



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA
Y PARASITOLOGÍA



**Especies de *Bacillus* aisladas de la rizósfera de
Asparagus officinalis L. y su potencial en el control de
hongos filamentosos causantes de pudrición en raíz y tallo**

TESIS

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN
BIOLOGÍA MICROBIOLOGÍA - PARASITOLOGÍA**

PRESENTADO POR:

Br. Liz Lorena Hernández Cueva

Br. Hayns Jhordy Tarrillo Espinoza

LAMBAYEQUE, PERÚ

2017

**Especies de *Bacillus* aisladas de la rizósfera de
Asparagus officinalis L. y su potencial en el control de
hongos filamentosos causantes de pudrición en raíz y tallo**

TESIS

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA
MICROBIOLOGÍA - PARASITOLOGÍA**

APROBADO POR:

Dr. Eduardo Julio Tejada Sánchez

PRESIDENTE

MSc. Consuelo Rojas Idrogo

SECRETARIA

Dra. Gianina Llontop Barandiaran

VOCAL

Dra. Carmen Rosa Carreño Farfán

PATROCINADORA

LAMBAYEQUE, PERÚ

2017

DEDICATORIA

A Dios, por haberme permitido llegar hasta este punto y poder lograr mis objetivos, además de su infinito amor y bondad que a pesar de todas las adversidades nunca me abandonó.

A mis padres Raquel Cueva Hernández y Heber Hernández Saavedra por su amor y apoyo incondicional y haberme dado la mejor herencia que es la educación.

A mi querida hermana Ana Claudia, por estar conmigo siempre, por su cariño y por los ánimos que siempre me dio.

LIZ LORENA HERNÁNDEZ CUEVA

DEDICATORIA

*A Dios por brindarme salud, fortaleza
para salir adelante en cada paso que
doy en mi vida, sin abandonarme en
los momentos más difíciles.*

*A mis padres, Olga Espinoza Díaz y
Saúl Tarrillo Estela por estar a mi
lado y apoyarme en cada
instante, darme ánimos, amor,
educación y por todos los sacrificios que
han hecho para ayudarme a alcanzar
mis objetivos .*

*A mi hermano Jhoín por preocuparse
por mí, por brindarme su cariño, por su
ayuda y orientación en cada experiencia
vivida.*

HAYNS JHORDY TARRILLO ESPINOZA

AGRADECIMIENTOS

Nuestro más sincero agradecimiento:

*A Dios quien fue nuestro guía constante,
por darnos la fortaleza para culminar
esta hermosa etapa en nuestras vidas.*

*A nuestros padres, hermanos y familiares
por su apoyo incondicional haciendo que
sea posible alcanzar nuestro objetivo.*

*Un agradecimiento muy especial a
nuestra asesora la Dra. Carmen Rosa
Carreño Farfán por sus valiosos aportes
como su conocimiento, tiempo, paciencia
y dedicación en la elaboración de esta
tesis.*

*A nuestros amigos y cada una de las
personas que nos brindaron su ayuda en
la realización del presente trabajo.*

Líz L. Hernández Cueva - Hayns J. Tarrillo Espinoza

Índice

I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	4
2.1 Antecedentes de la investigación	4
2.2 Base teórica	10
2.2.1 Pudriciones causadas por hongos fitopatógenos	12
2.2.2 <i>Asparagus officinalis</i> L.	13
III. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1 Materiales	15
3.1.1 Material biológico.....	15
3.1.2 Población y muestra	15
3.2 Métodos	15
3.2.1 Variable de la fase descriptiva.....	15
3.2.2 Variables de la fase experimental.....	15
3.2.3 Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis	16
3.2.4 Lugar de muestreo	16
3.2.5 Obtención de muestras para el aislamiento de <i>Bacillus</i> spp.	19
3.2.6 Aislamiento e identificación de hongos filamentosos asociados a pudrición de raíz y tallo de espárrago.....	19
3.2.7 Prueba de patogenicidad de los hongos filamentosos.....	27
3.2.8 Aislamiento e identificación fenotípica de <i>Bacillus</i> spp	32
3.2.9 Prueba de antagonismo <i>in vitro</i> de <i>Bacillus</i> spp. frente a los hongos fitopatógenos.....	34
3.2.10 Hongos fitopatógenos y <i>Bacillus</i> spp. seleccionados.....	36
3.2.11 Ensayo de biocontrol en invernadero.....	36
3.2.12 Análisis estadísticos de los datos	41
IV RESULTADOS	43
4.1 Hongos filamentosos asociados a pudrición de raíz y tallo en plantas de espárrago.....	43
4.2 Patogenicidad de hongos filamentosos.....	49
4.3 Bacterias del género <i>Bacillus</i> aisladas e identificadas fenotípicamente en la rizósfera de espárrago	49

4.4 Efecto antagonista de <i>Bacillus</i> spp frente a hongos fitopatógenos.....	49
4.5 Especies de <i>Bacillus</i> seleccionadas e identificadas.....	54
4.6 Efecto de <i>Bacillus</i> spp. en la severidad de la pudrición de la raíz y tallo de <i>Asparagus officinalis</i> L.	60
4.7 Efecto de <i>Bacillus</i> spp. en la altura de <i>Asparagus officinalis</i> L.....	60
V. DISCUSIÓN.....	81
VI. CONCLUSIONES	88
VII. RECOMENDACIONES.....	89
VIII. RESUMEN.....	90
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
X. ANEXOS.....	99

Índice de tablas

Tabla 1.	Lote de procedencia demuestras de raíces con suelo rizosferico de <i>Asparagus officinalis</i> L. en el fundo Josymar, Viru, La Libertad.....	18
Tabla 2.	Análisis físico – químico de suelo rizosferico de <i>Asparagus officinalis</i> L. en Viru, La Libetad, 2016	20
Tabla 3.	Características microscópicas de <i>Fusarium</i> spp.....	46
Tabla 4.	Número de plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. sin y con síntomas en el follaje 30 días después de la inoculación de diferentes especies de <i>Fusarium</i> spp.....	52
Tabla 5.	Número de plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. según la escala de severidad de pudrición de raíz y tallo por diferentes especies de <i>Fusarium</i>	52
Tabla 6.	Severidad de pudrición de raíz y tallo por <i>Fusarium</i> spp. en plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L.	52
Tabla 7.	Características diferenciales de especies de <i>Bacillus</i> identificadas en rizoplano y rizósfera de <i>Asparagus officinalis</i> L. “espárrago”, 2016.....	53
Tabla 8.	Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) de <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>F. proliferatum</i> y <i>F. solani</i> por efecto de <i>Bacillus</i> spp.....	58
Tabla 9.	Tasa de crecimiento micelial y porcentaje de inhibición del crecimiento radial de hongos fitopatógenos por efecto de <i>Bacillus</i> spp. seleccionadas.....	59
Tabla 10.	Severidad de síntomas de marchitez vascular según escala del Centro Internacional de Agricultura Tropical, en el follaje de <i>Asparagus officinalis</i> L. inoculado con <i>Bacillus</i> spp. y <i>F. proliferatum</i>	61
Tabla11.	Severidad de síntomas de marchitez vascular según escala del Centro Internacional de Agricultura Tropical, en el follaje de <i>Asparagus officinalis</i> L. inoculado con <i>Bacillus</i> spp. y <i>F. oxysporum</i>	63
Tabla 12.	Índices de efectividad (%) de <i>Bacillus</i> spp. en la altura de <i>Asparagus officinalis</i> L. inoculado con <i>Fusarium proliferatum</i>	66

Tabla 13.	Índices de efectividad (%) de <i>Bacillus</i> spp. en la altura de <i>Asparagus officinalis</i> L. inoculado con <i>F. oxysporum</i>	72
Tabla 14.	Análisis de varianza de la altura de <i>Asparagus officinalis</i> L. para los factores hongo fitopatógeno, tiempo y control de la pudrición.....	76
Tabla 15.	Prueba de la Diferencia Mínima Significativa, DMS ($\alpha = 0,05$) de la altura de <i>Asparagus officinalis</i> L. para el factor hongo fitopatógeno....	76
Tabla 16.	Prueba de la Diferencia Honestamente Significativa de Tukey ($\alpha=0,05$) de la altura de <i>Asparagus officinalis</i> L. para el factor tiempo.....	77
Tabla 17	Prueba de la Diferencia Honestamente Significativa de Tukey ($\alpha= 0,05$) de la altura de <i>Asparagus officinalis</i> L. para el factor control de la pudrición.....	77
Tabla 18	Prueba de la Diferencia Honestamente Significativa de Tukey ($\alpha= 0,05$) de la altura de <i>Asparagus officinalis</i> L. para la interacción hongo fitopatógeno – tiempo.....	79
Tabla 19	Prueba de la Diferencia Honestamente Significativa de Tukey ($\alpha= 0,05$) de la altura de <i>Asparagus officinalis</i> L. para la interacción tiempo – control de la pudrición.....	80

Índice de figuras

Figura 1.	Diseño completamente aleatorio para determinar el efecto de <i>Bacillus</i> spp. en el control de hongos fitopatógenos y desarrollo vegetativo en <i>Asparagus officinalis</i>	17
Figura 2.	Ubicación de la provincia de Virú, región La Libertad, abril, 2016 (https://www.google.com.pe/maps/place/Vir%C3%BA/@8.5664616,-78.794859,10z/data=!4m5!3m4!1s0x91ac59407c7b0391:0x6c172095672753ce!8m2!3d-8.5528417!4d-78.6254767).....	18
Figura 3.	Extracción de raíces con suelo rizosférico de <i>Asparagus officinalis</i> L.....	20
Figura 4.	Colección de planta de <i>Asparagus officinalis</i> L. con síntomas de pudrición.....	21
Figura 5.	Secado a temperatura ambiental de raíces y tallos de <i>Asparagus officinalis</i> L.....	21
Figura 6.	Corte en fragmentos de tallo y raíces de <i>Asparagus officinalis</i> L.....	22
Figura 7.	Desinfección de fragmentos de tallo y raíces de <i>Asparagus officinalis</i> L. con etanol al 70%.....	22
Figura 8.	Desinfección de fragmentos de tallo y raíces de <i>Asparagus officinalis</i> L. con agua destilada esterilizada.....	23
Figura 9.	Tejido desinfectado vegetal en papel secante esterilizado.....	25
Figura 10.	Siembra de fragmento de tallo de <i>Asparagus officinalis</i> L. en agar papa dextrosa más antibiótico.....	25
Figura 11.	Colonias de hongos filamentosos desarrolladas en agar papa dextrosa más antibiótico.....	26
Figura 12.	Cultivos puros de hongos filamentosos aislados de <i>Asparagus officinalis</i> L.....	26
Figura 13.	Suelo experimental en vasos de tecnopor.....	28
Figura 14.	Semillas de <i>Asparagus officinalis</i> L.	28
Figura 15.	Hidratación de semillas de <i>Asparagus officinalis</i> L. en agua clorada	29
Figura 16.	Desinfección de semillas de <i>Asparagus officinalis</i> L. con insecticida.....	29

Figura 17.	Plántulas de <i>Asparagus officinalis</i> L. desarrolladas en condiciones de casa de mallas.....	31
Figura 18.	Inmersión del sistema radicular en una suspensión acuosa del hongo fitopatógeno.....	31
Figura 19.	Raíces con suelo rizosférico de <i>Asparagus officinalis</i> L. deshidratadas.....	33
Figura 20.	Raíces con suelo rizósferico de <i>Asparagus officinalis</i> L. deshidratadas.....	33
Figura 21.	Prueba de antagonismo <i>in vitro</i> de <i>Bacillus</i> spp.....	35
Figura 22.	Hongo fitopatógeno cultivado en agar papa dextrosa.....	35
Figura 23.	Suelo agrícola, arena de río y humus.....	38
Figura 24.	Suelo experimental contenido en macetas de arcilla.....	38
Figura 25.	Inóculo bacteriano asperjado en coronas de <i>Asparagus officinalis</i> L.....	40
Figura 26.	Inoculación del hongo fitopatógeno en las heridas de la base de los tallos de <i>Asparagus officinalis</i> L.	40
Figura 27.	Medición de altura de tallo de <i>Asparagus officinalis</i> L.....	42
Figura 28.	Colonia fúngica de <i>Fusarium oxysporum</i> en agar papa dextrosa.....	44
Figura 29.	Colonia fúngica de <i>Fusarium proliferatum</i> en agar papa dextrosa.....	44
Figura 30.	Colonia fúngica de <i>Fusarium verticillioides</i> en agar papa dextrosa.....	45
Figura 31.	Colonia fúngica de <i>Fusarium solani</i> en agar papa dextrosa.....	45
Figura 32.	Monofiálides cortas de <i>Fusarium oxysporum</i>	46
Figura 33.	Microconidias en cadena de <i>Fusarium proliferatum</i>	47
Figura 34.	Monofiálides de <i>Fusarium verticillioides</i>	47
Figura 35.	Macroconidia de <i>Fusarium solani</i>	48
Figura 36.	Clamidosporas de <i>Fusarium solani</i>	48
Figura 37.	Plantas sanas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 30 días después de la aplicación de agua destilada(a) e inoculación de hongo no patógeno (b).....	50

Figura 38.	Planta clorótica de <i>Asparagus officinalis</i> L. 30 días después de la inoculación de <i>Fusarium oxysporum</i> en la corona...	50
Figura 39.	Planta marchita de <i>Asparagus officinalis</i> L. 30 días después de la inoculación de <i>Fusarium verticillioides</i> en la corona.....	51
Figura 40.	Planta muerta de <i>Asparagus officinalis</i> L. 30 días después de la inoculación de <i>Fusarium oxysporum</i> en la corona.....	51
Figura 41.	Frecuencia de <i>Bacillus</i> spp. con antagonismo a <i>Fusarium</i> spp.....	55
Figura 42.	<i>Bacillus</i> sp14.2 con antagonismo <i>in vitro</i> a <i>F. solani</i>	55
Figura 43.	Frecuencia de <i>Bacillus</i> spp. con efecto limitante a <i>Fusarium</i> spp....	56
Figura 44.	<i>Bacillus</i> spp.78.5 y 85.3 con efecto limitante <i>in vitro</i> a <i>F. proliferatum</i>	56
Figura 45.	Frecuencia de <i>Bacillus</i> spp. sin antagonismo ni efecto limitante a <i>Fusarium</i> spp	57
Figura 46.	<i>Bacillus</i> spp.92.2 y 93.2 sin antagonismo ni efecto limitante <i>in vitro</i> a <i>F. oxysporum</i>	57
Figura 47.	Severidad de síntomas de marchitez vascular en el follaje de <i>Asparagus officinalis</i> L. inoculado con <i>Bacillus</i> spp. y <i>Fusarium proliferatum</i>	62
Figura 48.	Severidad de síntomas de marchitez vascular en el follaje de <i>Asparagus officinalis</i> L. inoculado con <i>Bacillus</i> spp. y <i>Fusarium oxysporum</i>	64
Figura 49.	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 10 días después de la inoculación y la siembra de coronas con <i>Fusarium proliferatum</i>	65
Figura 50.	Altura de <i>Asparagus officinalis</i> L. 10 días después de la inoculación de <i>Bacillus</i> spp. y <i>Fusarium proliferatum</i>	65
Figura 51.	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 20 días después de la inoculación y la siembra de coronas con <i>Fusarium proliferatum</i>	67
Figura 52.	Altura de <i>Asparagus officinalis</i> L. 20 días después de la inoculación de <i>Bacillus</i> spp. y <i>Fusarium proliferatum</i>	67
Figura 53.	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 30 días después de la inoculación y la siembra de coronas con <i>Fusarium proliferatum</i>	68

Figura 54.	Altura de <i>Asparagus officinalis</i> L. 30 días después de la inoculación de <i>Bacillus</i> spp. y <i>Fusarium proliferatum</i>	68
Figura 55.	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 40 días después de la inoculación y la siembra de coronas con <i>Fusarium proliferatum</i>	70
Figura 56.	Altura de <i>Asparagus officinalis</i> L. 40 días después de la inoculación de <i>Bacillus</i> spp. y <i>Fusarium proliferatum</i>	70
Figura 57.	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 10 días después de la inoculación y la siembra de coronas con <i>Fusarium proliferatum</i>	71
Figura 58.	Altura de <i>Asparagus officinalis</i> L. 10 días después de la inoculación de <i>Bacillus</i> spp. y <i>Fusarium oxysporum</i>	71
Figura 59.	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 20 días después de la inoculación y la siembra de coronas con <i>Fusarium proliferatum</i>	73
Figura 60.	Altura de <i>Asparagus officinalis</i> L. 20 días después de la inoculación de <i>Bacillus</i> spp. y <i>Fusarium oxysporum</i>	73
Figura 61.	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 30 días después de la inoculación y la siembra de coronas con <i>Fusarium proliferatum</i>	74
Figura 62.	Altura de <i>Asparagus officinalis</i> L. 30 días después de la inoculación de <i>Bacillus</i> spp. y <i>Fusarium oxysporum</i>	74
Figura 63.	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 40 días después de la inoculación y la siembra de coronas con <i>Fusarium proliferatum</i>	75
Figura 64.	Altura de <i>Asparagus officinalis</i> L. 40 días después de la inoculación de <i>Bacillus</i> spp. y <i>Fusarium oxysporum</i>	75

I. INTRODUCCIÓN

La pudrición de raíz y tallo de las plantas causada por especies de *Fusarium* es económicamente importante y afecta considerablemente el rendimiento de los cultivos agrícolas (Castillo, 2011; Lugo, 2011). En *Asparagus officinalis* L. "espárrago" la enfermedad se denomina podredumbre de raíces y corona (PRC), en cuya etiología compleja se han identificado *F. oxysporum* f. sp. *asparagi*, *F. proliferatum* y *F. solani*. Se observa en la mayoría de las zonas de cultivo del mundo y causa graves pérdidas económicas. Los síntomas son podredumbre y coloración vascular de raíces, rizomas y tallos, lesiones necróticas sobre la superficie de raíces y de tallos, reducción del tamaño de las plantas, amarilleo y senescencia de los tallos y turiones y en casos graves, muerte de las plantas. Consecuentemente, el rendimiento del cultivo disminuye lentamente, tanto por una menor producción individual de las plantas enfermas, como por la disminución de la densidad de plantas debido a la muerte de las más afectadas (Borrego, 2014).

El control de la pudrición en raíz y tallo, es difícil debido a la prolongada supervivencia de los patógenos en el suelo, su fácil diseminación con el material de propagación y la escasa resistencia de los cultivares de espárrago. Para el manejo de esta enfermedad existen opciones de control químico disponible; sin embargo, la aplicación de fungicidas durante el desarrollo de la planta resulta ineficaz o difícil y además la escasa especificidad de estos productos afecta negativamente la microbiota del suelo (Durán, 2001; Borrego, 2014; Ríos et al., 2016).

Las rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas (Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR) que incluyen especies del género *Bacillus*, constituyen una alternativa sostenible y ecológica para el manejo de las pudriciones en raíz y tallo del espárrago. Estas bacterias están consideradas entre las más eficaces para el control de patógenos causantes de enfermedades radiculares y

foliares en las plantas, mediante mecanismos de antibiosis, competencia y actividad enzimática lítica (Reinoso et al., 2007., Layton et al., 2011; Altuna & Pelaez, 2013; Perleche & Rentería, 2013; Rodriguez, 2013). En la rizósfera de los cultivos de espárrago de la zona esparraguera de Trujillo, se encuentran especies de *Bacillus* con características de controladores biológicos de hongos fitopatógenos; sin embargo, las poblaciones de estos microorganismos antagonistas han sido reducidas por las actividades antropogénicas, especialmente por los plaguicidas químicos aplicados en el manejo de los cultivos agrícolas (Velasco et al., 2015) y tampoco se ha realizado investigación para aislarlas, caracterizarlas y determinar su potencial como biocontroladores.

El uso de agentes de control biológico y mayoritariamente los microorganismos antagónicos son una alternativa al control químico de hongos fitopatógenos. *Bacillus* es el género de bacterias más utilizado para el biocontrol, debido a que se disemina ampliamente en diferentes hábitas, forma esporas, produce antibióticos y además se comporta como promotor de crecimiento en plantas (Perleche & Rentería, 2013; Altuna y Pelaez, 2013). Desde los puntos de vista social y económico las empresas en la actualidad buscan garantías de inocuidad, calidad, máxima seguridad y bienestar para los trabajadores y protección del ambiente y recursos naturales. En este contexto, el uso de bacterias del género *Bacillus* como biocontroladores de fitopatógenos minimizará el riesgo del personal durante la aplicación de los plaguicidas químicos, así como también reducirá la contaminación de los alimentos y del ambiente.

Por lo expuesto, se planteó el siguiente problema ¿Cuáles son las especies de *Bacillus* aisladas de la rizósfera de espárrago y cuál es su potencial *in vitro* y en casa de mallas como controladores de hongos filamentosos causantes de pudrición en raíz y tallo? El objetivo general fue: Aislar e identificar especies de *Bacillus* en la rizósfera de espárrago y determinar su potencial como controladores de hongos filamentosos causantes de pudrición en raíz y tallo. Los objetivos específicos fueron: Aislar e identificar hongos filamentosos asociados a pudrición de raíz y tallo en plantas de espárrago, determinar la patogenicidad de los hongos en espárrago,

aislar e identificar fenotípicamente *Bacillus* en la rizósfera de plantas de espárrago, determinar el efecto antagonista *in vitro* de *Bacillus* spp. frente a los hongos fitopatógenos, seleccionar los tres cultivos de *Bacillus* con mayor efecto antagonista *in vitro*, determinar el efecto de tres cultivos de *Bacillus* spp. en la severidad de la pudrición de la raíz y tallo y en el desarrollo vegetativo del espárrago en condiciones de casa de mallas. La hipótesis planteada fue: las especies de *Bacillus* aisladas de la rizósfera de espárrago tienen potencial en el control de hongos filamentosos causantes de pudrición en raíz y tallo, con efecto antagonista del crecimiento *in vitro*, disminución en la severidad de la enfermedad y promoción del crecimiento de las plantas en condiciones de casa de mallas.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de la investigación

Las especies de *Bacillus* son ubicuas y han sido aisladas de raíces y rizósfera de diversos cultivos agrícolas como *Physalis peruviana* L. “uchuva” (Venner & Martin, 2009), *Solanum tuberosum* L. “papa” (Reinoso et al., 2007; Calvo & Zúñiga, 2010), *Glycine max* L. “soya” (Wahyudi et al., 2011), *Oryza sativa* L. (Badía et al., 2011), *Lycopersicon esculentum* Mill. “tomate” (Ríos & Zúñiga, 2012), *Jatropha curcas* L. “piñon blanco” (Aguilar & Coral, 2013), *Gossypium* sp. “algodón” (Salaheddin et al., 2010), *Zea mays* L. “maíz” (Altuna & Pelaez, 2013), e inclusive malezas (Perleche & Rentería, 2013).

