



Por un Desarrollo Agrario
Integral y Sostenible

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

DIRECCIÓN DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

Trabajo de Tesis

Capacidad inhibitoria *in vitro* de productos sintéticos y biológicos sobre el crecimiento micelial de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary (Pythiales: Pythiaceae), Managua 2024

Autores

Br. Erwind José Vallejos Castillo
Br. Katherine Alexa Moreira García

Asesores

MSc. Eliezer Hazael Lanuza Rodríguez
MSc. Isaías Ezequiel Sánchez Gómez

Presentado a la consideración del honorable Comité Evaluador como requisito final para optar al grado de Ingeniero en Sanidad Vegetal

Managua, Nicaragua

Abril, 2025

Este trabajo de graduación fue evaluado y aprobado por el honorable Comité Evaluador designado por la Dirección de ciencias agrícolas como requisito final para optar al título profesional de:

Ingeniero en Sanidad Vegetal

Miembros del Comité Evaluador

Presidente (MSc. María del Rosario
Chavarría Sánchez)

Secretario (MSc. Santos David
Romero)

Vocal (MSc. Trinidad Castillo Arevalo)

Lugar y Fecha: _____

DEDICATORIA

A Dios, por haberme dado paciencia, sabiduría y fortaleza para poder culminar mi formación académica. A mis padres Erwind Vallejos Sr. y Johanna Castillo que con su apoyo incondicional siempre han estado para mí. A mis hermanas, que me motivaron siempre.

A todas las personas que de una u otra forma me apoyaron y fueron parte de motivación en el proceso de elaboración de este trabajo.

Br. Erwind José Vallejos Castillo

A Dios que permitió esta investigación posible, a mis padres por su apoyo, esto es más para ellos, a mi hermano aquí queda algo de vos, a aquella constante compañía, por brindarme momentos de calma y alegría en los días más desafiantes. Gracias por estar siempre ahí, recordándome con su amor incondicional que cada momento vale la pena.

Este logro es tan suyo como mío.

Br. Katherine Alexa Moreira García

AGRADECIMIENTO

A Dios por la sabiduría, por darme la fortaleza y seguir adelante siempre. A mis padres por su apoyo de toda la vida.

Así mismo a mi compañera de tesis, a los docentes de la Universidad Nacional Agraria, por ser fuente de conocimientos a lo largo de mi aprendizaje y formación profesional, en especial, a mis asesores Msc. Eliezer Lanuza y MSc. Isaías Sánchez, tutores de la presente investigación, por su compromiso, dedicación, paciencia y por brindar todo su apoyo para la culminación de estudio. Gracias por todo.

Br. Erwind José Vallejos Castillo

Gracias al creador por acompañarme y permitir este momento, gracias a mis asesores por su paciencia, apoyo cuando lo necesite y estar presentes ante cualquier duda en el desarrollo de la investigación, gracias a mi compañero por apoyarme en el momento de necesidad. Gracias totales.

Br. Katherine Alexa Moreira García

ÍNDICE DE CONTENIDO

| SECCIÓN | PÁGINA |
|---|-------------|
| DEDICATORIA | i |
| AGRADECIMIENTO | ii |
| ÍNDICE DE CONTENIDO | iii |
| ÍNDICE DE CUADROS | v |
| ÍNDICE DE FIGURAS | vi |
| ÍNDICE DE ANEXOS | vii |
| RESUMEN | viii |
| ABSTRACT | ix |
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. OBJETIVOS | 3 |
| 2.1 Objetivo general | 3 |
| 2.2 Objetivos específicos | 3 |
| III. MARCO DE REFERENCIA | 4 |
| 3.1 Cultivo, producción e importancia nacional de la papa | 4 |
| 3.2 Características de <i>P. infestans</i> | 4 |
| 3.3 Mecanismos de sobrevivencia de <i>P. infestans</i> | 5 |
| 3.4 Daños causados por <i>P. infestans</i> en cultivo de papa | 6 |
| 3.5 Sintomatología asociada a <i>P. infestans</i> | 7 |
| 3.6 Fungicidas de uso comercial para manejar <i>P. infestans</i> | 7 |
| 3.7 Usos de <i>Trichoderma</i> sp | 8 |
| 3.8 Usos de <i>Bacillus subtilis</i> | 8 |
| 3.9 Experiencias investigativas | 8 |
| IV. MATERIALES Y MÉTODOS | 10 |
| 4.1 Ubicación del estudio | 10 |
| 4.2 Diseño metodológico | 10 |
| 4.3 Diseño experimental | 10 |
| 4.4 Colecta de muestras | 11 |
| 4.5 Aislamiento de <i>P. infestans</i> por medio de tejido vegetal | 12 |
| 4.6 Aislamiento de <i>P. infestans</i> por método de cultivo trampa | 12 |
| 4.7 Descripción de <i>P. infestans</i> | 13 |

| | |
|---|-----------|
| 4.8 Capacidad inhibitoria <i>in vitro</i> de <i>Bacillus subtilis</i> , Metalaxyl+Mancozeb, oxiclورو de cobre, sobre <i>P. infestans</i> en dosis comerciales | 13 |
| 4.8.1 Capacidad inhibitoria <i>in vitro</i> de <i>Bacillus subtilis</i> sobre <i>P. infestans</i> | 14 |
| 4.8.2 Inhibición de crecimiento micelial de oxiclورو de cobre y metalaxyl+mancozeb sobre <i>P. infestans</i> | 14 |
| 4.9 Evaluación del grado de antagonismo | 16 |
| 4.10 Colecta de datos | 16 |
| 4.11 Variables evaluadas | 17 |
| 4.12 Análisis de datos | 17 |
| V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 18 |
| 5.1 Descripción de <i>P. infestans</i> aislados a partir de la rizosfera del cultivo de papa | 18 |
| 5.2 Inhibición de crecimiento radial de <i>Bacillus subtilis</i> sobre <i>P. infestans</i> | 19 |
| 5.3 Inhibición de crecimiento radial de metalaxyl + mancozeb sobre <i>P. infestans</i> | 21 |
| 5.4 Inhibición de crecimiento radial de oxiclورو de cobre sobre <i>P. infestans</i> | 23 |
| 5.5 Actividad antagónica de <i>Trichoderma</i> sp sobre <i>P. infestans</i> | 24 |
| 5.6 Evaluación del grado de antagonismo de <i>Trichoderma</i> | 25 |
| 5.7 Análisis estadístico de los tratamientos frente a <i>P. infestans</i> | 27 |
| VI. CONCLUSIÓN | 28 |
| VII. RECOMENDACIÓN | 29 |
| VIII. LITERATURA CONSULTADA | 30 |
| IX. ANEXOS | 36 |

ÍNDICE DE CUADROS

| CUADRO | PÁGINA |
|---|--------|
| 1. Dosis de los tratamientos utilizados en el estudio | 11 |
| 2. Escala de cinco clases para medir el grado de antagonismo ejercido por el aislado de <i>Trichoderma</i> sp sobre <i>P. infestans</i> . | 16 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| FIGURA | | PÁGINA |
|--------|--|--------|
| 1. | Ubicación el estudio | 10 |
| 2. | Metodología para prueba de inhibición de <i>B. subtilis</i> sobre <i>P. infestans</i> | 14 |
| 3. | Metodología de cultivos duales para prueba de antagonismo | 16 |
| 4. | Colonia de <i>P. infestans</i> en medio V8 con características de crecimiento roseteado | 18 |
| 5. | A y B. Esporangios semipapilados, C. esporangio limoniforme de <i>P. infestans</i> | 19 |
| 6. | A y B. Oogonios con oospora plerótica, C. Oogonio con unión del anteridio anfigeno | 19 |
| 7. | Porcentaje de inhibición de crecimiento radial de <i>B. subtilis</i> sobre los aislados <i>P. infestans</i> | 20 |
| 8. | Inhibición de <i>B. subtilis</i> sobre los tres aislados de <i>P. infestans</i> A) FER B) FEZ C) FRJ | 20 |
| 9. | Porcentaje de inhibición de metalaxyl+mancozeb sobre los tres aislados de <i>P. infestans</i> | 21 |
| 10. | Porcentaje de inhibición de crecimiento radial de oxiclورو de cobre sobre los aislados <i>P. infestans</i> | 23 |
| 11. | Porcentaje de inhibición de crecimiento radial a las 144 horas de los aislados de <i>P. infestans</i> , evaluados en cultivos duales con el aislado de <i>Trichoderma</i> sp | 24 |
| 12. | Antagonismo por competencia ejercido por el aislado de <i>Trichoderma</i> sobre los tres aislados de <i>P. infestans</i> . | 26 |
| 13. | Medias de los tratamientos en estudio | 27 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| ANEXO | | PÁGINA |
|--------------|---|---------------|
| 1. | Hoja de colecta de datos | 36 |
| 2. | Análisis estadístico de los tratamientos frente a <i>P. infestans</i> | 37 |

RESUMEN

En Nicaragua existen 3 687 ha de producción de papa divididas en tres zonas del norte donde uno de los principales factores limitantes de producción es el oomicete *Phytophthora infestans*. El objetivo del estudio fue evaluar la capacidad inhibitoria *in vitro* de fungicidas químicos y biológicos, utilizados convencionalmente para el manejo de *Phytophthora infestans*. Se utilizaron aislados del patógeno provenientes de las comunidades El robledal y El zacatón, ubicadas en el departamento de Estelí, el aislamiento de *P. infestans* a partir de suelo se realizó empleando el método de cultivo trampa, utilizando como material vegetal trampa trozos de hojas de clavel (*Dianthus caryophyllus*), donde posteriormente se sembraron en medio de cultivo Agar-centeno. La identificación a nivel de especie se hizo mediante claves de identificación, tomando en cuenta las características morfológicas a nivel microscópico. La investigación fue de carácter experimental y se llevó a cabo en el laboratorio de microbiología vegetal de la Universidad Nacional Agraria mediante un diseño completo al azar (DCA). Se implementaron cinco tratamientos (Metalaxyl+mancozeb, oxiclورو de cobre, *Bacillus subtilis*, *Trichoderma* sp, Testigo absoluto) y seis repeticiones por cada tratamiento, sumando un total de 30 unidades experimentales. Las variables evaluadas fueron identificación de aislados de la rizosfera de papa, capacidad inhibitoria *in vitro* de *B. subtilis*, oxiclورو de cobre, metalaxyl+mancozeb, y actividad antagonica de *Trichoderma* sp. Los resultados obtenidos de capacidad inhibitoria fueron analizados de forma cuantitativa a través de porcentaje de inhibición de crecimiento radial y de forma cualitativa los datos de antagonismo mediante la escala de cinco clases se realizó un análisis de varianza para las variables porcentaje de inhibición, mostrando diferencias significativas, siendo el tratamiento más efectivo en capacidad inhibitoria metalaxyl+mancozeb con 88%, seguido de oxiclورو de cobre con 86%, además *Bacillus subtilis* mostró capacidad inhibitoria sobre los aislados de *P. infestans*, y *Trichoderma* sp se consideró altamente antagonista.

Palabras clave: Tizón tardío, antagonismo, capacidad inhibitoria, patógenos de la papa.

ABSTRACT

In Nicaragua, there are 3,687 hectares of potato production divided into three northern zones, where one of the main limiting factors in production is the oomycete *Phytophthora infestans*. The objective of this study was to evaluate the in vitro inhibitory capacity of chemical and biological fungicides conventionally used for managing *Phytophthora infestans*. Isolates were obtained from the communities of El robledal and El zacatón situated in the department of Estelí, and *P. infestans* was isolated from the soil using the trap culture method, with carnation (*Dianthus caryophyllus*) leaf fragments as trap plant material. These fragments were later cultivated in rye agar culture medium. The research was experimental and was conducted using a completely randomized design (CRD) in phyto microbiological laboratories in the Universidad Nacional Agraria. Five treatments (Metalaxyl+mancozeb, copper oxychloride, *Bacillus subtilis*, *Trichoderma* sp, untreated control) and six replicates were implemented, totaling 30 experimental units. The evaluated variables included the identification of isolates from the potato rhizosphere, in vitro inhibitory capacity of *Bacillus subtilis*, copper oxychloride, metalaxyl+mancozeb, and the antagonistic activity of *Trichoderma* sp. The results obtained from inhibitory capacity were analyzed quantitatively through percentage of radial growth inhibition and qualitatively the antagonism data through the five-class scale. An analysis of variance was performed for the variables percentage of inhibition, showing significant differences, being the most effective treatment in inhibitory capacity metalaxyl + mancozeb with 88%, followed by copper oxychloride with 86%. In addition, *Bacillus subtilis* showed inhibitory capacity on *P. infestans* isolates, and *Trichoderma* sp was considered highly antagonistic.

