó 500 µL de 70% etanol (solvente Tris EDTA 20:5), se homogenizó por inversión, se centrifugó a 13000 por 10 minutos y se descartó el sobrenadante. Luego se agregó 500 µL de etanol 70% (solvente Tris EDTA 20:1), se homogenizó por inversión, se centrifugó a 13000 rpm por 10 minutos y se descartó el sobrenadante. Posteriormente, se agregó 500 µL de etanol 70% (solvente agua estéril), se homogenizó y se centrifugó a 13000 por 10 minutos y se descartó el sobrenadante. Se secó los tubos a 50 °C por 6 horas. Por último, se resuspendió el ADN obtenido en 100 µL de buffer Tris EDTA (20:1) y se incubó a 37 °C por 1 hora. Se guardó a -20 °C hasta su uso.

B. Condiciones PCR y secuenciamiento (Zeng *et al.*, 2013)

Para amplificar la región ITS (Internal Transcribed Spacer) se usó el primer universal ITS-1 (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG -3') y ITS-4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC -3'). La amplificación comenzó con un paso de desnaturalización de 5 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 95 °C por 1 min, 72 °C por 1.30 minutos y una extensión final de 72 °C por 10 minuto. El producto de amplificación fue detectado mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, con bromuro de etidio como indicador, el gel

se reveló bajo una lámpara UV y el tamaño del amplicón fue estimado por comparación con un marcador de peso molecular.

Lo amplicones fueron secuenciados en Molecular Cloning Laboratories - MCLAB, San Francisco, U.S.A (<https://www.mclab.com/>). La secuencia de genes ITS fueron comparadas con secuencias conocidas en la base de datos del GenBank para identificar la secuencia con mayor similitud y analizadas con la herramienta BLAST.

4.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se realizó un análisis de varianza ANOVA y para identificar las diferencias significativas se usó la prueba de comparación de promedios de Tuckey con el programa estadístico SPSS 22.0.

4. RESULTADOS

5.1. Aislamiento e Identificación de *Fusarium oxysporum*

De las 5 muestras de raíces y parte basal del tallo de cafeto con síntomas de pudrición vascular se aisló cepas de *Fusarium* sp. en un 80% del total de muestras.

Macroscópicamente se observó el micelio aéreo de aspecto algodonoso (Fig.5A), que primero aparece en color blanco y luego va cambiando desde violeta hasta el púrpura según el cultivo envejecía, el reverso mostro un color púrpura (Fig.5B).

Microscópicamente se observó hifas hialinas y septadas, microconidias (5 - 12 X 2.3 - 3.4 μ m) con forma elipsoidales y forma ligeramente curva (Fig.5C), macroconidias en forma de media luna, integradas por tres a cinco divisiones dentro del macroconidio (Fig.5D). Las características microscópicas y macroscópicas concuerdan con *Fusarium oxysporum*.

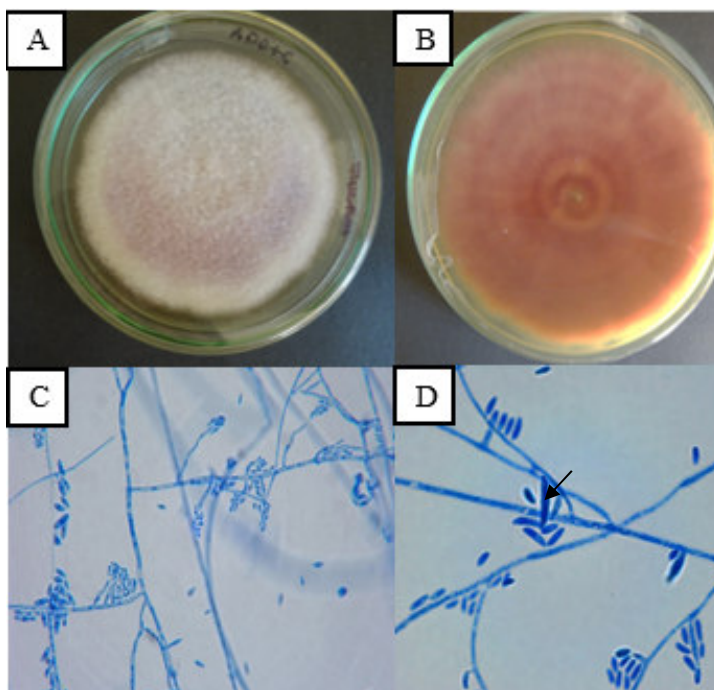


Figura 5. A. Características macroscópicas, micelio aéreo de *Fusarium oxysporum* en agar APD. B: Reverso de la placa muestra color púrpura en medio APD, C: Observación microscópica en aumento 10x, Microconidias agrupadas, D: Macroconidia en forma de media luna con 4-5 divisiones, aumento 40 x

5.2. Aislamiento de cepas de *Bacillus* spp y *Trichoderma* spp.

En el presente estudio se aislaron 30 cepas de *Bacillus* spp y 20 cepas de *Trichoderma* spp de la rizósfera de café (Tabla 2). Las cepas aisladas fueron enfrentadas a *Fusarium Oxysporum* en pruebas de antagonismo. De los cuales 6 cepas de *Bacillus* y 9 cepas de *Trichoderma* mostraron actividad antagonista frente a *F. oxysporum* (Tabla 2). Se determinó el porcentaje de inhibición de las cepas de *Bacillus* spp y *Trichoderma* spp frente *F. Oxysporum*. Posteriormente se pasó a la caracterización de las cepas que mostraron actividad antagonista.

Tabla 2. Colección de cepas de *Bacillus* spp y *Trichoderma* spp aisladas de la rizósfera de *Coffe arabica*.

| Colección de cepas | | | | | | | |
|--------------------|---|---------|---|-----------------------|---|--------|---|
| <i>Bacillus</i> sp | | | | <i>Trichoderma</i> sp | | | |
| MT7.II | + | MT9.II | - | MT5.A | + | TL14.R | - |
| MT15.II | - | MT2.v | - | MT1.V | - | TL4.R | - |
| MT7.I | - | MT6.II | - | MT12.A | + | B1T | + |
| MT9.VII | - | MT1.II | + | MT26.B | - | PLS01 | + |
| MT1.III | - | MT6.III | - | M3PI.I | + | MTSI | + |
| MT23.II | - | MT20.I | - | MT12.C | - | | |
| MT18.IV | - | MT20.II | - | TL7.A | - | | |
| MT7.III | - | MT25.I | - | TL1.A | - | | |
| MT2.II | + | MT25.II | - | MT13.A | - | | |
| MT3.P3 | + | MT4.I | - | MT22.A | - | | |
| MT15.VII | - | MT3.I | - | MT24 | - | | |
| MT4.II | - | MT3.II | - | MT10 | - | | |
| MT2.II | + | MT6.I | - | MT24.I | + | | |
| MT1.I | + | MT5.III | - | MT12.A | + | | |

+ : Presenta actividad antagonista

- : No presenta actividad antagonista

5.3. Pruebas de antagonismo de *Bacillus* sp frente a *Fusarium oxysporum*

De las 30 cepas de *Bacillus* rizosfericos aislados de café, 6 *Bacillus* resultaron tener actividad antagonista frente a *Fusarium oxysporum* en pruebas *in vitro*. Los resultados del porcentaje de inhibición y la tasa de crecimiento micelial, frente al patógeno se hicieron en base al promedio de las tres repeticiones por bacteria. Estos datos se referencian en la Tabla 3 y Figura 7. Las cepas de *Bacillus* con actividad presentaron un porcentaje entre el 64–71% de inhibición del micelio de *F. oxysporum* (Tabla 3). La cepa MT2.I mostro el mayor porcentaje de inhibición con 71%.

Tabla 3. Porcentaje de inhibición y tasa de crecimiento radial micelial del aislamiento de *Fusarium oxysporum* por la actividad antagonista de *Bacillus* spp al décimo día de enfrentamiento.

| Cepas de <i>Bacillus</i> | % Inhibición* | Tasa de crecimiento** (cm/día) |
|--------------------------|---------------|-----------------------------------|
| MT1.1 | 67,78 ± 0.00 | 1,45± 0.00 |
| MT1-II | 65,56± 1,11 | 1,55± 0.05 |
| MT2.I | 71,48 ± 0.64 | 1.28 ± 0.03 |
| MT2.II | 66,3 ± 0.64 | 1,52 ± 0.03 |
| MT3.P3 | 64,44 ± 1,11 | 1,6 ± 0.05 |
| MT7.III | 70,37 ± 1,28 | 1,33 ± 0.06 |
| CP*** | 0 | 4,5 ± 0.0 |

*Halos de inhibición promedio ± desviación estándar

**Tasa de crecimiento ± desviación estándar

*** CP: Testigo *Fusarium oxysporum*

La Figura 6 muestra los radios de la colonia del hongo *F. oxysporum* (radio promedio de la colonia en cm de tres repeticiones) sobre agar APD inoculado con los aislamientos de *Bacillus* y un testigo (solamente el hongo). Según los datos obtenidos por el crecimiento radial del patógeno frente a las seis cepas de *Bacillus* a los 5, 7 y 10 días, se observó que desde los primeros días de evaluación la cepa frente a la cual el

patógeno presentó la menor tasa de crecimiento fue MT2.I, permitiéndole alcanzar un radio de 1.28 cm a los 10 días de enfrentamiento.

Por otro lado, se observó que con la cepa MT3.P3 el patógeno mostró la mayor tasa de crecimiento, con un radio de 1.55 cm a los 10 días de enfrentamiento.

Se pudo observar que las seis cepas evaluadas mostraron algún tipo de control ya que el patógeno nunca alcanzó igual tasa de crecimiento con respecto al testigo (Fig. 6).

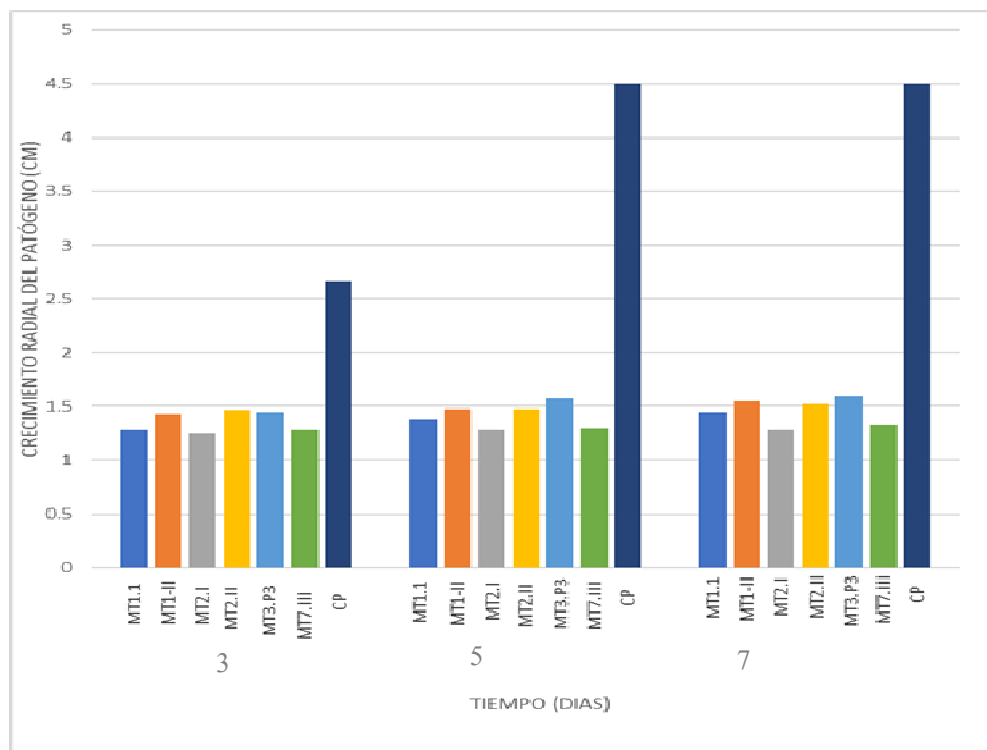


Figura 6. Medida de radios de crecimiento de *Fusarium oxysporum* frente a las cepas de *Bacillus* antagonistas en pruebas “*in vitro*” a los 5, 7 y 10 días. T1: MT1.I, T2: MT1.II, T3: MT2.I, T4: MT2.II, T5: MT3.P3, T6: MT7, CP: Testigo (*Fusarium oxysporum*).

La Figura 7 describe el comportamiento de los cultivos duales (promedio de tres repeticiones) con respecto a la reducción del crecimiento de *F. oxysporum*, observándose para el séptimo día, la cepa MT2.I en el tratamiento T3, fue quien exhibió el mayor PICR con un 71,48%, este efecto fue mostrado desde el tercer día logrando mantenerse hasta el último día de enfrentamiento, seguido por T6, donde se evaluó la cepa nativa MT7.III, con un 70,37 %. Contrario a lo observado con la cepa

MT3.P3 en el tratamiento T6, que mostró los menores porcentajes de inhibición frente a *F. oxysporum* con 64 %.

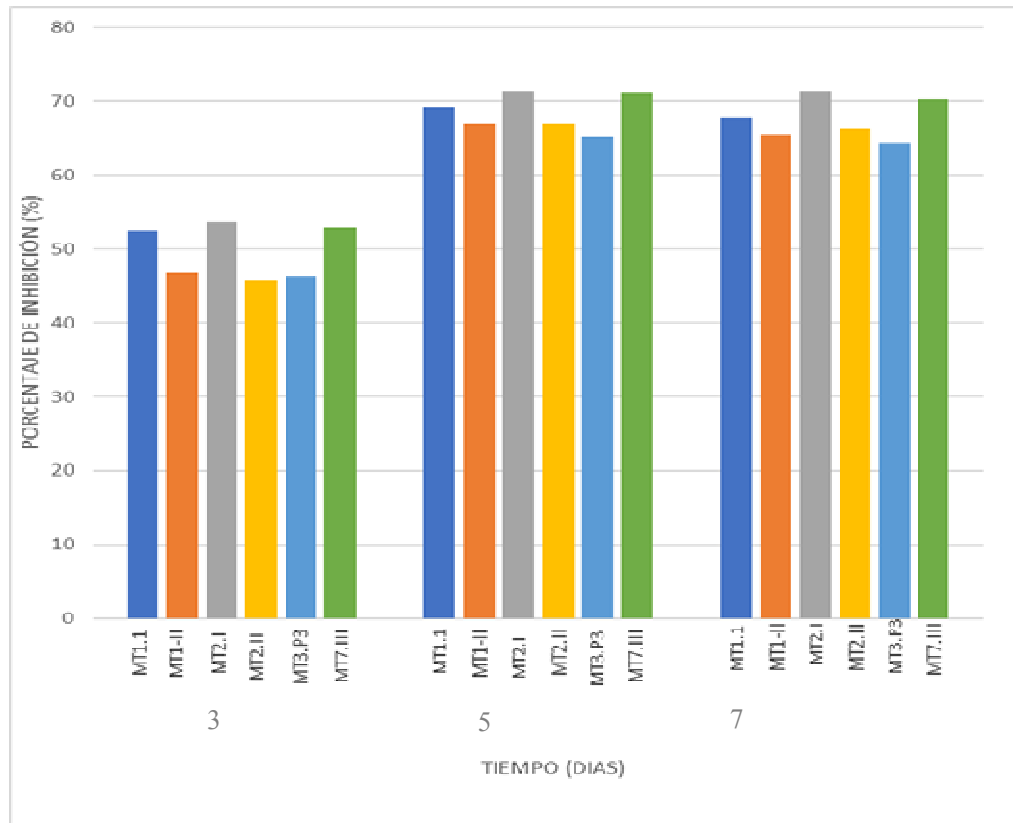


Figura 7. Porcentaje de inhibición micelial en cultivos duales de *Fusarium oxysporum* con cepas antagonista de *Bacillus spp s* a los 7,5 y 10 días T1: MT1.I, T2: MT1.II, T3: MT2.I, T4: MT2.II, T5: MT3.P3, T6:MT7.