Bacillus spp. junto a *Pseudomonas* y *Streptomyces* son considerados las bacterias más eficaces para el control de patógenos causantes de enfermedades foliares y radicales en las plantas (Fernández, 2001; Adesemoye et al., 2008). Los mecanismos indirectos o de biocontrol incluyen la competencia por un nicho ecológico o por nutrientes, la interacción directa con el patógeno (parasitismo y lisis enzimática), antibiosis, producción de sideróforos e inducción de resistencia sistémica en las plantas (Hernández et al., 2006; Bhattacharyya & Jha, 2012). Las especies de *Bacillus* son de crecimiento rápido por lo que colonizan rápidamente un ambiente (Martim et al., 2003; Perleche & Rentería, 2013), producen antibióticos (Schallmey et al., 2004; Layton et al., 2011), sideróforos (Wahyudi et al., 2011), enzimas quitinolíticas (Reinoso et al., 2007; Perleche & Rentería, 2013), compuestos antifúngicos difusibles y volátiles (Reinoso et al., 2007). La antibiosis, competencia y actividad enzimática lítica son características de *Bacillus* spp. (Perleche & Rentería, 2013).

En diversos trabajos científicos se ha demostrado el antagonismo de especies de *Bacillus* frente a fitopatógenos como *Alternaria solani* y *Rhizoctonia solani* (Reinoso et al., 2007), *Fusarium* spp.

(Villa et al., 2007; Velasco et al., 2015), *F. moniliforme* y *R. solani* (Izzedin & Medina, 2011), *F. oxysporum* (Lugo, 2011), *F. oxysporum* y *F. solani* (Castillo, 2011), *F. acuminatum* (Corrales et al., 2011), *Fusarium pseudomygamai* (Corrales et al., 2012), *F. verticillioides* (Altuna & Peláez, 2013; Perleche & Rentería, 2013), *Colletotrichum gloeosporioides* (Ruiz et al., 2014), *Moniliophthora roreri* (Suárez & Rangel, 2014), *R. solani* (Castillo et al., 2015), *F. oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium crustosum*, *Alternaria alternata* y *Aspergillus nidulans* (Ríos et al., 2016).

El efecto antifúngico de *Bacillus* y *Paenibacillus* se investigó frente a *Alternaria solani* Sor y *Rhizoctonia solani* Kühn. Se colectaron muestras de suelo de regiones paperas, se sometieron a tratamiento térmico de 85°C durante 15 minutos, se sembraron en agar nutritivo y se aislaron los bacilos Gram positivos. El efecto antagonista se determinó por el método de enfrentamiento en cultivos duales, a 30°C, durante 4-7 días. Con las bacterias que inhibieron el desarrollo fúngico se determinó el efecto de los metabolitos por el método de “envenenamiento” y se determinó el porcentaje de inhibición. Se obtuvieron 85 aislados con características semejantes a *Bacillus*, *Brevibacillus* y *Paenibacillus*, entre los que 21,17% inhibió el desarrollo de *A. solani* y 20% a *R. solani*. El 44% de las bacterias investigadas produjo metabolitos que inhibieron totalmente el crecimiento de *A. solani* y solo el 14,85% inhibió a *R. solani*. Los aislados con el mayor efecto inhibitorio se identificaron como *B. licheniformis*, *B. subtilis* y *Paenibacillus polymyxa*, siendo considerados promisorios para el control biológico de *A. solani* y *R. solani* (Reinoso et al., 2007).

Las cepas de *Bacillus* de una colección fueron investigadas en su potencial como antagonistas de fitopatógenos del género *Fusarium*. *Bacillus subtilis* 10, 44 y 45 y *Fusarium solani*, *F. sporotrichois* y *F. oxysporum* Schlenchtenderhl se enfrentaron mediante cultivo dual en agar nutritivo, papa dextrosa y King B. Las bacterias se cultivaron formando un triángulo equilátero en el medio contenido en

placas de Petri de 90 mm de diámetro. En el centro se colocó un disco de 5mm de diámetro, de un cultivo de 7 días de los hongos y el crecimiento micelial se midió a las 72 y 96 horas. Los porcentajes de inhibición fueron 67% para *F. solani*, 50% para *F. sporotrichois* y *F. oxysporum*, concluyéndose que las bacterias evaluadas son promisorias para el desarrollo de productos biocontroladores de *Fusarium* spp. (Villa et al., 2007).

El uso de agentes de control biológico es una alternativa eficaz para el tratamiento de enfermedades en plantas. Se realizó una investigación para identificar los metabolitos secundarios producidos por una cepa de *Bacillus subtilis* antagonica a *Fusarium* sp. La bacteria se llevó a fermentación sumergida en caldo Luria Bertani modificado, a 37°C, 150rpm, durante 24 horas. Los metabolitos se extrajeron con metanol y se identificaron por cromatografía de alta resolución, HPLC. En las pruebas de antagonismo se utilizó el método de excavación en placa. En cinco perforaciones, una en el centro y las cuatro restantes en las orillas con disposición equidistante, se depositaron 100µL del metabolito activo y en cuatro puntos de la placa, a similar distancia se sembró el fitopatógeno. Se determinó la presencia de Iturina A en una concentración de 151,805mg L⁻¹. El extracto del metabolito inhibió en 80–93,3% el crecimiento de *Fusarium*, considerándose a *Bacillus subtilis* una bacteria prometedora para la producción de antifúngicos (Ariza & Sánchez, 2012).

En condiciones *in vitro* se realizó una investigación con el objetivo de identificar taxas de microorganismos patógenos y antagonistas y evaluar la actividad antagonica *in vitro* de dos aislados de *Bacillus* y dos de *Trichoderma* contra hongos fitopatógenos. Éstos se aislaron de frutos y tejidos enfermos de árboles de manzano y de suelo cercano a la rizósfera y se identificaron a nivel morfológico y molecular. La evaluación del antagonismo *in vitro* se realizó colocando en el centro de placas de Petri círculos de papel filtro con la suspensión del hongo y en los puntos cardinales círculos de papel con la suspensión de bacterias. Los fitopatógenos se identificaron como *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium crustosum*, *Alternaria alternata* y *A. nidulans*. Los antagonistas

correspondieron a *T. asperellum*, *B. methylotrophicus* y *B. amyloliquefaciens*. Los halos de inhibición por antagonismo fueron de 2,6–4,5mm con *Trichoderma* y 4,9–13,2mm con *B. methylotrophicus*. Ambos antagonistas, bacterias y hongos inhibieron el crecimiento *in vitro* de los fitopatógenos y pueden ser considerados agentes de control biológico (Ríos et al., 2016).

El biocontrol de *Rhizotocnia solani* y *Fusarium* sp. en tomate se investigó empleando microencapsulados de *Bacillus subtilis*. Las cepas B1, J1 y M2 y un consorcio de los tres cultivos bacterianos se homogenizaron con alginato de sodio, se encapsularon con CaCl_2 y se mezclaron con semillas de tomate desinfectadas. Plántulas con 10 cm de altura se trasplantaron a macetas previamente inoculadas con los microencapsulados y con propágulos y esporas de *R. solani* y *Fusarium* sp. A los 30, 60 y 90 días se determinó que la altura, área foliar, peso de la biomasa seca de las hojas, tallos y biomasa radicular aumentaron respecto al testigo químico (TQ) y testigo absoluto (TA), alcanzando incrementos máximos de 18,2; 48,4; 77,5; 58,0 y 85,0%, respectivamente. La incidencia de la enfermedad fue de 0% con *Bacillus* B1, J1 y el consorcio, diferenciándose significativamente de TA (3,5%), TA (5,0%) y *Bacillus* M2 (1,5%). Los microencapsulados de *Bacillus* constituyen agentes de control de patógenos de suelo, cuya efectividad deberá ser corroborado en condiciones de campo (Hernández et al., 2010).

El efecto antagonista de *Trichoderma viride*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis* se investigó sobre *Phytophthora* spp., *Fusarium moniliforme* y *Rhizotocnia solani*, causantes de enfermedades en tomate, *Allium cepa* "cebolla" y *Capsicum annuum* "pimentón". En los bioensayos en medio sólido se utilizó el método de Kirby-Bauer o difusión en agar Sabouraud y en medio líquido el método suspensión en caldo Sabouraud. Las semillas se sumergieron por 24 horas en el caldo cultivado con los antagonistas y posteriormente en el caldo con los hongos fitopatógenos. Las semillas se sembraron en suelo abonado y se determinó el porcentaje de germinación y altura de las plántulas. En medio sólido los antagonistas inhibieron el crecimiento de los hongos, observándose halos de 2-15mm. En medio líquido *F. moniliforme* y *Phytophthora* spp. fueron inhibidos

totalmente mientras que *R. solani* mostró ligera resistencia, obteniéndose 3-20mm de crecimiento en el agar. La germinación de las semillas y altura de las plántulas se incrementó significativamente con la aplicación de los antagonistas. Los resultados mostraron que las bacterias investigadas pueden reducir el ataque de hongos fitopatógenos (Izzedin & Medina, 2011).

La utilización de microorganismos antagónicos es una estrategia de manejo de *Fusarium oxysporum* causante de la pudrición de la corona y raíz del tomate, pero se requiere de aislados eficaces contra el patógeno. Con el objetivo de seleccionar potenciales antagonistas, se investigaron nueve aislados de *Bacillus* spp. En una primera etapa se realizaron tres bioensayos en semilleros con plántulas de tomate, en cámara de crecimiento, con 12 horas luz, a 25°C y 12 horas oscuridad a 22°C. Plántulas de 5 días post-siembra se inocularon con $1,5 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ de cada aislado bacteriano y 10 días después con $1,0 \times 10^6$ microconidios de *Fusarium* mL⁻¹. En una segunda etapa se realizaron ensayos en rizocono de 60 días con tres aislados seleccionados. En semilleros, el 55,5% de aislados disminuyó 44–87% la severidad de la enfermedad. En rizoconos no se observó antagonismo hacia el fitopatógeno, pero sí incremento en la altura de las plántulas con *B. subtilis*144 y *B. thuringiensis*, concluyéndose que estos aislados tienen potencial antagónico a *F. oxysporum* (Lugo, 2011).

La producción de tomate de cáscara es limitada por enfermedades fungosas como la marchitez ocasionada por *Fusarium* spp. Con el objetivo de encontrar una alternativa se investigaron bacterias del género *Bacillus* en el control de la enfermedad en *Physalis ixocarpa* “tomatillo”. En una primera etapa se determinó la patogenicidad de aislados de *Fusarium oxysporum* y *F. solani* inoculándolos en sustrato esterilizado donde se sembraron semillas de tomatillo. En suelo rizosférico se aislaron las bacterias y se enfrentaron a los fitopatógenos en agar papa dextrosa, registrándose halos de 1-2cm de inhibición del crecimiento de *F. oxysporum* y 1-3cm de *F. solani*. En una segunda etapa los cinco aislados con mayor inhibición de *F. oxysporum* (14, 31, 35, 45, 47) y *F. solani* (22, 26, 31, 16, 47) se inocularon (10^7 UFC mL⁻¹) en macetas con sustrato previamente

inoculado con los hongos fitopatógenos. A los 150 días se determinó incremento en la altura, peso del follaje, número de flores, volumen y peso de la raíz y diámetro de tallos, seleccionándose *Bacillus* spp. 35 y 31 por alcanzar los mayores valores en las plantas evaluadas (Castillo, 2011).

Rosmerinus officinalis L. “romero” es afectada por la marchitez vascular producida por *Fusarium* spp. En la búsqueda de alternativas de control se investigó el efecto de *Bacillus* spp. frente a *Fusarium acuminatum* aislado de plantas afectadas. *Bacillus liqueniformis*, *B. subtilis*, *B. megaterium* y *B. brevis* se enfrentaron *in vitro* al hongo y se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento. En invernadero, las raíces de plantas de romero se sumergieron en suspensiones bacterianas (10^8 UFC mL⁻¹) durante 15 minutos. A las 24 horas se inoculó 1 mL de una suspensión (10^6 conidios mL⁻¹) del hongo y después de 35 días se evaluó la severidad de la enfermedad. *In vitro* se observó 53-70% de inhibición del micelio del hongo. En invernadero, las bacterias disminuyeron la severidad de la marchitez vascular, registrándose 13,3-31,6% frente a 50% en el testigo positivo. También se observó aumento en la longitud de la raíz, tallo, peso de la biomasa aérea y radicular. La concordancia entre las pruebas *in vitro* e invernadero evidenciaron que las bacterias investigadas son una alternativa para el manejo de fitopatógenos en el romero (Corrales et al., 2011).

El efecto biocontrolador de *Bacillus* spp. frente a *Fusarium* sp. se investigó bajo condiciones de invernadero en plantas de *Thymus vulgaris* L. “tomillo”. La metodología incluyó el aislamiento del posible patógeno causante de la marchitez vascular en las plantas y su identificación por claves taxonómicas. Se realizaron pruebas de antagonismo directo en placa y ensayos bajo condiciones de invernadero, determinándose la severidad de la enfermedad cada 5 días durante 1 mes. Se identificó como causante de la enfermedad a *F. pseudonygamai*. En las pruebas de antagonismo con *B. subtilis* se alcanzó el mayor porcentaje (78%) de inhibición de crecimiento del patógeno *in vitro* y bajo condiciones de invernadero con esta bacteria se alcanzó la menor severidad (25%) de la enfermedad, mayor

longitud y peso de raíces. Se concluyó que *B. subtilis* presenta el mayor potencial biocontrolador de *Fusarium* sp. en plantas de tomillo (Corrales et al., 2012).

2.2 Base teórica

El uso intensivo e indiscriminado de agroquímicos ha provocado daños considerables en el ambiente y fundamentalmente a los organismos del suelo. Como consecuencia se observan residuos contaminantes, resistencia de insectos, ácaros y hongos que hace inefectivos a los productos químicos, eliminación de “enemigos naturales” o reguladores de las plagas de insectos y ácaros, surgimiento de plagas nuevas, eliminación de prácticas usadas tradicionalmente y dependencia al químico, contaminación de ríos y aguas subterráneas y sus consecuencias negativas en la fauna piscícola, avícola y en la salud humana. Esta problemática hace que cada día se incrementen las regulaciones y restricciones al uso de plaguicidas químicos, por lo que se requiere buscar nuevas alternativas como el uso de microorganismos benéficos en el control de patógenos en cultivos de importancia económica (Villa et al., 2007).

La implementación del control biológico de enfermedades en plantas es una alternativa amigable para el ambiente y una forma de dar cumplimiento a las exigencias de los países, en lo referente a residualidad de agroquímicos. El control biológico es más lento que el control químico, pero es más estable y duradero. (Corrales et al., 2012). El control biológico según Baker & Cook (1974) mencionados por Corrales *et al.* (2012) se define como la “reducción de la densidad del inóculo o de las actividades de un patógeno que produce una enfermedad, por uno o más organismos, en forma natural, a través de la manipulación del ambiente, hospedero o antagonista. De esta manera, es posible lograr un cultivo sano con el mínimo de pérdidas para el agricultor.

Los mecanismos indirectos o control biológico de las bacterias promotoras de crecimiento en plantas (PGPR) son aquellos que reducen la población y actividades de los fitopatógenos o microbiota rizosférica deletérea. Se mencionan la antibiosis, competencia, producción de sideróforos, interacción directa con el patógeno e inducción de resistencia. La competencia puede ser definida como el

comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, siempre y cuando la utilización del mismo por uno de los organismos reduzca la cantidad disponible para los demás. Un factor esencial para que exista competencia es la escasez o limitación de un elemento. La competencia puede ser por nutrimentos, oxígeno o por espacio. La competencia por carbono es la más importante para el control de hongos (Fernández, 2001).

Los sideróforos son compuestos extracelulares fluorescentes o no, de bajo peso molecular y con gran afinidad por el Fe^{3+} . El complejo sideróforo-hierro es reconocido por receptores de membrana específicos y es interiorizado por un proceso que involucra un intercambio de ligandos y que puede estar precedido o no por la reducción de hierro III o por la hidrólisis del sideróforo. Las rizobacterias "secuestran" el Fe^{3+} y lo convierten en un factor limitante, inhibiendo el crecimiento de fitopatógenos. Cuando el sideróforo se acopla con el hierro, éste se hace inaccesible para los microorganismos que no poseen los receptores proteicos específicos y que además no tienen mecanismos efectivos en la adquisición de hierro. Las plantas colonizadas por rizobacterias no son afectadas, porque pueden incorporar hierro solubilizado por los sideróforos y para incluir el Fe^{3+} en su nutrición, tienen estrategias como la liberación de protones, excreción de agentes reductores y producción de fitosideróforos o aminoácidos no proteicos que solubilizan los iones Fe^{3+} formando un complejo Fe-fitosideróforo (Hernández et al., 2006; Camelo et al., 2011; Martín, 2011; Tejera et al., 2011).

En la interacción directa entre el antagonista y el patógeno se consideran el parasitismo y la predación. El parasitismo está mediado básicamente por la lisis enzimática, que degrada las estructuras fúngicas parasitadas, por ejemplo las glucanasas, responsables de la exolisis. Entre las PGPR, *Streptomyces*, *Bacillus* y *Serratia*, producen quinasas e hidrolizan la quitina presente en la pared celular de los fitopatógenos. El complejo quitinasa comprende tres enzimas: exoquitinasa, endoquitinasas y quitobiasa. La primera de éstas libera dímeros solubles de bajo peso molecular, la segunda libera multidímeros de N-acetilglucosamina y la tercera quitobiasas de N-acetilglucosamina (Layton et al., 2011; Martín, 2011).

La resistencia sistemática inducida (ISR) es una respuesta de defensa de la planta ante la presencia y actividad de un agente biológico no patógeno y no relacionado con el agente inductor. La resistencia sistemática también puede ser inducida por sustancias químicas o por presencia de patógenos, denominándose entonces resistencia sistémica adquirida (SAR). Las diferencias entre ISR y SAR son el agente inductor y los signos que presenta la planta. ISR es un fenómeno independiente del ácido salicílico, etileno y ácido jasmónico y no produce la acumulación de proteínas desarrolladas en la SAR inducida por los patógenos o químicos (Camarena & de la Torre, 2007).

2.2.1 Pudriciones causadas por hongos fitopatógenos

El efecto de organismos fitopatógenos sobre las plantas resulta de las reacciones bioquímicas entre las sustancias producidas por ellos y los exudados de raíces. Algunos hongos fitopatógenos producen enzimas, toxinas, reguladores de crecimiento y polisacáridos. Estos últimos son importantes en las enfermedades vasculares porque interfieren pasivamente con la translocación de agua en las plantas y pueden ser fungitóxicos. Las pudriciones de la raíz por *Fusarium* spp. aumentan su severidad cuando las plantas sufren agobio fisiológico causado por bajas temperaturas, sequía intermitente o excesiva cantidad de agua en el suelo, herbicidas, y compactación del suelo (Agrios, 1995). En espárrago las especies de *Fusarium* producen pudriciones caracterizadas por reducción del tamaño de la planta, clorosis, marchitez y seca de los frondes, podredumbres de turiones, rizomas y raíces, coloración vascular en la base del tallo y rizomas, y lesiones de color castaño en la superficie de tallos y raíces (Elmer, 2001; Corpas et al., 2006).

El espárrago es un cultivo perenne y los fitopatógenos pueden permanecer todo el año en su huésped. *Fusarium oxysporum* es más común en rizomas y raíces que *F. proliferatum*. La primera especie sobrevive muy bien en el suelo como saprófito y forma clamidosporas adaptadas a sobrevivir en el suelo durante muchos años, al igual que *F. solani*; no obstante, *F. proliferatum*, más frecuente en tallos, forma esporodocios en los que produce conidios que pueden dispersarse con facilidad y rapidez por el aire o por salpicadura del agua de lluvia o riego por

aspersión y además pueden sobrevivir en el suelo en forma de restos de micelio con paredes delgadas y endurecidas (Durán, 2001; Borrego, 2014).

Fusarium proliferatum y *F. oxysporum* en agar papa dextrosa (APD) se asemejan; sin embargo, se distinguen fácilmente por la presencia de microconidios, en cadena en *F. proliferatum* y clamidosporas y microconidios en falsas cabezas en *F. oxysporum*. A su vez, *F. solani* se distingue de *F. oxysporum* al examinar la longitud de las fialides portadoras de microconidios: muy largas en *F. solani* y cortas en *F. oxysporum* y por las propias microconidias de *F. solani* que son más anchas ovales y con pared más gruesa (Leslie & Summerell, 2006; Borrego, 2014).

2.2.2 *Asparagus officinalis* L.

El cultivo de espárrago lidera los productos alimenticios de exportación en el Perú. Es una hortaliza perenne de la cual se consume el brote o tallo tierno denominado turión. Según el manejo agronómico, el turión puede ser blanco y verde. El espárrago blanco crece dentro de la tierra (aporcado), se cosecha antes que la yema salga de la tierra y si ésta sale el espárrago toma un color rosa morado. El espárrago verde se cultiva de plano y las yemas crecen ampliamente al aire libre, recibiendo la luz de sol y produciendo la fotosíntesis. Las cultivares de espárragos blancos más sembrados son Larac, Aneto, Cito y Desto y las de espárragos verdes son Mary Washington W500, UC 72 y UC 157 (Reyes, 2006; Agrobanco, 2007).

En el mundo, Perú y Tailandia producen espárrago todo el año. En el resto de países la producción es estacional, concentrándose entre abril y junio. Durante setiembre a febrero muy pocos países producen espárrago. En el Perú la producción se incrementa notablemente en agosto a marzo, teniéndose dos campañas para el espárrago verde, una inicial de enero a julio y la principal de setiembre a diciembre. En el Perú el cultivo se rige por la Norma Técnica Peruana 011.109:2001, elaborada con la Norma Internacional de la Comisión del Codex Alimentarius creada en 1963 por la FAO y OMS para desarrollar normas alimentarias, reglamentos y otros textos seleccionados bajo el Programa Conjunto FAO /OMS de Normas Alimentarias (Reyes, 2006).