Key words: Late blight, antagonism, inhibitory capacity, potato pathogens

I. INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum* L.) pertenece a la familia Solanáceas, las especies cultivadas son las tetraploides ($2n = 48$) y algunas triploides, que pertenecen a las especies *S. tuberosum* y *S. andigenum*. En Nicaragua la FAO reporta un consumo per cápita de 8 kg anuales, se cultivan entre 800 - 1200 ha, donde se obtiene una producción de 35 - 40 % de la demanda nacional (Molina *et al.*, 2004).

La importancia de la papa radica en que sus tubérculos son parte de la dieta de millones de personas a nivel mundial, contiene 80% de agua y la materia seca constituida por carbohidratos, proteínas, celulosa, minerales, vitaminas A y C proporcionan una dieta balanceada (Molina *et al.*, 2004).

Los principales países productores son Polonia, CEI, USA, República Popular de China, Inglaterra, Holanda, Alemania, Perú, México y Suecia quienes consumen 75 kg per capita anual (Espinoza y Aragón, 2007).

En Nicaragua, el cultivo de papa tiene muchos factores limitantes en el rendimiento, entre estos se encuentran los problemas ocasionados por microorganismos fitopatógenos, siendo la principal limitante la enfermedad conocida como tizón tardío causado por *P. infestans*, esta enfermedad está presente en todas las zonas productoras de papa del país (Miranda y Lanzas, 2007, p3).

El tizón tardío de la papa, causado por el Oomycete *P. infestans* (Mont.) de Bary, es una de las enfermedades más devastadoras del cultivo de papa a nivel mundial, de los primeros casos reportados esta lo que sucedió en 1845 en Irlanda, denominado “La hambruna irlandesa”, lo que provocó una destrucción total de los campos de papa, afectando la principal fuente alimenticia de ese país provocando la muerte de miles de personas y la migración de muchos sobrevivientes a otros lugares de Europa y Norte América (Pérez y Forbes, 2008).

Rivera *et al.* (2014) mencionan que entre los productos utilizados para el manejo de este Oomycete están los fungicidas a base de cobre y fungicidas del grupo químico de los ditiocarbamatos, también la aplicación de sistémicos con acción curativa y preventiva, sin embargo, es notorio que las aplicaciones constantes y aumento de dosis tienen un alto riesgo

de ocasionar que poblaciones de *P. infestans* generen resistencia; lo que hace prácticamente inefectivo los productos, tal es el caso del metalaxilo a principio de los años 80.

Debido a la alta capacidad de adaptación, la emergencia de poblaciones virulentas hacia variedades tolerantes y su variabilidad genética que le confiere la capacidad para volverse resistente a productos químicos utilizados de forma regular para controlar la enfermedad, esta investigación pretende encontrar nuevas alternativas de manejo que puedan ser replicables a nivel de campo para que en un futuro se encuentren disponibles a los productores, siendo el caso del uso de *Trichoderma* spp y oxiclóruo de cobre donde se pretende demostrar el efecto de inhibición sobre el desarrollo de *P. infestans*.

Es debido a esto que se pretende evaluar *in vitro* productos sintéticos y biológicos sobre el desarrollo de *P. infestans*, como alternativas para el manejo del tizón tardío de la papa (*Solanum tuberosum* L.).

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Evaluar la capacidad inhibitoria *in vitro* de fungicidas químicos y biológicos utilizados convencionalmente para el manejo de *Phytophthora infestans*.

2.2 Objetivos específicos

Describir a *Phytophthora infestans* mediante características de crecimiento y morfología.

Evaluar el efecto inhibitorio *in vitro* de *Bacillus subtilis*, metalaxyl+mancozeb y oxiclورو de cobre sobre *P. infestans* en sus dosis comerciales.

Evaluar la actividad antagónica del formulado a base de *Trichoderma harzianum* sobre *P. infestans*.

III. MARCO DE REFERENCIA

3.1 Cultivo, producción e importancia nacional de la papa

Originaria y domesticada en las montañas de los Andes, al sur de Perú, luego del arroz, maíz y trigo, la papa es el cuarto alimento más consumido y de mayor importancia a nivel mundial gracias a su aporte de proteínas y carbohidratos (International Potato Center [CIP], 2015).

En el 2004 Nicaragua tenía áreas de cultivo de papa desde 800 a 1 200 ha Hernández (2018), para el 2021 la Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO STAT) tenía registro de un área de 3 687 ha divididas en las zonas de producción como lo son Jinotega, Matagalpa y Estelí, siendo este último el principal departamento de producción.

Se conoce que en la época de postrera en el departamento de Estelí se dan buenos rendimientos debido a las condiciones ambientales que presenta, con un fotoperiodo corto que promueve un mejor desarrollo de tubérculos, sin embargo, también aumentan los daños ocasionados por *P. infestans* debido a estas mismas condiciones que propician el desarrollo de este patógeno (Morales, 1999).

3.2 Características de *P. infestans*

P. infestans es un microorganismo que pertenece al reino Stramenopila (Chromista), Phylum Oomycota, posee una gran plasticidad genética y es un microorganismo fitopatógeno de importancia económica para las plantas pertenecientes de la familia solanaceae, siendo el agente causal de la enfermedad conocida como tizón tardío, caracterizada por ser la de mayor impacto en la reducción del rendimiento en el cultivo de papa (Alarcón-Rodríguez *et al.*, 2013).

La biología de *P. infestans* corresponde a la característica de los Oomycetes, los cuales están estrechamente relacionadas con algas, diatomeas y plantas superiores, carece de quitina en la pared celular y además producen zoosporas de dos flagelos. Se reproduce principalmente en forma asexual donde se encuentra caracterizado por formar esporangios sobre el tejido infectado (Acuña y Bravo 2019).

P. infestans es capaz de reproducirse de manera sexual y asexual, para el primer tipo de reproducción (sexual) es necesario la interacción del tipo A1 y A2, estos representan al gameto femenino y al gameto masculino (Alor, 2015).

Martínez y Osorio (2007) señalaron que este tipo de reproducción se denomina oogámica, con un gameto femenino (oogonio) relativamente grande, con forma de huevo no flagelado, que es fecundado por el gameto masculino (anteridio) que a diferencia del gameto femenino es notablemente pequeño y flagelado. Como producto de la reproducción sexual es un cigoto con paredes gruesas (la oospora), la cual puede entrar en estado o período de latencia con la finalidad de tolerar condiciones adversas que no son óptimas para la germinación, entre estas condiciones se encuentra la sequía, las bajas temperaturas y la ausencia de huéspedes.

Respecto a la reproducción asexual, esta se da mediante zoosporas, hifas y esporangios, el viento o bien agua son los principales métodos de diseminación, ambos métodos permiten encontrar un huésped y en condiciones favorables este desarrollará un tubo germinativo o apresorios que penetrará la cutícula o estomas respectivamente (Alor, 2015).

3.3 Mecanismos de sobrevivencia de *P. infestans*

La sobrevivencia del patógeno se relaciona con la reproducción sexual a causa de las oosporas que a falta de un huésped vivo son capaces de mantenerse en el suelo periodos largos hasta la siguiente temporada de siembra y en condiciones que le favorezcan para volver a germinar (Centre for Agricultural Bioscience International CABI, 2021).

Según Fry & Goodwin (1997) como se citó en Correa Meléndrez (2020); El ciclo biológico de *P. Infestans* se puede dar en un rango de cinco días (Penetración, colonización, esporulación y dispersión). Ambos tipos de apareamiento son bisexuales y además capaces de desarrollar ambas estructuras sexuales, el oogonio (femenino) y anteridio (masculino). Sin embargo, para darse la reproducción sexual se necesita la interacción de ambos tipos. La fertilización del oogonio produce oosporas, que son las estructuras capaces de sobrevivir en condiciones ambientales no favorables por varios meses o incluso años.

Según Drenth y Guest (2013), *P. infestans* al estar siempre presente en los tejidos de la planta tales como raíces, tallos, tubérculos, y follaje, aumenta la capacidad de sobrevivencia en el

cultivo, donde se pueden dar brotes epidémicos de manera estacional. Sin embargo, este patógeno posee estructuras denominadas clamidosporas, que facilitan la supervivencia en períodos secos, además las deficientes medidas fitosanitarias facilita la sobrevivencia hasta que los factores ambientales favorezcan los nuevos brotes de la enfermedad.

3.4 Daños causados por *P. infestans* en cultivo de papa

Fernández, 1994; Acuña y Torrez (2000) como se citó en Flores *et al.* (2008) mencionaron que una afectación temprana de esta enfermedad en el cultivo puede ocasionar pérdidas de hasta un 100 %.

El daño más conocido a nivel mundial y de mayor importancia en su época fue "la hambruna irlandesa" en el año 1845 donde ocasionó una disminución de habitantes, emigración y un declive en la economía del país. La aparición de la enfermedad se tomó a la ligera y no se tomaron medidas para controlar el brote que poco a poco se extendió por todas las plantaciones (Sadurni, 2020).

Desde el año 1845 hasta la actualidad se realizaron numerosos estudios sobre la etiología, epidemiología y manejo de esta enfermedad, los cuales se han incrementado a partir del hallazgo del tipo A2 en el continente de Europa en el año 1984.

Estos estudios brindaron conocimiento sobre los peligros para la producción de papa que ocurrían después de los procesos de variación genética, debiéndose principalmente a la aparición de variantes que presentan mayor resistencia a los fungicidas sistémicos, mayor virulencia y alta aptitud parasítica, así como a la presencia de oosporas resultado de la reproducción sexual del patógeno en nuevas zonas agrícolas (Pérez y Forbes, 2008).

El tizón tardío es la enfermedad de papa más importante en el mundo y Nicaragua no es la excepción. Es sumamente importante conocer el comportamiento de este microorganismo y sus condiciones favorables para poder ejercer las medidas de control de manera eficiente. (Rizo, 2019).

3.5 Sintomatología asociada a *P. infestans*

El tizón tardío causado por *P. infestans* puede afectar todas las estructuras de la planta, afectando hojas, tallos y tubérculos. Los síntomas iniciales aparecen en las hojas inferiores de los bordes de estas como pequeñas manchas acuosas de color verde oscuro.

En condiciones con alta humedad, se producen lesiones en el follaje, estas se pueden propagar rápidamente formando zonas café atizonadas de formas irregulares siendo un borde clorótico alrededor de las lesiones lo que separa el tejido sano del infectado. En condiciones de alta humedad es posible distinguir el micelio como un crecimiento aterciopelado de color blanco en el envés de las hojas inferiores (Acuña y Gutiérrez, 2010).

Según Heinfling (1987) y Alor (2015), cuando se da la infección a los tubérculos, se presenta una decoloración en la parte superficial de coloración marrón, con manchas necróticas irregulares que llegan a extenderse hacia la médula de este. Llegando a producirse de esta manera la pudrición seca en el tejido interno, que cuando está avanzado puede servir como focos de infección a otros microorganismos patógenos secundarios, tales como hongos y bacterias.

3.6 Fungicidas de uso comercial para manejar *P. infestans*

Por su modo de acción los productos utilizados caen en los conocidos productos de contacto o protectantes, Rivera *et al.* (2014) mencionaron que entre los productos utilizados de manera convencional para el manejo del tizón tardío se incluyen productos a base de cobre, y fungicidas del grupo químico de los ditiocarbamatos.