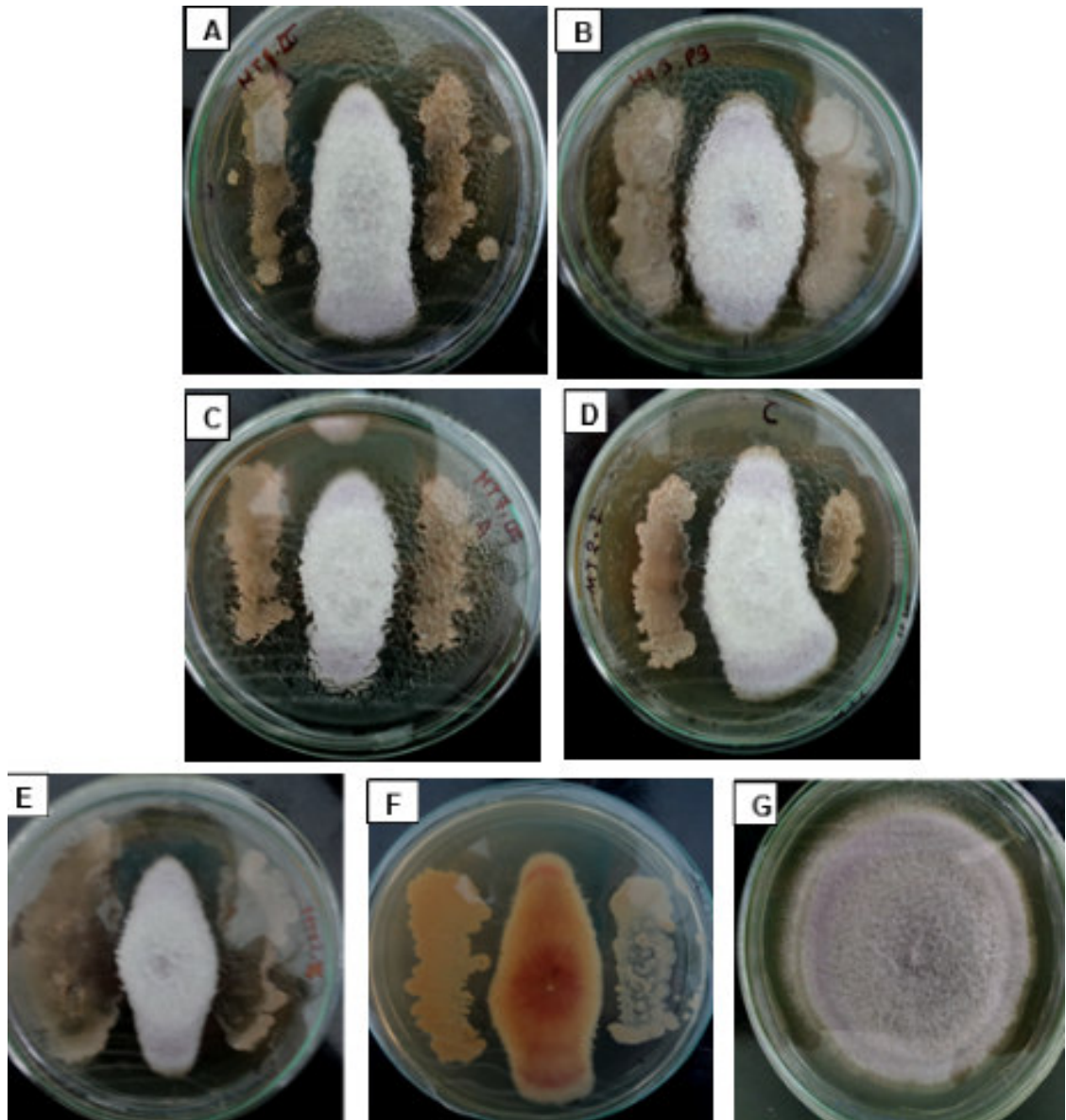


Figura 8. Pruebas de antagonismo *in vitro* de cepas de *Bacillus* spp frente a *Fusarium oxysporum* (*FUS*) a los 10 días de enfrentamiento. A: Cepa MT1.II+ Fus, B: Cepa MT3.P3+ Fus, C: Cepa MT7.III+ Fus, D: Cepa MT1.I +Fus. E: MT2.II+Fus F: MT2.I +Fus. G: Cepa de *Fusarium oxysporum* sin enfrentamiento.

5.4. Pruebas de antagonismo de *Trichoderma* spp frente a *Fusarium Oxysporum*

De las 25 cepas de *Trichoderma* spp rizosfericos aislados de café, 9 cepas de resultaron tener actividad antagonista frente a *F. oxysporum* (Tabla 4).

Para determinar la capacidad antagonista se realizó un estudio de la competencia por nutrientes y espacio según la comparación del radio de crecimiento del antagonista y el radio de crecimiento del fitopatógeno, al realizarse la comparación del radio del crecimiento antagonista (RCA), con el radio de crecimiento patógeno (RCP) de cada cultivo dual durante 7 días, se encontró que las cepas de *Trichoderma* nativos se desarrollaron a una velocidad superior a la de *F. oxysporum* (Figura.9), ya que las cepas de *Trichoderma* spp mostraron un crecimiento promedio de 7,7 cm al séptimo día de enfrentamiento (Figura. 9), muy similar al promedio de sus testigos (Cepas de *Trichoderma* sin enfrentamiento) 8,8 cm, mientras que *Fusarium oxysporum* mostró un crecimiento limitado en cultivo dual, con un promedio de 1,3 cm al séptimo día.

Tabla 4. Porcentaje de inhibición y tasa de crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*, por las cepas de *Trichoderma* spp al séptimo día de enfrentamiento dual.

| Cepas de <i>Trichoderma</i> | % Inhibición* | Tasa de crecimiento** (cm/día) |
|-----------------------------|---------------|--------------------------------|
| M3PI.I | 80.74± 1.28 | 0.87 ± 0.06 |
| MT5.A | 70.37± 1.28 | 1.33 ± 0.06 |
| MT14.E | 73.33± 2.22 | 1.2 ± 0.10 |
| MT12.A | 55.56± 4.01 | 2 ± 0.18 |
| TL7.R | 64.44± 2.22 | 1.6 ± 0.10 |
| MT24.1 | 70.00± 2.94 | 1.35 ± 0.13 |
| B1-T | 79.26± 3.39 | 0.93 ± 0.15 |
| PLSO1 | 66.30± 2.31 | 1.52 ± 0.15 |
| MTS.1 | 80.00± 2.22 | 0.90 ± 0.10 |
| CP*** | 0 | 4.5 ± 0.0 |

*Porcentaje de inhibición promedio ± desviación estándar

**Tasa de crecimiento ± desviación estándar.

*** CP: Testigo *Fusarium oxysporum*

La inhibición del crecimiento micelial se observó en todos los tratamientos al tercer día (Fig. 10), aun cuando el antagonista se encontraba distante del patógeno, posiblemente a través de antibiosis, mecanismo característico para estas especies de biocontroladores. La Tabla 4 y Figura 10 muestran los porcentajes de inhibición

promedio de tres repeticiones, obtenidos por las cepas de *Trichoderma* en los enfrentamientos directos. Estos resultados obtenidos del porcentaje de inhibición de las nueve cepas evaluadas frente al patógeno, muestran que M3PI.I tuvo el mayor efecto antagonista, logrando mantenerse desde el tercer al séptimo día los porcentajes más altos, logrando 80% de inhibición micelial, por otro lado, la cepa MT12.A mostró los menores porcentajes de inhibición frente al patógeno con 55 %, todas las cepas de *Trichoderma* presentaron un PICR superior al 50%.

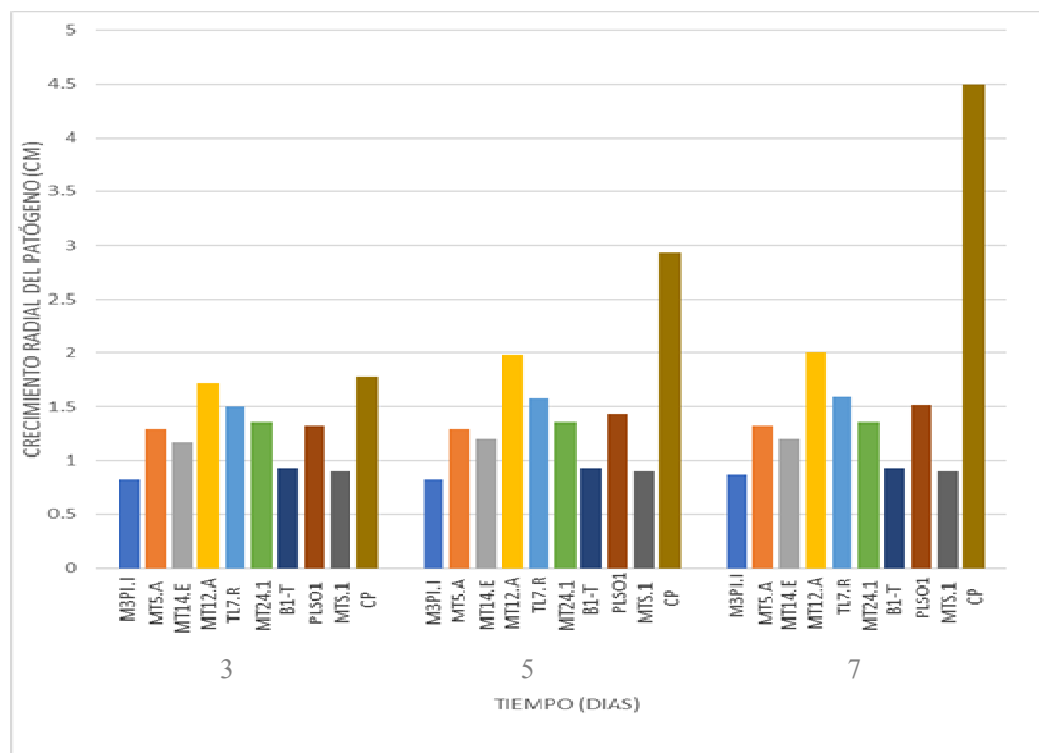


Figura 9. Medida de radios de crecimiento de *Fusarium oxysporum* en presencia de las cepas antagonistas de *Trichoderma* en prueba “*in vitro*” a los 3, 5 y 7 días de evaluación. T1: M3PI.I, T2: MT5.A, T3: MT14.E, T4: MT12.A, T5: TL7.R, T6: MT24.1, T7: B1-T, T8: PLSO1, T9: MTS.1 CP: Testigo (*Fusarium oxysporum*).

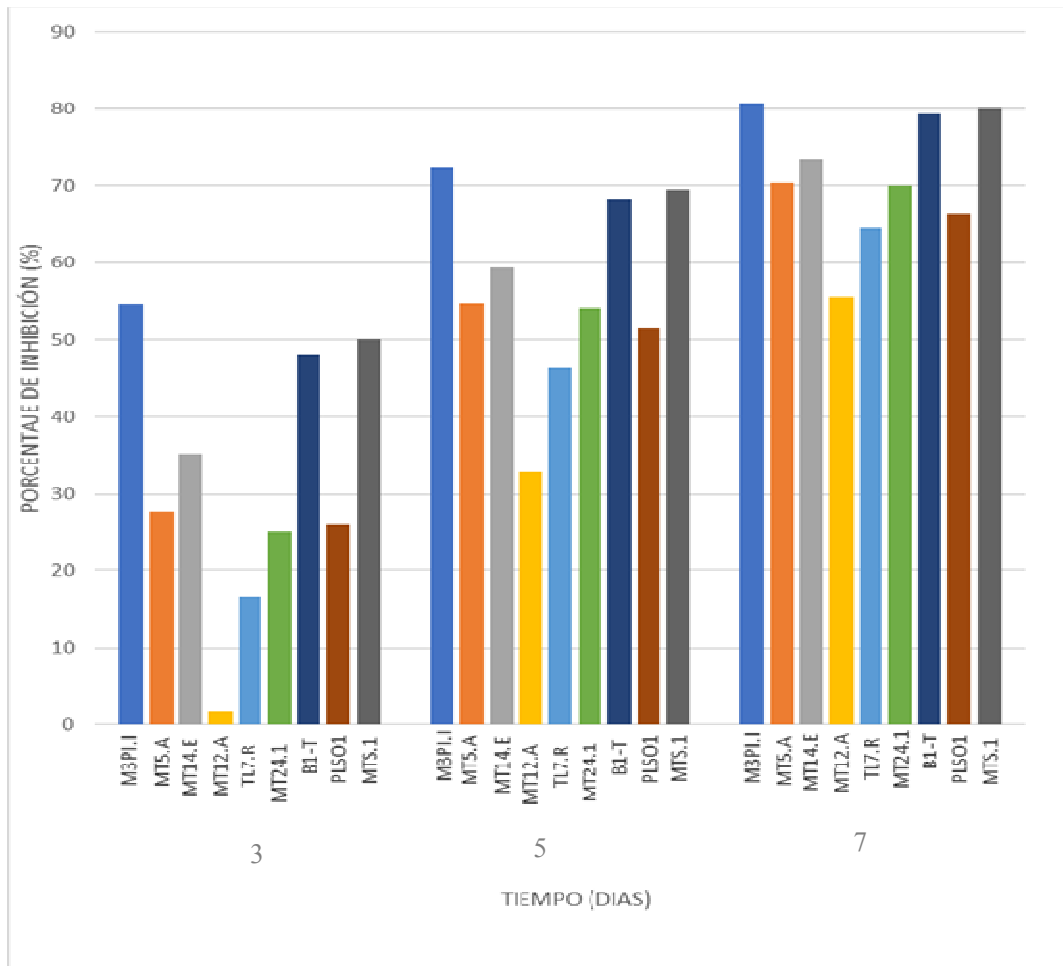


Figura 10. Porcentaje de inhibición del fitopatógeno *Fusarium oxysporum* por cepas antagonistas de *Trichoderma* en pruebas “*in vitro*” a los 3 ,5 y 7 días T1: M3PI.I I, T2: MT5.A, T3: MT14.E, T4: MT12.A, T5: TL7.R, T6: MT24.1, T7: B1-T, T8: PLSO1, T9: MTS.1 CP: Testigo (*Fusarium oxysporum*).