El cultivo del espárrago requiere una buena preparación del terreno. El trasplante se puede realizar con plántulas de 10-12cm de altura obtenidas a partir de semillas híbridas UC-157 o con yemas y raíces denominadas "garras" o "coronas" que se obtienen en un terreno con una gran densidad de plantas por m². Las plántulas se desarrollan en melgas, con una densidad de una semilla cada 5-7cm y un promedio de 4000-7000 plántulas por melga. Luego éstas son cortadas o chapodadas a la altura de la base, obteniéndose la garra y son trasladadas al campo definitivo. La densidad de plantación en el cultivo de espárrago verde es de 25 000-30 000 plantas ha⁻¹. El primer riego es para mantener la humedad del sistema radicular y favorecer la formación de la garra. Los otros dos riegos corresponden a la recolección y al desarrollo anual de la parte aérea. El riego de recolección debe mantener la humedad en la zona donde van a emerger los turiones y el riego de desarrollo de la parte aérea se debe hacer por gravedad sino se dispone de riego por goteo; aplicando 1-2 riegos semanales. El último riego se realiza 3 meses antes de la cosecha para evitar las brotaciones tardías que puedan consumir las reservas de las raíces (Reyes, 2006; Vallejo et al., 2009).

En la etapa de formación y desarrollo de los plumeros, la parte aérea sintetiza las sustancias de reserva que son acumuladas en el sistema radicular; pero en la fase de recolección se produce una migración de estas reservas hacia la corona y son empleadas para la formación de turiones. Finalizado el periodo de aprovisionamiento y restitución de las sustancias de reserva extraídas de la planta durante la recolección, la parte aérea empieza a secarse y el chapodo debe realizarse próximo a la base del tallo. El cultivo tiene moderados requerimientos nutritivos. Se realiza el abonado de fondo conjuntamente con una labor profunda el primer año de plantación y durante el desarrollo vegetativo es imprescindible el abonado de cobertera. El primer año se aplican 30-60 tha⁻¹ de estiércol, 60 UF (unidades de fertilizante) ha⁻¹ N, 100–200 UF ha⁻¹ P₂O₅ y 150–250 UF ha⁻¹ K₂O. El segundo año corresponde 15tha⁻¹ de estiércol, 70–90 UF ha⁻¹ P₂O₅ y 100–190 UF ha⁻¹ K₂O. El tercer año se aplican 15 tha⁻¹ de estiércol, 100–250 UF ha⁻¹ N, 70-100 UF ha⁻¹ P₂O₅ y 150–250 UF ha⁻¹ K₂O (Reyes, 2006).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Material biológico

El material biológico estuvo constituido por raíces con suelo rizosférico adherido de espárrago, cultivos puros de *Bacillus* spp. y coronas de espárrago cultivar UC-157 F2.

3.1.2 Población y muestra

En la investigación descriptiva la población estuvo constituida por las plantas de espárrago del fundo Josymar (50ha) en Virú, Trujillo y se investigó una muestra no probabilística de 96 plantas colectadas durante abril de 2016. El número de muestras fue calculado (Vásquez et al., 2012), tomando en cuenta una prevalencia de 90% (Anexo 1), determinada en un estudio piloto por los investigadores. En la investigación explicativa la población fueron las bacterias del género *Bacillus* aisladas e identificadas en el suelo rizosférico de espárrago durante abril de 2016 y la muestra no probabilística y por conveniencia estuvo constituida por tres cultivos de *Bacillus* spp. seleccionados.

3.2 Métodos

3.2.1 Variable de la fase descriptiva

Variable cuantitativa: Potencial antagónico *in vitro* de *Bacillus* spp frente a hongos fitopatógenos (Tasa de crecimiento radial de hongos fitopatógenos, TC; porcentaje de inhibición del crecimiento radial de hongos fitopatógenos, PICR).

3.2.2 Variables de la fase experimental

Variable independiente: Cultivos (3) de *Bacillus* spp.

Variables dependientes: Control de hongos fitopatógenos (severidad de pudrición de raíz y tallo de plantas de espárrago), desarrollo vegetativo (altura, biomasa aérea y radicular de plantas de espárrago).

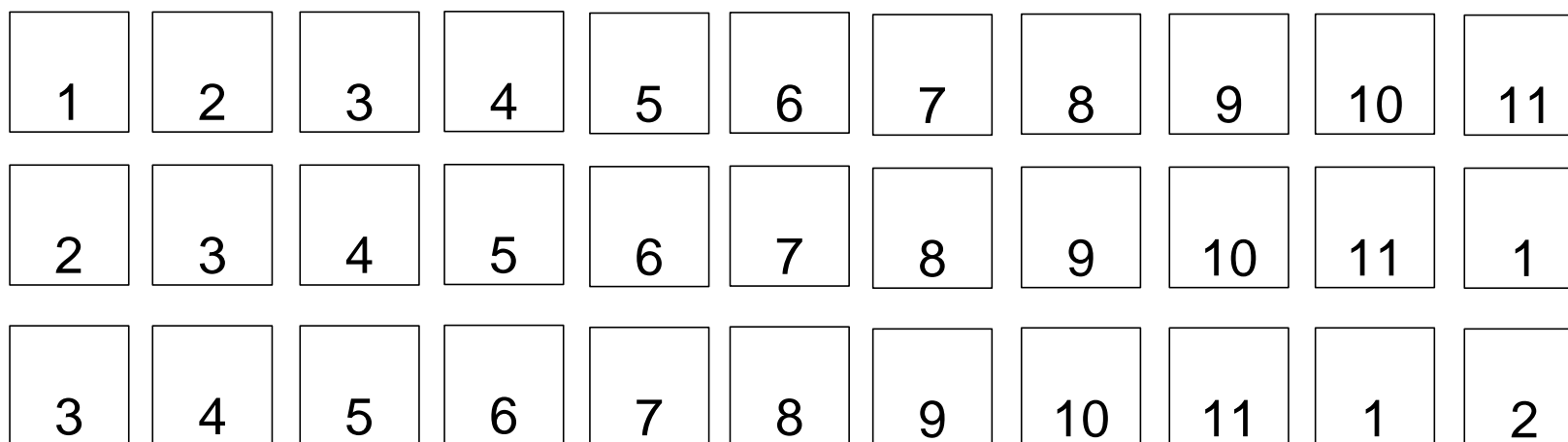
3.2.3 Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis

La investigación se realizó en dos fases. La primera fase descriptiva correspondió al aislamiento e identificación de los hongos filamentosos asociados a la pudrición de raíz y tallo y especies de *Bacillus* de la rizósfera de plantas de espárrago, así como también se determinó el potencial antagonístico *in vitro* de *Bacillus* spp. frente a los hongos fitopatógenos. En la segunda fase experimental se determinó el efecto de *Bacillus* spp. en el control de fitopatógenos causantes de pudrición de raíz y tallo y en el desarrollo vegetativo de plantas de espárrago, en condiciones de invernadero.

La hipótesis en la primera fase se contrastó con el diseño no experimental de “sólo después” (Vásquez et al., 2012) y en la segunda fase con el diseño experimental completamente aleatorio, DCA, con arreglo factorial 2x4x5, investigándose tres variables independientes correspondientes a: a) Hongos fitopatógenos, con dos niveles: Hongo 1 y hongo 2, b) Tiempo con cuatro niveles: 10,20,30 y 40 días y c) Control de la pudrición, con cinco niveles: *Bacillus* sp.1, *Bacillus* sp.2, *Bacillus* sp.3, sin *Bacillus* sp., fungicida químico (Hernández et al., 2010), incluyéndose un testigo negativo: sin *Bacillus* spp., sin hongo y sin fungicida. Los tratamientos fueron 11 con tres repeticiones, totalizando 33 unidades experimentales (Figura 1).

3.2.4 Lugar de muestreo

Las 96 muestras de raíces con suelo rizósferico de espárrago se colectaron en el fundo Josymar, ubicado en el lote 10,6 del sector IV, Proyecto Especial Chavimochic, en la provincia Virú, región La Libertad (Figura 2, tabla 1, anexo 2). Virú tiene una superficie de 3218,74km² y limita por el norte con la provincia de Trujillo, por el este con las provincias de Julcán y Santiago de Chuco, por el sur con el Departamento de Ancash y por el oeste con el océano Pacífico (Municipalidad Provincial de Virú, 2016). El fundo Josymar tiene 50 ha, distribuidas en 24 lotes de aproximadamente 1,5ha cada uno. Al momento del muestreo 19 lotes estaban sembrados con espárrago cultivar UC-157 F2 (cuatro plantas por metro lineal), con 1,8-2,5 años transcurridos después del transplante de coronas y una población promedio de 30 000 plantas ha⁻¹.



T1 – T3 = *Bacillus* spp. (1,2,3) + Hongo fitopatígeno 1

T9 = Testigo positivo 1(Hongo fitopatígeno 1)

T4 – T6 = *Bacillus* spp. (1,2,3) + Hongo fitopatígeno 2

T10 = Testigo positivo 2 (Hongo fitopatígeno 2)

T7 = Testigo químico 1 (Fungicida químico + Hongo fitopatígeno 1) T11 = Testigo negativo (sin *Bacillus* spp., sin hongo,

T8 = Testigo químico 2(Fungicida químico + Hongo fitopatígeno 2) sin fungicida)

Figura 1. Diseño completamente aleatorio para determinar el efecto de *Bacillus* spp. en el control de hongos fitopatógenos y desarrollo vegetativo en *Asparagus officinalis* L.



Figura 2. Ubicación de la provincia de Virú, región La Libertad, abril, 2016 (<https://www.google.com.pe/maps/place/Vir%C3%BA/@-8.5664616,-78.794859,10z/data=!4m5!3m4!1s0x91ac59407c7b0391:0x6c172095672753ce!8m2!3d-8.5528417!4d-78.6254767>).

Tabla 1. Lote de procedencia de muestras de raíces con suelo rizósferico de *Asparagus officinalis* en el Fundo Josymar, Virú, La Libertad

Lote	Nº de surcos	Nº de muestras
A1-B1-C1	54	15 (1-15)
A2-B2-C3	61	15 (16-30)
A3-B3-C3	62	15 (31-45)
A4-B4-C4	63	15 (46-60)
C5	56	5 (61-65)
A6-B6-C6	64	15 (66-88)
C7	49	5 (81-85)
C8	55	6 (86-91)
C9	51	5 (92-96)
Total: 19 lotes	515	96

3.2.5 Obtención de muestras para el aislamiento de *Bacillus* spp.

En el campo de cultivo de espárrago, cada cinco surcos se seleccionó la planta más vigorosa y se extrajeron aproximadamente 50g de raíces con suelo adherido (Figura 3), se depositaron en bolsas de polietileno debidamente identificadas e inmediatamente se transportaron en una caja térmica ($10 \pm 1^{\circ}\text{C}$) hacia el Laboratorio de Microbiología y Parasitología, sección Biotecnología Microbiana de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo en Lambayeque.

En simultáneo al muestreo de raíces con suelo rizosférico de espárrago para el aislamiento de *Bacillus* spp., se colectó una muestra representativa de 1kg de suelo para realizar el análisis físico-químico en el Instituto Nacional de Innovación y Extensión Agraria, Estación Experimental Vista Florida de Chiclayo. Según los resultados (Tabla 2), el suelo es ligeramente ácido (pH 6,5) y ligeramente salino (CE $3,06 \text{ dSm}^{-1}$), con textura arenosa, niveles bajos de materia orgánica (0,23%), nitrógeno (0,103ppm), fósforo disponible (6,0ppm) y potasio (203,0ppm).

3.2.6 Aislamiento e identificación de hongos filamentosos asociados a pudrición de raíz y tallo de espárrago

En el campo de cultivo se colectaron (Figura 4) plantas de espárrago con síntomas de pudriciones en raíz y tallo: podredumbre y coloración vascular de raíces y tallos, lesiones necróticas sobre la superficie de raíces y tallos, reducción de altura, amarilleo y senescencia de tallos (Borrego, 2014). Las plantas fueron transportadas en una caja térmica ($10 \pm 1^{\circ}\text{C}$) hacia el laboratorio, donde los tallos y raíces fueron separados de la parte aérea, se lavaron con agua potable hasta eliminar el suelo adherido y se dejaron secar (Carreño & Altamirano, 2016) a temperatura ambiental por 24 horas (Figura 5).

Los tejidos vegetales se cortaron en fragmentos de aproximadamente 0,5cm (Borrego et al., 2014), que incluyeron parte sana y enferma, se sumergieron en hipoclorito de sodio al 1% por 1 minuto, etanol al 70% por 0,5 minutos con agitación manual (Corrales et al., 2012) y se enjuagaron tres veces consecutivas con agua destilada esterilizada (Figuras 6,7,8).



Figura 3. Extracción de raíces con suelo rizosférico de *Asparagus officinalis* L.

Tabla 2. Análisis físico – químico de suelo rizosférico de *Asparagus officinalis* L. en Virú, La Libertad, 2016.

Clase		CE	MO	N	P	K
textual	pH	(dSm ⁻¹)	(%)	(%)	(ppm)	(ppm)
Arenoso	6,5	3,06	0.23	0,103	6,0	203,0



Figura 4. Colección de planta de *Asparagus officinalis* L. con síntomas de pudrición.



Figura 5. Secado a temperatura ambiental de raíces y tallos de *Asparagus officinalis* L.



Figura 6. Corte en fragmentos de tallo y raíces de *Asparagus officinalis* L.



Figura 7. Desinfección de fragmentos de tallo y raíces de *Asparagus officinalis* L. con etanol al 70%



Figura 8. Desinfección de fragmentos de tallo y raíces de *Asparagus officinalis* L. con agua destilada esterilizada.

El tejido desinfectado se secó con papel toalla esterilizado (Figura 9), se sembró en placas de Petri con agar papa dextrosa (PDA) más antibiótico Cloramfenicol (Figura 10, anexo 3) y se incubó a 30°C durante 4–5 días (Corrales et al., 2012). Las colonias de hongos filamentosos desarrollados (Figura 11) se purificaron por cultivos sucesivos en PDA y constituyeron los cultivos puros (Figura 12) que se guardaron en refrigeración (8°C).

La identificación de los hongos se realizó con cultivos desarrollados de una espora o cultivos monospóricos (Arias & Piñeros, 2008). Un fragmento de 0,1cm² del micelio del hongo cultivado en PDA durante 5 días se depositó en un tubo con 5mL de solución salina esterilizada (NaCl 0,87% p/v) y se homogenizó durante 1 minuto. Inmediatamente después se tomó 0,1mL de la suspensión de conidios y se llevó a un segundo tubo con 5mL de solución salina esterilizada, se homogenizó durante 1 minuto, se tomó una alícuota con el asa bacteriológica en anillo y se sembró por agotamiento y estría en placas de Petri con agar papa dextrosa. La incubación se realizó a 30°C y cada 6 horas, las placas de Petri se observaron bajo el microscopio óptico para detectar las esporas germinadas, que independientemente se transfirieron a tubos con agar papa dextrosa, continuando con la incubación hasta completar el desarrollo de la colonia.

La identificación del género de hongos filamentosos aislados se realizó en microcultivos, con ayuda de las claves taxonómicas de Seifert (1996). Mediante tinciones con azul de lactofenol se determinó la morfología del micelio, tipo de conidios, fiálides y clamidosporas producidas. Asimismo, se observaron las características macroscópicas de las colonias: aspecto, color y producción de pigmento de los hongos en agar papa dextrosa (Corrales et al., 2012).

La técnica de microcultivo en lámina (Arias & Piñeros, 2008) se realizó en una cámara húmeda consistente en una placa de Petri esterilizada conteniendo un triángulo de vidrio como soporte de una lámina portaobjetos y en cuya parte central se colocó un bloque de agar papa dextrosa de 0,5x0,5cm². Con el asa micológica se tomó pequeña porción de cultivo del hongo monospórico y se depositó en el centro de uno de los lados del agar.



Figura 9. Tejido desinfectado vegetal en papel secante esterilizado.



Figura 10. Siembra de fragmento de tallo de *Asparagus officinalis* L. en agar papa dextrosa más antibiótico.



Figura 11. Colonias de hongos filamentosos desarrolladas en agar papa dextrosa más antibiótico.



Figura 12. Cultivos puros de hongos filamentosos aislados de *Asparagus officinalis* L.

El mismo procedimiento se repitió en los tres lados restantes. Posteriormente, el bloque de agar fue cubierto con una laminilla cubreobjetos y en el fondo de la placa de Petri se depositó un trozo de algodón esterilizado y humedecido con agua destilada esterilizada y se incubó a temperatura ambiente (25°C) por 4 días. Para realizar el montaje la laminilla cubreobjetos se levantó con una pinza y se depositó sobre una lámina conteniendo en el centro una gota de azul de lactofenol. El exceso de colorante se eliminó con papel filtro y la observación se realizó en el microscopio con objetivo de 40X.

3.2.7 Prueba de patogenicidad de los hongos filamentosos

La prueba de patogenicidad de los hongos filamentosos aislados e identificados se realizó en plántulas de espárrago de 1 mes (Corrales et al., 2011), desarrolladas en condiciones de invernadero.

a. Obtención de plántulas de espárrago

Para obtener plántulas de espárrago, se preparó una mezcla de suelo agrícola, arena de río y humus, en la proporción 2:1:1, que fue distribuida en 50 vasos de tecnopor de 0,450 kg de capacidad (Figura 13), a razón de 0,340kg por vaso y después se sembraron las semillas de espárrago (Figura 14), cultivar UC-157 previamente hidratadas y desinfectadas (Regalado, 1992).

Para la hidratación, las semillas previamente tratadas por 3 minutos con hipoclorito de sodio 20% más 0,05% Tween 20 y enjuagadas por tres veces con agua destilada (Borrego et al., 2014) se acondicionaron en una bolsita de tocuyo, que fue sumergida en un recipiente de vidrio con 600 mL de agua de clorada (Figura 15), la misma que fue cambiada cada 24 horas, durante 96 horas (Regalado, 1992). Para la desinfección, las semillas se remojaron por 2 minutos en una solución del fungicida Benomyl polvo mojable-WP (Benlate), en la dosis de 2 gL⁻¹ de agua de clorada y posteriormente en una solución del insecticida en polvo soluble Acephate O, S-dimethylacetylphosphoramiothioate, (Orthene 75PS) en la dosis de 4,8 g kg⁻¹ (Figura 16).



Figura 13. Suelo experimental en vasos de tecnopor.



Figura 14. Semillas de *Asparagus officinalis* L.



Figura 15. Hidratación de semillas de *Asparagus officinalis* L. en agua declorada.



Figura 16. Desinfección de semillas de *Asparagus officinalis* L. con insecticida.

Las semillas de espárrago previamente tratadas se sembraron a 2cm de profundidad, separadas 2,5cm cada una de la otra, se cubrieron con la mezcla de suelo previamente obtenida y se mantuvieron bajo sombra en condiciones de invernadero durante 45-60 días (Figura 17).

b. Inoculación de hongo filamentosos

Las plántulas de espárrago fueron cuidadosamente retiradas de los vasos de tecnopor y el suelo radicular fue colectado y depositado en nuevos vasos. En la base del tallo de las plántulas se realizó una herida de 10mm (Castillo, 2011) e inmediatamente después el sistema radicular incluyendo la base del tallo se sumergieron durante 15 minutos (Corrales et al., 2011) en una suspensión acuosa del hongo correspondiente (Figura 18), a razón de diez plantas por hongo.

Para la obtención de la suspensión fúngica, previamente los hongos se cultivaron en PDA a 30°C durante 7 días y con la biomasa desarrollada se obtuvo una suspensión de conidios en solución salina esterilizada (NaCl 0,87% p/v), cuya concentración se estandarizó a 10^7 conidios mL⁻¹ mediante el recuento de células en la cámara de Neubauer (Borrego et al., 2014). Las plántulas inoculadas se sembraron en los vasos de tecnopor previamente acondicionadas con el suelo y se realizaron los riegos correspondientes con agua decolorada (24 horas), según los requerimientos, a temperatura ambiente, bajo condiciones de casa de mallas.

c. Evaluación de la severidad de la enfermedad

Durante los 30 días posteriores a la inoculación de los hongos filamentosos, las plantas de espárrago se examinaron cada 3 días para determinar síntomas de pudrición: reducción de altura, amarilleo y senescencia de tallos. Transcurridos los 30 días las plantas se extrajeron para observar las raíces y en simultáneo se tomaron fragmentos de tejido para sembrarlos en PDA y reaislar el hongo inoculado.

Con base al porcentaje del sistema radicular afectado con pudrición, la severidad de la enfermedad en espárrago se determinó con una escala de 1-5, considerando las categorías: 1= 1 a 20%; 2= 21 a 40%; 3= 41 a 60%; 4= 61 a 80% y 5= 81 a 100% del sistema radicular (Borrego et al., 2014).



Figura 17. Plántulas de *Asparagus officinalis* L desarrolladas en condiciones de casa de mallas.



Figura 18. Inmersión del sistema radicular en una suspensión acuosa del hongo fitopatógeno.

El porcentaje de severidad se calculó con la fórmula de Townsed and Heuberger (1943) descrita por Lugo (2011):

$$\text{Severidad (\%)} = \sum \frac{n.t}{5.N} \times 100$$

Donde:

n = Número de plantas en cada categoría

t= Valor numérico según escala asignada por categoría

5= Valor máximo de la escala por severidad

N= Número total de plantas por unidad experimental

d. Reaislamiento de los hongos filamentosos

Para cumplir con los postulados de Koch (Corrales et al., 2012) se realizaron cortes longitudinales en los tallos con el fin de observar los haces vasculares e identificar síntomas internos de marchitez vascular y el patógeno causante de los síntomas observados se reaisló de las raíces y tallos. Éstos se lavaron por tres veces con agua y Tween 80, se cortaron en fragmentos de aproximadamente 0,5cm, se sumergieron en hipoclorito de sodio al 1% durante 1 minuto con agitación manual y etanol al 70% durante 0,5 minutos con agitación, se enjuagaron tres veces con agua destilada esterilizada y se sembraron en PDA más antibiótico cloranfenicol. Transcurridos 8 días de incubación a 30°C se observaron las características macroscópicas de las colonias y microscópicas de las células, para determinar la compatibilidad con los hongos involucrados (Corrales et al., 2011).

3.2.8 Aislamiento e identificación fenotípica de *Bacillus* spp.

Para el aislamiento de *Bacillus* spp. (Ríos & Zuñiga, 2012), cada muestra de raíces y suelo rizósferico (Figura 19) fue deshidratado bajo sombra, durante 72 horas y después fue triturada y tamizada. Del material obtenido se tomaron 10g para realizar una dilución en 90mL de solución salina esterilizada: NaCl 0,87% p/v (Figura 20). Las diluciones se llevaron a tratamiento térmico, a 80°, durante 10 minutos y luego se enfriaron rápidamente con agua de caño.