El Metalaxyl fue el ingrediente activo más utilizado para el control de *P. infestans*, inicialmente se aplicaba sin combinaciones con otros fungicidas, a pesar de que este, al igual que otras acilalaninas, actúa sobre sitios muy específicos del patógeno. Esta situación facilitó e indujo a un rápido desarrollo de resistencia en poblaciones de *P. infestans*, haciendo más difícil el manejo de este. (Riveros *et al.*, 2003).

3.7 Usos de *Trichoderma* sp

Trichoderma es un hongo cosmopolita, cuya importancia está en su característica de alta capacidad de adaptación a la rizosfera y producción de metabolitos como enzimas, compuestos promotores de la mejora en la toma y disponibilidad de nutrientes, compuestos volátiles, e induciendo tolerancia a la planta a enfermedades (Mesa-Vanegas *et al.*, 2020), estas características lo definen como un eficiente biocontrolador de enfermedades en plantas causadas por microorganismos fitopatógenos del suelo de los géneros *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Pythium* y *Fusarium*, entre otros (Colquehuanca y Blanco, 2021).

Otro mecanismo de acción que posee este género es la antibiosis, el micoparasitismo, la competencia por espacio y nutrientes, y la producción de metabolitos secundarios (Alarcón *et al.*, 2019).

3.8 Usos de *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis pertenece a la familia bacillaceae, es una bacteria que incluye subespecies o diferentes cepas que se encuentran en el ecosistema de donde es extraída para ser usada como agente de control biológico ante agentes fitopatógenos por su capacidad de producir enzimas y antibióticos (Hernandez *et al.*, 2011).

Villarreal-Delgado *et al.* (2018) describieron al género *Bacillus* como un microorganismo que puede ofrecer una importante y eficiente alternativa como agente de control biológico, debido a características como capacidad para permanecer en el suelo gracias a las endosporas, excretar antibióticos dañinos para patógenos y además funciona como promotor del crecimiento de las plantas y la hacen resistentes a enfermedades. Estas características destacan a *B. subtilis* como una alternativa para disminuir el uso de fungicidas sintéticos.

3.9 Experiencias investigativas

Espinoza y Aragón (2007) realizaron pruebas *in vivo* para el control de *P. infestans* con fungicidas químicos los cuales fueron aplicados en combinación con *B. subtilis* QST 713, sus resultados mostraron que la combinación de *B. subtilis* con otros ingredientes activos reduce la severidad de *P. Infestans*.

Bustamante (2015) realizó pruebas para el control de *P. infestans* con distintas cepas del antagonista *Trichoderma* alternado con productos químicos, con los resultados obtenidos se logró determinar que existe un efecto inhibitorio para el control del patógeno y también en un aumento productivo de la planta.

En Chile se ha utilizado fungicidas sistémicos como metalaxil desde 1980 de forma curativa y no preventiva. En México, Canadá, Ecuador y Estados Unidos se detectó que al actuar sobre sitios específicos del patógeno potenció la resistencia de este, lo que ha llevado a la búsqueda de tratamientos que no generen resistencia y que ejerzan mejor control sobre el patógeno para frenar su daño (Riveros *et al.*, 2003).

Day y Shattock (1997) citado por Blandón-Díaz *et al.* (2012) concuerdan en su publicación titulada “Phenotypic Variation Within a Clonal Lineage of *Phytophthora infestans* Infecting both Tomato and Potato in Nicaragua” que desde mediados de 1980 han existido cambios en la estructura poblacional de *P. Infestans* fuera de México.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Ubicación del estudio

El estudio se realizó en el laboratorio de microbiología vegetal de la Universidad Nacional Agraria ubicada en el km 12 ½ de la carretera norte del departamento de Managua, en las coordenadas 12° 08' 51.05" latitud norte y 86° 09' 50.69" longitud oeste.



Figura 1. Ubicación el estudio laboratorio de microbiología vegetal UNA

4.2 Diseño metodológico

La investigación fue de carácter experimental, de corte transversal y se llevó a cabo mediante un diseño completo aleatorizado (DCA). Se implementaron cinco tratamientos y seis repeticiones, sumando un total de 30 unidades experimentales siendo cada una un plato Petri, así mismo se contó con la misma cantidad de repeticiones en testigo absoluto. A partir de pruebas *in vitro* se observó la capacidad inhibitoria de los productos evaluados con base a sus respectivas dosis comerciales y el porcentaje de antagonismo del producto biológico.

4.3 Diseño experimental

La etapa experimental consistió en pruebas *in vitro* para observar la capacidad inhibitoria de cuatro tratamientos que fueron: *B. subtilis*, metalaxy1+mancozeb, *Trichoderma* sp y oxiclورو de cobre. Las dosis de los tratamientos fueron tomadas con base a las

recomendadas en las formulaciones y se ajustaron para un menor volumen de agua (Cuadro 1), se hizo uso de la metodología de medio envenenado (Dingra & Sinclair, 1985); luego de inoculadas las muestras con los tratamientos a evaluar se midió el crecimiento radial y la capacidad inhibitoria de los tratamientos sobre el desarrollo de *P. infestans*.

Para el método de medio envenenado se utilizó medio de cultivo agar centeno (AC), previo a verter los platos Petri se adicionaron 10 ml de tratamiento, previamente ajustado la cantidad a usar, luego se colocó un disco de 5 mm con micelio del patógeno evaluado en el centro del medio, las placas fueron incubadas a 22°C y se tomaron los datos cada 24 horas.

Cuadro 1. Dosis de los tratamientos utilizados en el estudio

| Tratamiento | Descripción | Dosis |
|-------------|--------------------------|---------------------------------|
| T1 | Testigo absoluto | Sin aplicación |
| T2 | <i>Trichoderma</i> sp | 1x10 ¹² UFC |
| T3 | <i>Bacillus subtilis</i> | 1x10 ⁸ UFC |
| T4 | Metalaxyl+mancozeb | 0.7 g/100 ml medio Agar-centeno |
| T5 | Oxicloruro de cobre | 2 g/100 ml medio Agar-centeno |

T1: Testigo absoluto. T2: *Trichoderma* sp. T3: *Bacillus subtilis*. T4: Metalaxyl+mancozeb. T5: Oxicloruro de cobre.

4.4 Colecta de muestras

Las muestras fueron colectadas en tres fincas ubicadas en el departamento de Estelí. En cada finca se recolectó aproximadamente un kilogramo de suelo. La colecta de suelo se realizó mediante un muestreo aleatorio en forma de “X”, una técnica que se utiliza comúnmente con el fin de asegurar una adecuada representatividad de la finca y de la obtención de las muestras. En cada finca se excavaron cinco puntos equidistantes a una profundidad aproximada de 20 cm, de los cuales se extrajeron submuestras de suelo. Estas submuestras posteriormente se homogeneizaron hasta conformar una muestra compuesta de 1 kg, representativa de cada finca.

Para preservar la calidad microbiológica de las muestras y evitar contaminaciones externas, el material fue colocado en bolsas plásticas limpias, previamente rotuladas. Cada etiqueta contenía información esencial, la cual incluía el nombre de la finca, la fecha de muestreo, la profundidad de recolección y las coordenadas geográficas del sitio. La recolección se realizó en condiciones de campo adecuadas, procurando minimizar la exposición prolongada al sol

o a fuentes de calor que pudieran alterar la composición microbiana del suelo. Estas muestras fueron transportadas al laboratorio en un contenedor térmico, donde se procedió a su almacenamiento y posterior análisis para el aislamiento e identificación del fitopatógeno evaluado en el presente estudio. (Mendoza y Espinoza, 2017).

Para la colecta de tejido se observaron y recolectaron hojas con los síntomas característicos de la enfermedad, que consistían en manchas necróticas con bordes irregulares con halos de coloración amarillenta (Noroña y Tipanquiza, 2010), y se almacenaron en bolsas plásticas con su respectiva etiqueta, en total se recolectaron tres muestras de tejido y dos muestras de suelo por cada finca.

La colecta se realizó en marzo del año 2024, el primer punto de colecta finca El Robledal con coordenadas 13° 11' 34 5" N, 0 86° 16' 57.0" O el cultivo se encontraba en cosecha y su finalidad era consumo familiar, la segunda finca, Rosita con coordenadas 13° 14' 04.6" N, 0 86° 14' 29.8" O el cultivo tenía aproximadamente 50 días y el último punto de colecta, El Zacatón con coordenadas 13° 13' 35.2" N, 086° 14' 07.8" O.

En la finca Rosita se realizaban aplicaciones de Phytan[®] y Genoxy[®] para el manejo de tizón tardío o chamusco como lo conocían en la zona, en El Robledal y Zacatón no fueron indicados los métodos de manejo aplicados para este patógeno.

4.5 Aislamiento de *P. infestans* por medio de tejido vegetal

Para el aislamiento a partir de tejido vegetal se hicieron cortes de 3x3mm que abarcara tejido sano y tejido dañado posterior a esto se desinfectó con alcohol al 70% durante 30 segundos, luego se enjuagaron con agua destilada y se dejaron secando en papel toalla, luego se sembraron cinco cortes en tres platos petri por cada finca. Los platos Petri respectivamente codificados fueron incubados a 22°C durante 72 horas.

4.6 Aislamiento de *P. infestans* por método de cultivo trampa

El aislamiento se realizó a partir de suelo empleando el método de cultivo trampa, en el cual se pesaron 200 g de suelo y se depositó en un envase con capacidad de 800 ml, posteriormente se agregaron 500 ml de agua destilada estéril, se homogeneizó y se dejó reposar hasta que la materia orgánica presente en el suelo se observaran sobre la superficie del agua y

posteriormente retirarla con ayuda de un papel toalla, seguido de esto se agregaron trozos de hojas de clavel (*Dianthus caryophyllus*) de tal manera que los propágulos del patógeno se liberaran en el agua, subiendo a la superficie y ocurriendo la infección sobre el tejido vegetal usado como trampa. Los envases se etiquetaron con los códigos correspondientes y se incubaron durante 72 horas (Soto *et al.*, 2017).

Después de transcurrido el tiempo se sembraron en medio de cultivo agar centeno cinco fragmentos de hoja de clavel en un plato petri, esto se repitió en tres platos petri por cada aislado, luego las muestras fueron incubadas durante siete días a una temperatura de 22 C°.

Para purificar los aislados se hizo uso del método de superposición, consistiendo en, tomar un trozo de medio de agar-centeno con micelio, colocarlo con el crecimiento hacia arriba y sobre este se colocó un triángulo de medio estéril, posteriormente se incubó por 7 días. (Soto *et al.*, 2017).

La codificación para cada aislado de *P. infestans* fue la siguiente, Finca El zacatón (FEZ), Finca Rosita (FRJ) y Finca El robledal (FER).

4.7 Descripción de *P. infestans*

Para describir *P. infestans* se utilizaron aislados con buen desarrollo y libres de contaminantes fúngicos y bacterianos, se agregó una gota de lactofenol en un portaobjeto estéril y se colocó micelio, se observó en un microscopio a 40 X. La morfología presente se ingresó en la herramienta interactiva Lucid key (Abad *et al.*, 2023) para la identificación morfológica de *Phytophthora*, así mismo la clave de (Gallegly & Hong, 2008) y (Erwin y Ribeiro, 1996).

4.8 Capacidad inhibitoria *in vitro* de *Bacillus subtilis*, Metalaxyl+Mancozeb, oxiclورو de cobre, sobre *P. infestans* en dosis comerciales

Para estimar el porcentaje de inhibición del crecimiento radial se utilizó la fórmula propuesta por Ezziyyani *et al.* (2004).

$$(\%) = [(Tc - Tt) / Tc] \times 100$$

Donde:

Tc: Radio promedio del testigo absoluto

Tt: Radio de la colonia de *P. infestans* en medio con fungicidas

4.8.1 Capacidad inhibitoria *in vitro* de *Bacillus subtilis* sobre *P. infestans*

El ensayo se realizó en medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) y similar a la prueba de antagonismo con cultivos duales, siguiendo el procedimiento siguiente: las bacterias fueron obtenidas de producto comercial y reaisladas a un medio AN estéril, posteriormente se preparó 800 ml de medio PDA para 36 platos petri correspondiente a los tres aislados, con seis repeticiones por aislados y su correspondiente testigo.