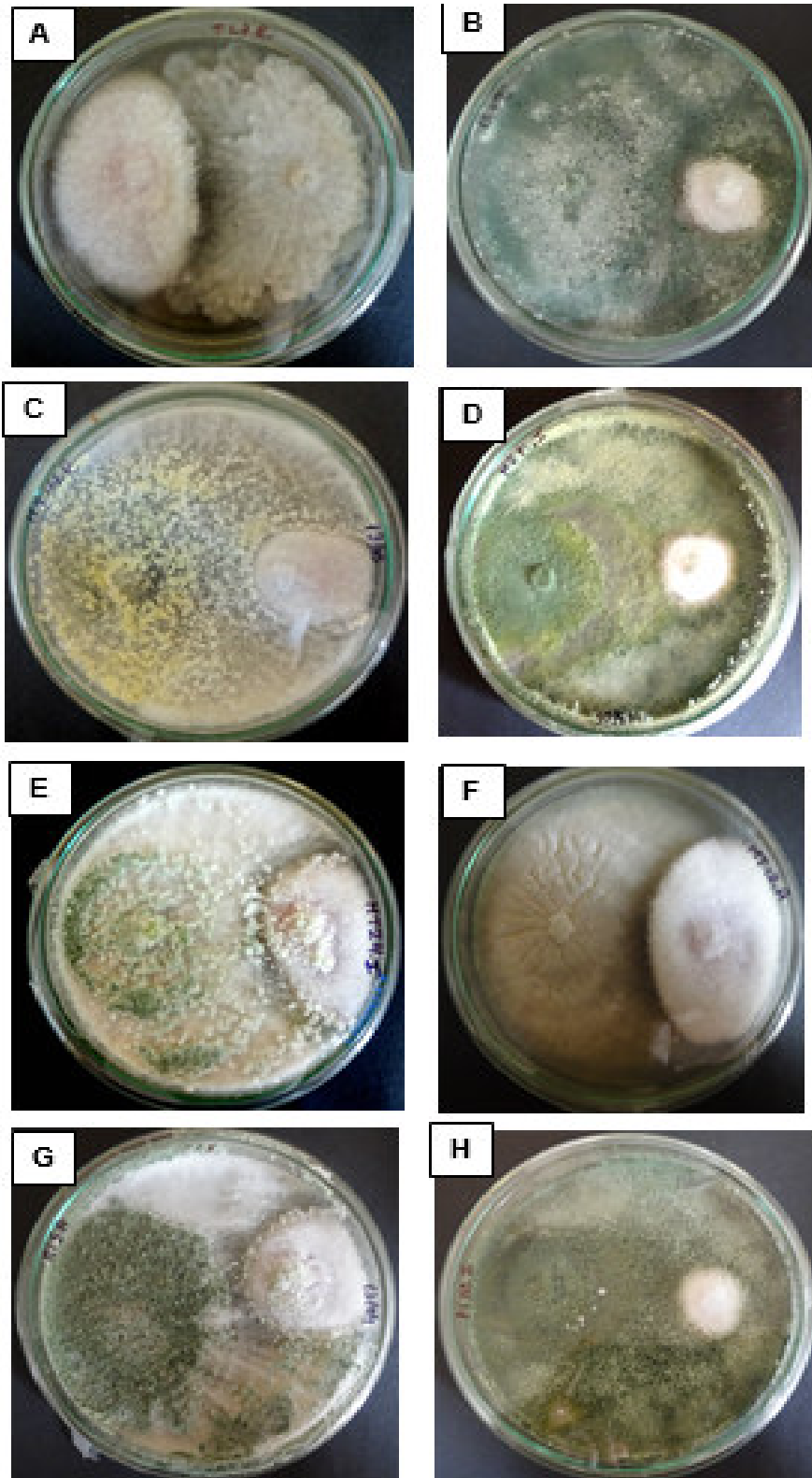


Figura 11. Pruebas de antagonismo *in vitro* de cepas de *Trichoderma* spp frente a *Fusarium oxysporum* a los 7 días de enfrentamiento. A: Cera TL7.R, B: Cera MT3.P3, C: Cera MT14.E, D: Cera M3PI.I, E: Cera MT24.I, F: Cera MT12, G: Cera MT5.A, H: Cera PIMO.I.

En la Tabla 5, se muestra las interacciones entre las 9 cepas de *Trichoderma* con actividad antagonista y *F. oxysporum*. Algunas cepas de *Trichoderma* spp (M3PI.I, MT5.A, MT24.1, MTS1) sobrecrecieron y esporularon sobre el micelio de *F. oxysporum*, otras redujeron el crecimiento de *F. oxysporum* parcialmente, rodeando la colonia y crecimiento el micelio en forma sumergida por debajo de la misma (MT14.E, TL7.R, PLSO1). Finalmente, las cepas MT12.A, B1-T presentaron una inhibición mutua con *F. oxysporum*.

Tabla 5. Interacción entre de cepas de *Trichoderma* spp y *Fusarium oxysporum*

| <i>Fusarium oxysporum</i> . | Cepas de <i>Trichoderma</i> | | | | | | | | |
|---------------------------------|-----------------------------|-------|--------|--------|-------|--------|------|-------|-------|
| | M3PI.I | MT5.A | MT14.E | MT12.A | TL7.R | MT24.1 | B1-T | PLSO1 | MTS.1 |
| Sobrecrecimiento | + | + | - | - | - | + | - | - | + |
| Inhibición sin sobrecrecimiento | - | - | + | - | + | - | - | + | - |
| Inhibición mutua | - | - | - | + | - | - | + | + | - |

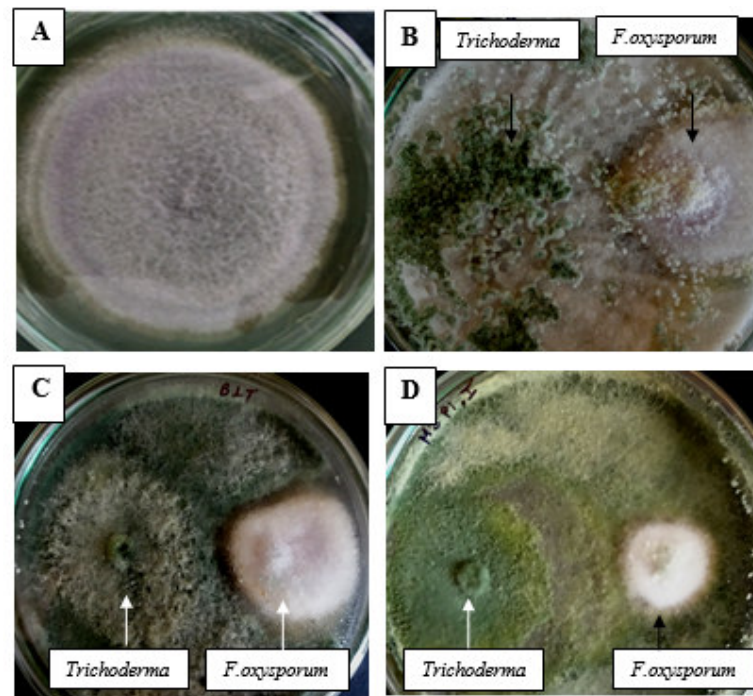


Figura 12. Interacción entre de cepas de *Trichoderma* spp y *Fusarium oxysporum*. A: control, B: *Trichoderma* sobrecrece a *F. oxysporum*, C: *Trichoderma* sp y *F.oxysporum* se inhiben mutuamente D: *Trichoderma* sp rodea al micelio de *F. oxysporum*.

5.5. Caracterización de cepas de *Bacillus* con actividad antagonista

5.5.1. Caracterización morfológica y observaciones microscópicas

Las colonias crecidas en medio Agar nutritivo, donde se permitió observar en detalle las características de cada cepa por su tamaño, color, superficie, consistencia, densidad, forma, elevación y margen (Tabla 6). Se observó que los caracteres culturales se muestran uniforme en las cepas estudiadas.

Tabla 6. Características morfológicas de colonias de cepas de *Bacillus* spp con actividad antagonista.

| Cepas de <i>Bacillus</i> | TAMAÑO (mm) | COLOR | SUPERFICIE | CONSISTENCIA | DENSIDAD | FORMA | ELEVACION | MARGEN |
|--------------------------|-------------|--------|------------|--------------|----------|-----------|-----------|-------------|
| MT1.I | Mediano | Blanco | Rugosa | Cremosa | Opaca | Circular | Chata | filamentosa |
| MT1.II | Grande | crema | Plana | Cremosa | Opaca | Circular | Chata | Lobulado |
| MT2.I | Mediano | Crema | Plana | Cremosa | Opaca | Irregular | Chata | Lobulado |
| MT2.II | Grande | Blanco | Rugosa | Cremosa | Opaca | Irregular | Chata | Lobulado |
| MT3.P3 | Mediano | Crema | Rugosa | Cremosa | Opaca | Irregular | Elevada | Filamentosa |
| MT7.III | Mediano | crema | Rugosa | Cremosa | Opaca | irregular | Elevada | Filamentosa |

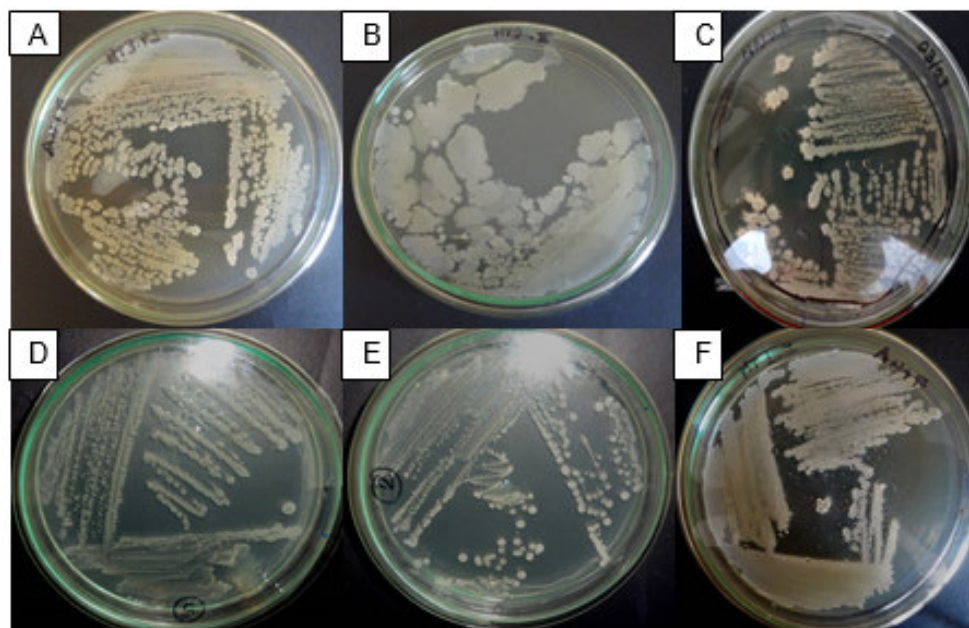


Figura 13. Morfología de las colonias de cepas de *Bacillus* en medio Agar nutritivo. A: MT3.P3, B: MT2.II, C: MT7.III, D: MT1.II, E: MT1.I F: MT2.1.

Respecto a las observaciones microscópicas realizadas para las cepas de *Bacillus* mediante tinción Gram, señalan que cepas son bacilos Gram positiva (Fig. 14), las cepas muestran características típicas de *Bacillus*, con morfología de bastones para todas ellas. Las cepas B, C y F presentaron una morfología celular similar. Por otra parte, en A y E se observó células en forma de bastón más gruesas ya alargadas en relación al resto y D mostro células más pequeñas.

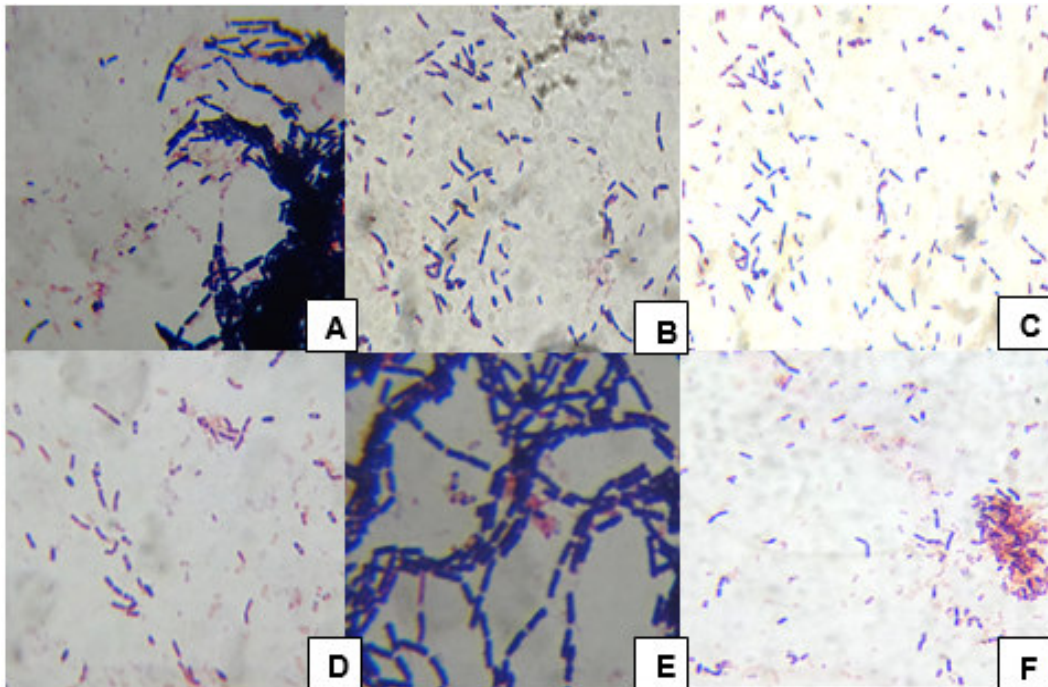


Figura 14. Morfología microscópicas de cepas de *Bacillus* con actividad antagonista, las 6 cepas muestran tinción gran positiva. A: MT2.I, B: MT1.II, C: MT3.P3, D: MT1.I, E: MT2.II, F: MT7.III. Aumento: 100X

5.5.2. Caracterización bioquímica de cepas *Bacillus* sp.

Las pruebas de conducta fisiológica y bioquímica de las 6 cepas de *Bacillus* seleccionados (Tabla 7), indicaron en general actividad positiva en pruebas catalasa, motilidad así como hidrolisis de gelatina, hidrolisis de almidón, hidrolisis de caseína,

estas 3 últimas fueron evidenciadas por la formación de un halo alrededor de cada colonia tal como se muestra en la Figura 15.