Figura 19. Raíces con suelo rizosférico de *Asparagus officinalis* L. deshidratadas.

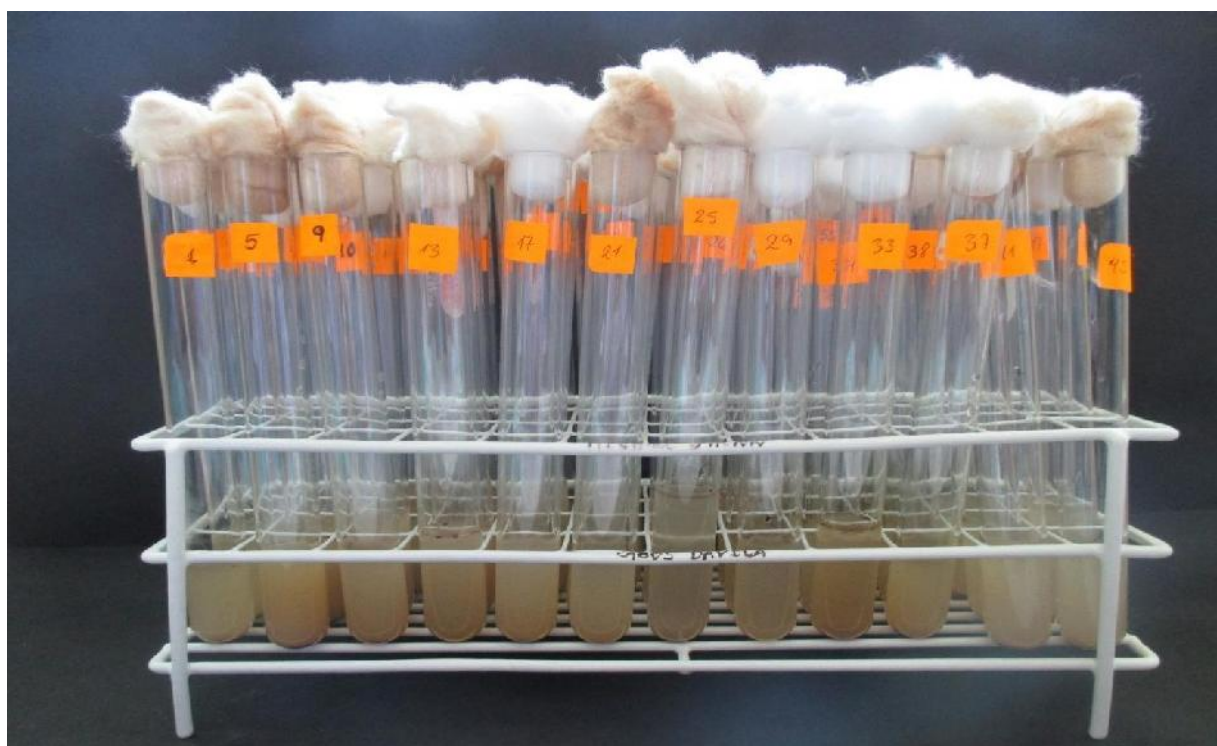


Figura 20. Diluciones de raíces con suelo rizosférico de *Asparagus officinalis* L. deshidratadas.

A continuación, se tomó una alícuota, se sembró mediante la técnica de agotamiento y estría sobre la superficie de agar nutritivo en placas de Petri y se sembró en aerobiosis, a 30°C durante 48 horas. Con las bacterias de las colonias desarrolladas se realizó tinción de Gram y los bacilos Gram positivos esporulados, catalasa positivos, se cultivaron en Agar Tripticosa Soya (TSA), constituyendo los cultivos puros que se guardaron en refrigeración (8°C).

El género *Bacillus* se identificó (Guillén et al., 2006; Cuervo, 2010), investigando la posición de las esporas y realizado las pruebas de catalasa, utilización del citrato como fuente de carbono y energía, crecimiento anaerobio en glucosa, producción de acidez a partir de arabinosa, manitol y xilosa, hidrólisis del almidón, lecitina y producción de acetoina o 2,3 butanodiol en la prueba de Voges – Proskauer.

3.2.9 Prueba de antagonismo *in vitro* de *Bacillus* spp. frente a los hongos fitopatógenos

El efecto antagonista de los cultivos de *Bacillus* investigados se determinó por el método de enfrentamiento de cultivos duales (Reinoso et al., 2007) o enfrentamiento directo dual (Corrales et al., 2012). Las bacterias se sembraron en paralelo ocupando un 1/6 del área de la placa de Petri con PDA y se incubaron a 30°C, por 48 horas. Cada placa se sembró con dos morfotipos bacterianos diferentes y se realizaron tres repeticiones para cada combinación.

Los tres cultivos de hongos fitopatógenos con los mayores valores en la severidad de la enfermedad en las plantas de espárrago se cultivaron en PDA a 30°C, durante 7 días. A continuación, en el centro de las placas de Petri cultivadas con *Bacillus* spp. se depositó un disco de 0,5cm de diámetro de PDA (Figura 21) con el hongo fitopatógeno, y como testigo absoluto el fitopatógeno se sembró sólo sin bacterias (Figura 22).

Transcurridos 3, 5 y 7 días se evaluó el control fúngico. Los halos de inhibición se midieron partiendo del borde externo del hongo hasta la línea donde se encontraba la bacteria.



Figura 21. Prueba de antagonismo *in vitro* de *Bacillus* spp.

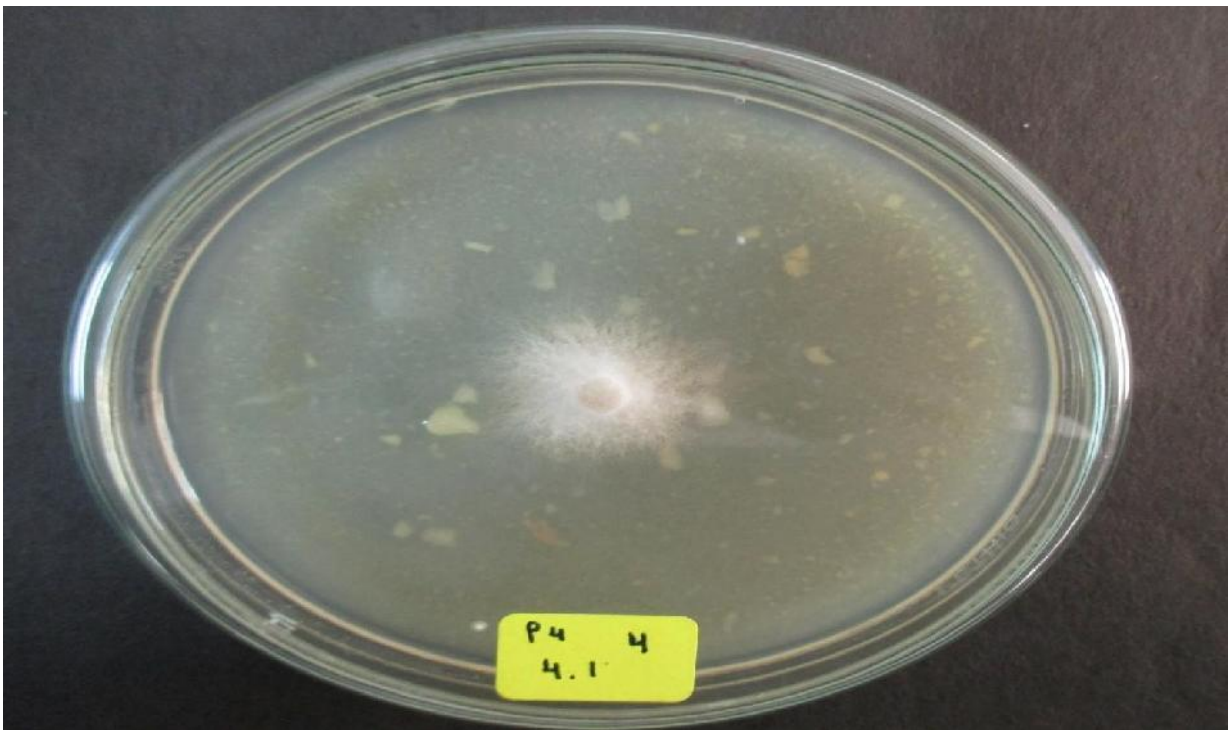


Figura 22. Hongo fitopatógeno cultivado en agar papa dextrosa.

Se consideraron positivos aquellos cultivos de bacterias que presentaron halos de inhibición; limitantes los que presentaron crecimiento micelial del hongo hasta las líneas de la bacteria sin alcanzar el borde de la placa y negativos aquellos donde el hongo llegó hasta el límite de la placa, pasando por encima de las líneas con las bacterias (Corrales et al., 2012).

La tasa de crecimiento micelial, TC o crecimiento radial *in vitro*, CRI (Ríos et al., 2016) se calculó en centímetros por día, considerando el radio de crecimiento micelial de la colonia fúngica desde el borde externo del disco de agar hasta el borde de la colonia y calculando su magnitud mediante la expresión utilizada por Corrales et al. (2011, 2012):

$TC = (C_f - C_i) / (T_f - T_i)$, donde C_f es el crecimiento radial final expresado en cm; C_i es el crecimiento radial inicial expresado en cm; T_f es el tiempo final y T_i es el tiempo inicial. El porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) se calculó mediante la fórmula:

$PICR (\%) = (R_1 - R_2) / (R_1) \times 100$, donde R_1 es el radio de la colonia del hongo testigo y R_2 es el radio de la colonia del hongo frente a la bacteria investigada (Astorga et al., 2013; Ríos et al., 2016).

3.2.10 Hongos fitopatógenos y *Bacillus* spp. seleccionados

Los dos cultivos de hongos filamentosos que alcanzaron la mayor severidad (%) en la pudrición de raíz y tallo de plantas de espárrago y los tres cultivos de *Bacillus* spp. con el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) de los hongos fitopatógenos, se seleccionaron para la fase experimental de la investigación. Asimismo, se identificó la especie de los tres cultivos de *Bacillus* spp. seleccionados.

3.2.11 Ensayo de biocontrol en invernadero

El biocontrol de hongos fitopatógenos por los cultivos de *Bacillus* con efecto antagónico *in vitro* se investigó en plantas de espárrago, cultivar UC-157 F2. Este cultivar, obtenido en 1980 en Estados Unidos (Farías et al., 2004), es específico para

la producción de turiones verdes y se comercializan los híbridos F1 y F2 que son los más precoces y productivos del mercado (Delgado, 2007).

El suelo experimental estuvo constituido por 132kg de una mezcla de suelo agrícola, arena de río y humus en la proporción 2:1:1 (Figura 23), que fue distribuido en macetas de arcilla de 7kg de capacidad, a razón de 4kg por maceta (Figura 24). El cultivo de espárrago y la inoculación de *Bacillus* spp. se realizó entre el 28 de diciembre de 2016 al 5 de febrero de 2017, registrándose las temperaturas máximas (29°C), mínima (21°C) y media (25°C), valores obtenidos por la Estación Meteorológica de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, ubicado en el Fundo "El Cienago" de Lambayeque (Anexo 4).

a) Inóculo

El inóculo de los hongos fitopatógenos se preparó con cultivos de 7 días de crecimiento en PDA, a los que se agregaron 20mL de agua destilada esterilizada para obtener una suspensión de conidios que se filtró en gasa esterilizada y su concentración se estandarizó a 10^4 conidios mL^{-1} , mediante el recuento de células en la cámara de Neubauer. La suspensión de conidios en Tween 80 el 0,03% se diluyó hasta 10^{-2} en tubos Eppendorf, de la última dilución se tomaron 50uL y utilizando la cámara de Neubauer se realizó el recuento de conidios (Corrales et al., 2011; 2012).

El inóculo de los biocontroladores *Bacillus* spp. se obtuvo con cultivos de las bacterias en agar nutritivo durante 24 horas, se agregó solución salina (NaCl 0,87% p/v) y la concentración se estandarizó por el método de turbidez óptica con el estándar de Mac Farland de 1×10^8 células mL^{-1} o tubo N°3 (Corrales et al., 2012).



Figura 23. Suelo agrícola, arena de río y humus.



Figura 24. Suelo experimental contenido en macetas de arcilla.

b) Bioensayo

Las coronas de espárrago de los tratamientos 1,2,3,4,5 y 6 se asperjaron con el inóculo de *Bacillus* spp. (80 mL por corona) con ayuda de un pulverizador de plástico de 500 mL de capacidad (Figura 25). En los testigos químicos T7y T8 las coronas se trataron por inmersión durante 5 minutos en una solución de fungicida Benomyl polvo mojable-WP, Benlate en la dosis de 2 gL⁻¹ de agua declorada previamente durante 24 horas. En el testigo absoluto T11 las coronas se sumergieron en agua destilada durante 5 minutos.

Transcurridos 30 minutos de la aplicación de los tratamientos, las coronas se sembraron en el suelo experimental, a razón de una corona por maceta. Los riegos se realizaron cada 3 días con agua previamente declorada, tomando en cuenta los requerimientos hídricos de las plantas. Después de 24 horas de la siembra, en las plantas de los tratamientos T1 a T10 se realizó una herida longitudinal de 1cm a 10mm de la base del tallo (Corrales et al., 2012) y con una jeringa estéril se aplicó 1mL del inóculo de los hongos fitopatógenos en las heridas de los tallos (Figura 26).

Las plantas se mantuvieron en la casa de mallas durante 40 días, siendo evaluadas cada 10 días (Corrales et al., 2012) para determinar los síntomas de la enfermedad: clorosis, pudrición y necrosis, con base a la escala de severidad utilizada por el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), para marchitez vascular por *Fusarium*, adaptada por Corrales et al.(2012): 0% (planta sana), 10% (no más del 10% del follaje total está marchito o clorótico), 25% (hojas marchitas o cloróticas), 50-70% (hojas marchitas o cloróticas), 100% (planta muerta, severamente infectada, prácticamente todo el follaje marchito, con clorosis, necrosis o defoliación prematura).



Figura 25. Inóculo bacteriano asperjado en coronas de *Asparagus officinalis* L.



Figura 26. Inóculación del hongo fitopatógeno en las heridas de la base de los tallos de *Asparagus officinalis* L.

El efecto de *Bacillus* spp. en el desarrollo vegetativo se determinó midiendo la altura (cm) de las plantas (Figura 27), considerando desde la base del tallo más alto hasta la yema terminal (Puicón, 2014). Con los valores obtenidos se calculó el índice de efectividad de la inoculación (IEI) en porcentaje, mediante la fórmula (Carreño, 2009) siguiente:

$$IEI (\%) = \frac{\text{Tratamiento con inoculación} - \text{Control sin inoculación}}{\text{Control sin inoculación}} \times 100$$

Transcurridos 40 días, se determinó la severidad de la enfermedad expresada en porcentaje del tejido aéreo afectado (Corrales et al., 2010):

$$\text{Severidad (\%)} = \frac{\sum(n \times I)}{N}$$

Donde:

n = número de unidades de muestreo clasificadas en cada clase

I = índice de severidad por clase

N = número total de unidades de muestreo observadas

c) Reaislamiento de los hongos fitopatógenos

El reaislamiento de los hongos fitopatógenos se realizó según la metodología explicada en el ítem 3.2.7.d.

3.2.12 Análisis estadístico de los datos

Con los valores de altura de las plantas de espárrago se realizaron las pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza y según los resultados se llevaron a cabo análisis paramétricos y no paramétricos (Hernández et al., 2010). En la presente investigación se utilizó el software estadístico SPSS versión 15,0 así como los programas de Microsoft Office Word, Excel versión 2013 y Minitab 15.



Figura 27. Medición de altura de tallo de *Asparagus officinalis* L.

IV. RESULTADOS

4.1 Hongos filamentosos asociados a pudrición de raíz y tallo en plantas de espárrago

En las raíces y tallos de plantas de espárrago con síntomas de pudrición: reducción en la altura, amarilleo, senescencia de tallos y lesiones necróticas, se obtuvieron 24 aislados de hongos filamentosos, correspondientes a cuatro morfotipos (Anexo 5). Las colonias del morfotipo 1 (14=58,33%) presentaron un micelio blanco, algodónoso con pigmento púrpura difusible oscuro; el morfotipo 2 (5=20,83%) un micelio durazno, algodónoso, sin pigmento difusible; el morfotipo 3 (3=12,5%) un micelio salmón, floco, sin pigmento difusible y el morfotipo 4 (2=8,33%) un micelio crema, escaso, sin pigmento difusible (Figuras 28,29,30,31).

Microscópicamente (Tabla 3) el morfotipo 1 presentó macroconidias medianas, relativamente delgadas, ligeramente curvadas, microconidias en coma o elipsoidales, monofialides cortas y clamidosporas solas y en pares; el morfotipo 2 presentó macroconidias esbeltas, rectas, con morfología apical curvada, microconidias piriformes en cadenas y polifialides; el morfotipo 3 presentó macroconidias largas y delgadas, morfología apical curvada, microconidias ovaladas en cadenas largas, monofialides y el morfotipo 4 presentó macroconidias anchas, rectas, gruesas con ápice redondeado, con cinco a siete septos; microconidias elipsoidales; monofialides largas y clamidosporas solas y en pares (Figuras 32 a 36). Con base a las características macroscópicas y microscópicas se identificaron *F. oxysporum* (morfotipo 1), *F. proliferatum* (morfotipo 2), *F. verticillioides* (morfotipo 3) y *F. solani* (morfotipo 4).



Figura 28. Colonia fúngica de *Fusarium oxysporum* en agar papa dextrosa.



Figura 29. Colonia fúngica de *Fusarium proliferatum* en agar papa dextrosa.



Figura 30. Colonia fúngica de *Fusarium verticillioides* en agar papa dextrosa.

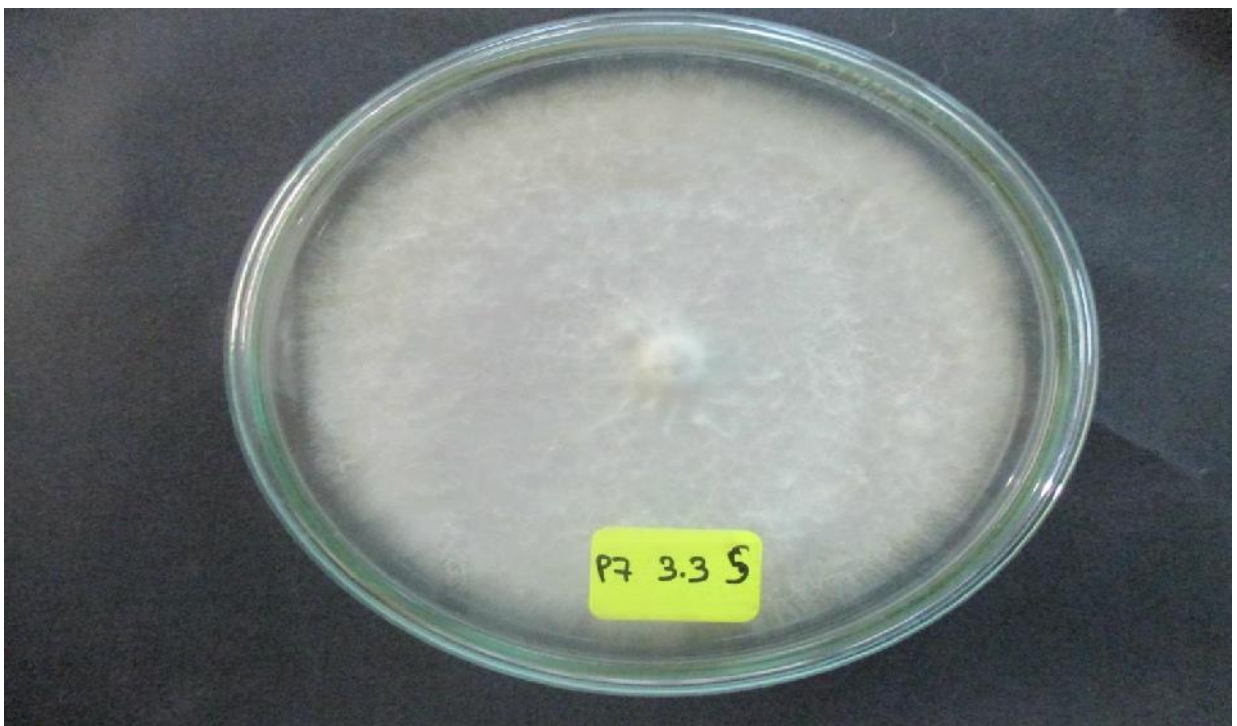


Figura 31. Colonia fúngica de *Fusarium solani* en agar papa dextrosa.

Tabla 3. Características microscópicas de *Fusarium* spp.

Características microscópicas	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. solani</i>
Macroconidias	Medianas, relativamente delgadas, ligeramente curvadas	Esbeltas, rectas, ápice curvado	Largas y delgadas, ápice curvado	Anchas, rectas, gruesas con ápice redondeado
Microconidias	Coma o elipsoidales	Piriformes en cadenas	Ovaladas en cadenas largas	Elipsoidales
Fialides	Monofiálides cortas	Polifiálides	Monofiálides	Monofiálides largas
Clamidosporas	Solas, pares	Ausentes	Ausentes	Solas, pares

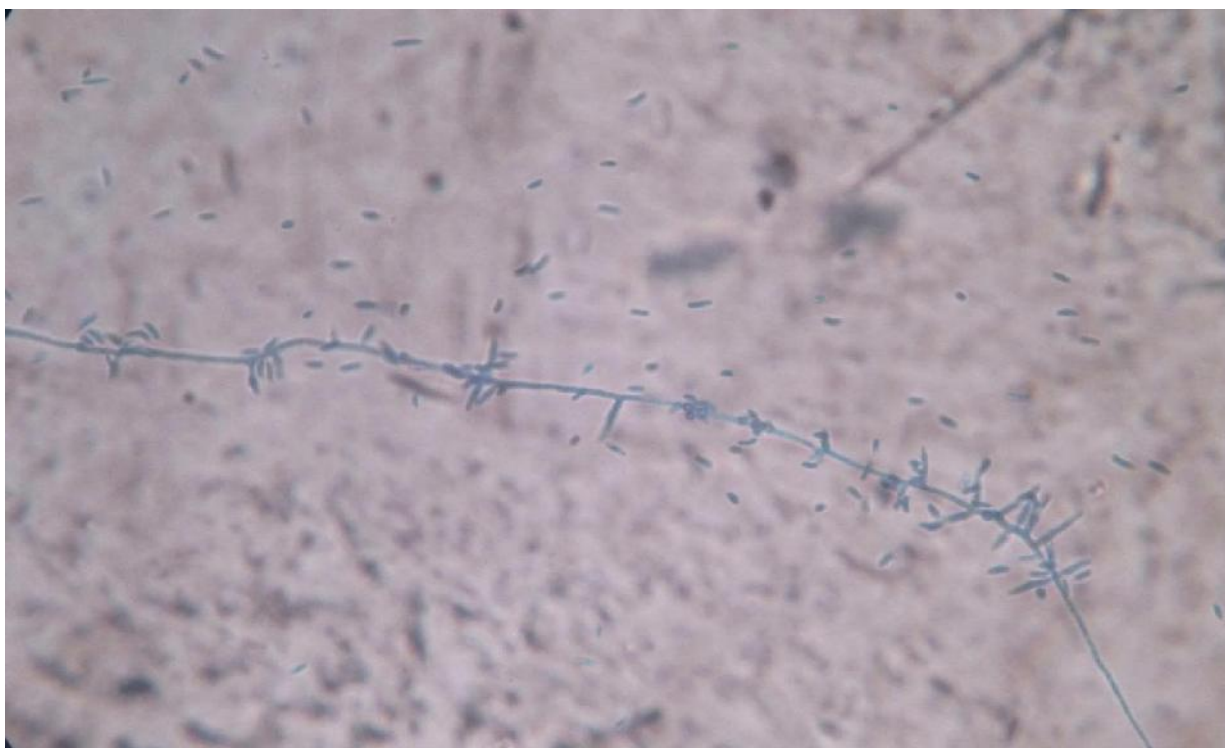


Figura 32. Monofiálides cortas de *Fusarium oxysporum*.