Se colocó en un extremo del plato petri un disco de cinco mm de cada aislado de *P. infestans* posteriormente se realizó un estriado de la bacteria con la ayuda de un asa bacteriológica previamente esterilizada en línea recta centrada (Oliva *et al.*, 2017) (Figura 2) y se incubó a 22°C, el crecimiento micelial se medía en dirección al centro del plato petri cada 24 h. Con los datos obtenidos se realizó el procedimiento descrito en variables evaluadas, porcentaje de inhibición.

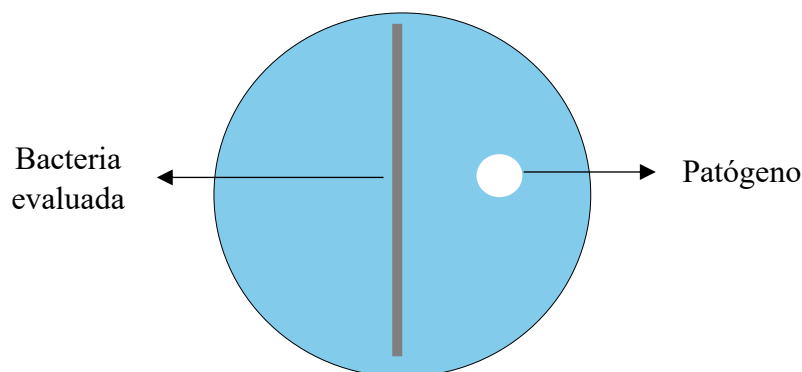


Figura 2. Metodología para prueba de inhibición de *B. subtilis* sobre *P. infestans*

4.8.2 Inhibición de crecimiento micelial de oxiclóruo de cobre y metalaxyl+mancozeb sobre *P. infestans*

El ensayo se realizó en medio de cultivo Agar-centeno (AC) mediante la técnica de medio envenenado propuesta por Dingra & Sinclair (1985).

Para el método de medio envenenado se utilizó medio de cultivo agar-centeno (AC), previo a verter los platos Petri se adicionaron 10ml de tratamiento, previamente ajustado la cantidad a usar, luego se colocó un disco de 5 mm con micelio del patógeno evaluado en el centro del medio, las placas fueron incubadas a 22°C y se tomaron los datos cada 24 horas.

4.9 Actividad antagónica de *Trichoderma* sp sobre *P. infestans*

Para el montaje del ensayo se utilizó la técnica de cultivo dual *in vitro* para evaluar la actividad antagónica de *Trichoderma* sp. frente a *P. infestans*. Para ello, se prepararon placas Petri con medio PDA y se inocularon discos con micelio de 5 mm de ambos microorganismos en extremos opuestos del plato petri. Estos se incubaron a 24 °C durante 7 días, monitoreando el crecimiento radial y la interacción entre ambos micelios. La evaluación se realizó mediante la observación y medición de crecimiento micelial, zonas de inhibición y comparación con los testigos absolutos, permitiendo determinar la capacidad inhibitoria de *Trichoderma* sobre el patógeno de forma cualitativa y cuantitativa. (Bell *et al*, 1982).

Para evaluar el antagonismo de *Trichoderma* sp sobre *P. infestans* se realizaron mediciones cada 12 horas con la ayuda de una regla milimetrada, midiendo desde el centro del disco del antagonista en dirección al disco con micelio del patógeno, hasta que el testigo absoluto cubrió todo el medio de cultivo. Se estudió la capacidad antagónica mediante el método de cultivos duales (Figura 3) y una evaluación cualitativa mediante la escala propuesta por Bell *et al.* (1982) (Cuadro 2), el porcentaje de inhibición del antagonista sobre *P. infestans* se determinó mediante la siguiente fórmula propuesta por (Ezziyyani *et al.* 2004):

$$(\%) = [(Tc - Tt) / Tc] \times 100$$

Donde:

Tc: Radio promedio del testigo absoluto

Tt: Radio de la colonia en medio con el antagonista

4.9 Evaluación del grado de antagonismo

También se midió el grado de antagonismo con el uso de la escala propuesta por Bell *et al.* (1982), dicha escala cuenta con cinco clases las cuales toman a *Trichoderma* sp como altamente antagonista si el valor promedio según en la escala es igual o menor a dos y no se considera como altamente antagonista si el valor promedio es igual o mayor a tres.

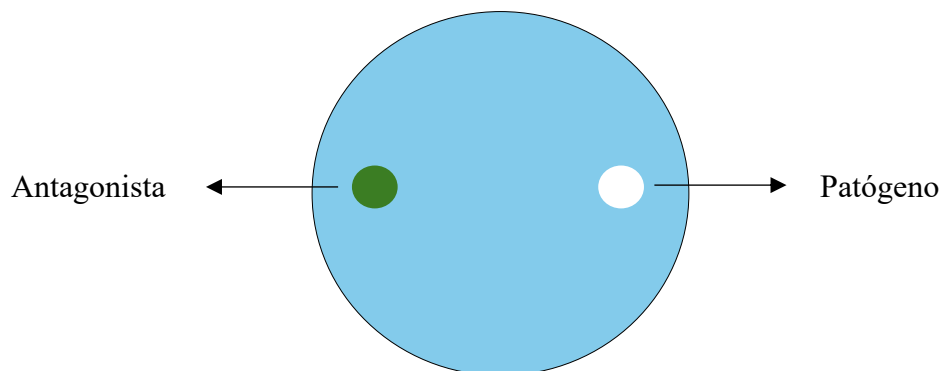


Figura 3. Metodología de cultivos duales para prueba de antagonismo

Cuadro 2. Escala de cinco clases para medir el grado de antagonismo ejercido por los aislados de *Trichoderma* sp sobre *P. infestans*. Según Bell *et al* (1982).

| Clase | Descripción |
|-------|---|
| 1 | El antagonista crece completamente sobre la colonia del patógeno y cubre toda la superficie del medio de cultivo. |
| 2 | El antagonista cubre al menos las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo. |
| 3 | El antagonista y el patógeno cubren aproximadamente la mitad de la superficie del medio de cultivo. |
| 4 | El patógeno cubre al menos dos terceras partes del medio de cultivo limitando el crecimiento del antagonista. |
| 5 | El patógeno crece sobre la colonia del antagonista y cubre toda la superficie del medio de cultivo. |

4.10 Colecta de datos

Se elaboró una base de datos en Microsoft Excel donde los datos tomados de las mediciones realizadas para los tratamientos cada 24 h y cada 8 h eran guardados para su posterior análisis (Anexo 1), las mediciones para obtener el porcentaje de crecimiento radial se realizaron durante 96 h y el grado antagónico se realizaron durante 144 h.

4.11 Variables evaluadas

- Descripción de aislados *P. infestans* en el cultivo de papa
- Capacidad inhibitoria *in vitro* de *Bacillus subtilis*, Metalaxyl+Mancozeb, oxiclورو de cobre, sobre *P. infestans* en dosis comerciales
- Actividad antagónica de *Trichoderma* sp sobre *P. infestans*
- Grado de antagonismo de *Trichoderma* sp sobre *P. infestans*

4.12 Análisis de datos

Se elaboró una base de datos en Microsoft Excel 2016 para cada variable en estudio.

Las variables porcentaje de inhibición de *Bacillus subtilis*, metalaxyl+mancozeb, oxiclورو de cobre y *Trichoderma* sp se evaluaron de forma cuantitativa, obteniendo porcentaje de inhibición de crecimiento radial mediante la formula propuesta por (Ezziyyani *et al.* 2004).

La variable grado antagónico de *Trichoderma* sp fue analizada de forma cualitativa mediante la escala propuesta por Bell *et al.* (1982) y se obtuvo el porcentaje de inhibición de crecimiento radial mediante la fórmula propuesta por (Ezziyyani *et al.* 2004).

Posteriormente, las variables evaluadas (porcentaje de inhibición y grado antagónico) se sometieron a una prueba de normalidad de datos, al cumplirse el supuesto de normalidad se procedió a realizar un análisis de varianza (ANDEVA) con sus respectivas separaciones de medias mediante la prueba Tuckey α 0.05.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Descripción de *P. infestans* aislados a partir de la rizosfera del cultivo de papa

Para la identificación de *P. infestans* a nivel de especie, se tomaron en cuenta la morfología de características macroscópicas y microscópicas, como tipo crecimiento micelial, el cual presentó un crecimiento micelial aéreo abundante, con una coloración blanca, además presentando una textura algodonosa y con crecimiento de micelio en forma de roseta en el medio de cultivo V8, típico de la especie (Figura 4), así mismo la morfología de cada estructura a nivel microscópico (Figura 5).



Figura 4. Colonia de *P. infestans* en medio V8 con características de crecimiento roseteado

Se determinó que los aislados eran heterotálicos, en este caso encontrando estructuras microscópicas de ambos tipos de reproducción, en la fase asexual se observaron e identificaron esporangios caducos, semipapilados y limoniformes, así como hifas cenocíticas no abultadas (Figura 5). Asimismo, en la identificación de estructuras de la fase sexual se lograron observar en mayor medida oogonios de paredes lisas con la unión del anteridio anfigino, y oosporas pleróticas. (Figura 6).

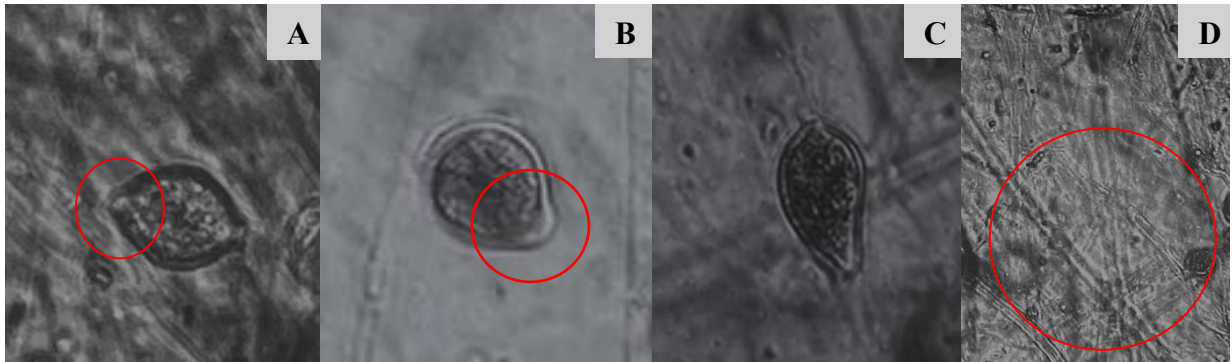


Figura 5. A y B. Esporangios semipapilados, C. esporangio limoniforme de *P. infestans*

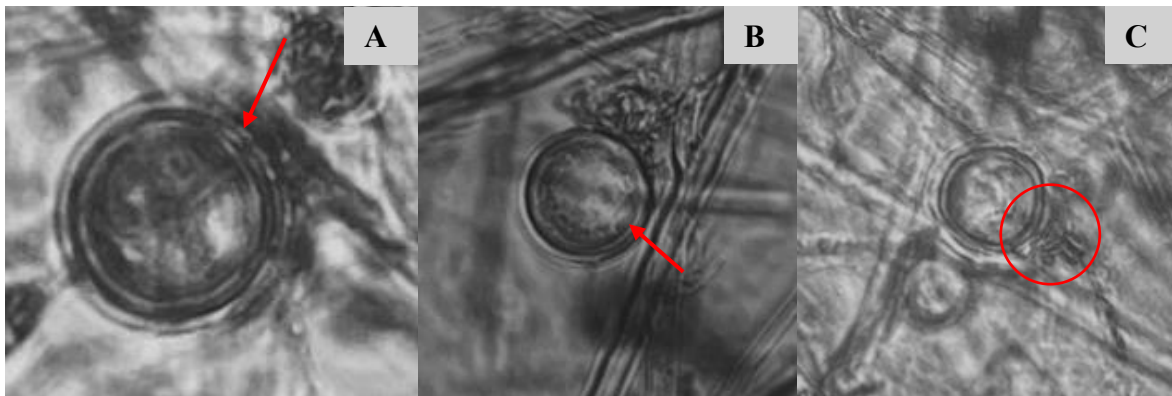


Figura 6. A y B. Oogonios con oospora plerótica, C. Oogonio con unión del anteridio anfigeno

La identificación a nivel microscópico coincide con las características descritas por Erwin y Ribeiro (1996), Gallegly & Hong. (2008) y los resultados emitidos por la herramienta interactiva IDphy (Lucid key), donde indican que *P. infestans* presenta esporangios semipapilados, y caducos, desprendiéndose fácilmente del esporangióforo, además de que esta especie está caracterizada por ser heterotálica, a diferencia de otras especies de *Phytophthora* que son homotálicas.