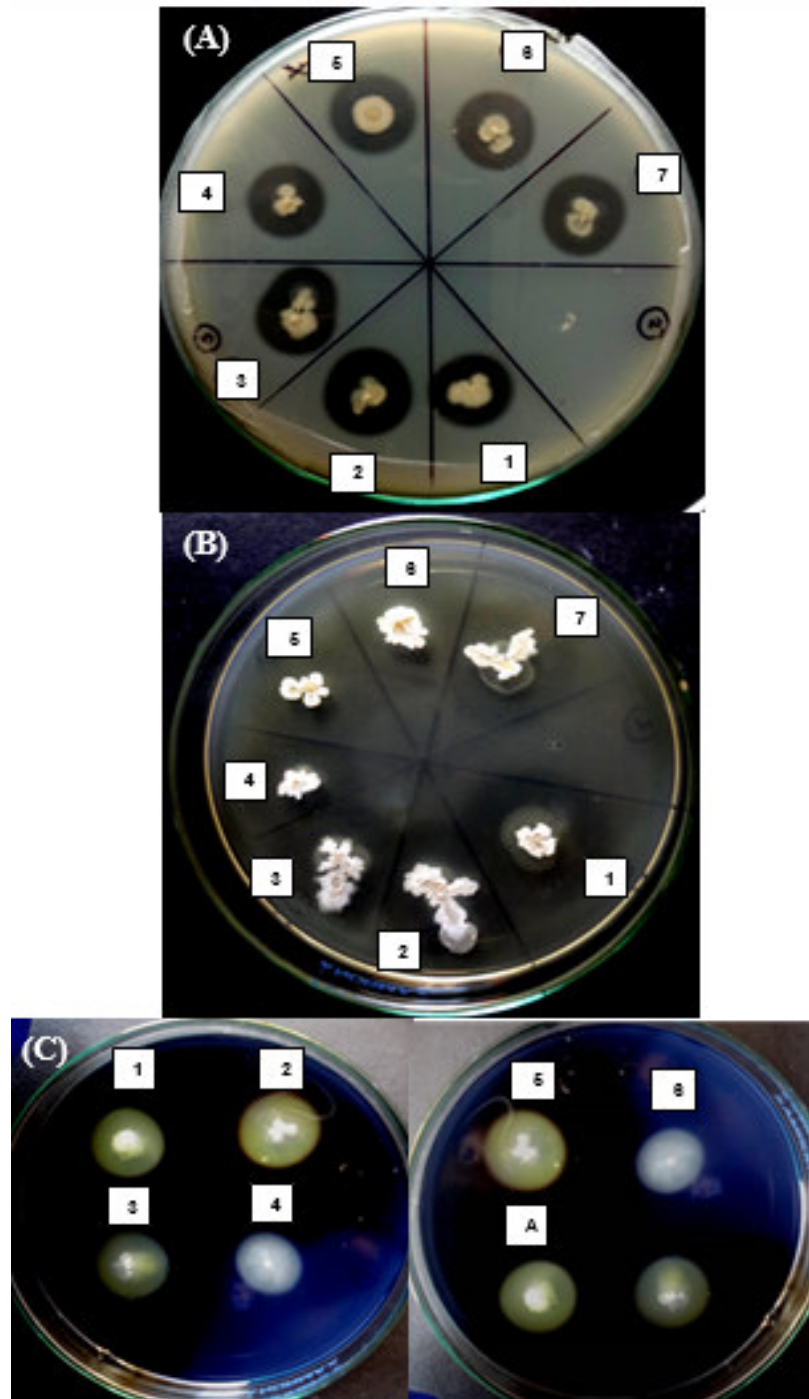


Figura 15. A: Actividad proteolítica (positiva) de las 6 cepas de *Bacillus* en medio con Agar leche, B: Actividad amilolítica (positiva) de las 6 cepas de *Bacillus* en medio con Agar Almidón revelada con lugol, C: Actividad de gelatinasa (positiva) 6 cepas de *Bacillus* en Medio Frazier. 1: MT2.I, 2: MT1.I, 3: MT1.II 4: MT3.P3, 5: MT2.II, 6: MT7.III.

Las cepas de *Bacillus* sembradas en medio Hicrome mostraron diferentes coloraciones, debido al manitol como carbohidrato fermentable en el medio, cuya fermentación es detectada por el rojo de fenol, las cepas MT1.II y MT3.P3, MT7.III, presentaron un color verde en el centro siendo presuntivo para *Bacillus subtilis* y *Bacillus firmus*, en cambio las cepas MT2.I y MT2.II presentaron pigmentación amarilla presuntiva para *Bacillus megaterium*, mientras la cepa MT1.I no mostro cambio de color (Fig. 16). En la prueba de citrato las cepas MT1.I, MT2.II, MT2.I y MT7.III cambian de color verde a azul siendo citrato positivo, mientras que las cepas MT1.II, y MT3.P3 permanecen color verde, citrato negativo así se muestra en la Figura 17.

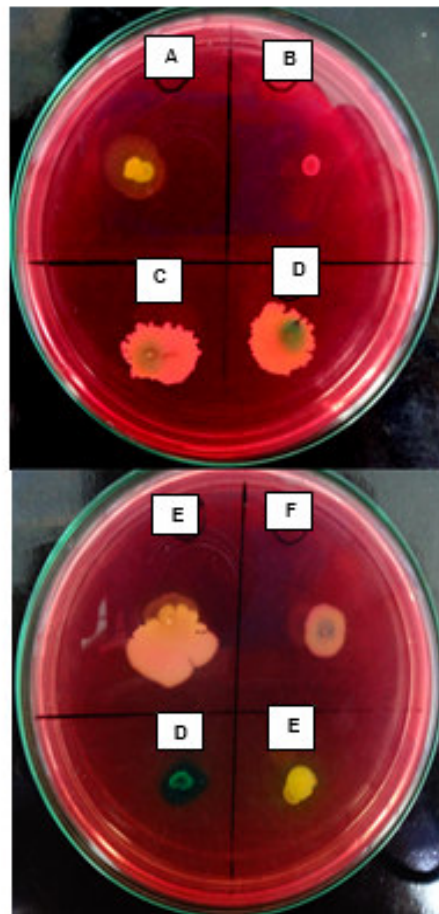


Figura 16. Diferenciación de especies de *Bacillus* en medio Hicrome *Bacillus*. A: MT2.I, B: MT1.I, C: MT1.II D: MT3.P3, E: MT2.II, F: MT7.III.

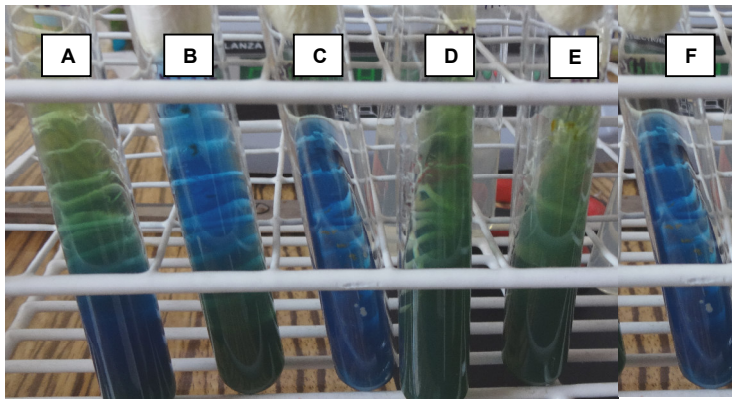


Figura 17. Prueba de asimilación de citrato para las cepas de *Bacillus*, las cepas A: MT1.I, B: MT2.I, C: MT2.II y F: MT7.II muestran citratos positivos; C: MT1.II, D: MT3.P3 son citrato negativo.

La caracterización bioquímica de *Bacillus* antagonistas se realizó en base a la prueba de asimilación y utilización de carbohidratos, se utilizó 5 carbohidratos: glucosa, arabinosa, manosa, manitol y lactosa (Tabla 7) .Tanto la utilización positiva como negativa de los azúcares se detectaron gracias al viraje del indicador azul de bromotimol, como se observa en la Figura 18. Los resultados de utilización de carbohidratos por las 6 cepas de *Bacillus* fueron variables (Tabla 8) esto por la cantidad de carbohidratos utilizados. Las 6 cepas de *Bacillus* dieron positivo para glucosa, lactosa y manosa mientras que las cepas MT1.II, MT2.I, MT2.II, MT7.III y MT3.P3 fueron positivo para manitol, MT1.I, MT7.II fueron positivas para arabinosa.

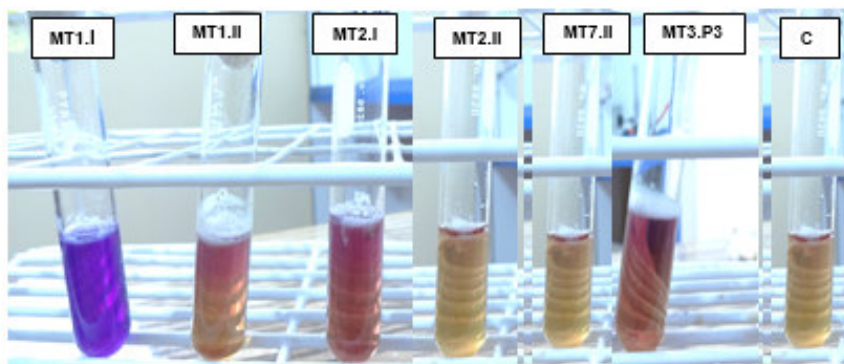


Figura 18. Prueba de asimilación y utilización de carbohidratos. Se muestra un viraje del indicador azul de bromotimol.

5.5.3. Crecimiento de *Bacillus* a diferentes valores de pH

Se evaluó el crecimiento de las cepas de *Bacillus* seleccionados a diferentes pH 5, 6, 7.5 y 9 en caldo nutritivo, probando su capacidad de crecimiento en suelos ácidos y básicos. Transcurrido el tiempo de crecimiento, se realizaron las mediciones y se halló la relación de crecimiento con respecto al control, que presentaba pH 7. En este ensayo, se pudo observar que todas las cepas lograron crecer a diferentes pH, sin embargo, se llegó a determinar que a pH 5, las cepas de *Bacillus* redujeron su eficiencia de crecimiento con respecto al control, mientras que a pH 7,5 obtuvieron una eficiencia de crecimiento mayor respecto al control (Tabla 7).

5.5.4. Crecimiento a diferentes concentraciones de NaCl.

Se evaluó el crecimiento de las cepas de *Bacillus* a diferentes concentraciones de NaCl 5, 7, 10% en caldo nutritivo (Fig.19). Las cepas de *Bacillus* MT1.I, MT2.I, MT2.II, MT3.P3 Y MT7.III crecieron óptimamente en medio nutritivo al 5% NaCl, las cepas MT1, MT2.I y MT3.P3 crecieron tenuemente a 7% NaCl mientras que las demás no crecieron, al 10% NaCl hubo ausencia de crecimiento por parte de las 6 cepas de *Bacillus*, tal como se muestra en la Tabla 7.

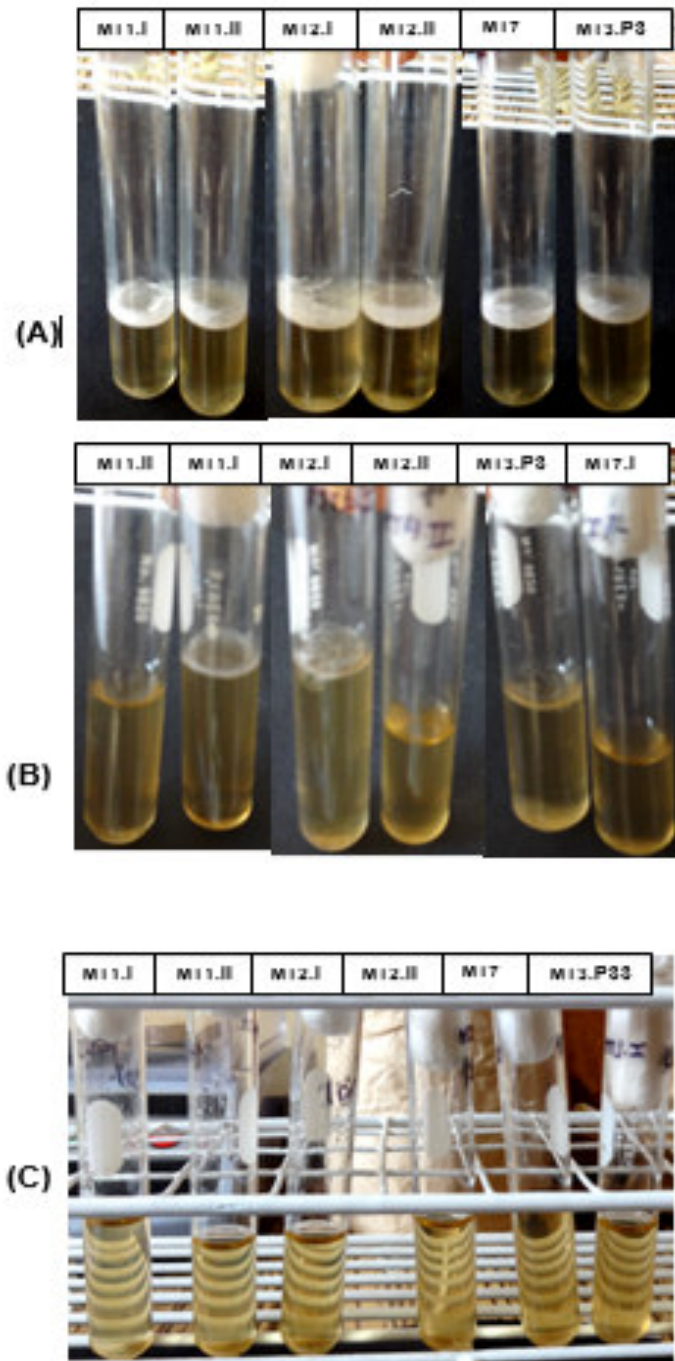


Figura 19. Crecimiento de cepas de *Bacillus* en concentración de NaCl al 5% (A). Crecimiento de cepas de *Bacillus* en concentración de NaCl al 7 % (B). Crecimiento de cepas de *Bacillus* en concentración de NaCl al 10% (C).

Tabla 7. Resultados de las pruebas bioquímicas de las cepas de *Bacillus* aislados de la rizósfera de cultivos de café.

| PRUEBA | MT1.I | MT1.II | MT2.I | MT2.II | MT3.P3 | MT7 |
|-------------------------------|-------|--------|-------|--------|--------|-----|
| Tinción Gram | + | + | + | + | + | + |
| Catalasa | + | + | + | + | + | + |
| Oxidasa | - | - | - | - | - | - |
| Motilidad | + | + | + | + | + | + |
| Voges Proskaver | - | + | + | - | + | + |
| Hidrolisis de: | | | | | | |
| Almidón | + | + | + | + | + | + |
| Caseína | + | + | + | + | + | + |
| Gelatina | + | + | + | + | + | + |
| Crecimiento NAACL | | | | | | |
| 5% | + | + | + | + | + | + |
| 7% | + | - | + | - | + | - |
| 10% | - | - | - | - | - | - |
| Crecimiento pH | | | | | | |
| 5 | + | + | + | + | + | + |
| 6 | + | + | + | + | + | + |
| 7,5 | + | + | + | + | + | + |
| 9 | + | + | + | + | + | + |
| Crecimiento T° | | | | | | |
| 30°C | + | + | + | + | + | + |
| 45°C | + | + | + | + | + | + |
| Utilización de citrato | + | + | + | - | - | - |
| Crecimiento anaeróbico | - | - | - | - | - | - |
| Fermentación de | | | | | | |
| Glucosa | + | + | + | + | + | + |
| Arabinosa | - | + | - | - | - | + |
| Manosa | - | + | + | + | + | + |
| Lactosa | + | + | + | + | + | + |
| Manitol | - | + | + | + | + | + |

+: Crecimiento

-: No crecimiento

5.6. Caracterización de cepas *Trichoderma* spp con actividad antagonista

5.6.1 Caracterización morfológica y observaciones microscópicas

Las colonias de *Trichoderma* crecidas en medio Agar Papa Dextrosa, donde se permitió observar en detalle las características de cada cepa como tamaño, color, tinción del medio, textura, borde, forma, presencia de anillos (Tabla 8, Fig. 20).