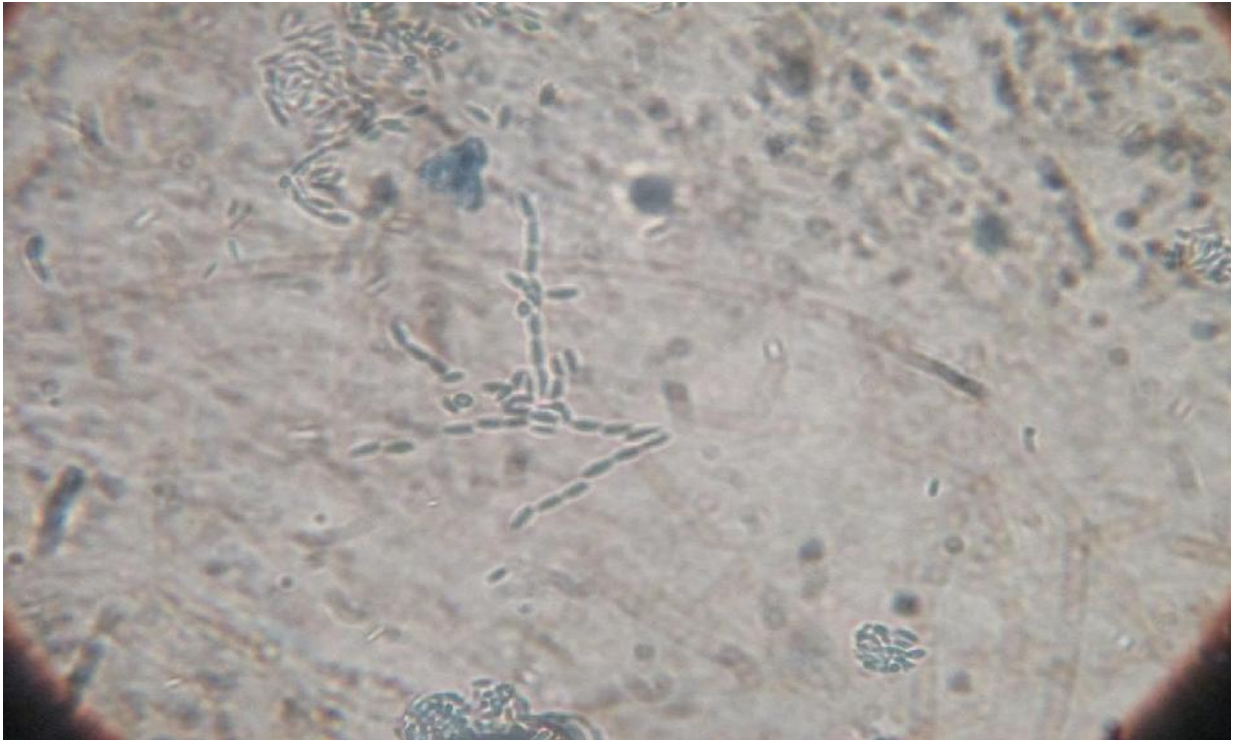


Figura 33. Microconidias en cadena de *Fusarium proliferatum*.

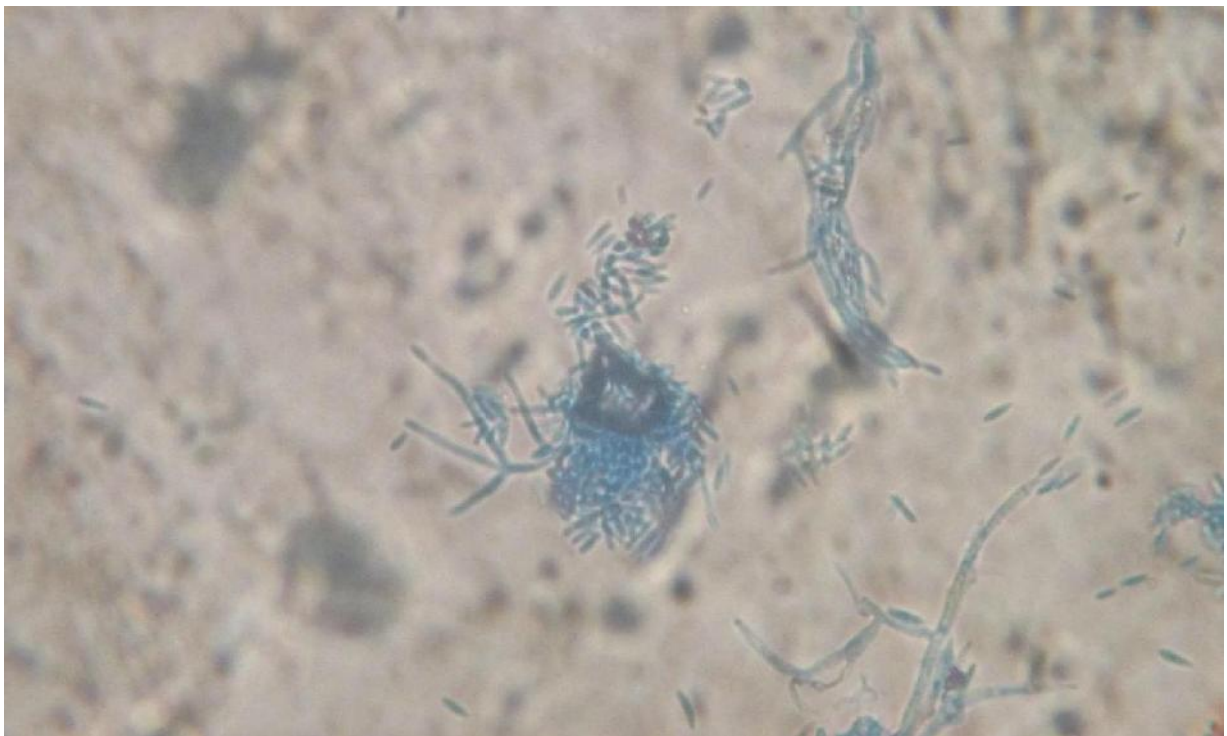


Figura 34. Monofiálides de *Fusarium verticillioides*.

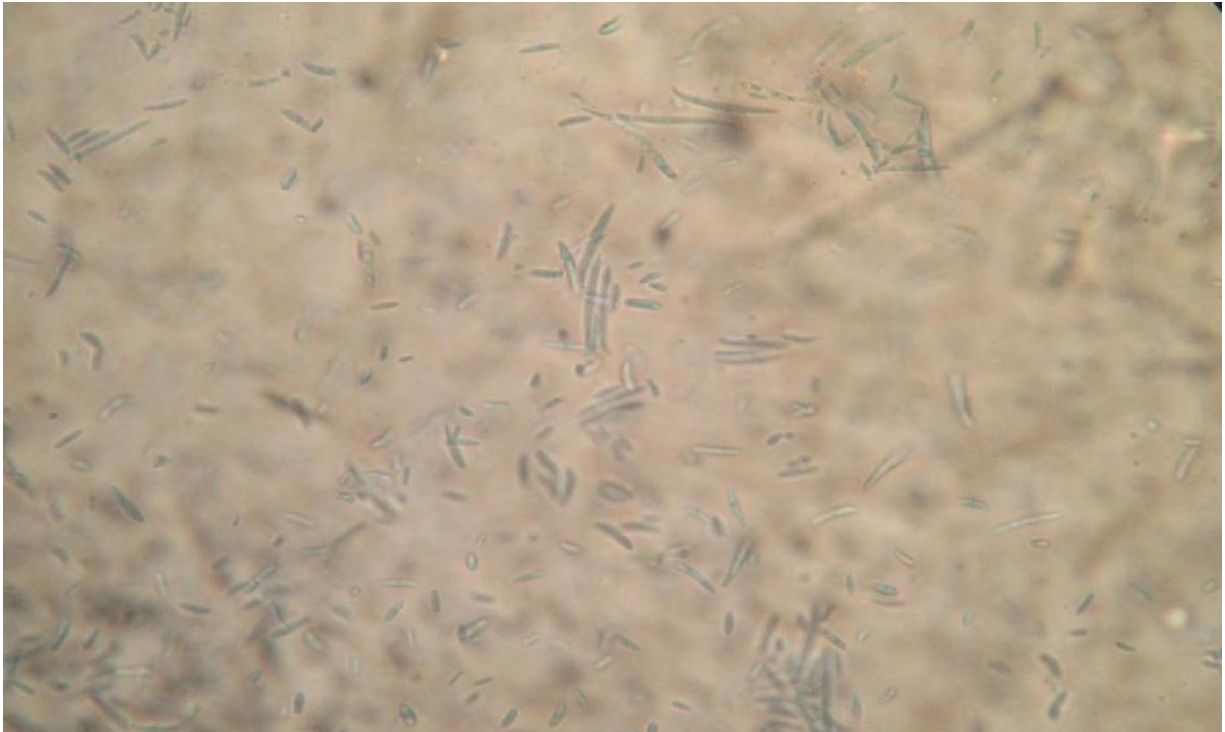


Figura 35. Macroconidias de *Fusarium solani*.

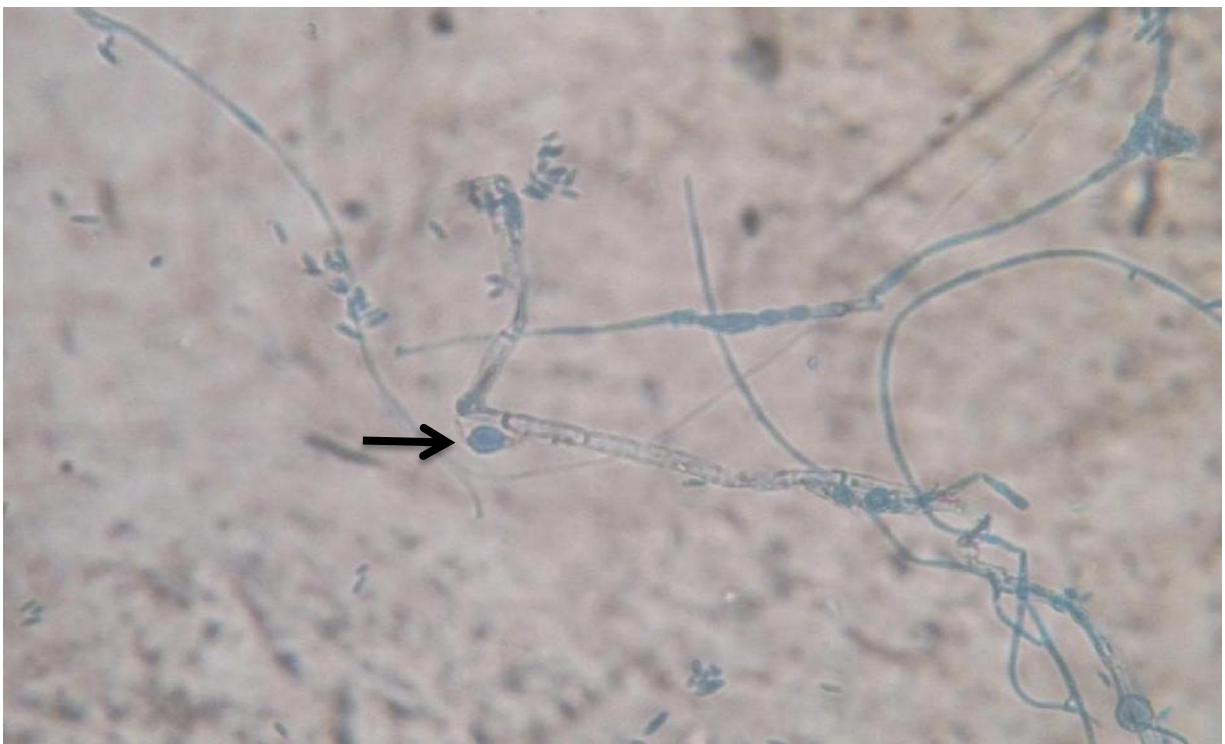


Figura 36. Clamidosporas de *Fusarium solani*.

4.2 Patogenicidad de hongos filamentosos

Transcurridos 30 días después de la inoculación de los hongos filamentosos, las plantas de espárrago se observaron pequeñas y amarillas e inclusive muertas y con lesiones necróticas marrones y marrón rojizas en las raíces, en contraste con las plantas no inoculadas (Figuras 37,38,39,40). Las plantas con síntomas correspondieron al 80,0% (8) con *F. oxysporum*; 60,0% (6) con *F. proliferatum*; 50,00% (5) con *F. solani* y 10,0% (1) con *F. verticillioides* (Tabla 4). La severidad (%) de la enfermedad en las plantas de espárrago fue de 84% con *F. oxysporum*, 76% con *F. proliferatum*, 68% con *F. solani* y 22% con *F. verticillioides* (Tablas 5,6, anexo 6).

4.3 Bacterias del género *Bacillus* aisladas e identificadas fenotípicamente en la rizósfera de espárrago

El 100% (96) de las muestras de rizoplasma y rizósfera de espárrago resultó positivo al aislamiento de *Bacillus* spp., obteniéndose 277 cultivos puros. Las bacterias del género *Bacillus* se observaron como bacilos Gram positivos, con esporas deformantes y no deformantes, positivos en la prueba de catalasa, negativos a la utilización de citrato como fuente de carbono y energía y positivos o negativos en el crecimiento anaerobio con glucosa; producción de acidez en arabinosa, manitol y xilosa; hidrólisis del almidón y lecitina y producción de acetoina o 2,3 butanodiol, hidrólisis de la urea y reducción de nitratos (Tabla 7).

4.4 Efecto antagonista de *Bacillus* spp frente a hongos fitopatógenos

En la prueba de antagonismo *in vitro* a los 3 días el crecimiento radial micelial por efecto de *Bacillus* spp. fue de 0,2-2,4cm con *F. oxysporum*; 0,1- 2,3cm con *F. proliferatum* y 0,1-2,2cm con *F. solani* (Anexo 7). A los 5 días el crecimiento radial micelial fue de 0,3-3,1cm con *F. oxysporum*; 0,2-2,8cm con *F. proliferatum* y 0,2-3,6 cm con *F. solani* (Anexo 8). A los 7 días el crecimiento radial micelial fue de de 0,5-4,5cm con *F. oxysporum*; 0,3-4,3cm con *F. proliferatum* y 0,3-4,3cm con *F. solani* (Anexo 9).

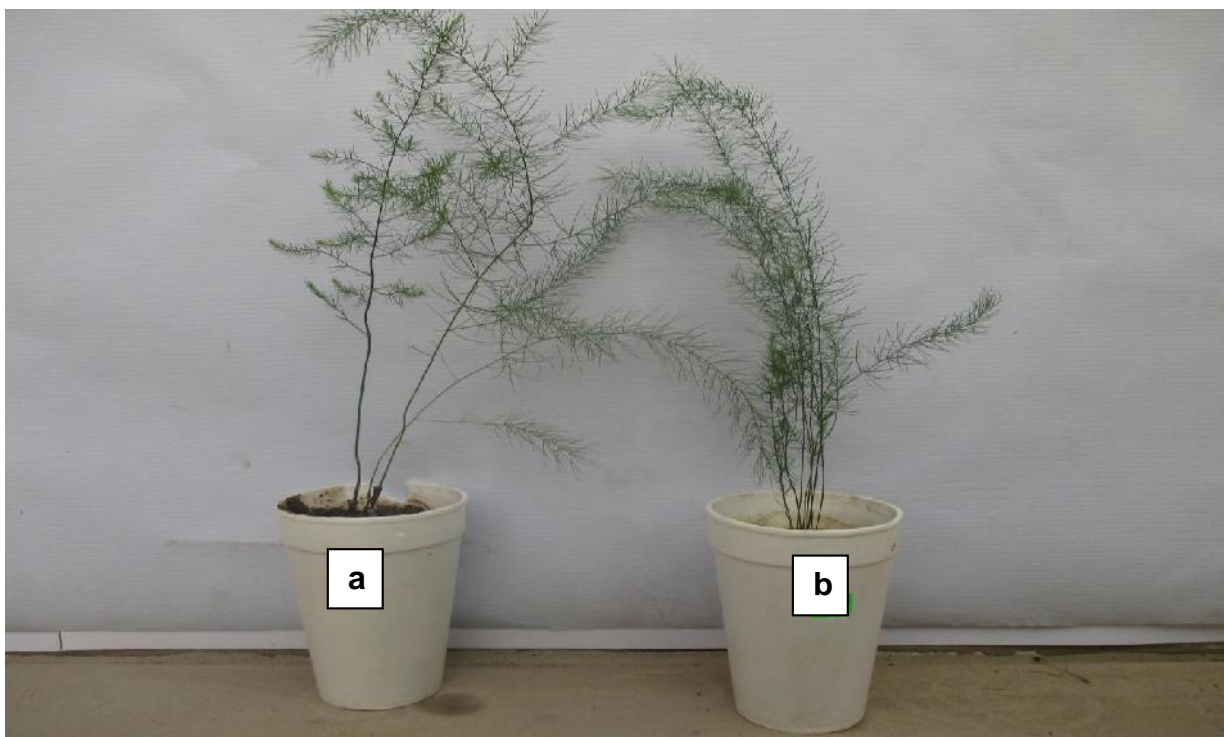


Figura 37. Plantas sanas de *Asparagus officinalis* L. 30 días después de la aplicación de agua destilada (a) e inoculación de hongo no patógeno (b).



Figura 38. Planta clorótica de *Asparagus officinalis* L. 30 días después de la Inoculación de *Fusarium oxysporum* en la corona.



Figura 39. Planta marchita de *Asparagus officinalis* L. 30 días después de la inoculación de *Fusarium verticillioides* en la corona.

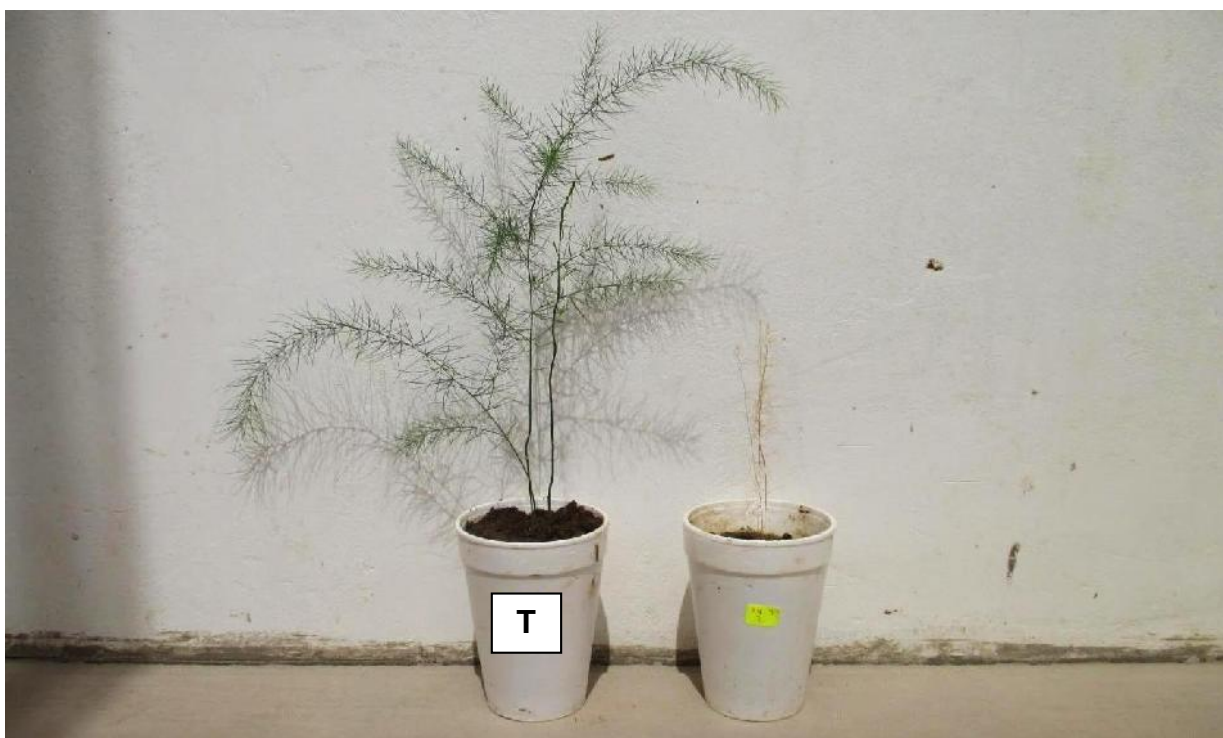


Figura 40. Planta muerta de *Asparagus officinalis* L. 30 días después de la inoculación de *Fusarium oxysporum* en la corona.

Tabla 4. Número de plantas de *Asparagus officinalis* L. sin y con síntomas en el follaje 30 días después de la inoculación de diferentes especies de *Fusarium* spp.