5.2 Inhibición de crecimiento radial de *Bacillus subtilis* sobre *P. infestans*

El porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) de *B. subtilis* sobre *P. infestans* para los aislados FEZ y FER mostraron resultados mayores al 65% siendo inferior el resultado obtenido del aislado FRJ con un 57% (Figura 7).

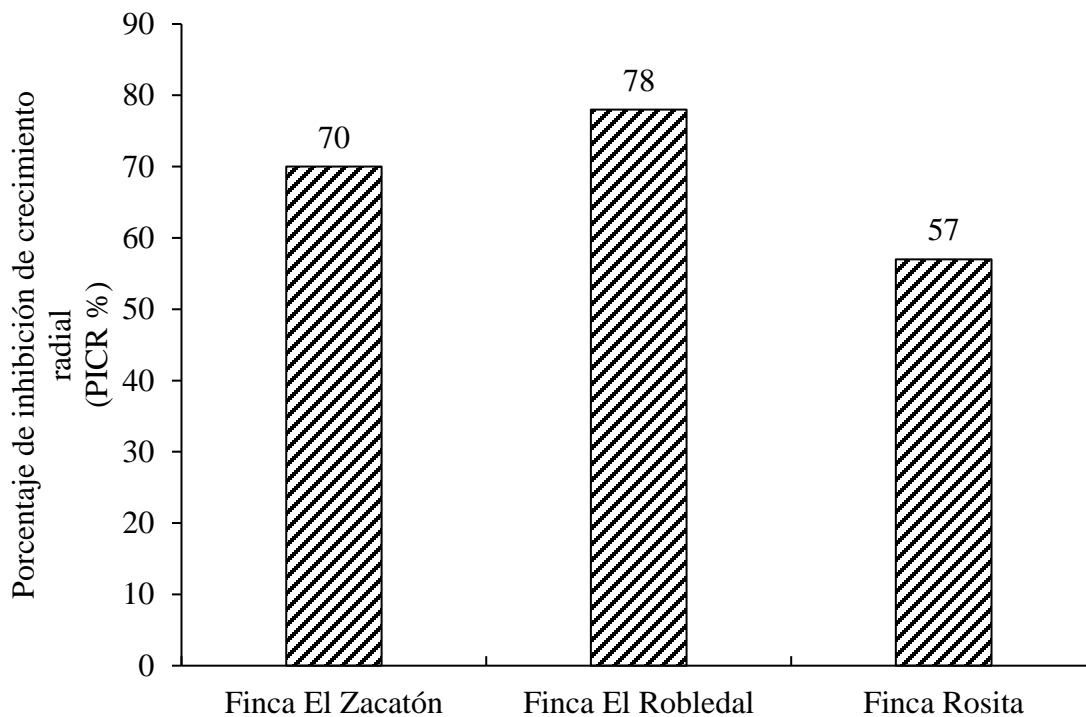


Figura 7. Porcentaje de inhibición de crecimiento radial de *B. subtilis* sobre los aislados de *P. infestans* FEZ, FER y FRJ

Los porcentajes obtenidos por los aislados FEZ y FER fueron de 70% y 78% respectivamente (Figura 7), encontrándose en un rango similar a los obtenidos por Wang *et al.* (2020) donde la cepa *B. subtilis* WL-2 estudiada inhibió en un 75,6% efectuando un mejor control sobre *P. infestans* en comparación a *Pseudomonas* WL-1 y *B. pumillus* W-7. De igual forma Alfiky *et al.* (2022) obtuvieron un porcentaje de 82% en una cepa de *B. subtilis* EG21.

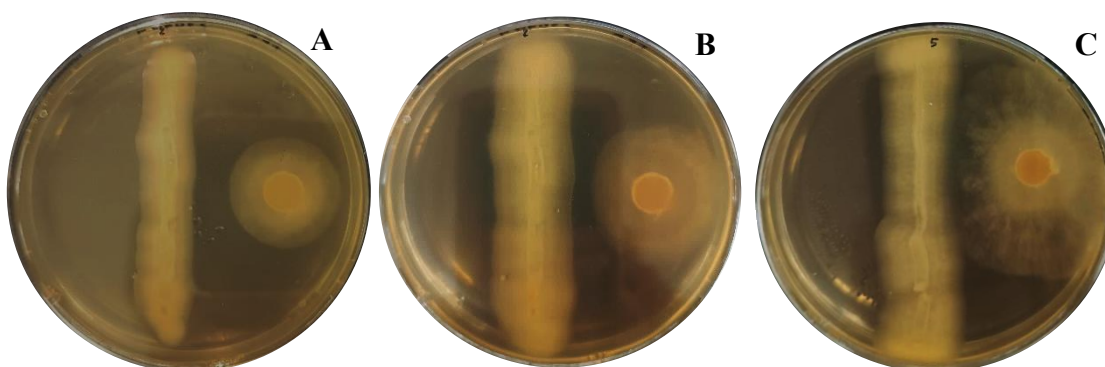


Figura 8. Inhibición de *B. subtilis* sobre los tres aislados de *P. infestans*. A) FER B) FEZ C) FRJ

En estudios realizados por Villareal-Delgado *et al.* (2018), mencionan que la capacidad antifúngica de *B. subtilis* se basa en la producción de moléculas de naturaleza química como son los lipopéptidos (surfactina, iturina y fengicina), las cuales inhiben la expresión de un microorganismo patógeno, afectando la membrana citoplasmática de las células fúngicas, y como consecuencia generando la muerte celular.

La especie *B. subtilis* es una alternativa eficaz para prevenir el desarrollo de *P. infestans*, esto es mencionado en estudios llevados a cabo por Arteaga (2023), donde evaluó la actividad biológica inhibitoria de esta sobre *Phytophthora* sp *in vitro* e *in vivo*, en el cual obtuvo una reducción significativa del crecimiento micelial del patógeno, con valores de inhibición promedios mayores al 70%.

5.3 Inhibición de crecimiento radial de metalaxyl + mancozeb sobre *P. infestans*

Los PICR obtenidos en los aislados FEZ y FRJ fueron de 88,8 % en ambos casos, sin embargo, en el aislado FER se presentó un valor de 86% (figura 9), por lo que son considerados como sensibles al efecto ejercido por el tratamiento.

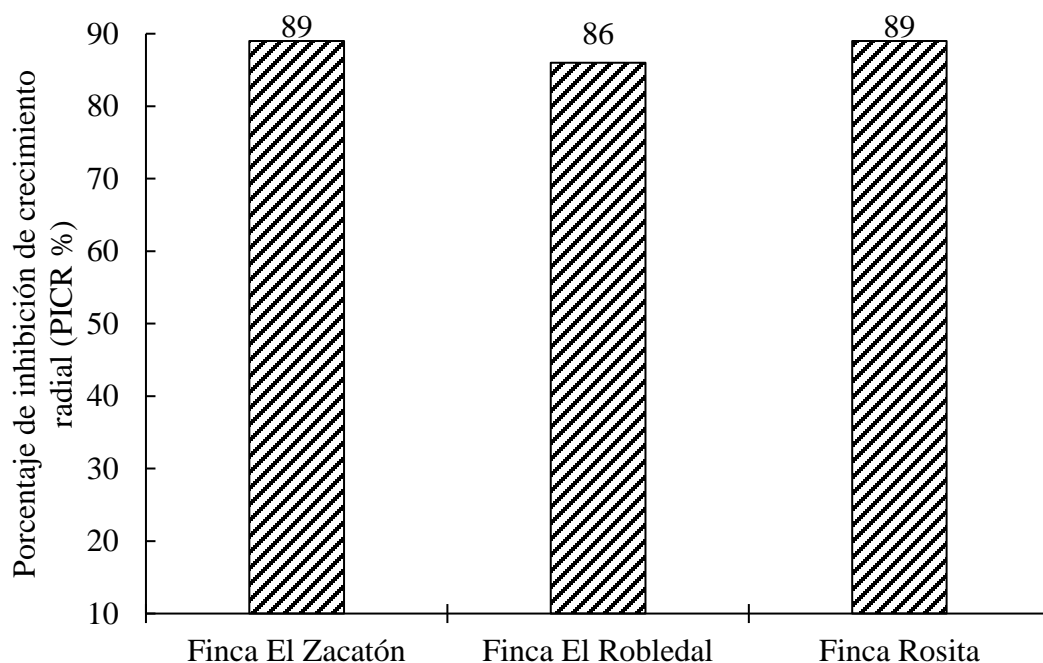


Figura 9. Porcentaje de inhibición de metalaxyl+mancozeb sobre los tres aislados de *P. infestans*

De acuerdo con Deahl y Demuth (1993), citado también por Riveros et al. (2003), los criterios para clasificar los aislados de *P. infestans* como sensibles, intermedios o resistentes al metalaxyl se basan en el crecimiento radial de la colonia en presencia del fungicida, comparado con los tratamientos testigos. Considerando que el diámetro total de la placa Petri es de 90 mm, el porcentaje de inhibición se calcula en función del crecimiento radial observado. Los aislados se clasifican como sensibles si presentan un porcentaje de inhibición superior al 90% (crecimiento inferior a 9 mm), intermedios con un porcentaje de inhibición entre el 10% y el 60% (crecimiento entre 9 mm y 54 mm), y resistentes si el porcentaje de inhibición es menor al 40% (crecimiento superior a 54 mm).

Paez *et al.* (2001) mencionan que los ingredientes activos pertenecientes al grupo químico de las acilalalinas, tal es el caso de metalaxyl, actúan sobre sitios específicos del patógeno, debido a esta característica se encontró en la evaluación de resistencia *in vitro* e *in vivo* de *P. infestans* al metalaxyl, que de 69 aislados en estudio el 64% (44 aislados), presentaron resistencia y un 36% (25 aislados), fueron sensibles.

El modo de acción de este ingrediente activo es inhibir la enzima RNA polimerasa y ARN ribosomal, inhibiendo así la síntesis de proteínas y reduciendo el desarrollo micelial, sin embargo, al ser *P. infestans* un microorganismo considerado con una alta variabilidad genética, genera resistencia dado los cortos periodos de aplicación del producto (Robledo, 2015).

En Nicaragua, la resistencia y el aumento de aislados de *P. infestans* al metalaxyl ocurrieron en la década de 1980 hasta 1990, debido que los productores de papa comenzaron a utilizar este ingrediente activo de manera indiscriminada y frecuente. Consecuente a esto, se condujo a una presión de selección por parte de aislados de *P. infestans*, donde persiste hasta la actualidad en la población clonal nicaragüense de este patógeno (Blandón-Díaz, 2011).