Tabla 8. Características morfológicas de cepas de *Trichoderma* con actividad antagonista a *Fusarium oxysporum*.

| Cepas de <i>Trichoderma</i> | Forma | Textura | Superficie | Color Rev. | Color Av | Borde | Color espora |
|-----------------------------|----------------------|------------|-------------|------------|----------------|--------|--------------|
| M3PI.I | Anillos concéntricos | Algodonoso | invasiva | Amarillo | Verde amarillo | Entero | Verde claro |
| MT5.I | Anillos concéntricos | Algodonosa | Superficial | Blanco | Blanco | Entero | Verde jade |
| MT14.e | Radial | Algodonosa | Supercial | Blanco | Blanco | Entero | Verde claro |
| MT12.A | Radial | Algodonosa | Superficial | Blanco | Blanco | Entero | Blanco |
| TL7.R | Radial | Algodonosa | Supercial | Blanco | Blanco | Entero | Blanco |
| B1.T | Anillo interior | Algodonosa | Superficial | Marrón. | Verde | Entero | Verde oscuro |
| MT24.I | Anillo interior | Algodonosa | Superficial | Blanco | Blanco | Entero | Verde jade |
| PLSO1 | Anillo concéntricos | Algodonoso | Elevada | Blanco | Blanco | Entero | Verde |
| MTS.I | Anillo interior | Algodonosa | superficial | Amarillo | Verde claro | Entero | Verde claro |

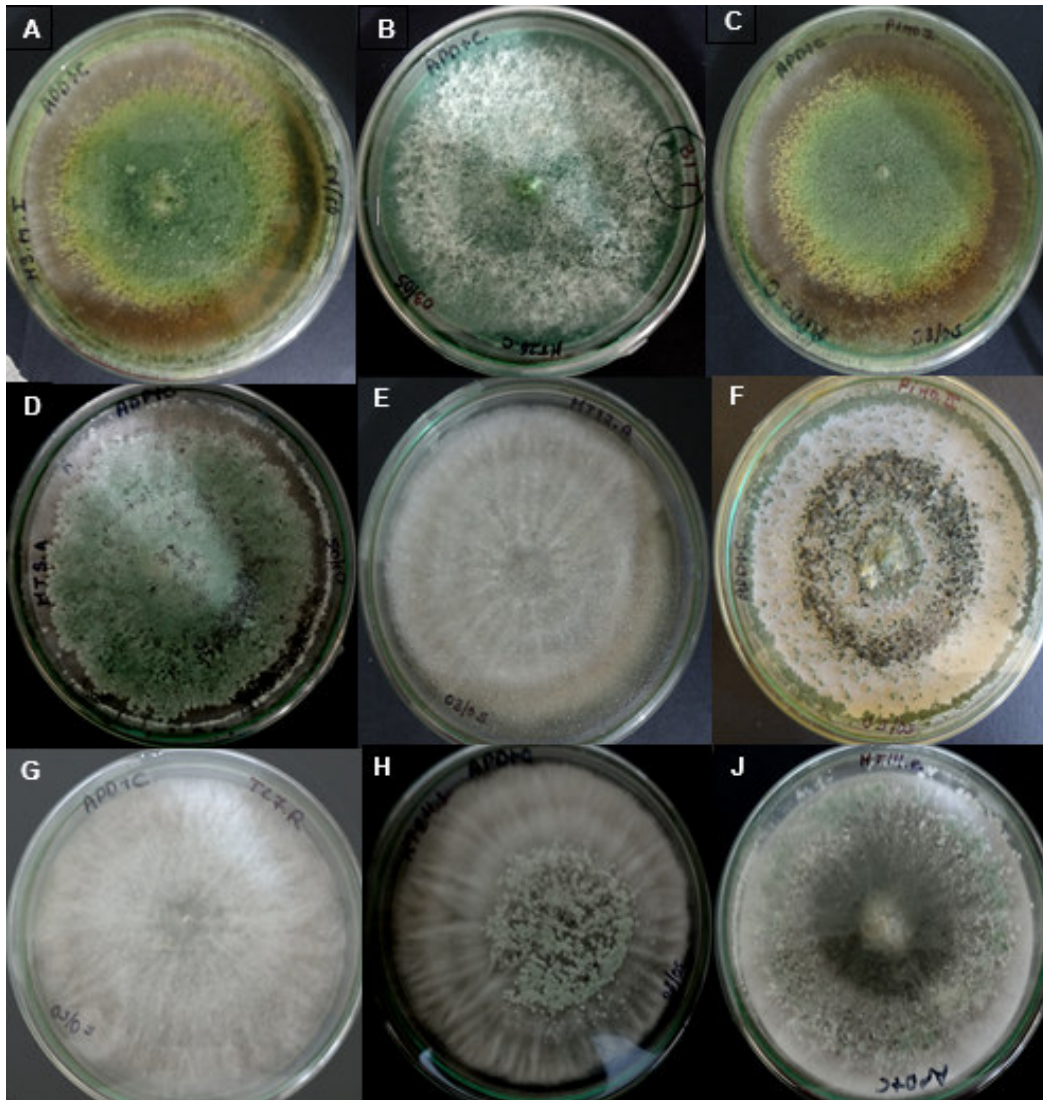


Figura 20. Morfología colonial de las 9 Cepas de *Trichoderma* sp con actividad antagonista a los 7 días de crecimiento A: M3PI.I, B: B1.T, C: MTS.I, D: MT5.A, E: MT12.A, F: PLSO1, G: TL7.R, H: MT24.I, J: MT14.e.

La Figura 21 muestra la velocidad de crecimiento de las cepas de *Trichoderma*, se observa que al quinto día las 9 cepas de *Trichoderma* ya alcanzaron toda su capacidad de crecimiento en placa, la cepa M3PI.I muestra una mayor velocidad de crecimiento con respecto a las demás cepas, estos resultados nos sirven para

comparar el tiempo de crecimiento de las cepas de *Trichoderma* sp y la de *F. oxysporum*

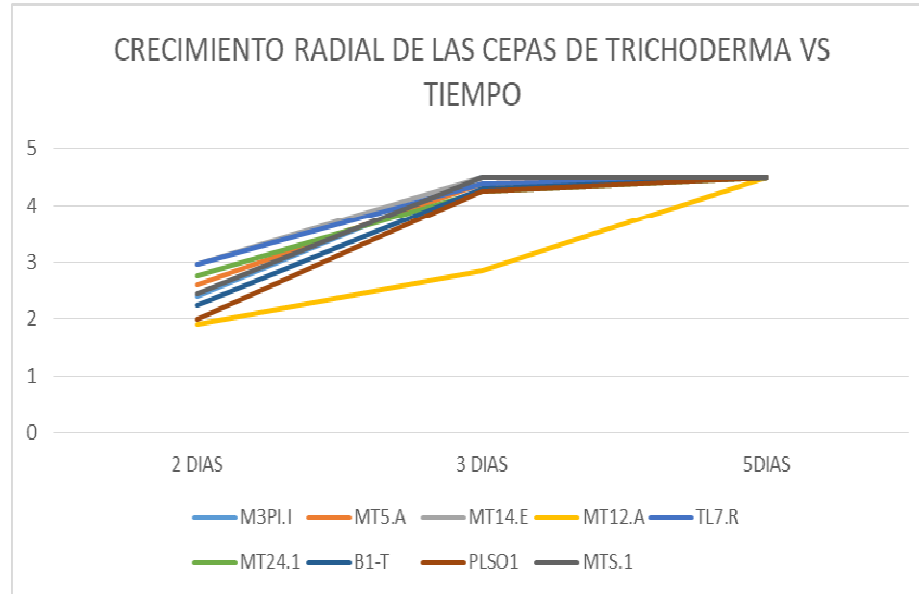


Figura 21. Crecimiento Radial de cada cepa de *Trichoderma* spp durante 5 días en Agar APD.

Los microcultivos de las cepas nativas de *Trichoderma* evaluadas por observaciones microscópicas de *Trichoderma* mostraron que las cepas MT12, MT5.A, TL7.R presentaron conidias ligeramente ovoides, dispuestas en roseta en grupos, clamidosporas globosas, fiálides apicales arregladas en verticilos cruzados en grupos de 3 a 4 y conidióforos ramificados. La cepa B1T presentó conidias ovoides y fiálides en par o triadas a lo largo del conidióforo, más anchas en el centro que en la base (Fig. 22). La cepa M3PI.I presento hifas ramificadas, de las cuales se desprenden conidióforos también ramificados, a partir de los cuales se desarrollan fiálides en forma de botella que producen los conidios muchas veces en formación de cabezas conidiales.

Sin embargo, debido a que las características macroscópicas y microscópicas son variables, no permiten diferenciar entre especies, lo cual muestra la importancia de la

caracterización molecular, es por ello que las 3 cepas con mayor actividad antagonista fueron identificadas molecularmente.

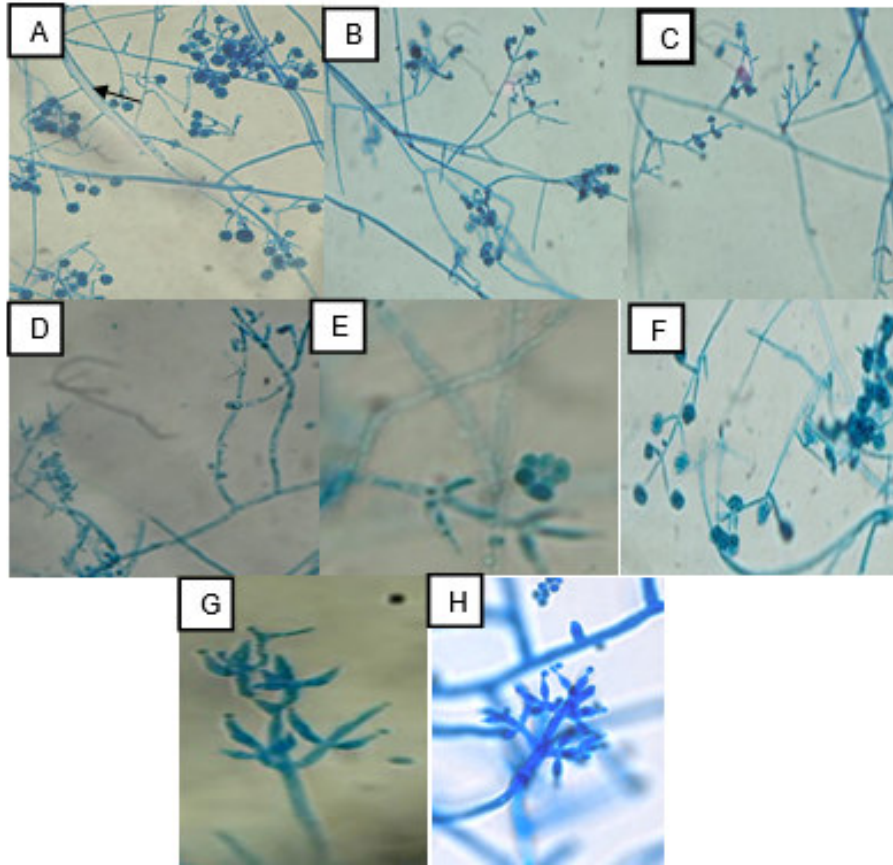


Figura 22. Características microscópicas de las cepas nativas de *Trichoderma* a un aumento de 10x y 40X. con tinción azul de lactofenol A: MT12, B: TL7R, C: MT5.A, D: MT14.e, E: B1T, F: M3PI.I , G: PLS01, MTS.1

5.7. Identificación molecular de cepas con mayor actividad antagonista M3PI.I, B1T, PLS01 y *Fusarium oxysporum*

En la Tabla 9 se muestran los resultados obtenidos en la identificación molecular de las cepas M3PI .I, B1T, PLS01 y del patógeno (*Fusarium oxysporum*), obtenida por comparación de secuencias de la región ITS1 e ITS4 mediante comparación con la base de datos del GenBank utilizando la herramienta BLAST.(Figura 23)La identificación de las cepas antagónicas mostraron porcentajes de similitud de hasta 98

% para las especies *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma sp*, y para patógeno, 99% a *Fusarium oxysporum*..

Tabla 9. Resultados de la identificación molecular de las cepas M3PI .I, B1T, PLS01 y *Fusarium oxysporum*

| Cepas | Especie | Código de acceso GenBank | % Similitud |
|--------|-------------------------------|--------------------------|-------------|
| M3PI.I | <i>Trichoderma sp</i> | MK389391 | 98% |
| B1T | <i>Trichoderma asperellum</i> | MK389392 | 98% |
| PLS01 | <i>Trichoderma sp</i> | MK389392 | 98% |
| MT1.F | <i>Fusarium oxysporum</i> | KJ756373.1 | 99% |

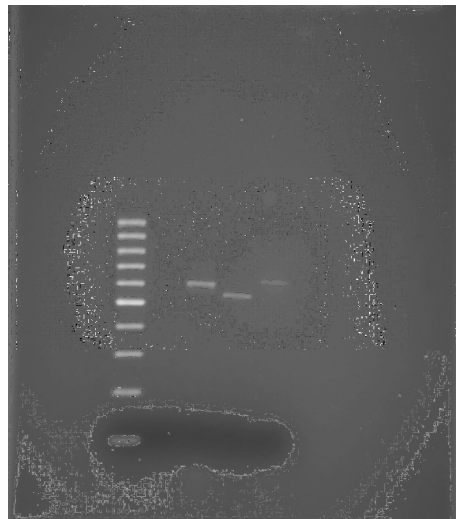


Figura 23. Electroforesis de fragmentos amplificados por PCR de los genes región ITS 1 e ITS 4 de cepas M3PI.I, B1T, PLS01, MT1.F de rizósfera de cafeto.

5.8. Análisis estadístico

La Tabla 10 y 12 está integradas por las fuentes de variabilidad, la suma de cuadrados, los grados de libertad (gl), las medias cuadráticas, el estadístico de prueba (F) y la significancia observada (p) asociado a cada estadístico F, siendo la variable

independiente el porcentaje de inhibición. La Tabla 10 muestra los resultados obtenidos al analizar la varianza de la variable de % de inhibición de *Fusarium oxysporum* frente a las cepas de *Trichoderma* spp.

Tabla 10. Análisis de varianza (ANOVA) para el porcentaje de inhibición de *Fusarium oxysporum* frente a cepas de *Trichoderma* spp.

ANOVA

PORCENTAJE DE INHIBICION (%)

| | Suma de cuadrados | GI | Media cuadrática | F | Sig. |
|------------------|-------------------|----|------------------|-------|------|
| Entre grupos | 11465,078 | 9 | 1273,898 | 3,405 | ,011 |
| Dentro de grupos | 7483,157 | 20 | 374,158 | | |
| Total | 18948,234 | 29 | | | |

Observamos que la significancia obtenida es 0.011, la cual es menor a $\alpha=0.05$ por lo tanto, podemos decir que al menos dos o más de los tratamientos presentan diferencias significativas. Considerando la diferencia significativa observada entre las variables evaluadas se realizaron pruebas de comparaciones múltiples de medias de Tukey, cuyos resultados se pueden observar en la Tabla 11.

Tabla 11. Resultados de la prueba de comparaciones múltiples de medias de Tukey.

PORCENTAJE DE INHIBICION (%)

HSD Tukey^a

| TRATAMIENTO | N | Subconjunto para alfa = 0.05 | |
|-------------|---|------------------------------|---------|
| | | 1 | 2 |
| T10 | 3 | ,0000 | |
| T4 | 3 | 30,0600 | 30,0600 |
| T5 | 3 | 42,4800 | 42,4800 |
| T8 | 3 | 47,8800 | 47,8800 |
| T6 | 3 | 49,7467 | 49,7467 |
| T2 | 3 | 50,9833 | 50,9833 |
| T3 | 3 | | 55,9467 |
| T7 | 3 | | 65,2567 |
| T9 | 3 | | 66,4967 |
| T1 | 3 | | 69,2300 |
| Sig. | | ,093 | ,334 |

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

En la comparación de medias de los porcentajes de inhibición de *Fusarium oxysporum* frente a los *Bacillus* antagonistas, la tabla 10 demuestra que el tratamiento T4 (cepa MT12.A) se presenta el porcentaje de inhibición más bajo con respecto a la media (30,0600%) el cual difiere de los demás valores calculados, seguido de los porcentajes frente al tratamiento T5 (cepa TL7.R) con 42,4800%, T8 (PLS01) con 47,8800% y T6 (MT24.I) con 49,7467 % estos tres últimos tienen un porcentaje de inhibición similar menor al 50%, mientras que el mayor porcentaje se observó frente al tratamiento T1 (M3PI) con 69,2300% en la media de los porcentajes de inhibición, lo cual indica que las cepas de *Trichoderma* presentan una buena actividad antagonista frente a *Fusarium oxysporum*. Por otro lado, la Tabla N° 13 muestra los resultados obtenidos al analizar la varianza de la variable de crecimiento de *Fusarium oxysporum* frente a las cepas de *Bacillus* (tratamientos). Observamos que la significancia obtenida es 0.0, el

cual es menor a $\alpha=0.05$, por lo tanto, podemos decir que al menos dos o más de los tratamientos presentan diferencias significativas.