<i>Fusarium</i> spp.	Plantas			
	Sin síntomas		Con síntomas	
	Nº	%	Nº	%
<i>F. oxysporum</i>	2	20,0	8	80,0
<i>F. proliferatum</i>	4	40,0	6	60,0
<i>F. solani</i>	5	50,0	5	50,0
<i>F. verticillioides</i>	9	90,0	1	10,0

Tabla 5. Número de plantas de *Asparagus officinalis* L. según la escala de severidad de pudrición de raíz y tallo por diferentes especies de *Fusarium*

<i>Fusarium</i> spp.	Escala de severidad de enfermedad				
	1	2	3	4	5
<i>F. oxysporum</i>	0	0	2	4	4
<i>F. proliferatum</i>	0	1	3	3	3
<i>F. solani</i>	1	2	2	2	3
<i>F. verticillioides</i>	9	1	0	0	0

Tabla 6. Severidad de pudrición de raíz y tallo por *Fusarium* spp. en plantas de *Asparagus officinalis* L.

<i>Fusarium</i> spp.	Severidad (%)
<i>F. oxysporum</i>	84,0
<i>F. proliferatum</i>	76,0
<i>F. solani</i>	68,0
<i>F. verticillioides</i>	22,0

Tabla 7. Características diferenciales de especies de *Bacillus* identificadas en rizoplano y rizósfera de *Asparagus officinalis* L. “espárrago”, 2016

<i>Bacillus</i> spp.	Catalasa	Citrato	Glucosa	Arabinosa	Manitol	Xilosa	Almidón	Lecitina	VP	Urea	Nitratos
<i>B. brevis</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>B. megaterium</i>	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-
<i>B. subtilis</i>	+	-	+	V	V	V	V	-	V	-	+

*V: variable

El crecimiento radial micelial en el testigo a los 3 días fue de 1,5cm con *F. oxysporum*; 1,7cm con *F. proliferatum* y 1,5cm con *F. solani*. A los 5 días fue de 3,0cm con *F. oxysporum* y *F. proliferatum* y 2,5cm con *F. solani*. A los 7 días fue de 4,0cm con *F. oxysporum*; 3,9cm con *F. proliferatum* y 3,6cm con *F. solani*. En este contexto, a los 3 días, el crecimiento radial fue inhibido por el 70,75%(196) de *Bacillus* spp. para *F. oxysporum*; 84,11%(233) para *F. proliferatum* y 71,11% (197) para *F. solani*. A los 5 días el crecimiento radial fue inhibido por el 98,91%(274) de *Bacillus* spp. para *F. oxysporum*; 99,27%(275) para *F. proliferatum* y 75,09% (208) para *F. solani*. A los 7 días el crecimiento radial fue inhibido por el 91,69%(254) de *Bacillus* spp. para *F. oxysporum*; 91,33%(253) para *F. proliferatum* y 85,55% (237) para *F. solani* (Anexos 7,8,9).

Los valores en el crecimiento radial micelial a los 7 días determinaron que el 9,02%(25) de los cultivos de *Bacillus* spp. se consideraran positivos para el antagonismo, con halos de inhibición de 0,1 a 0,8cm; el 79,06% (219) limitantes y el 11,19% (31) negativos (Figuras 41 a 46). En los cultivos de *Bacillus* spp. positivos al antagonismo la tasa de crecimiento micelial (TC) fue de 0,014–0,486 con *F. oxysporum*; 0,014–0,471 con *F. proliferatum* y 0,014–0,429 con *F. solani* (Anexo 10), todos los valores inferiores a los testigos con 0,500 (*F. oxysporum*); 0,486 (*F. proliferatum*) y 0,443 (*F. solani*). Los 25 cultivos de *Bacillus* spp. con los que se alcanzaron las menores tasas de crecimiento micelial presentaron porcentajes de inhibición del crecimiento radial (PICR) de 22,5-87,5% con *F. oxysporum*; 58,9-94,9% con *F. proliferatum* y 52,8–91,7% con *F. solani* (Tabla 8).

4.5 Especies de *Bacillus* seleccionadas e identificadas

F. oxysporum y *F. proliferatum* que presentaron la mayor severidad en la pudrición de raíz y tallo de plantas de espárrago, en la prueba de patogenicidad y los tres cultivos de *Bacillus* spp. con los mayores PICR se seleccionaron para la fase de la investigación experimental. Asimismo, se identificaron las especies de *Bacillus*, correspondiendo a *B. subtilis*16.2, *B. brevis*29.1 y *B. megaterium*65.1 (Tabla 9).

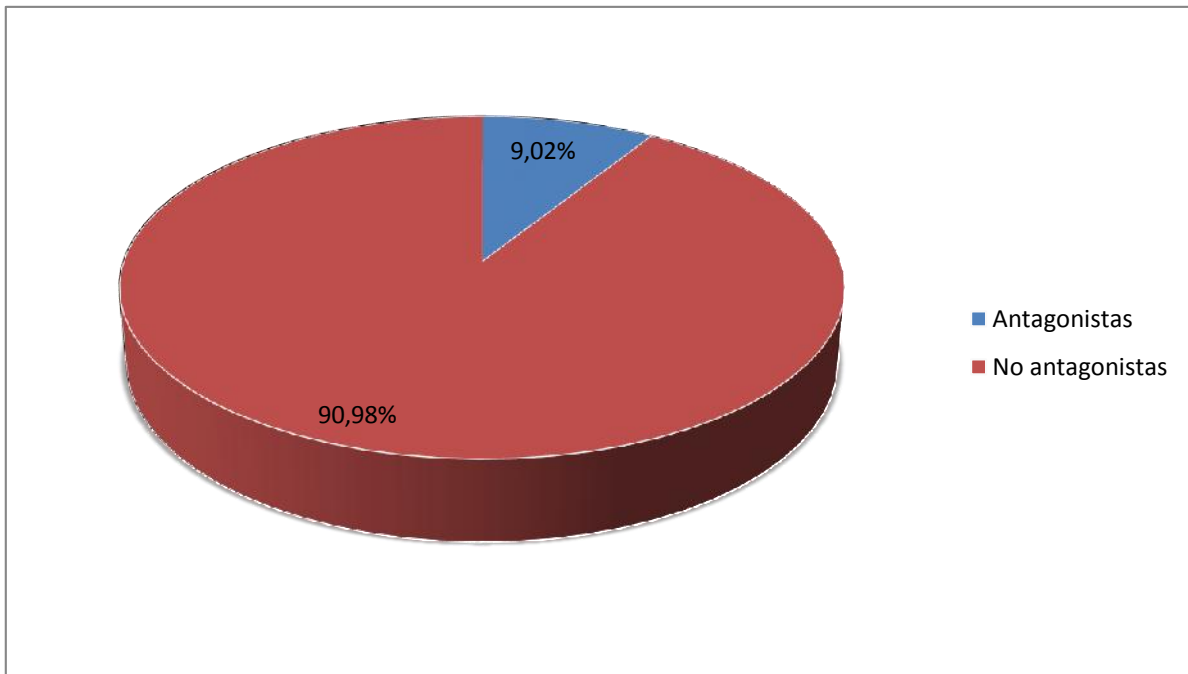


Figura 41. Frecuencia de *Bacillus* spp. con antagonismo a *Fusarium* spp.

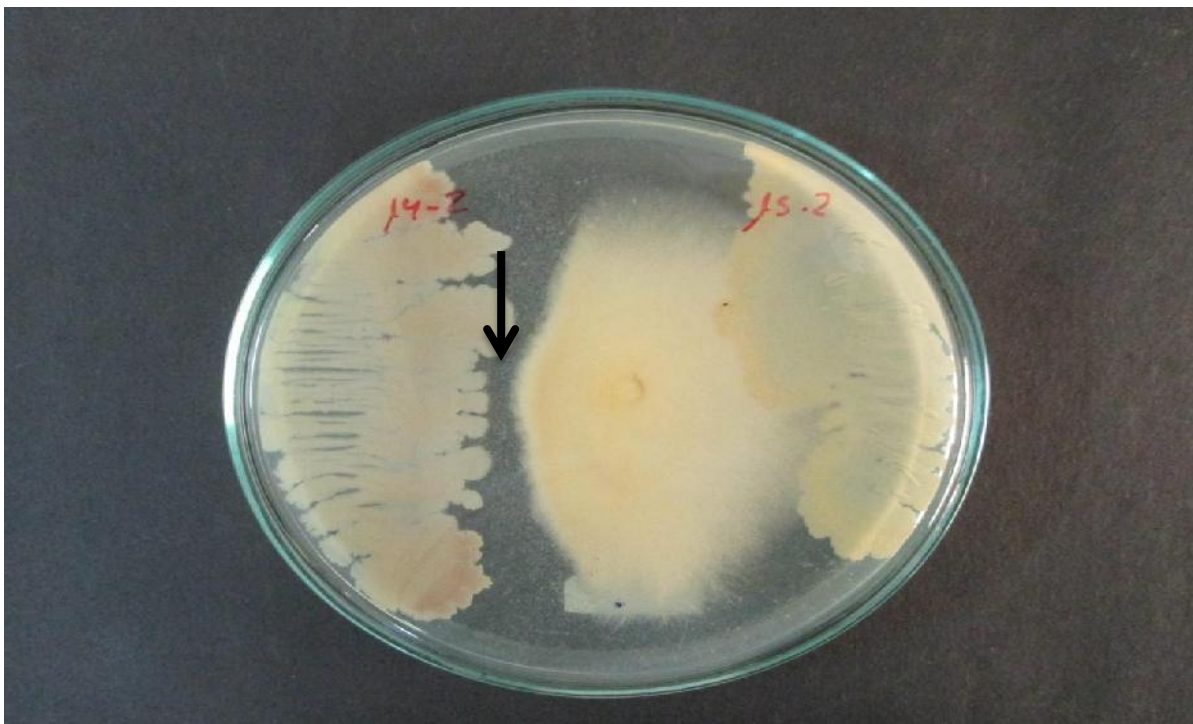


Figura 42. *Bacillus* sp.14.2 con antagonismo *in vitro* a *F. solani*.

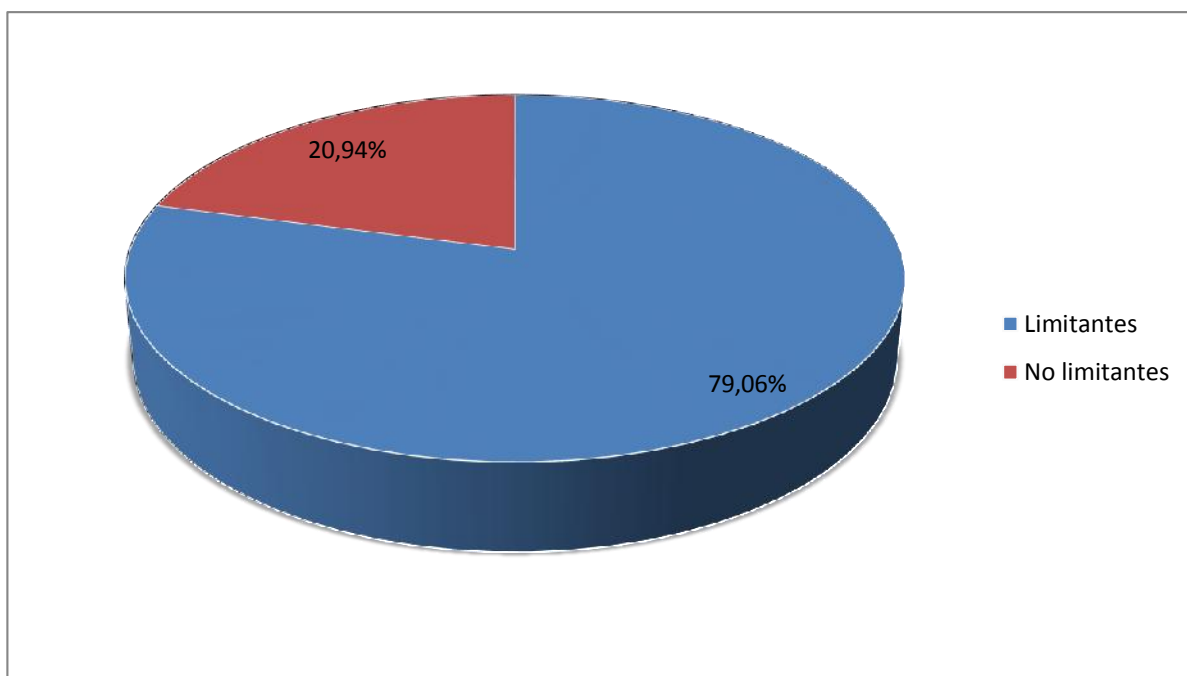


Figura 43. Frecuencia de *Bacillus* spp. con efecto limitante a *Fusarium* spp.

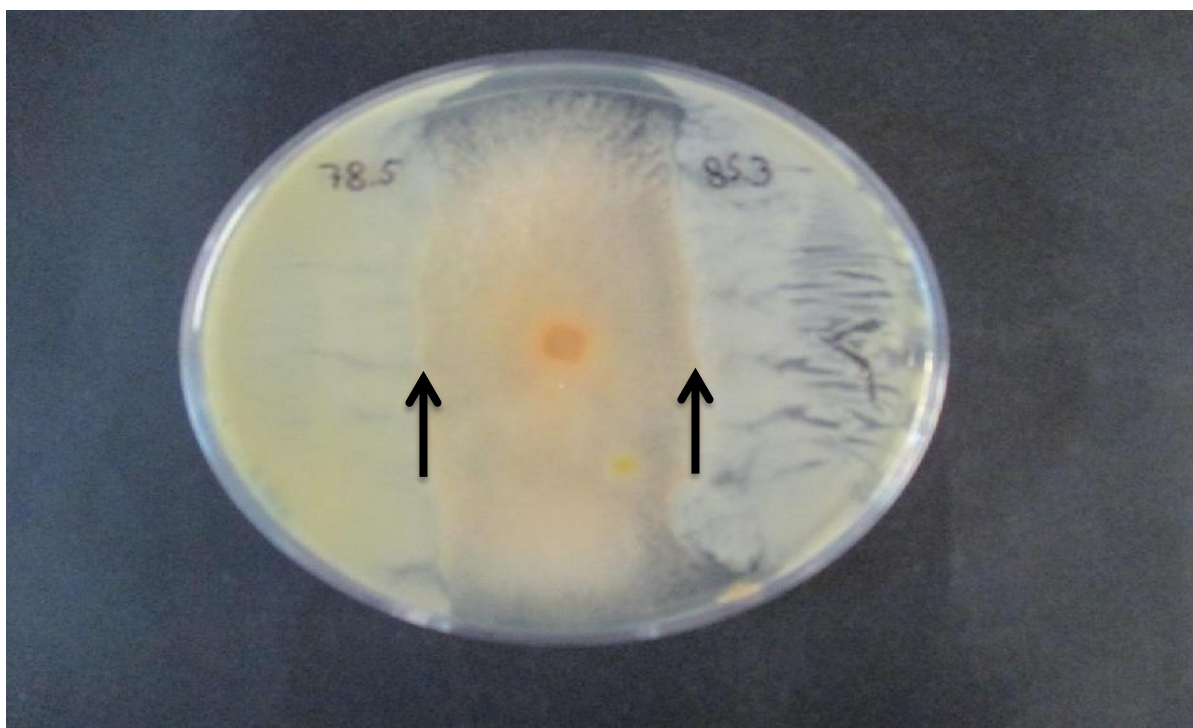


Figura 44. *Bacillus* spp.78.5 y 85.3 con efecto limitante *in vitro* a *F. proliferatum*.

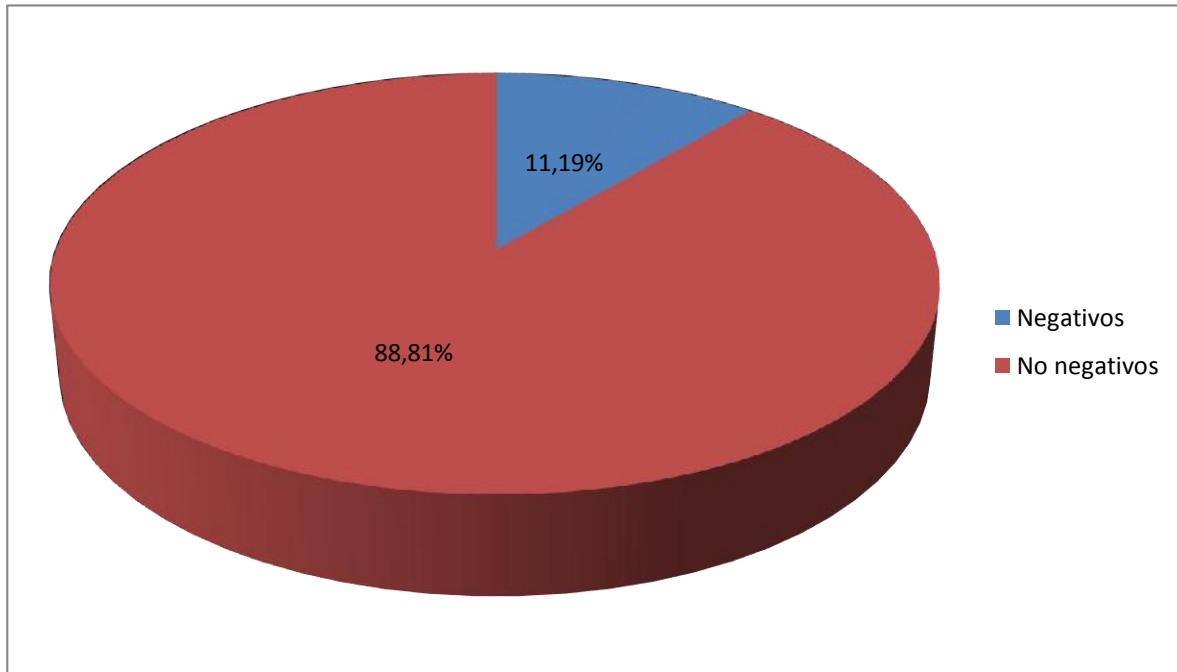


Figura 45. Frecuencia de *Bacillus* spp. sin antagonismo ni efecto limitante a *Fusarium* spp.



Figura 46. *Bacillus* spp. 92.2 y 93.2 sin antagonismo ni efecto limitante *in vitro* a *F. oxysporum*.

Tabla 8. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) de *Fusarium oxysporum*, *F. proliferatum* y *F. solani* por efecto de *Bacillus* spp.

<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	PICR(%)		
	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. solani</i>
41.3	77,5	58,9	83,3
46.1	22,5	79,5	77,8
48.4	85,0	82,1	72,2
62.2	75,0	74,4	52,8
62.1	87,5	87,2	83,3
71.3	62,5	61,5	83,3
77.5	72,5	76,9	69,4
82.4	80,0	74,4	72,2
14.2	82,5	74,4	91,7
16.2	80,0	89,7	91,7
37.2	55,0	71,8	91,7
39.6	82,5	71,8	86,1
46.3	67,5	76,9	83,3
50.4	77,5	74,4	72,2
64.2	60,0	89,7	69,4
65.1	85,0	94,9	63,9
29.1	75,0	92,3	86,1
30.1	75,0	82,1	75,0
44.1	65,0	71,8	63,9
67.2	50,0	87,2	83,3
80.4	77,5	79,5	72,2
82.2	40,0	74,4	72,2
93.3	42,5	84,6	80,6
83.4	67,5	69,2	72,2
79.3	55,0	71,8	63,9

Tabla 9. Tasa de crecimiento micelial y porcentaje de inhibición del crecimiento radial de hongos fitopatógenos por efecto de *Bacillus* spp. seleccionadas

Características en el antagonismo	<i>B. subtilis</i> 16.2	<i>B. brevis</i> 29.1	<i>B. megaterium</i> 65.1
T.C <i>F. oxysporum</i>	0,043	0,071	0,014
T.C <i>F. proliferatum</i>	0	0	0
T.C <i>F. solani</i>	0	0,357	0,114
PICR <i>F. oxysporum</i>	80,0	75,0	85,0
PICR <i>F. proliferatum</i>	89,7	92,3	94,9
PICR <i>F. solani</i>	91,7	86,1	63,9

TC= Tasa de crecimiento, PICR= Porcentaje de inhibición del crecimiento radial

4.6 Efecto de *Bacillus* spp. en la severidad de la pudrición de la raíz y tallo de *Asparagus officinalis* L.

Bacillus spp. disminuyó la severidad de la pudrición de raíz y tallo de las plantas de espárrago inoculadas con *F. proliferatum* (Tabla 10, figura 47) observándose a los 40 días síntomas en el follaje, con una severidad de 0% (*B. subtilis*16.2 y *B. megaterium*65.1); 8,3% (*B. brevis*29.1) y 25% (Testigo químico), en comparación con 83,3% del control positivo. De igual manera, *Bacillus* spp. disminuyó la severidad de la pudrición de raíz y tallo de las plantas de espárrago inoculadas con *F. oxysporum* (Tabla 11, figura 48), observándose a los 40 días síntomas en el follaje, con una severidad de 0% (*B. subtilis*16.2 y *B. megaterium*65.1); 16,6% (*B. brevis*29.1) y 33,3 % (Testigo químico), en comparación con 100% del control positivo.

4.7 Efecto de *Bacillus* spp. en la altura de *Asparagus officinalis* L.

La altura de las plantas inoculadas con *F. proliferatum* a los 10 días fue de 22,6 - 40cm con *Bacillus* spp. ; 15,6cm en el testigo positivo; 12,6cm en el testigo negativo y 23,3cm en el testigo químico (Figuras 49,50), registrándose índices de efectividad de 79,37% con *B. subtilis*16.2 y 217, 46% con *B. megaterium*65.1 (Tabla 12). La altura de las plantas a los 20 días fue de 53,3 - 57,6cm con *Bacillus* spp. ; 20,6cm en el testigo positivo; 41,3cm en el testigo negativo y 58,6cm en el testigo químico (Figuras 51,52), registrándose índices de efectividad de 29,06% con *B. brevis*29.1 y 39,47% con *B. megaterium*65.1 (Tabla 12).

La altura de las plantas a los 30 días fue de 58-68,8cm con *Bacillus* spp. ; 27,3cm en el testigo positivo; 46,3cm en el testigo negativo y 63,3cm en el testigo químico (Figuras 53,54), registrándose índices de efectividad de 25,27% con *B. brevis*29.1 y 48,60% con *B. subtilis*16.2 (Tabla 12).

La altura de las plantas a los 40 días fue de 63,6-82,5cm con *Bacillus* spp. ; 15,6cm en el testigo positivo; 58,8cm en el testigo negativo y 66,6cm en el testigo químico (Figuras 55,56), registrándose índices de efectividad de 8,16% con *B. brevis*29.1 y 40,31% *B. subtilis*16.2 (Tabla 12).