Para evitar la aparición de más poblaciones del patógeno resistente se comenzó a aplicar con otros ingredientes activos, tal es el caso de la combinación metalaxyl+mancozeb que se empezó a utilizar a partir del año 1985 (Robledo, 2015. p26), la cual fue empleada en el presente estudio, donde queda evidenciado que, al utilizar este ingrediente activo con otro de diferente modo de acción, sigue siendo eficaz para disminuir el desarrollo del patógeno.

5.4 Inhibición de crecimiento radial de oxiclورو de cobre sobre *P. infestans*

El porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) de oxiclورو de cobre sobre *P. infestans* para todos los aislados demostraron resultados mayores al 80 % (Figura 10). No se observó crecimiento radial del microorganismo desde el inicio hasta el final del estudio (testigo cubrió todo el medio) en los platos petri que contenían el tratamiento.

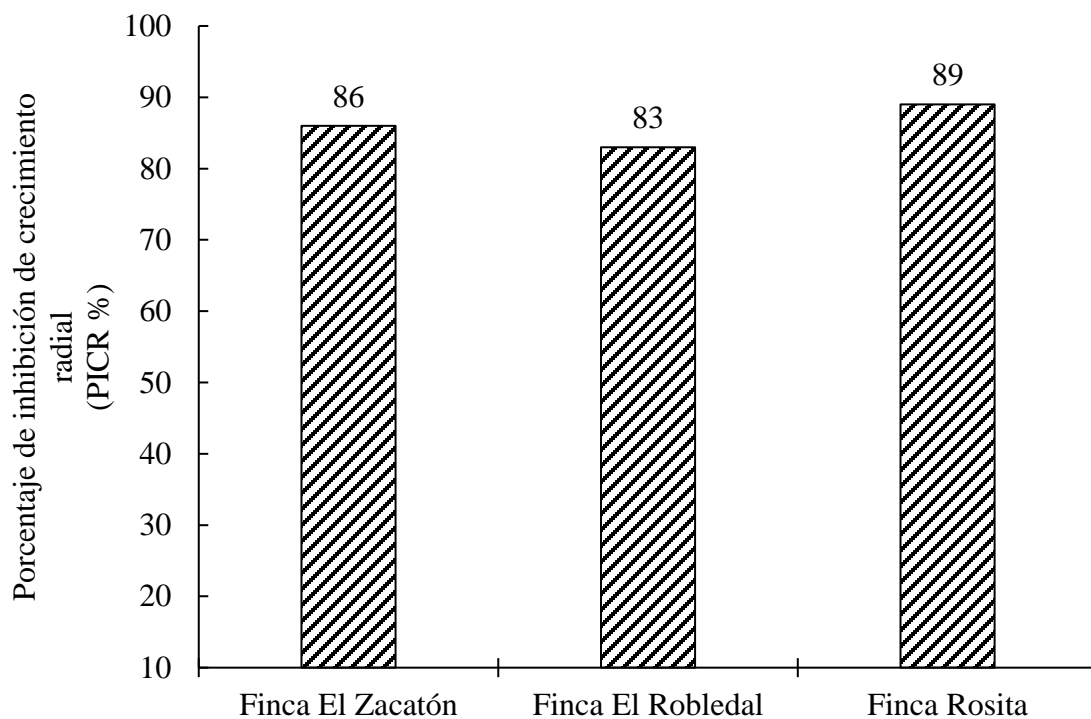


Figura 10. Porcentaje de inhibición de crecimiento radial de oxiclورو de cobre sobre los aislados *P. infestans*

En un estudio realizado entre 2014-2015 en campo en el cultivo de tomate donde se evaluaron extractos de *Allium sativum*, *Trichoderma*, hidróxido de cobre y oxiclورو de cobre, este último presentó 87.52% de control sobre el crecimiento de la infección (Gopi *et al.*, 2020).

El riesgo de que un producto a base de cobre genere resistencia es bajo dado que, en el patógeno bloquean las enzimas relacionadas al proceso de respiración, desnaturaliza proteínas y también se caracteriza por provocar envenenamiento y muerte celular El Bilali (2005) citado por Kovačič *et al.*, (2013).

5.5 Actividad antagonica de *Trichoderma* sp sobre *P. infestans*

El porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) de *Trichoderma* sp sobre los aislados de *P. infestans* (Finca El zacatón (FEZ), Finca El robledal (FER) y Finca Rosita (FRJ) fueron superior al 30% siendo 46,2, 42.8 y 32.5 respectivamente.

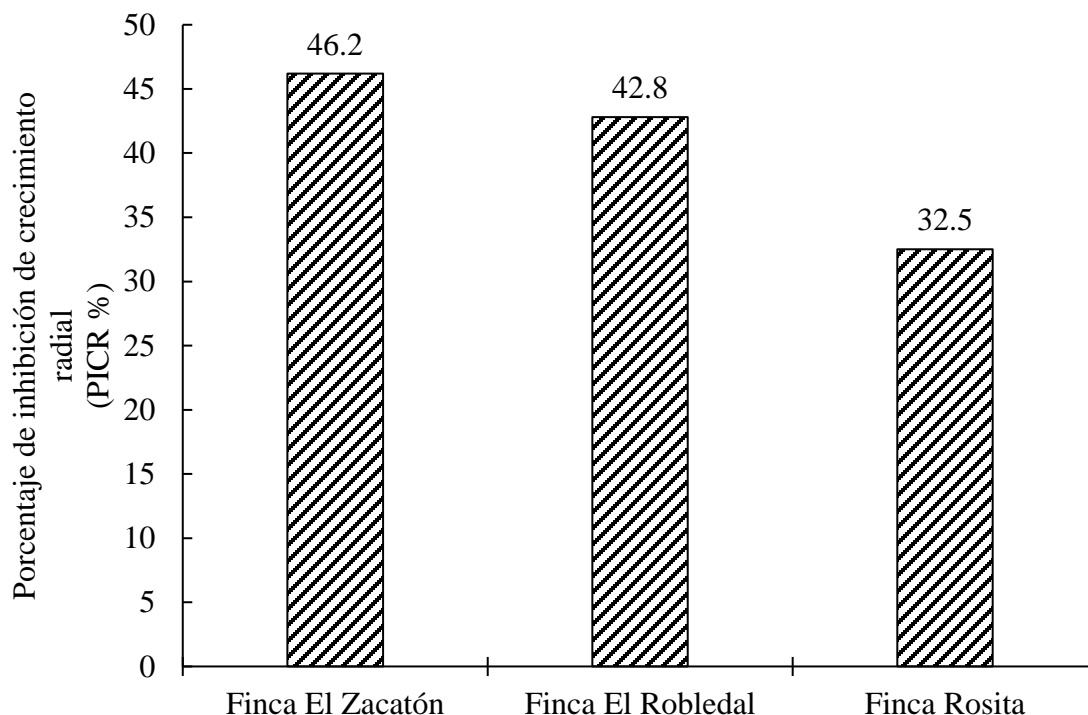


Figura 11. Porcentaje de inhibición de crecimiento radial a las 144 horas de los aislados de *P. infestans*, evaluados en cultivos duales con el aislado de *Trichoderma* sp

El PICR del aislado FRJ (32,5 %) presentó una menor susceptibilidad a *Trichoderma* tal y como lo demuestran los resultados obtenidos en estudios realizados por Debebe *et al.* (2011), donde informaron que el valor mínimo de biocontrol de *Trichoderma* sobre *P. infestans* fue de 36,7%, siendo un resultado cercano al logrado en el presente estudio. Esto a su vez coincide con los resultados obtenidos por Kariuki *et al.* (2020), en el cual evaluaron el efecto antagonico de *T. harzianum* y *T. asperellum* sobre *P. infestans*, donde ambas especies del antagonista redujeron significativamente el crecimiento micelial del patógeno, siendo la especie de *T. asperellum* la que tuvo valores similares al del presente estudio con un PICR de 30.7% a los ocho días después del enfrentamiento.

A diferencia del PICR en el aislado FEZ (46,2 %), fue el aislado más susceptible al efecto antagónico ejercido por la cepa de *Trichoderma* utilizada, el cual tuvo valores similares de inhibición en estudios realizados por García-Núñez *et al.* (2017), donde obtuvieron un PICR de 49% de *T. asperellum* sobre *P. infestans*. Además, Michel-Aceves *et al.* (2009), reportaron especies de *Trichoderma* con un porcentaje de biocontrol *in vitro* de 5,35 % hasta un 62,9 %.

Sin embargo, en la observación directa de los enfrentamientos en cultivos duales se determinó el efecto antagónico ejercido por *Trichoderma* sobre el crecimiento micelial de los tres aislados de *P. infestans*, presentando un crecimiento acelerado de *Trichoderma* a comparación de los aislados de *P. infestans*, disminuyendo su desarrollo debido a, probablemente, la competencia por espacio y nutrientes ejercida por el antagonista.

de Aguiar *et al.* (2014), manifestaron que a pesar de que el aislado de *Trichoderma* haya presentado diferentes PICR sobre los aislados de *P. infestans*, sigue siendo una buena alternativa de biocontrol, debido a que se caracteriza a *P. infestans* como un patógeno virulento, a pesar de ello se pudo determinar mediante pruebas de inhibición y antagonismo que en presencia de otro microorganismo en el mismo medio presentó un retraso en el desarrollo y capacidad para colonizar el medio.

5.6 Evaluación del grado de antagonismo de *Trichoderma*

Un aislado de *Trichoderma* se considera altamente antagonista si el valor promedio de la escala era ≤ 2 y no es considerado altamente antagonista si el valor promedio era ≥ 3 (Bell *et al.*, 1982). Teniendo esto como referencia, en este estudio el aislado de *Trichoderma* utilizado en las pruebas de antagonismo se ubicó en la clase 1 de la escala (Figura 11), por lo que se es considerado como altamente antagonista sobre los aislados de *P. infestans*, lo que lo convierte en un agente viable para poder ser implementado en estudios posteriores a nivel de campo.

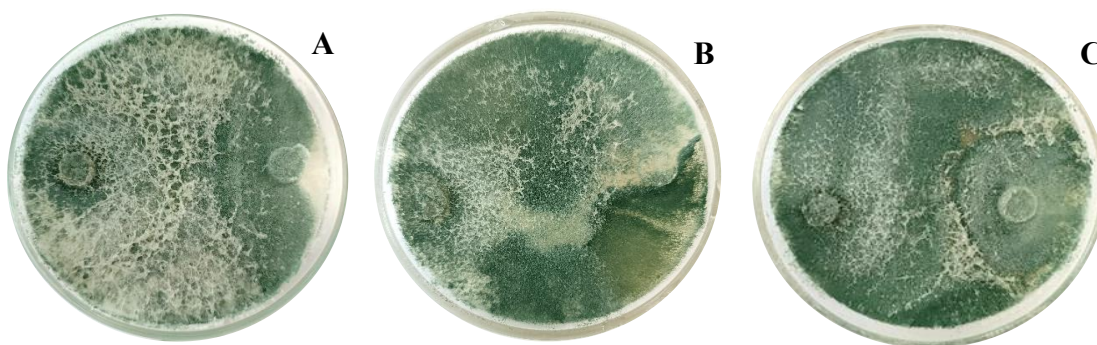


Figura 12. Antagonismo por competencia ejercido por el aislado de *Trichoderma* sobre los tres aislados de *P. infestans*, donde se observa el crecimiento de este sobre *P. infestans* considerado altamente antagonista. A) FER B) FEZ C) FRJ

En estudios realizados sobre la caracterización del agente causal de la pudrición radicular del aguacate, y *Trichoderma* sp como potencial agente de control biológico se menciona lo siguiente:

El establecer la capacidad antagonica o de las cepas de *Trichoderma* en condiciones *in vitro* es algo necesario y tiene como principio la selección de las mejores cepas, esto para las pruebas posteriores a nivel de campo, además de que se genera información sobre una posible formulación con materiales inertes apropiados que le brinden mayor efectividad. De tal manera se logra obtener resultados satisfactorios en el manejo biológico en los agroecosistemas donde los fitopatógenos puedan repercutir de manera negativa. (Sánchez, 2016, p 41).