Tabla 12. Resultados de análisis de varianza (ANOVA) de la variable crecimiento de *Fusarium oxysporum* frente a *Bacillus*.

ANOVA

CRECIMIENTO DEL PATG (CM)

| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|------------------|-------------------|----|------------------|--------|------|
| Entre grupos | 16,001 | 6 | 2,667 | 16,445 | ,000 |
| Dentro de grupos | 2,270 | 14 | ,162 | | |
| Total | 18,271 | 20 | | | |

Considerando la diferencia significativa observada entre los factores evaluados se realizaron pruebas de comparaciones múltiples de medias de Tukey, cuyos resultados se pueden observar en la Tabla 13.

Tabla 13. Resultados de la prueba de comparaciones múltiples de medias de Tukey.

PORCENTAJE DE INHIBICION (%)

| | TRATAMIENTO | N | Subconjunto para alfa = 0.05 | |
|------------------------|-------------|---|------------------------------|---------|
| | | | 1 | 2 |
| HSD Tukey ^a | T7 | 3 | ,0000 | |
| | T5 | 3 | | 58,6433 |
| | T4 | 3 | | 59,6733 |
| | T2 | 3 | | 59,8367 |
| | T1 | 3 | | 63,1700 |
| | T6 | 3 | | 64,7533 |
| | T3 | 3 | | 65,5533 |
| | Sig. | | | 1,000 |
| Duncan ^a | T7 | 3 | ,0000 | |
| | T5 | 3 | | 58,6433 |
| | T4 | 3 | | 59,6733 |
| | T2 | 3 | | 59,8367 |
| | T1 | 3 | | 63,1700 |
| | T6 | 3 | | 64,7533 |
| | T3 | 3 | | 65,5533 |
| | Sig. | | | 1,000 |

En la comparación de medias de los porcentajes de inhibición del fitopatógeno frente a los antagonistas, la tabla 9 demuestra que frente T5 (cepa MT3.P3) presentan el porcentaje de inhibición más bajo con respecto a la media de 58,6433%, seguido de los porcentajes frente a T4 (cepa MT2.II) con 59,6733%, T2 (MT1.II) con 59,8367, estos tres últimos tienen un porcentaje de inhibición similar mayor al 50%, mientras que el mayor valor se observó frente a T3 (M3PI) con 65,5523 % en la media de los porcentajes de inhibición, lo cual indica que las cepas de *Trichoderma* presentan una buena acción inhibitoria frente a este fitopatógeno ya que todas las cepas obtuvieron un porcentaje de inhibición mayor al 50 %.

DISCUSIÓN

En los últimos años la caficultura peruana viene enfrentando una serie de problemas fitosanitarios en las diversas etapas del cafeto generalmente son causadas por hongos, como roya (*Hemileia vastatrix*), antracnosis (*Colletotrichum coffeanum*), ojo de gallo (*Mycena citricolor*), etc. Siendo *Fusarium* sp uno de los hongo que en etapa de vivero tiene mayor repercusión causando damping off. (Chen, 1987; Craft & Nelson, 1996; Santos & Bettiol, 2003). La infección por el género *Fusarium* penetra y actúa en la parte aérea de la plántula de café, su síntoma muestra una necrosis que empieza en la raíz y termina en la parte aérea. Ante esta problemática el control biológico es considerado una alternativa importante dentro del manejo integrado de plagas, resaltando el rol benéfico de los microorganismos para contrarrestar enfermedades fúngicas (Vessey, 2003).

En la primera parte del presente trabajo de investigación para el aislamiento del fitopatógeno *Fusarium oxysporum* se tomó muestras de raíces con sintomatología similar a la que describe Nina *et al* .(2011) en su investigación la capacidad biocontroladora de cepas nativas de *Trichoderma* spp sobre *Fusarium* sp en café, la cual determinó que los agentes causales actúan en lugares específicos de las plantas de café: En la infección por el género *Fusarium* sp penetró y actuó en la parte aérea de la plántula de café, su síntoma fue una necrosis que empieza en la raíz y termina en la parte aérea. En nuestras muestras de raíces con la sintomatología citada el 80 % estaba infectada por *Fusarium*, pudiendo verificar que este fitopatógeno comienza a infectar en lugares específico en cafeto tal como lo cito Nina *et al*. (2011).

Las características morfológicas y microscópicas de *F. oxysporum* en nuestra investigación, se observó el crecimiento de colonias de apariencia algodonosa y de color blanquecino-rosado en los primeros días de desarrollo que, conforme el micelio

se desarrolló, se tornó de un color levemente púrpura en el centro del mismo. Por el reverso de la placa Petri se observó un color morado oscuro hacia el centro, en la observación microscópica, se observó la forma típica de los macroconidios, aunque con algunas diferencias entre ellos, unos son más cortos y otros menos curvos. En promedio cada uno tenía de 5 a 6 septos de igual forma, Retana (2018) en su investigación de caracterización morfológica y molecular de *F. oxysporum* afirma que en los últimos años esta ha causado serios problemas de marchitez en plantas a nivel productivo; para identificar y describir el fitopatógeno, aisló el hongo a partir de plantas enfermas provenientes de campo que presentaban los siguientes síntomas: retraso en la tasa de crecimiento, enanismo, amarillamiento marchitez en el follaje y reducción, oscurecimiento y daño en el sistema radical. Según la descripción morfológica del patógeno, características tales como la cantidad y presencia o ausencia de macro y microconidios, la apariencia del micelio (color y pigmentación) en medio Papa Dextrosa Agar (PDA), coinciden con nuestra descripción de *F. oxysporum* aislado en nuestra investigación.

En la segunda parte del presente trabajo se logró aislar 30 de cepas de *Bacillus* spp y 20 cepas de *Trichoderma* spp provenientes de la rizósfera de *Coffee arabica*, de los cuales las 6 cepas del género *Bacillus* MT2.I, MT1.II, MT3.P3, MT1.I, MT2.II, MT7.III y 9 cepas del género *Trichoderma* M3PI.I, B1.T, MTS.I, MT5.A, MT12.A, PLSO1, TL7.R, H: MT24.I, MT14.e. mostraron actividad antagonista frente a *F. oxysporum* ambos géneros resultaron ser eficientes para controlar a este fitopatógeno, siendo la cepa M3PI.I la que alcanzo el mayor porcentaje de inhibición micelial con un 80 %, mientras que la cepa de *Bacillus* MT2.I alcanzo un 71 %. De la misma manera autores como Astorga *et al.* (2014) aislaron cepas *Trichoderma* sp y *Bacillus subtilis* para controlar enfermedades radiculares provocadas por *Fusarium*, en el caso de las cepas de *Trichoderma* sp que utilizaron para la prueba antagónica mostraron un porcentaje de 60 % PICR, el cual es un indicador de la alta actividad de los

mecanismos de biocontrol disponibles por parte de *Trichoderma*. En sus pruebas *in vitro* se obtuvo evidencia de los procesos de competencia, antibiosis y parasitismo que logran la inhibición y destrucción de los fitopatógenos, los resultados que obtuvieron indicaron que las cepas de *Trichoderma* sp. pueden utilizarse como antagonistas frente a la pudrición vascular. Sin embargo, en este mismo trabajo los resultados de *Bacillus subtilis* no fueron los óptimos, pues la cepa aislada no logró controlar al patógeno.

Por otro lado, los resultados obtenidos por Constanza *et al.* (2011) sobre la evaluación del efecto biocontrolador de *Bacillus* spp , frente a *Fusarium* spp son similares a los obtenidos a la presente investigación mostrando que las cepas de *Bacillus* presentaron un buen desempeño en las pruebas antagónicas *in vitro*, resultado esperado ya que las especies del género *Bacillus* han sido reportadas como efectivos biocontroladores de múltiples fitopatógenos por su capacidad de producir varios antibióticos de amplio espectro, característica que ha permitido utilizarlos como fungicidas comerciales, sus cepas B1 (*Bacillus liqueniformis*) obtuvo un 71 % PCIR y B2 un 70%PCIR (*Bacillus subtilis*), resultados similares a nuestra cepa con la mayor actividad MT7.III con 71 % , esto nos muestra que *Bacillus* es efectiva contra *Fusarium* sp que probablemente sea por la capacidad de secretar lipopéptidos antibióticos del grupo Iturin cuyo mecanismo de acción va dirigida sobre la permeabilidad de la membrana y la composición lipídica de la célula fúngica, de tal forma que inhibe el crecimiento micelial y la esporulación del hongo.

En varias investigaciones se describe que algunas cepas del genero *Bacillus* no solo son eficientes controladores biológicos sino que también inducen diferentes mecanismos relacionados con la promoción de crecimiento en las plantas, ya sea que proporcionen directamente nutrientes, participen en la fijación de nitrógeno, fósforo y potasio, la solubilización de fosfato y otros nutrientes; o bien, que las plantas sean

capaces de producir hormonas vegetales y sustancias promotoras del crecimiento como el ácido indolacético o por la producción de sideróforos o antibióticos para la supresión de la microflora dañina a ésta (Hallmann *et al.*, 1997; Van Veen *et al.*, 1997).

Fernández *et al.* (2009) en su trabajo de antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium oxysporum* muestra resultados similares a nuestra investigación sobre el mecanismos de acción y porcentajes de inhibición que ejerce *Trichoderma* sp sobre *Fusarium oxysporum* donde el estudio por competencia de nutrientes y espacio, al hacer la comparación diaria del radio del crecimiento antagonista (RCA), con el radio de crecimiento patógeno (RCP) de cada cultivo dual, se encontró que los aislamientos de *Trichoderma harzianum* nativos se desarrollaron a una velocidad superior a la de *Fusarium oxysporum*. Debido a que los aislamientos del antagonista tuvieron un crecimiento promedio de 7,42 cm al décimo día en enfrentamiento, muy similar al promedio de sus testigos (7,55 cm) ; mientras que el patógeno mostró un crecimiento limitado en cultivo dual, con un promedio de 1,99 cm al décimo día, comparando con nuestros resultados sobre la velocidad de crecimiento nuestras cepas de *Trichoderma* mostraron un crecimiento promedio de 7,7 cm al séptimo día de enfrentamiento, mientras que el *Fusarium* mostró un crecimiento limitado en cultivo dual, con un promedio de 1,3 cm al séptimo día, mostrando que nuestras cepas tienen una mayor velocidad de crecimiento que las que citadas por Fernández *et al.* (2009).

Lo anterior permite plantear que con los aislamientos nativos de *Trichoderma* es probable llegar a un eficaz control de *Fusarium oxysporum* de forma preventiva a nivel de campo, aplicando el antagonista antes y en el momento de la siembra de la planta, estimulando la colonización de la rizósfera por la rapidez de crecimiento del hongo, impidiendo el desarrollo y la llegada del patógeno a la planta, siendo favorable cuando el antagonista se encuentra adaptado a las condiciones ambientales del medio (Bernal

et al., 2000), sin embargo, es necesario realizar estudios a nivel de invernadero, no solo para determinar su efectividad *in vivo*, sino para hallar la concentración de esporas/ml apropiada para la aplicación.

Con respecto al porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR), que mostraron nuestras cepas de *Trichoderma* spp sobre *F. oxysporum*, todos los tratamientos presentaron una inhibición del crecimiento radial del patógeno superior al 55%. Resultados similares reportados por Michel *et al.* (2001), quien halló un nivel de PICR de 69,5%, afirma que *Trichoderma harzianum* es capaz de inhibir del crecimiento de fitopatógenos porque produce numerosos antibióticos como la trichodermina, la suzukacilina, la alameticina, la dermadina, la penicilina, los trichotecenos, las trichorzianinas, entre otros, probablemente estos aislamientos antagónicos utilizaron este método de supresión contra el patógeno.

Respecto a la caracterización morfológica y microscópica de las cepas con actividad antagonista de nuestra investigación, las 6 cepas de *Bacillus*: MT1.I, MT1.II, MT2.I, MT2.II, MT3P3, MT7 presentaron tinción Gram positiva, presentando características típicas del género *Bacillus*, como morfología de bastones para todas ellas. Las cepas MT1.II, MT3.P3 y MT7.III mostraron una morfología celular similar bastones medianos distribuidos en cadenas pequeñas, pares y bastones solos, por otra parte las cepas MT2.1 y MT2.II mostraron formas de bastoncillos alargados de mayor tamaño en relación a las demás cepas y MT1.II mostro bastones más pequeños.

En la descripción morfológica, se observa que una característica común en todas las colonias de *Bacillus* es su forma irregular y color crema, la apariencia de los bordes de las colonias varía entre entera, lobulada, y ondulada; las elevaciones de las colonias suelen ser planas o acuminadas, la consistencia suele ser seca pero también se presentan colonias cremosas, la gran mayoría presenta una superficie opaca y tamaño

es variable. Estas características son similares a los que describe Calvo *et al.* (2010) en su trabajo de caracterización de *Bacillus* en base a la apariencia de la forma, borde, superficie, tamaño, consistencia, color y elevación de las colonias. Esta descripción se realizó después de 48 h de crecimiento del cultivo, incubado a 28°C, condiciones muy similares a nuestra investigación. Por otro lado, Wakita *et al.* (2007) reportan que las colonias de *Bacillus* presentan la característica de formar un anillo concéntrico y borde irregular en el centro. Esto es lo que se observó en la mayoría de cepas estudiadas de nuestra investigación.

Complementariamente, se realizaron otras pruebas de caracterización bioquímica para obtener un perfil metabólico más completo de las cepas de *Bacillus*. La prueba de asimilación de azúcares nos demostró que la tercera parte de los aislados de *Bacillus* (33 %) pueden utilizar todos los azúcares ensayados, los cuales fueron glucosa, sacarosa, manitol, arabinosa, manosa y lactosa. Mientras que las cepas MT2.II y M3.P3 utilizaron todos los azúcares con excepción de Arabinosa. En el trabajo Rico *et al.* (2009) trabajando con los mismos azúcares, y en comparación a este estudio, solo el 15% de sus aislados pudo utilizar la totalidad de azúcares.

En nuestra investigación, las cepas estudiadas MT7.III y MT3.P3 muestran un comportamiento que las relacionan con la especie *B. subtilis*, donde en medio Hicrome muestran una pigmentación verde, citrato positivo, prueba Voges Proskauer positivo y una tinción Gram similar, mostrando características similares a la que cita Calvo *et al.* (2010) en base a sus pruebas fisiológicas y bioquímicas para esta especie.

Las cepas MT2. I y MT2.II se diferencian de las demás porque en medio Hicrome *Bacillus* muestran una pigmentación amarilla, no utilizan arabinosa y crecen NaCl al 7 % y 5 %, prueba de Voges Proskauer negativo y citrato positivo, lo que las relaciona más con el género *B. megaterium*. La cepa MT1.I muestra una pigmentación verde en medio Hicrome *Bacillus*, prueba de Voges Proskauer negativo, arabinosa negativa y

citrato positivo mostrando un perfil similar a *Bacillus firmus*. Estos últimos resultados son similares a los de Lagunas *et al.* (2001) sobre la caracterización de 3 cepas de *Bacillus*: B2, B3y B10 que presentaron tinción Gram positiva, crecimiento aerobio, utilizaron glucosa y manitol, pero no arabinosa y xilosa; hidrolizaron almidón y caseína, crecieron en NaCl al 7% y a 10°C, y no utilizaron el citrato. Por todo lo anterior, se identificó como *Bacillus firmus*.