Tabla 10. Severidad de síntomas de marchitez vascular según escala del Centro Internacional de Agricultura Tropical, en el follaje de *Asparagus officinalis* L. inoculado con *Bacillus* spp. y *F. proliferatum*

Tratamientos	10 días			20 días			30 días			40 días		
	r ₁	r ₂	r ₃	r ₁	r ₂	r ₃	r ₁	r ₂	r ₃	r ₁	r ₂	r ₃
Testigo positivo	10	0	0	25	25	25	50	50	100	100	50	100
Testigo negativo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Testigo químico	0	0	0	0	0	0	25	25	0	50	25	0
<i>B. subtilis</i> 16.2	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0
<i>B. brevis</i> 29.1	0	0	0	0	0	0	0	25	0	0	25	0
<i>B. megaterium</i> 65.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

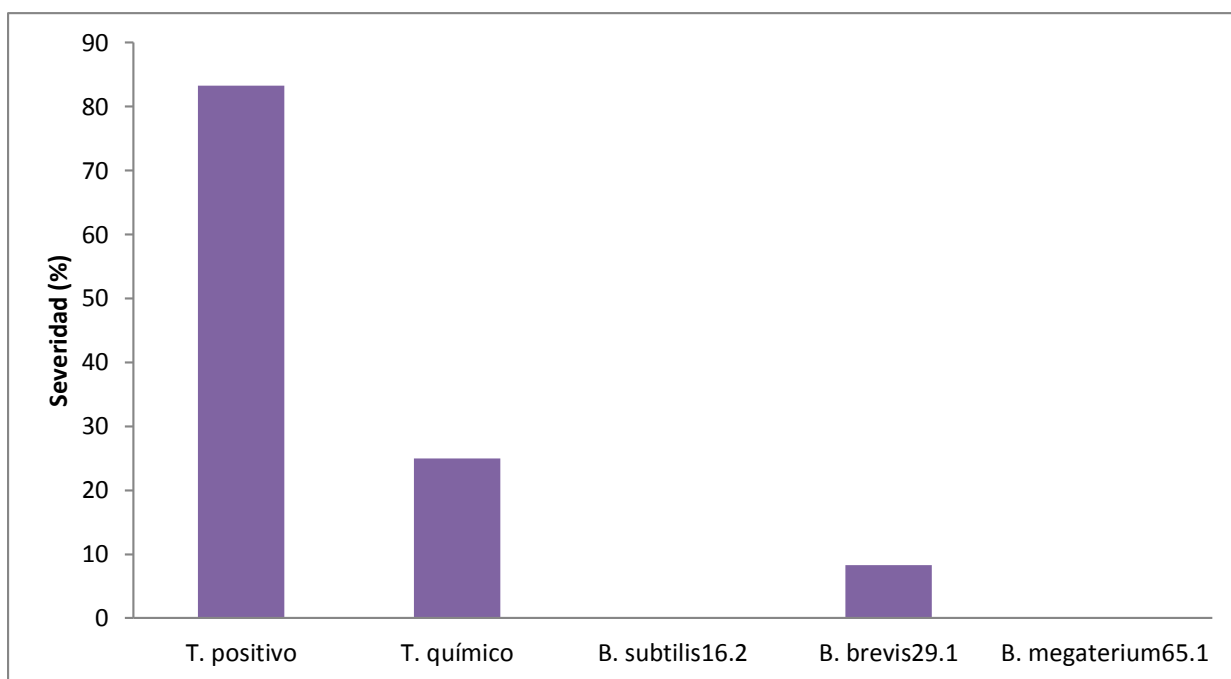


Figura 47. Severidad de síntomas de marchitez vascular en el follaje de *Asparagus officinalis* L. inoculado con *Bacillus* spp. y *Fusarium proliferatum*.

Tabla 11. Severidad de síntomas de marchitez vascular según escala del Centro Internacional de Agricultura Tropical, en el follaje de *Asparagus officinalis* L. inoculado con *Bacillus* spp. y *F. oxysporum*

Tratamientos	10 días			20 días			30 días			40 días		
	r ₁	r ₂	r ₃	r ₁	r ₂	r ₃	r ₁	r ₂	r ₃	r ₁	r ₂	r ₃
Testigo positivo	10	10	0	25	50	25	100	100	100	100	100	100
Testigo negativo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Testigo químico	0	0	0	0	0	0	25	50	0	50	50	0
<i>B. subtilis</i> 16.2	0	0	0	0	25	0	0	0	0	0	0	0
<i>B. brevis</i> 29.1	0	0	0	0	0	0	0	25	0	25	25	0
<i>B. megaterium</i> 65.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

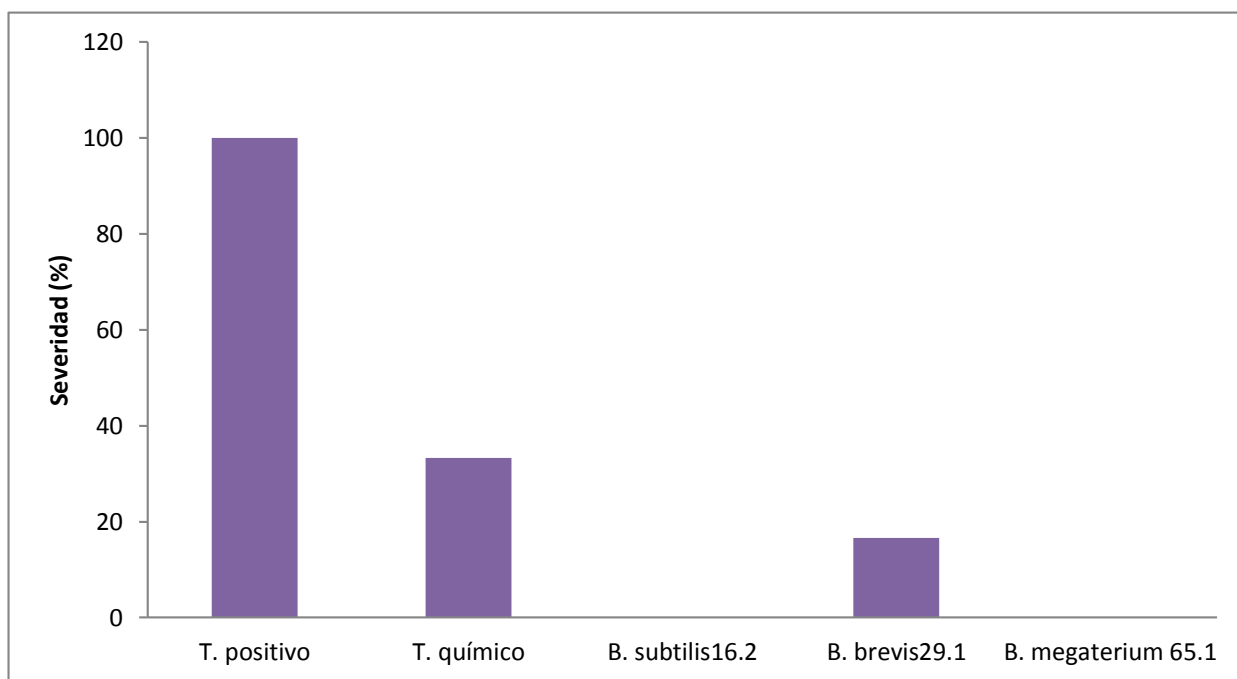


Figura 48. Severidad de síntomas de marchitez vascular en el follaje de *Asparagus officinalis* L. inoculado con *Bacillus* spp. y *Fusarium oxysporum*.

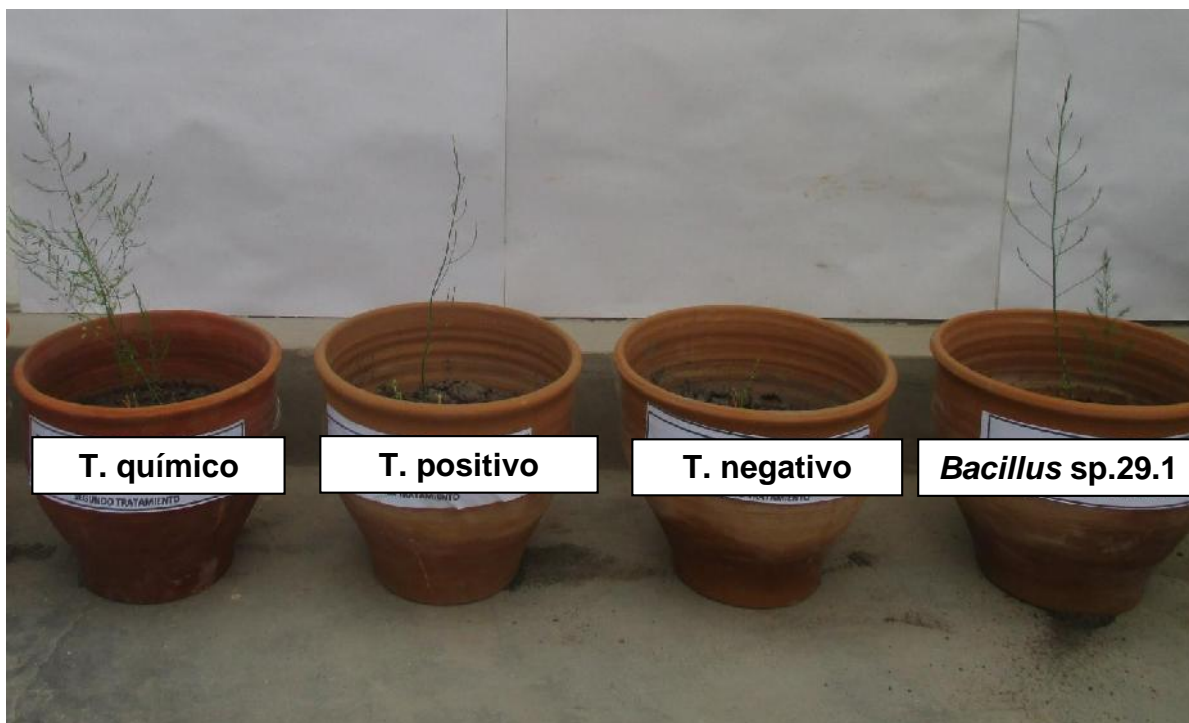


Figura 49. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 10 días después de la inoculación y la siembra de coronas con *Fusarium proliferatum*.

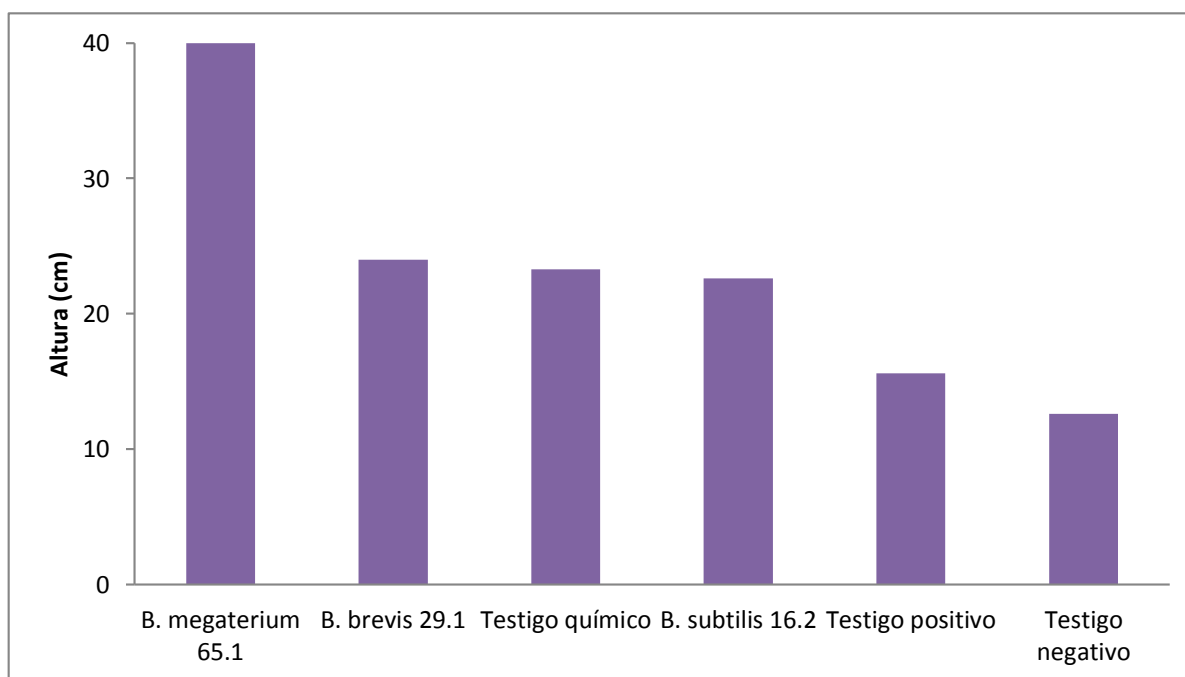


Figura 50. Altura de *Asparagus officinalis* L. 10 días después de la inoculación de *Bacillus* spp. y *Fusarium proliferatum*.

Tabla 12. Índices de efectividad (%) de *Bacillus* spp. en la altura de *Asparagus officinalis* L. inoculado con *Fusarium proliferatum*

<i>Bacillus</i> spp	IE(%)			
código UNPRG	10 días	20 días	30 días	40 días
Testigo químico	84,92	41,89	36,72	13,27
<i>B. subtilis</i> 16.2	79,37	37,05	48,60	40,31
<i>B. brevis</i> 29.1	90,48	29,06	25,27	8,16
<i>B. megaterium</i> 65.1	217,46	39,47	42,12	14,97

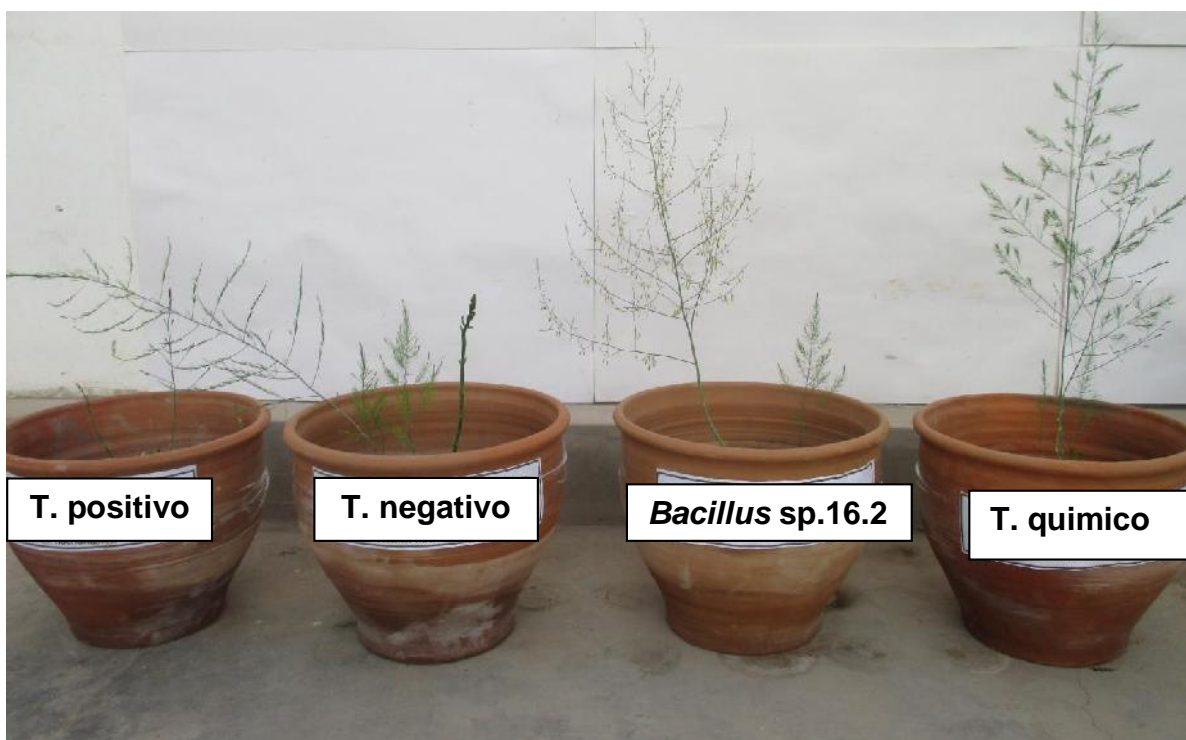


Figura 51. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 20 días después de la inoculación y la siembra de coronas con *Fusarium proliferatum*.

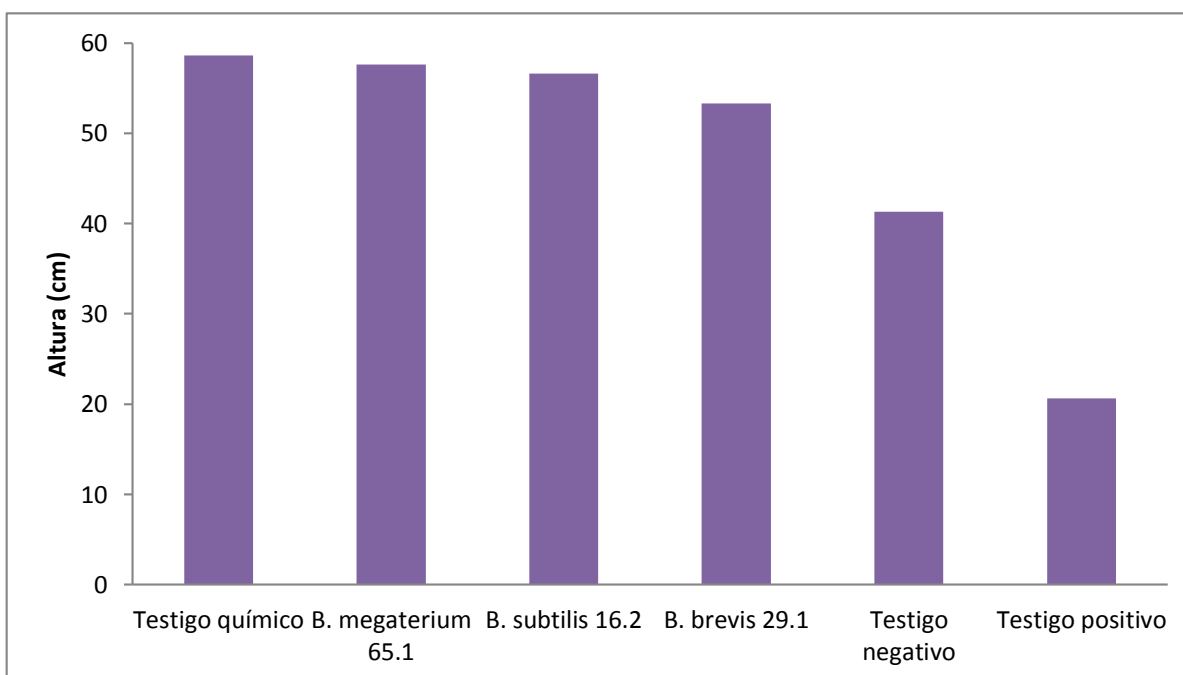


Figura 52. Altura de *Asparagus officinalis* L. 20 días después de la inoculación de *Bacillus* spp. y *Fusarium proliferatum*.

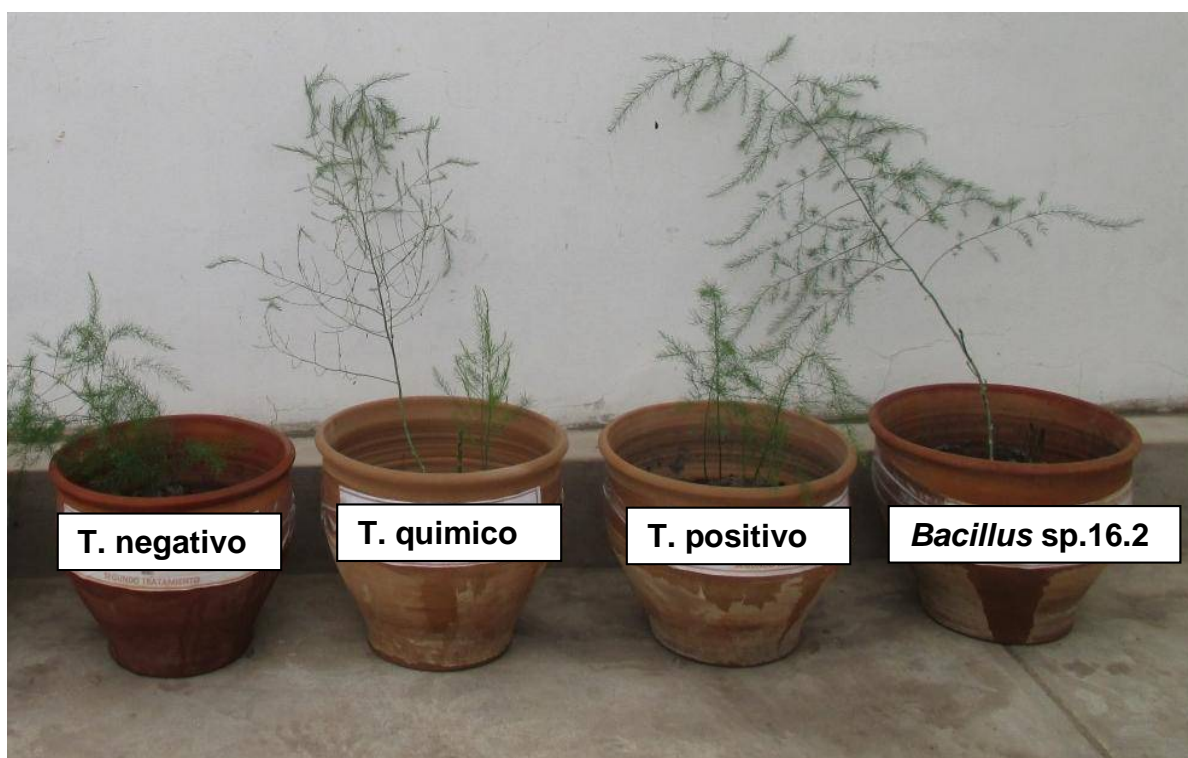


Figura 53. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 30 días después de la inoculación y la siembra de coronas con *Fusarium proliferatum*.