En el presente estudio, se pudo observar que la capacidad antagonica de *Trichoderma* fue atribuida a uno de sus mecanismos de acción, el cual fue por competencia de espacio y nutrientes. Infante *et al.* (2009) indican que *Trichoderma* sp al ser un microorganismo de crecimiento acelerado y rápido desarrollo, el principal mecanismo de acción es la competencia por espacio y nutrientes con otros microorganismos que se encuentran en el mismo sustrato.

Ademas se realizan numerosos estudios de especies que pertenecen al género *Trichoderma* para ser evaluados y propuestos como una alternativa de control biológico debido a sus características de crecimiento rápido en una alta gama de sustratos, producción de enzimas

(quitinasas, glucanasas, proteasas) y metabolitos secundarios que degradan la pared celular de microorganismos fitopatógenos, además de tener resistencia a diversos fungicidas. (Tyśkiewicz *et al*, 2022).

5.7 Análisis estadístico de los tratamientos frente a *P. infestans*

En el análisis de varianza con un nivel de significancia de 0.05, quedó demostrado que existieron diferencias significativas en al menos un par de las medias de los tratamientos evaluados $p < (0.05)$, siendo el mejor tratamiento metalaxyl+mancozeb con 89%, seguido del oxiclورو de cobre con un 86%. Así mismo *B. subtilis* mostró efectividad al inhibir en un 68.33%.

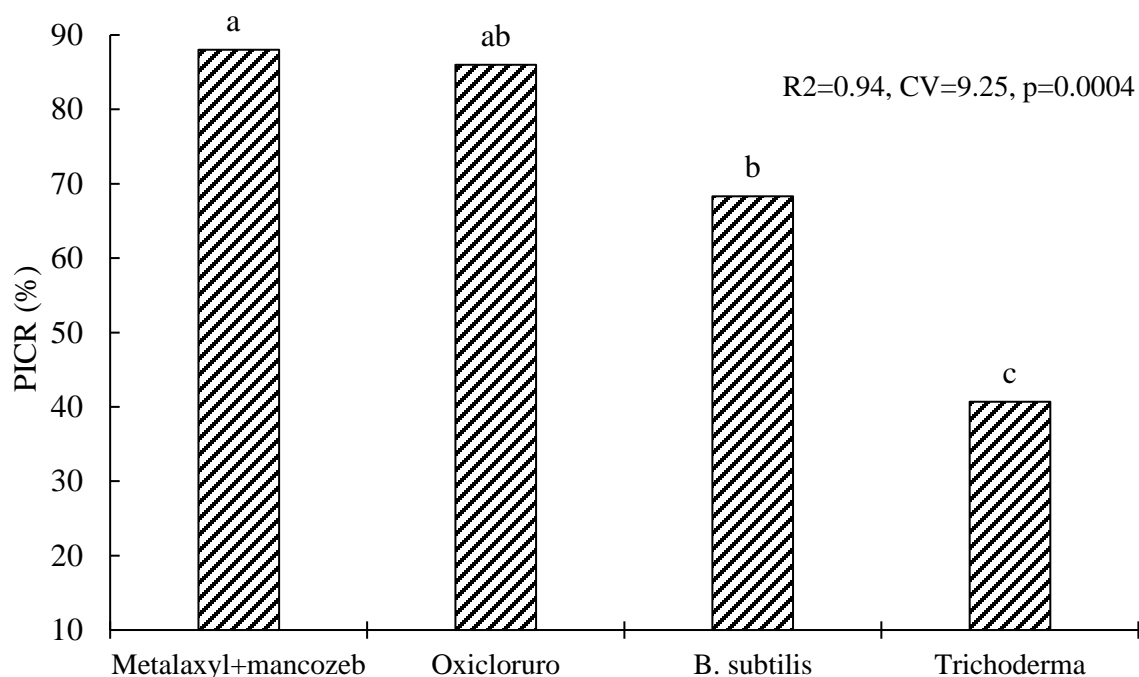


Figura 13. Medias de PICR de los tratamientos en estudio sobre los aislados de *P. infestans* evaluados.

VI. CONCLUSIÓN

Phytophthora infestans presentó micelio aéreo de coloración blanco roseteado, hifas cenocíticas, esporangios caducos, limoniformes y semipapilados, oogonios de paredes lisas y oosporas pleróticas con unión del anteridio anfigino.

El mejor tratamiento con mayor porcentaje de inhibición fue metalaxyl+mancozeb con un 89% seguido de oxiclورو de cobre 88% y *Bacillus subtilis* con 78% *in vitro* quien mostró capacidad inhibitoria.

Trichoderma mostró ser efectivo al alcanzar la clase 1 de antagonismo sobre *Phytophthora infestans*.

VII. RECOMENDACIÓN

Realizar investigaciones en campo para evaluar el efecto de los tratamientos sobre la enfermedad de tizón tardío (*P. infestans*).

Evaluar otros productos sintéticos, biológicos y botánicos para el manejo de *P. infestans*

Realizar ensayos en semillas de papa, como manejo preventivo de *P. infestans*

VIII. LITERATURA CONSULTADA

- Abad Z., G, Burgess TI, Redford A., J, Bienapfl J., C., Coffea M & Caballero L. (2023). *IDphy: Molecular and morphological identification of Phytophthora based on the types*. USDA APHIS PPQ S&T Plant Pathogen Confirmatory Diagnostics Lab and USDA APHIS PPQ S&T ITP, United States; *Phytophthora Science and Management*, Murdoch University, Australia; and World *Phytophthora* Collection. <https://idtools.org/phytophthora/index.cfm?pageID=3141>
- Acuña B., Ivette y Bravo H., Rodrigo (eds.) (2019). Tizón tardío de la papa: Estrategias de manejo integrado con alertas tempranas [en línea]. Osorno, Chile: Boletín INIA - Instituto de Investigaciones Agropecuarias. no. 399. <https://biblioteca.inia.cl/handle/20.500.14001/6777>
- Acuña, I., y Gutiérrez, M. (2010). Como reconocer los tizones de la papa. Informativo INIA Remehue. no. 47. <https://hdl.handle.net/20.500.14001/4188>
- Alarcón-Rodríguez, Norma M., Lozoya-Saldaña, Héctor, Valadez-Moctezuma, Ernestina, García-Mateos, Ma. del Rosario, & Colinas-León, María T. (2013). Diversidad genética del tizón tardío de la papa [*Phytophthora infestans* (Mont) de Bary] en Chapingo, México. *Agrociencia*, 47(6), 593-607. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952013000600006&lng=es&tlng=es.
- Alarcón, A., Hernández-Melchor, D. J., y Ferrera-Cerrato, R. (2019). *Trichoderma*: Importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. *Chilean Journal of Agricultural y Animal Sciences*, 35(1), 98-112. <https://revistas.udec.cl/index.php/chjaas/article/view/993>
- Alfiky, A., L'Haridon, F., Abou-Mansour, E & Weisskopf, L. 2022. Disease inhibiting effect of strain *Bacillus subtilis* EG21 and its metabolites against potato pathogens *Phytophthora infestans* and *Rhizoctonia solani*. *The American Phytopathological Society* (APS)K, 112. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-21-0530-R>
- Alor, R. N. A. (2015). Caracterización de *Phytophthora infestans* y mejora genética para la resistencia en patata [Tesis de doctorado, Universitat de Lleida]. <https://www.tdx.cat/handle/10803/286188#page=1>
- Arteaga, R. P. (2023). Evaluación de la actividad biológica inhibitoria de filtrados producidos por cultivos inmovilizados en agar-agar de *Bacillus* sp. contra *Phytophthora* sp. como patógeno foliar del tomate (*Solanum lycopersicum*) [Tesis de licenciatura, Universidad Mayor de San Andrés]. <https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/35259/TG-2053.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Bell, D. K., Wells, H. D., & Markham, C. R. (1982). *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, 72(4), 379-382. <https://doi.org/10.1094/Phyto-72-379>
- Blandón-Díaz, J. U. (2011). *Insights into population structure and epidemiology of Phytophthora infestans from Nicaragua*. Department of Forest Mycology and Pathology, Swedish University of Agricultural Sciences. <https://core.ac.uk/reader/11697700>
- Blandón-Díaz, J. U., Widmark, A. K., Hannukkala, A., Andersson, B., Högberg, N., & Yuen, J.E. (2012). Phenotypic variation within a clonal lineage of *Phytophthora infestans* infecting both tomato and potato in Nicaragua. *Phytopathology*, 102(3), 323-330. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-11-0033>
- Bustamante Gavilanes, A. E. (2015). Control biológico del Tizón Tardío *Phytophthora infestans* en papa *Solanum tuberosum* a través de consorcios microbianos formados por hongos nativos del género *Trichoderma* sp [Tesis de Maestría, Universidad Politécnica Salesiana]. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/7692/1/UPS-CT004553.pdf>
- Centre for Agricultural Bioscience International (CABI). 2021. *Phytophthora infestans* (tizón de *Phytophthora*). <https://doi.org/10.1079/cabicompendium.40970>
- Colquehuanca Nina, G. y Blanco Villacorta, M. 2021. Importancia y beneficios del *Trichoderma* en la producción agrícola. *Revista Estudiantil agro-vet*, 5(2), 78–82. <https://agrovet.umsa.bo/index.php/AGV/article/view/64>
- Correa Meléndrez, M. Y. (2020). Caracterización fenotípica y molecular de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, aislados de hospedantes alternos pertenecientes a la familia Solanaceae en dos regiones agroecológicas del Perú en el periodo noviembre 2016–septiembre 2017. [Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo]. <https://hdl.handle.net/20.500.12893/9061>
- De Aguiar, R. A., da Cunha, M. G., & Junior, M. L. (2014). Management of white mold in processing tomatoes by *Trichoderma* spp. and chemical fungicides applied by drip irrigation. *Biological Control*, 74, 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.03.009>
- Debebe, Z. E., Santhanam, A., Gorfú, D., Tessera, M., & Kassa, B. (2011). Biocontrol activity of *Trichoderma viride* and *Pseudomonas fluorescens* against *Phytophthora infestans* under greenhouse conditions. *Journal of Agricultural Technology*, 7(6), 1589-1602. http://www.ijataatsea.com/pdf/v7_n6_11_November/12_IJAT_2011_7_6___Ephrem_Debebe_Zegeye-22%20Nov%202011.pdf
- Dingra, D. & J. Sinclair. 1985. *Basic Plant Pathology Methods*. Editorial CRC Press. ISBN 10: 084935921. 448p

- Drenth, A., y Guest, D. (2013). *Phytophthora*: la destructora de plantas. *Palmas*, 34, 49-56. <https://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/10666>
- Erwin, D. C., & Ribeiro, O. K. (1996). *Phytophthora Diseases Worldwide*. APS Press, St. Paul, Minnesota.
- Espinoza, R. J., y Aragón, J. F. (2007). Manejo de tizón tardío [*Phytophthora infestans* (mont) de Bary] en el cultivo de papa cv calwhite en época de apante en la zona de tisey, Estelí, 2007. [Tesis de ingeniería, Universidad Nacional Agraria]. <https://repositorio.una.edu.ni/2035/>
- Ezziyyani, M., S.C. Pérez, M.E. Requena, L. Rubio y M.E. Candela 2004. Biocontrol por *Streptomyces rochei* –Ziyani–, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. *Anales de Biología* 26: 69-78. <https://revistas.um.es/analesbio/article/view/30471>
- Flores, P., Lerdon, J., Bravo, R., y Acuña, I. (2008). Factibilidad de implementar pronosticadores automatizados para controlar el tizón tardío de la papa en el sur de Chile. *Agro sur*, 36(1), 37-42. <https://doi.org/10.4206/agrosur.2008.v36n1-06>
- Fry, W. E., & Goodwin, S. B. (1997). Re-emergence of potato and tomato late blight in the United States. *Plant Disease*. 81(12):1349- 1357. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.12.1349>
- Gallegly, M.E., and Hong, C. 2008. *Phytophthora*: identifying species by morphology and DNA fingerprints. First Edition. Minnesota, US.A. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, U.S.A. 158 p.
- García-Núñez, H. G., Martínez-Campos, Á. R., Hermosa-Prieto, M. R., Monte-Vázquez, E., Aguilar-Ortigoza, C. J., & González-Esquivel, C. E. (2017). Morphological and molecular characterization of native isolates of *Trichoderma* and its potential biocontrol against *Phytophthora infestans*. *Revista mexicana de fitopatología*, 35(1), 58-79. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1605-4>
- Gopi, R., Avasthe, RK, Kalita, H., Yadav, A., Das, SK & RAI, D. (2020). Eco-friendly management of tomato late blight using botanicals, bio-control agents, compost tea and copper fungicides. *The Indian Journal of Agricultural Sciences*, 90 (1), 35-39. <https://doi.org/10.56093/ijas.v90i1.98525>
- Hernández, B., Badia, M.M., & Perez, M.(2011). Potencialidades del genero *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y control biológico de hongos fitopatógenos.*CENIC*, 131-138.
- Hernández, E. A. (2018). Dinámica temporal del tizón tardío [*Phytophthora infestans* (mont.) de Bary] en el cultivo de papa (*Solanun tuberosum* L.) e impacto ambiental de las prácticas de manejo [Tesis de Maestría, Universidad Nacional Agraria]. <https://repositorio.una.edu.ni/3749/>