Respecto a la caracterización morfológica de cepas de *Trichoderma* con actividad antagonista de la presente investigación, los aislados presentaron la forma típica de las colonias de *Trichoderma* sp. con formación de anillos concéntricos de color verde en los sitios de esporulación, el color verde varió de tono en cada uno de los aislados, las cepas B1.T, MTS.I, MT14.e, durante los primeros días el color del micelio fue blanco y luego desarrollaron un color verde oscuro después de la esporulación, las cepas M3PI.I, PLSO1 durante los primeros días el color del micelio es blanco y luego desarrollaron un color verde claro – amarillo, mientras que las cepas MT12.A y TL7.R mostraron un micelio blanco a largo de su crecimiento por ultimo las cepas MT5.A, MT24.I presentaron una coloración verde jade luego de la esporulación. Todas las cepas de *Trichoderma* utilizadas en esta investigación crecieron rápidamente a los cinco días de incubación en medio de cultivo agar papa (PDA) a 25°C.a un pH ácido de 5. Según el trabajo de Hernández *et al.* (2011), sobre caracterización molecular y morfológica de aislados de *Trichoderma* spp nativos ,muestra características similares a las cepas de *Trichoderma* aisladas en nuestra investigación ,sus aislamientos se realizaron en medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA) por el método de diluciones , para ello seleccionaron las colonias que presentaron las características morfológicas de *Trichoderma* spp, entre las que se destacan: la morfología, la forma, el color y el crecimiento de la colonia, sus resultados fueron reforzados por una caracterización molecular de las cepas de *Trichoderma* , las

especies identificadas correspondieron a *T. hammatum*; *T. koningiopsis*; *T. asperellum* y a *Trichoderma* sp respectivamente.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la investigación expuesta, este estudio sugiere la utilización del género *Bacillus* y *Trichoderma* en consorcios , debido a su actividad antifúngica frente a hongos fitopatógenos del cafeto y sus roles de promotor de crecimiento vegetal, como alternativa frente al uso de agroquímicos y con ellos proteger la salud del agricultor, reducir la contaminación ambiental, el deterioro de los campos de cultivo y la disminución de la resistencia de los fitopatógenos, beneficiando el aumento de la producción y calidad del cafeto.

Uno de los objetivos a futuro será el de formar consorcios de bacterias y hongos antagonistas como una alternativa promisoría en el control biológico de fitopatógenos con alta versatilidad ecológica en condiciones de invernadero.

CONCLUSIONES

- A. Se aisló bacterias nativas de los géneros *Bacillus* y *Trichoderma* de la rizósfera de *Coffea arabica* de las zonas del Valle del Monzón, Perú con potencial antagonista frente a hongos fitopatógenos como *Fusarium oxysporum*
- B. Los géneros *Bacillus* y *Trichoderma* son habitantes comunes en la rizósfera de café, que a su vez demuestra una gran diversidad intraespecífica que se confirma con las diferentes formas de crecimiento, tanto a temperaturas de 28 °C como a pH 5, donde las cepas ejercen una acción específica mediante la producción de metabolitos secundarios y varios mecanismos de acción.
- C. En base a las pruebas de caracterización fenotípica, las cepas M3PI.I, B1.T, MTS.I, MT5.A, MT12.A, PLSO1, TL7.R, MT24.I, MT14.e. Pertenecen al género *Trichoderma* y MT1.I, MT1.II, MT2.I, MT2.II, MT7, MT3P3 pertenecen al género *Bacillus* .
- D. De las 30 cepas de *Bacillus* spp solo 6 tuvieron actividad antagonista, mientras que de las 25 cepas de *Trichoderma* spp, 9 tuvieron actividad antagonista.
- E. Tanto *Bacillus* como *Trichoderma* mostraron actividad antagonista frente a *Fusarium oxysporum*, siendo las cepas de *Trichoderma* M3PI.I BIT, MTS.I las más eficiente, alcanzando un porcentaje de inhibición de 80%; mientras que las cepas de *Bacillus* MT2.I obtuvo un porcentaje de 71%.
- F. Los aislamientos de *Trichoderma* M3PI.I, B1.T, MTS.I, MT5.A, MT12.A, PLSO1, TL7.R, MT24.I, MT14.e presentaron un modo de acción favorable por competencia de nutrientes y espacio, superando el crecimiento de *F. oxysporum*, inhibiendo en más del 50% el desarrollo de este. El aislamiento M3PI.I, resulta más promisorio para la búsqueda de un antagonista en el control de *F. oxysporum* en regiones agroclimáticas similares a la zona del Monzón –Huánuco.

RECOMENDACIONES

- Continuar la investigación sobre la selección de cepas de *Bacillus* y *Trichoderma* aislados de la rizósfera de *Coffea arábica* y su capacidad antagonista frente a otros fitopatógenos del café no evaluados en este estudio, pero que también son de importancia fitosanitaria en el país.
- Complementar la investigación de *Bacillus* y *Trichoderma* productores de sustancias antifúngicas con la evaluación de la curva de crecimiento microbiano para encontrar el tiempo de desarrollo en cultivo donde produce la mayor cantidad de estos compuestos.
- Para verificar con certeza las especies de *Bacillus* spp se recomienda utilizar un sistema analítico de identificación rápida como API 50 CHB y en lo posible pruebas de identificación molecular.
- Se recomienda probar en pruebas piloto en el campo a los géneros *Trichoderma* y *Bacillus* que mostraron gran capacidad antagónica.
- Realizar un estudio de metabolitos secundarios que permita conocer los compuestos que son responsables del antagonismo de los hongos y bacterias estudiados.
- Evaluar la actividad antagonista de consorcios de bacterias y hongos como una alternativa promisoría en el control biológico de fitopatógenos con alta versatilidad ecológica en condiciones de invernadero.

BIBLIOGRAFIA

1. ARCILA, P. ; JARAMILLO, R. y CHAVES, C. Acumulación de materia seca y extracción de nutrimentos por *Coffea arabica* L Colombia en tres localidades de la zona cafetera central. Cenicafé. 2004, 55 (4):265-276.
2. AGRIOS .Fitopatología 2da edición. México ,1995. 838 p.
3. AGROBANCO. Cultivo del café, 2008. www.pdfactory.com
4. ALEXOPOULOS, C.; MMS, C. y BLACKWELL, M. Introductory mycology .Cuarta edición Jhon Willey & Sons .Nueva Yorkk ,2008. 869pp.
5. ANAMURO, H.; ARBOLEDA, V. y ARCILA P. Colinas de café descopados, una opción para obtener altas densidades de siembra a menos costo. Avances técnicos Cenicafe, 2015. Nª 309 1-4
6. ASTORGA, K. Evaluación in vitro del antagonismo de *Bacillus subtilis* estirpe silvestre y *Trichoderma* spp. frente a cepas aisladas e identificadas de *Sclerotium cepivorum*, *Pseudomonas marginalis* y *Penicillium* sp., patógenos de ajo (*Allium sativum* L.). Trabajo final de graduación Ingeniería en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica, 2012.
7. ÁVILA, R.; SADEGHIAN, K.; SANCHEZ A. y CASTRO F. Producción de almácigos de café en el departamento de Santander con diferentes fuentes de materia orgánica y fosforo. Avances Tecnicos .2008, Cenicafe Nª 336 1-12.
8. BADIA, M.; HERNÁNDEZ, B. y MURREL, J. Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus* asociadas al cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Revista Brasileira de Agroecología*, 2011. 6(1), 90-99 ISSN: 1980-9735.

9. BARNETT, H. y BARRY, G. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. *The American Phytopathological Society St. Paul*. 2006, Vol 3, p .31-39.
10. BELL, D.; WELL, H. y MARKHAM, C. In vitro Antagonism of *Trichoderma* Species Against Six Fungal Plant Pathogens. *Phytopathology*. 1982, 72: 379-382, EE. UU.
11. BENÍTEZ, T.; DELGADO, J.; RINCÓN, A. y Rey, M .Biofungicidas *Trichoderma* as a biocontrol agent against phytopathogenic fungi. In Pandalai SG. Recent research developments in Microbiology. 1998, Vol 2. Research Singpost, Trivandrum, pp 129-150.
12. BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A.; LIMÓN, C.; REY, M. y DELGADO, J. Mejora de cepas de *Trichoderma* para su empleo como biofungicidas. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2000; 17:S31-S36.
13. BENÍTEZ, A.; RINCÓN, M. y LIMÓN. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 2004. 7:249-260.
14. BENÍTEZ, L.; VOLTOLINI, R y MAGNO, M. Aislamiento y caracterización de péptidos antifúngicos producidos por *Bacillus amyloliquefaciens* LBM5006. *The Journal of Microbiology*, 2010. Volume 48, Issue 6, pp 791–797.
15. BERGEY D. y JOHN, H .Bergey's manual of determinative bacteriology. Philadelphia, 2000 .9th ed, 787 pág.
16. BERNAL, A.; ANDRÉU, M.; MOYA, M.; GONZÁLEZ, O y FERNÁNDEZ. Utilización de *Trichoderma* spp como alternativa ecológica para el control de *Fusarium oxysporum* Schlecht f.sp cubense (e.f. Smith) Snyder & Hans, 2000.

17. CALVO, P. y ZÚÑIGA, D. Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). *Ecología aplicada*, 2010. 9(1), 31-39.
18. CARRILLO, F.; SUÁREZ, J. y SANZ, R. Cómo obtener una buena muestra para el análisis de suelos. *Cenicafé*, 1995. *Avances Técnicos* 214: 1-4
19. CASTRO, A. y RIVILLAS, C. Antagonismo “in vitro” de *Trichoderma harzianum* sobre hongos patógenos de café. Centro Nacional de Investigaciones de Café. *Cenicafé. Colombia*, 2010.60 (22): 7259–7267.
20. CRAFT, C. y NELSON, E. Microbial properties of compost that suppress damping-off and root rot of creeping bentgrass caused by *Pythium graminicola*. *Appl Environ Microbiol*, 1996. 65(5):1550-1557.
21. CENTENO, A. Niveles de producción y de calidad del café (Coffe arábica) bajo sombrero de guamo *Inga* ssp y a libre exposición solar durante (La afectación del periodo del niño.) en la vereda Criollo Timana- Huila. Proyecto de grado presentado para optar al título de Ingeniera Agroforestal. Colombia, 2016. 19-41pag.
22. CHEN, W., HOITINK, H.A. Y SCHMITTHENNER, A.F. Factors affecting suppression of *Pythium* damping off in container media amended with composts. *Phytopathology*, St. Paul ,1987.77:755-760.
23. CONSTANZA, L., SÁNCHEZ, L.C., JOYA, J.A. Efecto biocontrolador de *Bacillus* spp., frente a *Fusarium* sp., bajo condiciones de invernadero en plantas de tomillo (*Thymus vulgaris* L.). 2012. Nova. Publicación científica en ciencias biomédicas issn 1794 - 2470 vol. 10.

24. COOK, J. Y BAKER, K. La naturaleza y práctica del control biológico de patógenos de plantas. St. Paul, Minnesota. La Sociedad Americana de Fitopatología, 1989. 539 p.
25. DATNOFF, L.; NEMEC, S. y PERNEZNY, K. Control biológico de la de *Fusarium* y la pudrición de la raíz del tomate usando *Trichoderma harzianum* y *Glomus intraradices*. Estación Experimental Agrícola de Florida, 1995. diario series No. R-04120 Biologica1 Control 5: 427-431.
26. DE COSTA, D. y ERABADUPITIYA, H. An integrated method to control postharvest diseases of banana using a member of the Burkholderia cepacia complex. Postharvest Biology and Technology, 2005. 36:31-39
27. DITA, R.; ECHEGOYÉN, R. y PÉREZ, L. Plan de contingencia ante un brote de la raza 4 Tropical de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense en un país de la región del OIRSA. Sanidad Vegetal. Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA). San Salvador, El Salvador. Sanidad Vegetal, 2013. 155 p.
28. DURÁN, E.; ROBLES, F.; MARTÍNEZ, J. Y BRITO, M. *Trichoderma* un hongo combatiente de patógenos. Revista Técnico Ambiental Teorema Ambiental, 2003. 42: 23-26.
29. ELLIOTT, M. Marchitez vascular causada por *Fusarium oxysporum*. .2010. Vol. 31 No. Especial, Tomo I.
30. EZZIYANI, M.; PEREZ, C.; REQUENA, M. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). 2006. *Anales de Biología* 26: 35-45.
31. FERNÁNDEZ, R.; VALERO, N.; GÁMEZ, R. y PÁEZ, A. (Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.)

- Sacc. Asociado a la marchitez en maracuyá. Revista Colombiana de Biotecnología, 2009. 10(3): 35-43.
32. GAMS Y BISSETT. Morphology and identification of *Trichoderma* in: *Trichoderma* and Gliocladium, 1998. Vol. 1 pp. 3-31
33. GILCHRIST, L.; FUENTES, D. y MARTÍNEZ, R. Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. 2 edición. México, D.F. 2005: CIMMYT.
34. GONSALVEZ, A. y FERREIRA, S. *Fusarium* Primer; General Information Summary. Department of Plant Pathology, College of Tropical and Agriculture and Human Resources. University of Hawaii at Manoa. Accesado. 2001. Disponible en <http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/Type/fusDrim.htm>
35. GUILLEN, R.; HERNÁNDEZ, F. y GALLEGOS, G. *Bacillus* spp. como Biocontrol en un Suelo Infestado con *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora capsici* Leonian y su Efecto en el Desarrollo y Rendimiento del Cultivo de Chile. Revista Mexicana de Fitopatología, 2006. 105.
36. GONSALVEZ, A. y FERREIRA, S. *Fusarium* Primer; General Information Summary. Department of Plant Pathology, College of Tropical and Agriculture and Human Resources. University of Hawaii at Manoa. Disponible en <http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/Type/fusDrim.htm>. Acceso 22 /07/ 2001.
37. HARTMAN, J. y FLETCHER, J. *Fusarium* y podredumbre de la raíz de tomates en el Reino Unido. 1991. Volumen 40, Issue 1. Pag 85-92.

38. HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.; y KLOPPER, J. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, 1997. 43:895-914
39. HERNÁNDEZ, F.; AGUIRRE, A.; GUERRERO, E.; GALLEGOS, G.; FRÍAS, G.; LIRA, R. y CEPEDA, M. Actividad de *Bacillus* spp., y fungicidas sobre *Alternaria dauci* en zanahoria in vitro e in vivo. XXVII Congreso Nacional de Control Biológico. Los Mochis, Sinaloa, México. 2004. Resumen pp. 416-419.
40. HOWELL, C.R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease* .2003. 87(1): 4-10.
41. JARVIS, W.R. *Fusarium* y podredumbre de la raíz de los tomates. *Fitoprotección*, 1998. 69:49-64.
42. JANISIEWICZ, J. y KORSTEN, L. Control biológico de enfermedades poscosecha de frutos. *Annu Rev Phytopathol*. 2012. Pag 40:411-41.
43. JUNTA NACIONAL DEL CAFÉ. Café Peruano: Producción y exportación. Recuperado el 18 de marzo de 2015 de <http://juntadelcafe.org.pe/produccion-y-exportacion> .
44. KONEMAN, E.W. .Diagnostico microbiológico: Texto y atlas de color. Quinta Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 2001.
45. LAGUNAS-LAGUNAS, J.; ZAVALA, E.; OSADA, S.; ARANDA S.; LUNA, L. y VAQUERA, H. *Bacillus firmus* como agente de control biológico de *Phytophthora capsici* Leo. en jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Revista Mexicana de Fitopatología* ,2001. 19:57-65.

46. LIU, S.; LIAO, C.; LO, C.; YANG, H.; LIN, K. y PENG, K. Chrysophanol is involved in the biofertilization and biocontrol activities of *Trichoderma*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2006. 96:1-706.003
47. MANZO . Epidimiologia y manejo del mal de panamá Victor Rubio Susan y Alberto Fereres Castiel control biológico de plagas y enfermedades de los cultivos, 2013. 88(1).
48. MICHEL, A.; OTERO, M.; REBOLLEDO, O.; LEZAMA, R. y OCHOA M. Producción y efecto antagónico de quitinasas y glucanasas por *Trichoderma* spp., en la inhibición de *Fusarium subglutinans* y *F. oxysporum in vitro*. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*. 2005. 11(2):273-278.
49. MINAGRI (2003). Caracterización de las zonas cafetaleras en el Perú. Programa para el Desarrollo de la Amazonía. 16- 147pg
50. MINAGRI (2013). Situación del mercado del Café en grano. Oficina de Estudios Económicos y Estadísticos – OEEE.
51. MONTGOMERY, G.; BEST, R. y YAMAKOSHI, M. A radio-tracking study of the American manatee *Trichechus inunguis* (Mammalia: Sirenia). *Biotropica*, 1981. 13: 81 -85.
52. MONZÓN, A. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Avances en el fomento de productos fitosanitarios no-sintéticos. Manejo Integrado de Plagas. Costa Rica, 2001. Edición 63: 95-103.
53. MORA, J.R. Control biológico de la pudrición radicular por *Fusarium oxysporum* en semilleros de café usando endomicorriza y *Trichoderma*

- harzianum*. Programa Especial del Programa de Ingeniero Agrónomo, Zamorano, Honduras.2001. 42 p.
- 54.NINA, R.; ALMANZA, J. y LOZA, M. Evaluación de la capacidad biocontroladora de cepas nativas de *Trichoderma* spp sobre *Rhizoctonia* sp y *Fusarium* sp en café (*Coffea arabica*) en condiciones experimentales. 2011. J Selva Andina Res Soc; 2(1):43-52.
- 55.OIC, Convenio internacional de café.2013.
- 56.ORTIZ, A .Descripción de la sintomatología asociada a fusariosis y comparación con otras enfermedades en gulupa (*Passiflora edulis* Sims.) en la región del Sumapaz. Colombia, 2012
- 57.PAPAVIZAS, G. y DAVEY, C. Activity of *Rhizoctonia* in soil as affected by carbón dioxide. *Phytopathologu*.1982. 52:759-766.
- 58.PATIÑO, A. & FLORES, A. (2012). Evaluación de la efectividad en campo de cepas nativas de *Bacillus subtilis* BS-111 y *Trichoderma harzianum* TRHA-7 contra *Botrytis cinerea* “Pudrición gris” en Vid vinífera. XXI Reunión Científica del Instituto de Investigación de Ciencias Biológicas “Antonio Raimondi” ICBAR 2012, Ed. ICBAR – F. C. Biológicas, Res. pp.
- 59.PÉREZ, N. 2004. Control biológico de patógenos vegetales, Manejo ecológico de plagas. Ed. Agustín García 7:231-247
- 60.PROCAFE, 1998. Boletín Técnico. Manejo integrado de enfermedades en viveros de café. 2ed. El Salvador. Fundación Salvadoreña para investigaciones del café. 3:8.
- 61.RICO, L .; GUERRERO, B . Z .; LÓPEZ , A .; MUÑOZ , C . I.; GUEVARA, R. G .; TORRES , I . Y GONZÁLEZ, M. (2001). Búsqueda de

resistencia natural en plantas de chile (*Capsicum* spp.) contra aislados del complejo fúngico que causa pudrición de raíz. Querétaro: XXVIII Congreso Nacional de Fitopatología.

62. Rincon G., A. A.; Leguizamon C., J.E.; Arbelaez T., G. 1992. Control Biológico de Rhizoctonia solani con *Trichoderma* spp. En semilleros de café. Cenicafé (Colombia) 43(3):73-83.
63. Samaniego, J., Ulioa, A. & Herrera, T.(1989) .Hongos del suelo antagónicos de *Phymatorichum omnivorum*,” Fitopatología Mexicana 7(1): 86-95.
64. Samuels, G.J., Chaverri, P. & Farr, D.F. (2007). *Trichoderma* Online, Systematic Botany & Mycology Laboratory. Disponible en <http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>.
65. Tronconi, N., Pineda, C. & Ordoñez, M.(1997). Memoria 6to Seminario Nacional de Investigación y transferencia en Caficultura. Evaluación de productos químicos para el control de *Fusarium* spp. en semilleros. Tegucigalpa, Honduras.
66. Van Veen, J.A., Oberbeek, L.S., and Elsas, J.D. (1997). Fate and activity of microorganisms introduced into soil. Microbiology and Molecular Biology Reviews 61:121-135.
67. Ventura-Suárez, A. (2007). Caracterización morfológica y genética de la cepa Bt1-88. Tesis de Maestría. ENCB-IPN.
68. Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant and soil, 255(2), 571-586.

69. Wakita J., Shimada H., Itoh H., Matsuyama T. & Matsushita M. (2001).
Periodic Colony Formation by Bacterial Species *Bacillus subtilis*. Journal
of the Physical Society of Japan. 70: 911-919.
- Wilson, C.L., and Wisniewski, M.E. (1989). Biological control of
postharvest diseases of fruits and vegetables: An emerging technology.
Annual Review
70. WHIPPS, J.M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the
rhizosphere. Journal of Experimental Botany, v.52, p.487-51.
71. World Coffee Researchs (2016). Las variedades de café de
Mesoamérica y el Caribe. Disponible en: Varieties.worldcoffeeresearch.org.

ANEXOS 01

Plantaciones de cafeto infestado por *F.oxysporum*, en el caserío de Tazopampa - MONZON



Muestras recolectadas de la rizósfera de cafeto

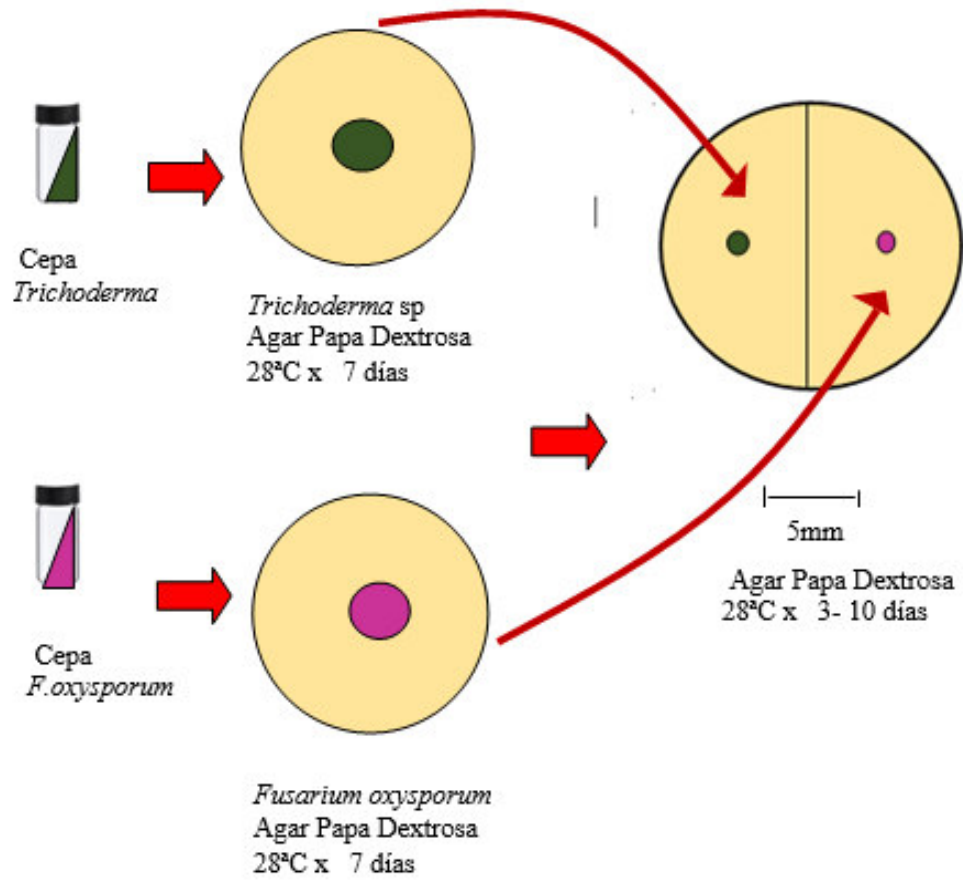


Muestra de raíz

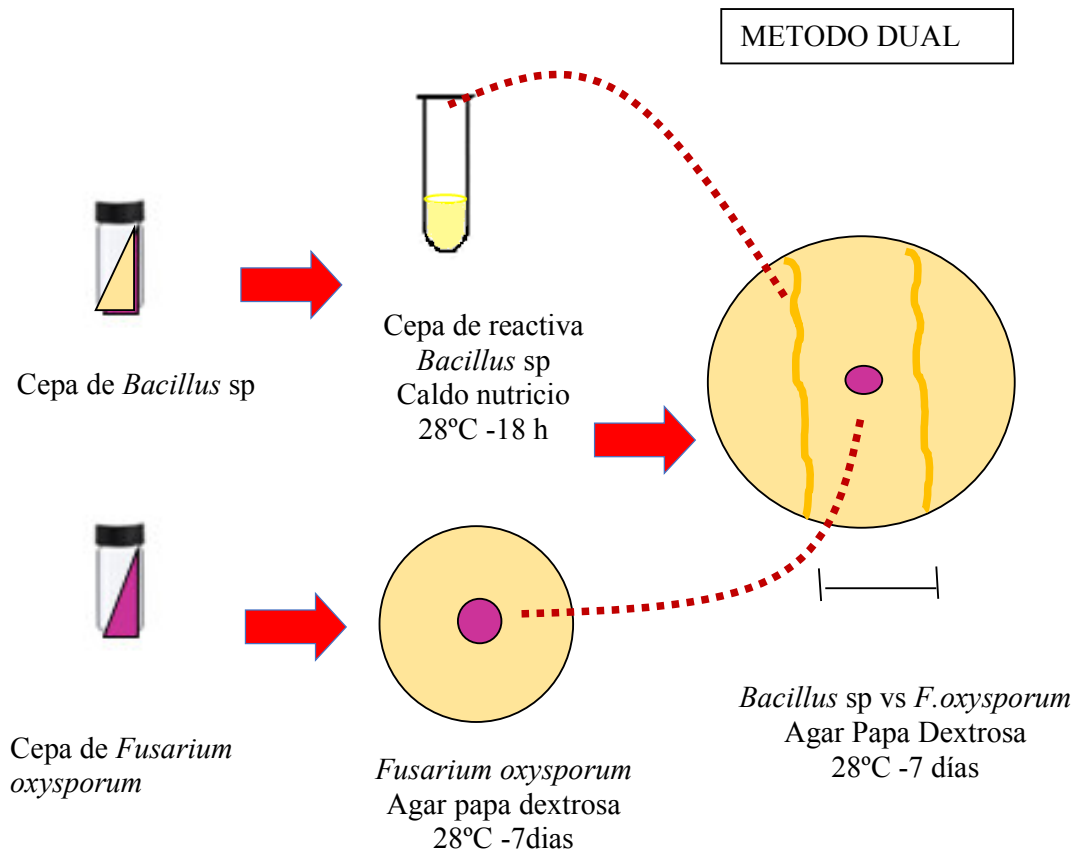
Muestra de tierra

ANEXO 2

METODO DUAL



Prueba *in vitro* de la capacidad antagonista de *Trichoderma* sp frente a *Fusarium oxysporum*



Prueba *in vitro* de la capacidad antagonista de *Bacillus* sp frente a *Fusarium oxysporum*

Anexo 3

MEDIOS DE CULTIVO

1. AGAR NUTRITIVO

| Componentes | g/L |
|----------------------|---------|
| Extracto de carne | 1,0 |
| Extracto de levadura | 2,0 |
| Peptona | 5,0 |
| Cloruro sódico | 5,0 |
| Agar | 15,0 |
| Agua destilada | 1000 ml |
| pH 7 | |

2. Agar Papa Dextrosa (APD)

| Componentes | g/L |
|------------------|---------|
| Infusión de papa | 4,0 |
| D-glucosa | 20,0 |
| Agar | 15,0 |
| Agua destilada | 1000 ml |
| pH 5,5 | |

3. Caldo Nutritivo

| Componentes | g/L |
|-----------------------|-------------|
| Pluripeptona | 5 |
| Extracto de carne | 3 |
| Agua destilada | 1000 |
| ml | |
| pH 7,0 ± 0,2 | |

4. Agar Almidón Caseína

| Componentes | g/L |
|---------------------------------------|------------|
| Almidón soluble | 10 |
| Caseína hidrolizada | 1 |
| KNO ₃ | 2 |
| NaCl | 2 |
| K ₂ HPO ₄ | 2 |
| CaCO ₃ | 0,02 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,05 |
| FeSO ₄ . 7H ₂ O | 0,01 |
| | |
| Agar – Agar | 18 |
| | |
| pH 7 | |

5. Agar Citrato de Simmons

| Componentes | g/L |
|-------------------------------------|-------------|
| Citrato de Sodio | 2 |
| Cloruro de Sodio | 5 |
| KPO₄ | 1 |
| K₂HPO₄ | 1 |
| MgSO₄ | 0,2 |
| Azul de bromotimol | 0,08 |
| Agar – Agar | 18 |
| | |
| pH 7 | |

6. Medio Sulfuro Indol Movilidad(SIM)

| Componentes | g/L |
|----------------------------|------------|
| Tripteina | 20 |
| Peptona | 6,1 |
| Sulfatodehierro | 0,2 |
| Tiosulfato de Sodio | 0,2 |
| Agar – Agar | 18 |
| pH 7 | |

7. Agar HiCrome *Bacillus*

| Componentes | g/L |
|---------------------------|------------|
| Peptic digest | 10 |
| Extracto de Malta | 1 |
| D-Mannitol | 10 |
| Sodium chloride | 10 |
| Chromogenicmixture | 3,2 |
| Phenol red | 0.025 |
| Agar – Agar | 18 |
| pH 7 | |

8. Agar Almidón

| Componentes | g/L |
|-----------------------|-------------|
| Pluripeptona | 5 |
| Extracto de carne | 3 |
| Agua destilada | 1000 |
| ml | |
| pH 7,0 ± 0,2 | |

9. Medio de Fermentación

| Componentes | g/L |
|-------------------------------|--------------|
| Extracto de carne | 1 |
| Peptona | 10 |
| Cloruro de Sodio | 5 |
| Purpura de bromocresol | 0,015 |
| pH 7,0 | |

10. Agar Caseína

| Componentes | g/L |
|--------------------------|-------------|
| Peptonade caseina | 5 |
| Extracto de Carne | 3 |
| NaCl | 5 |
| Caseína | 2 |
| CaCl₂ | 0,05 |
| Agar – Agar | 15 |
| pH 7 | |