- Infante, D., Martínez, B., González, N., y Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de protección vegetal*, 24(1), 14-21. https://www.researchgate.net/publication/262498589_mecanismos_de_accion_de_trichoderma_frente_a_hongos_fitopatogenos
- International Potato Center [CIP].(2015).*International Potato Center*.Obtenido de <https://cipotato.org/es/lapapa/dato-y-cifras-de-la-papa/>
- Kariuki, W. G., Mungai, N. W., Otaye, D. O., Thuita, M., Muema, E., Korir, H., & Masso, C. (2020). Antagonistic effects of biocontrol agents against *Phytophthora infestans* and growth stimulation in tomatoes. *African Crop Science Journal*, 28(s1), 55-70. <https://doi.org/10.4314/acsj.v28i1.5S>
- Kovačič G. R., Lešnik M & Vršič S. (2013). An overview of the copper situation and usage in viticulture. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 19 (No 1) 50-59.
- Martínez, E. P., y Osorio, J. A. (2007). Estudios preliminares para la producción de un biosurfactante bacteriano activo contra *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 8(2), 5-16. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=449945023001>
- Mesa-Vanegas, A. M., Marin, A., y Calle-Osorno, J. (2020). Metabolitos secundarios en *Trichoderma* spp. y sus aplicaciones biotecnológicas agrícolas. *Actualidades biológicas*, 41(111), 32–44. <https://doi.org/10.17533/udea.acbi.v41n111a02>
- Michel-Aceves, A. C., Otero-Sánchez, M. A., Solano-Pascacio, L. Y., Ariza-Flores, R., Barrios-Ayala, A., & Rebolledo-Martínez, A. (2009). Biocontrol *in vitro* con *Trichoderma* spp. de *Fusarium subglutinans* (Wollenweb. y Reinking) Nelson, Toussoun y Marasas y *F. oxysporum* Schlecht., Agentes Causales de la" Escoba de Bruja" del Mango (*Mangifera indica* L.). *Revista mexicana de fitopatología*, 27(1), 18-26. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092009000100003
- Miranda, Y, U., y Lanzas, W, J. (2007). Evaluación de alternativas químicas y biológicas en el manejo del tizón tardío [*Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary] en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum*). [Tesis de ingeniería, Universidad Nacional Agraria]. <https://repositorio.una.edu.ni/2024/1/tnh20m672.pdf>
- Molina, J. D. D., Mairena Santos, B., y Aguilar, B. L. (2004). *Manejo integrado de plagas: A MIP en el cultivo de la papa*. Instituto Nicaraguense de Tecnología Agropecuaria, Managua (Nicaragua). <https://cenida.una.edu.ni/relectronicos/RENH10M722.pdf>
- Morales, C. A. (1999). *Evaluación del manejo de fungicidas para el control de tizón tardío (Phytophthora infestans de Bary) en papa en Estelí, Nicaragua*. <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/4dd9c03d-121a-4cd5-ad91-a0a99f845c13/content>

- Noroña, C, J, P., y Tipanquiza, I, J, J. (2010). Evaluación del comportamiento en el cultivo de papa (*solanum tuberosum*) variedades" INIAP; Natividad, INIAP Estela"; versus un testigo, la variedad tradicional" Bolona" en el cantón Paute provincia del Azuay. [Tesis de ingeniería]. <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/4744>
- Oliva-Ortiz, L., Velázquez-Alcaraz, T., Sosa-Pérez, R., Ruvalcaba, L., Valdés, T., Arciniega-Ramos, J. & López Orona, C. (2017). Controlling Fusarium wilt of chickpea (*Cicer arietinum* L.) with native microorganisms of Sinaloa, Mexico. *Agrociencia*. 51. 683-695.
https://www.researchgate.net/publication/320145714_Controlling_Fusarium_wilt_of_chickpea_Cicer_arietinum_L_with_native_microorganisms_of_Sinaloa_Mexico
- Páez, O., Gómez, L., Brenes, A., y Valverde, R. (2001). Resistencia de aislamientos de *Phytophthora infestans* al metalaxyl en el cultivo de la papa en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 25(1), 33-44.
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43625103>
- Pérez, W., y Forbes, G. (2008). *El tizón tardío de la papa*. Centro Internacional de la Papa (CIP). <https://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/08/004271.pdf>
- Rivera, J. M., Brown, J. K., Weller, S., y Melgar, J. C. (2014). *Consideraciones técnicas para el efectivo manejo integrado del tizón tardío en papa*. La Lima, Cortes, Honduras. http://bvvirtual.infoagro.hn/xmlui/bitstream/handle/123456789/180/consideraciones_tecnicas_para_manejo_de_tizon_tardio_en_papa.pdf?sequence=1
- Riveros, F., Sotomayor, R., Rivera, V. y Espinoza, B. (2003). Resistencia de *Phytophthora infestans* (Montagne) de Bary a Metalaxyl, en cultivo de papas en el norte de Chile. *Agricultura Técnica*, 63(2), 117-124. <https://hdl.handle.net/20.500.14001/36845>
- Rizo, D. (2019). Producción de papa con Buenas Prácticas Agrícolas. Belgica. https://assets.rikolto.org/paragraph/attachments/guia_papa_1.pdf
- Robledo, M. N. (2015). Susceptibilidad/resistencia de *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary a fungicidas. [Tesis de doctorado, Instituto de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas]. http://colposdigital.colpos.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/10521/2510/Robledo_Esqueda_MN_DC_Fitopatologia_2014.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Sadurní, J. M. (21 de septiembre de 2020). La gran hambruna irlandesa, un desastre humanitario. https://historia.nationalgeographic.com.es/a/gran-hambruna-irlandesa-desastre-humanitario_15669
- Sánchez, I, E. (2016). Caracterización del agente causal de la pudrición radicular del aguacate y *Trichoderma* sp., como potencial agente de control biológico en Nicaragua. [Tesis de maestría, Universidad Nacional Agraria]. <https://repositorio.una.edu.ni/3359/1/tnh20s194.pdf>

- Soto, A., Rodríguez, G., Fernández, Y. L., Pedraza, M. E., López, L., Díaz, M., y Fernández, S. P. (2017). Protocolos de aislamiento y diagnóstico de *Phytophthora* spp. enfoque aplicado a la investigación. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 8(8), 1867-1880. <https://doi.org/10.29312/remexca.v8i8.708>
- Tyśkiewicz, R., Nowak, A., Ozimek, E., & Jaroszuk-Ściseł, J. (2022). *Trichoderma*: The current status of its application in agriculture for the biocontrol of fungal phytopathogens and stimulation of plant growth. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4), 2329. <https://doi.org/10.3390/ijms23042329>
- Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I., & Santos-Villalobos, S. D. L. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista mexicana de fitopatología*, 36(1), 95-130. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>
- Wan, Y., Zhang, C., Liang, J., Wu, L., Gao, W & Jiang J. (2020). Iturin A extracted from *Bacillus subtilis* WL-2 affects *Phytophthora infestans* via cell structure disruption, oxidative stress, and energy supply dysfunction. *Frontiers in microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.536083>
- Mendoza, R, B., y Espinoza, A. (2017). Guía técnica para muestreos de suelo. <https://repositorio.una.edu.ni/3613/1/P33M539.pdf>

IX. ANEXOS

1. Hoja de colecta de datos

| Finca | Tiempo h | Repetición/plato | Cuadrante | Testigo (crecimiento en mm) | Tratamiento (mm) |
|-------------------|-------------|------------------|-----------|-----------------------------------|---------------------|
| FEZ (El zacatón) | 24 | 1 | 1 | | |
| FEZ (El zacatón) | 24 | 1 | 2 | | |
| FEZ (El zacatón) | 24 | 1 | 3 | | |
| FEZ (El zacatón) | 24 | 1 | 4 | | |
| FEZ (El zacatón) | 24 | 2 | 1 | | |
| FEZ (El zacatón) | 24 | 2 | 2 | | |
| FEZ (El zacatón) | 24 | 2 | 3 | | |
| FEZ (El zacatón) | 24 | 2 | 4 | | |
| FER (El robledal) | 24 | 3 | 1 | | |
| FER (El robledal) | 24 | 3 | 2 | | |
| FER (El robledal) | 24 | 3 | 3 | | |
| FER (El robledal) | 24 | 3 | 4 | | |
| FER (El robledal) | 24 | 4 | 1 | | |
| FER (El robledal) | 24 | 4 | 2 | | |
| FER (El robledal) | 24 | 4 | 3 | | |
| FER (El robledal) | 24 | 4 | 4 | | |
| FRJ (Rosita) | 24 | 5 | 1 | | |
| FRJ (Rosita) | 24 | 5 | 2 | | |
| FRJ (Rosita) | 24 | 5 | 3 | | |
| FRJ (Rosita) | 24 | 5 | 4 | | |
| FRJ (Rosita) | 24 | 6 | 1 | | |
| FRJ (Rosita) | 24 | 6 | 2 | | |
| FRJ (Rosita) | 24 | 6 | 3 | | |
| FRJ (Rosita) | 24 | 6 | 4 | | |

2. Análisis estadístico de los tratamientos frente a *P. infestans*

Shapiro-Wilks (modificado) sobre variable capacidad inhibitoria

| Variable | n | Media | D.E. | W* | p(Unilateral D) |
|----------|----|-------|-------|------|-----------------|
| PICR | 12 | 70.75 | 20.59 | 0.80 | 0.0097 |

Análisis de la varianza

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|----------|----|----------------|-------------------|------|
| PICR | 12 | 0.94 | 0.90 | 9.25 |

Cuadro de Análisis de la Varianza sobre variable capacidad inhibitoria (SC tipo I)

| F.V | SC | gl | CM | F | p-valor |
|-------------|---------|----|---------|-------|---------|
| Modelo | 4407.42 | 5 | 881.48 | 20.59 | 0.0010 |
| Tratamiento | 4322.92 | 3 | 1440.97 | 33.66 | 0.0004 |
| Finca | 84.50 | 2 | 42.25 | 0.99 | 0.4260 |
| Error | 256.83 | 6 | 42.81 | | |
| Total | 4664.25 | 11 | | | |

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=18.49249

Error: 42.8056 gl: 6

| Tratamiento | Medias | n | E. E | Categorías |
|--------------------------|--------|---|------|------------|
| Metalaxyl+mancozeb | 88.00 | 3 | 3.78 | A |
| Oxicloruro de cobre | 86.00 | 3 | 3.78 | A B |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 68.33 | 3 | 3.78 | B |
| <i>Trichoderma</i> | 40.67 | 3 | 3.78 | C |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)