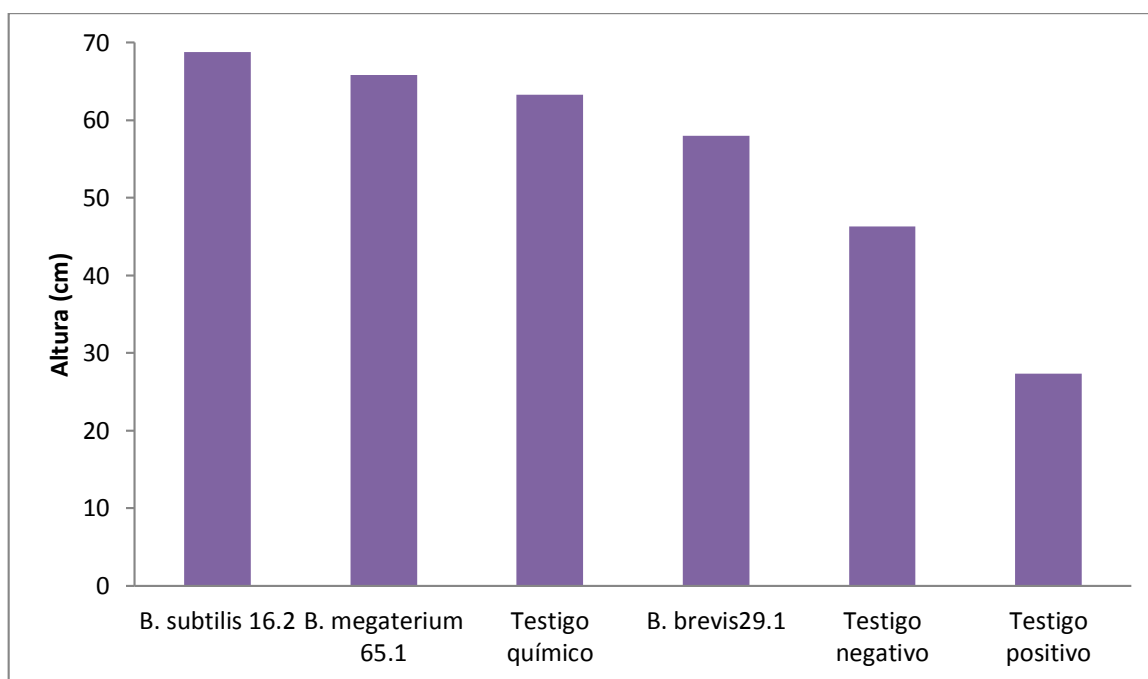


Figura 54. Altura de *Asparagus officinalis* L. 30 días después de la inoculación de *Bacillus* spp. y *Fusarium proliferatum*.



Figura 55. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 40 días después de la inoculación y la siembra de coronas con *Fusarium proliferatum*.

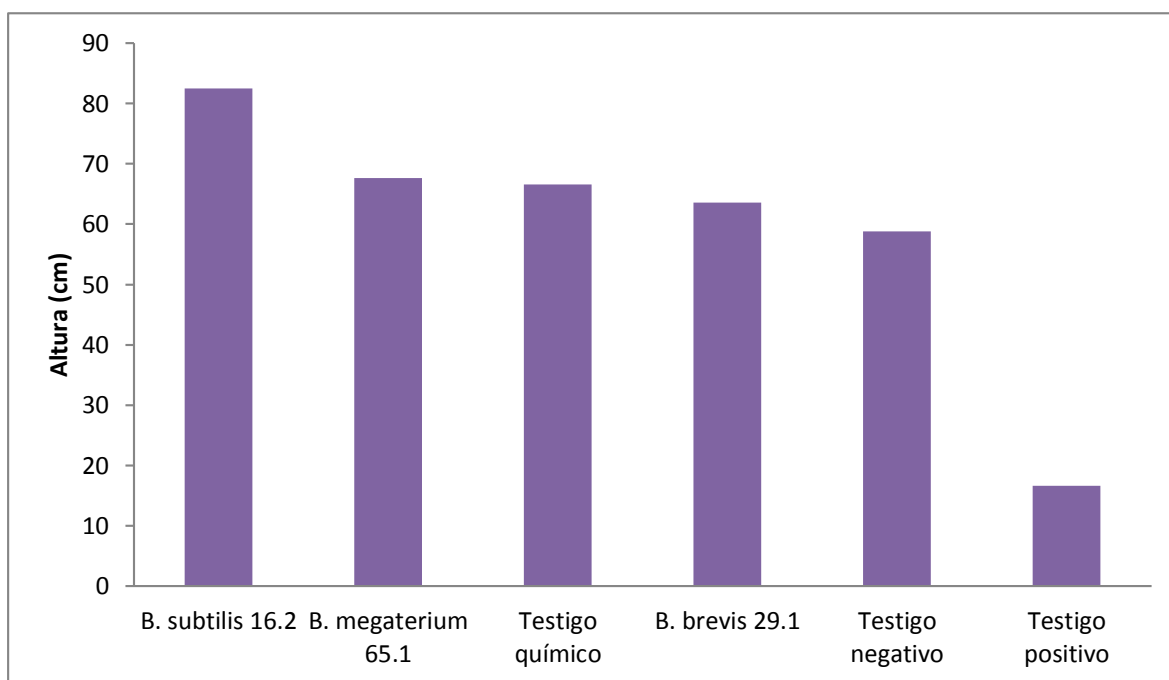


Figura 56. Altura de *Asparagus officinalis* L. 40 días después de la inoculación de *Bacillus* spp. y *Fusarium proliferatum*.

La altura de las plantas inoculadas con *F. oxysporum* a los 10 días fue de 25-30cm con *Bacillus* spp.; 16cm en el testigo positivo; 12,6cm en el testigo negativo y 24cm en el testigo químico (Figuras 57,58), registrándose índices de efectividad de 98,41% con *B. brevis*29.1 y 138,10% con *B. subtilis*16.2 (Tabla 13). La altura de las plantas a los 20 días fue de 49,5-51,6cm con *Bacillus* spp. ; 19cm en el testigo positivo; 41,3cm en el testigo negativo y 45,3cm en el testigo químico (Figuras 59,60), registrándose índices de efectividad de 19,85% con *B. subtilis*16.2 y 24,94% con *B. brevis* 29.1 (Tabla 13).

La altura de las plantas a los 30 días fue de 54-58cm con *Bacillus* spp. ; 0cm en el testigo positivo; 46,3cm en el testigo negativo y 52,6cm en el testigo químico (Figuras 61,62), registrándose índices de efectividad de 16,63% con *B. subtilis*16.2 y *B. megaterium*65.1 y 25,27% con *B. brevis*29.1 (Tabla 13). La altura de las plantas a los 40 días fue de 61,6-69,6cm con *Bacillus* spp.; 0cm en el testigo positivo; 58,8cm en el testigo negativo y 59,3cm en el testigo químico (Figuras 63,64), registrándose índices de efectividad de 5,66% con *B. brevis*29.1 y 19,38% con *B. megaterium*65.1 (Tabla 13).

El efecto de los factores hongo fitopatógeno (A), tiempo (B), control de la pudrición (C), interacciones de primer orden AxB y BxC en la altura de las plantas de espárrago fue altamente significativo. Asimismo, no existió efecto de la interacción de segundo orden AxBxC (Tabla 14).

En cuanto al factor hongo fitopatógeno (A) los mayores valores en la altura se alcanzaron con *F. proliferatum*, diferenciándose significativamente de *F. oxysporum* (Tabla 15). Respecto al factor tiempo (B), los mayores valores en la altura se registraron a los 40 días, diferenciándose significativamente de 30, 20 y 10 días (Tabla 16). En cuanto al factor control de la pudrición (C) los mayores valores con la altura correspondieron a *B. subtilis*16.2, *B. megaterium*65.1, *B. brevis*29.1 y testigo químico, sin diferencias significativas entre ellos, pero si del testigo positivo (Tabla 17).

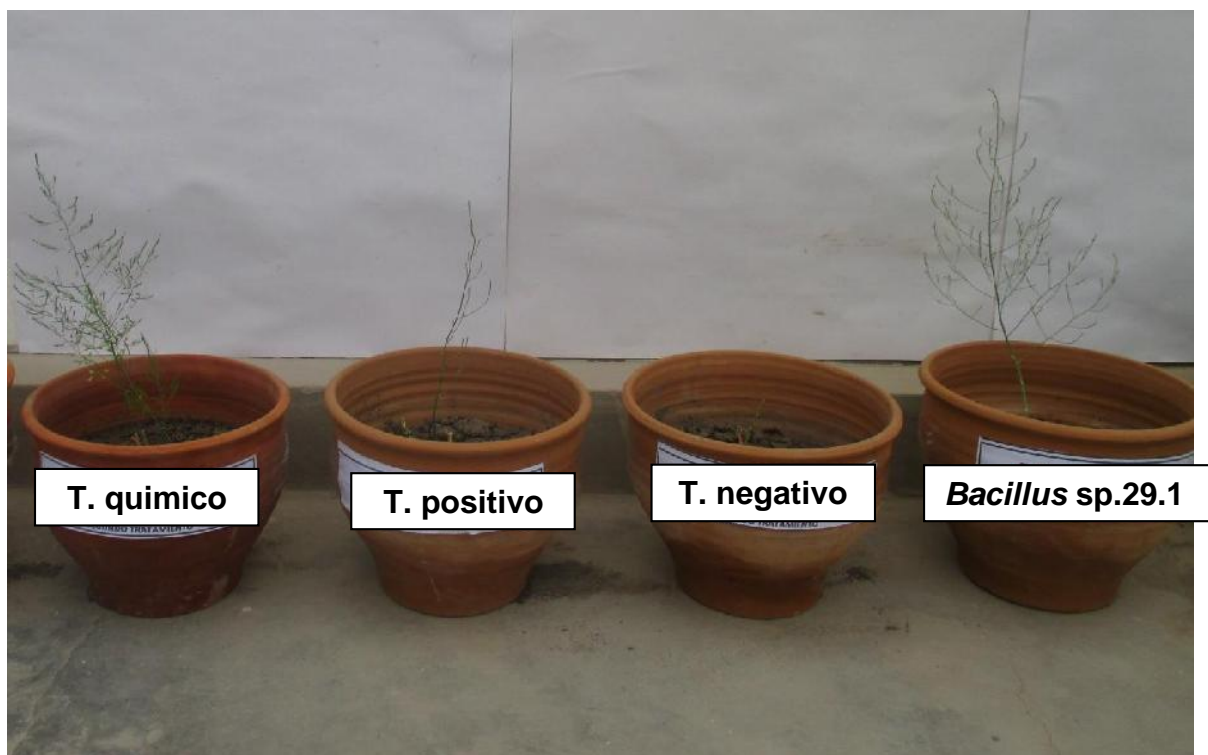


Figura 57. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 10 días después de la inoculación y la siembra de coronas con *Fusarium oxysporum*.

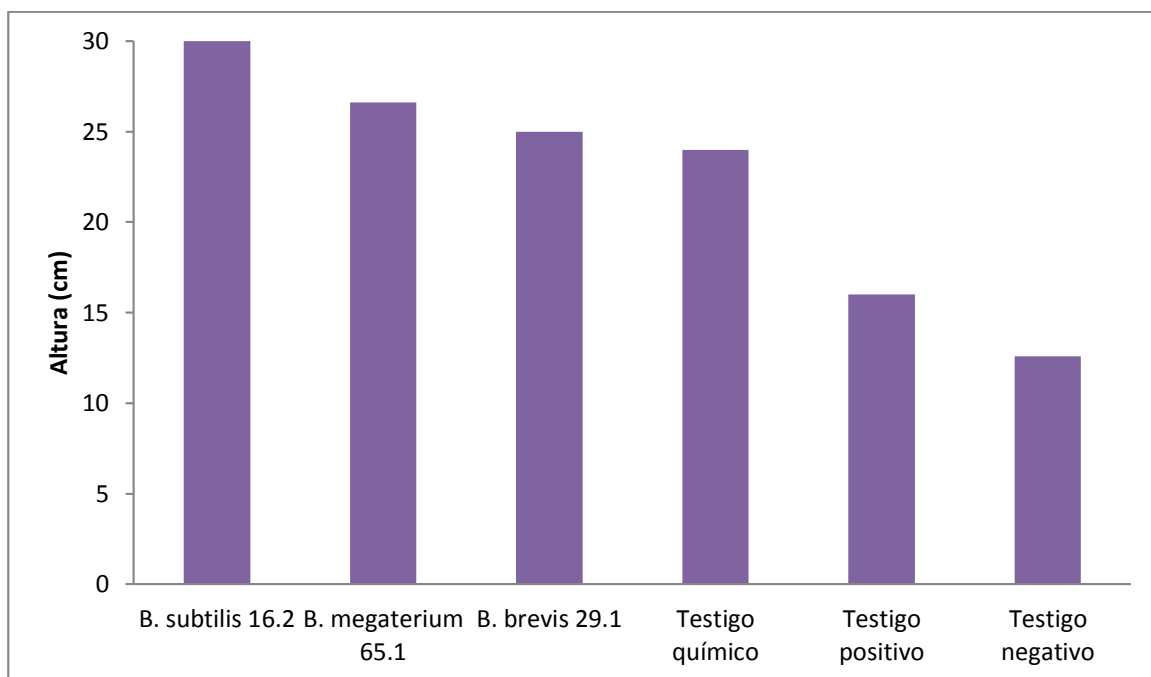


Figura 58. Altura de *Asparagus officinalis* L. 10 días después de la inoculación de *Bacillus* spp. y *Fusarium oxysporum*.

Tabla 13. Índices de efectividad (%) de *Bacillus* spp. en la altura de *Asparagus officinalis* L. inoculado con *F. oxysporum*

<i>Bacillus</i> spp	IE(%)			
código UNPRG	10 días	20 días	30 días	40 días
Testigo químico	90,48	8,96	13,61	1,72
<i>B. subtilis</i> 16.2	138,10	19,85	16,63	16,64
<i>B. brevis</i> 29.1	98,41	24,94	25,27	5,66
<i>B. megaterium</i> 65.1	111,11	20,10	16,63	19,38

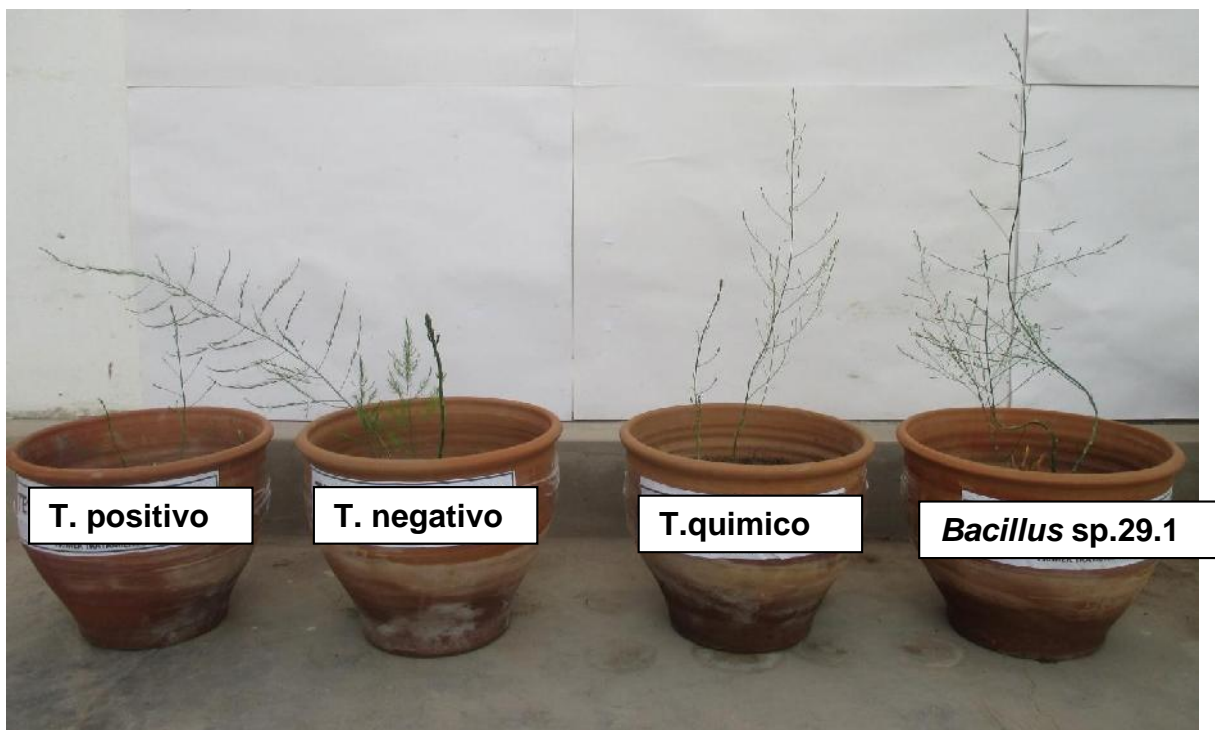


Figura 59. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 20 días después de la inoculación y la siembra de coronas con *Fusarium oxysporum*

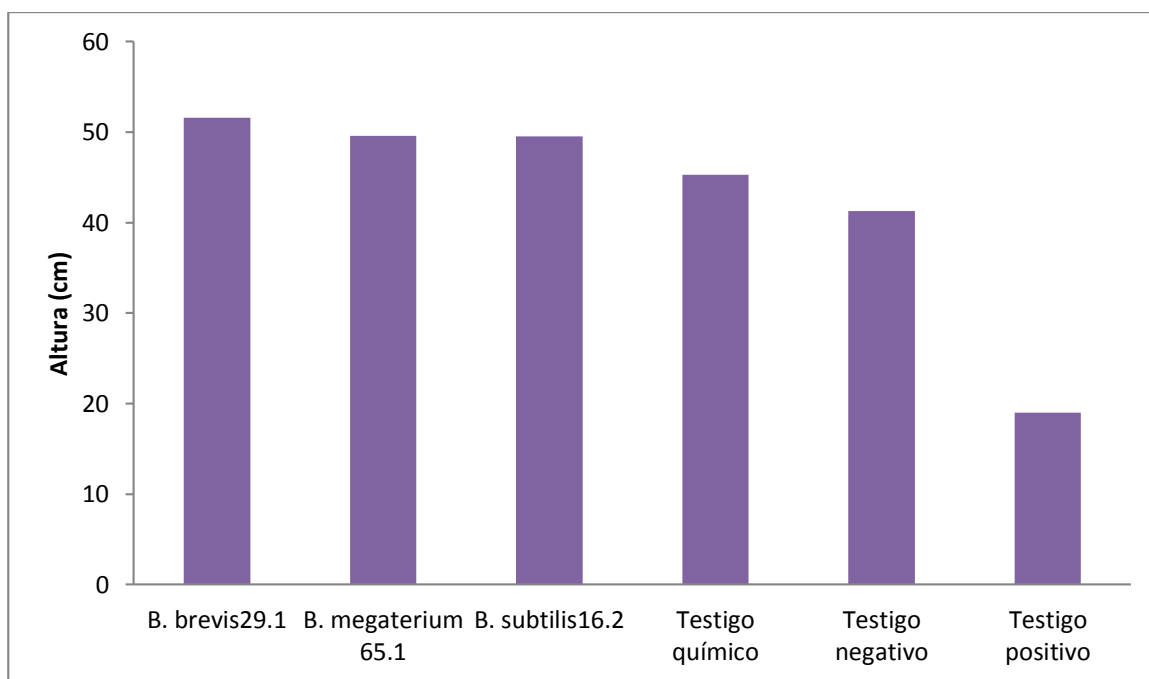


Figura 60. Altura de *Asparagus officinalis* L. 20 días después de la inoculación de *Bacillus* spp. y *Fusarium oxysporum*.

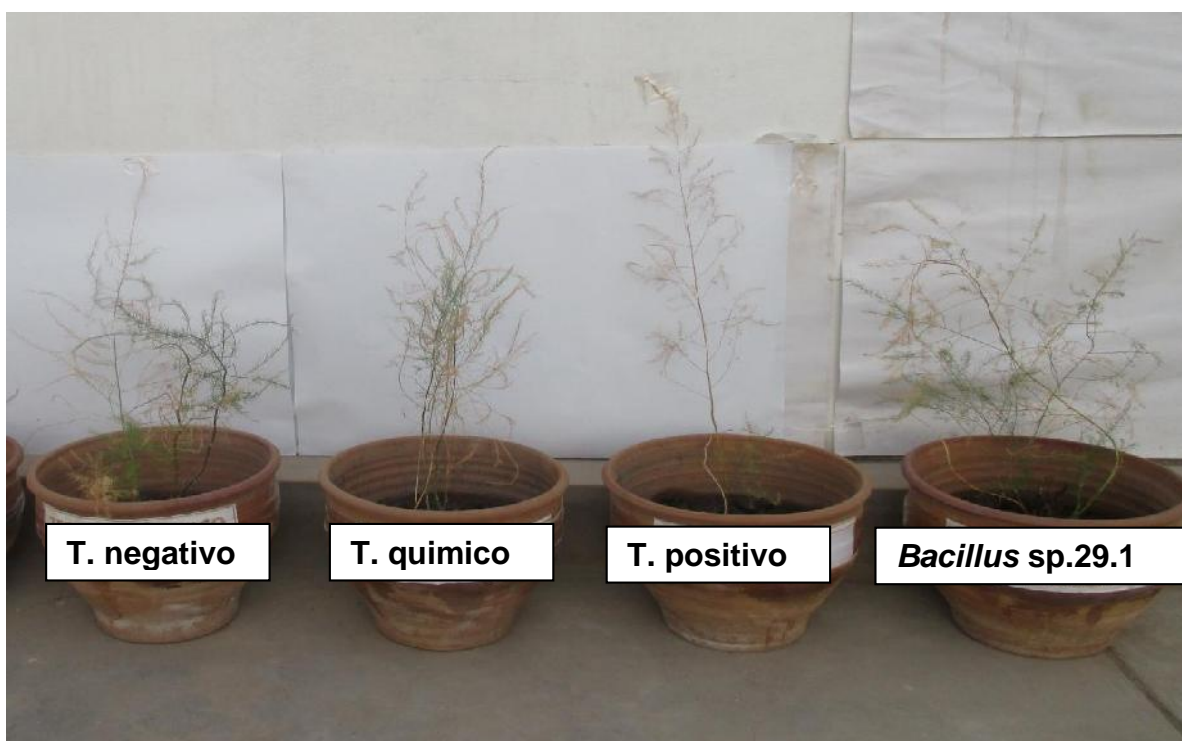


Figura 61. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 30 días después de la inoculación y la siembra de coronas con *Fusarium oxysporum*

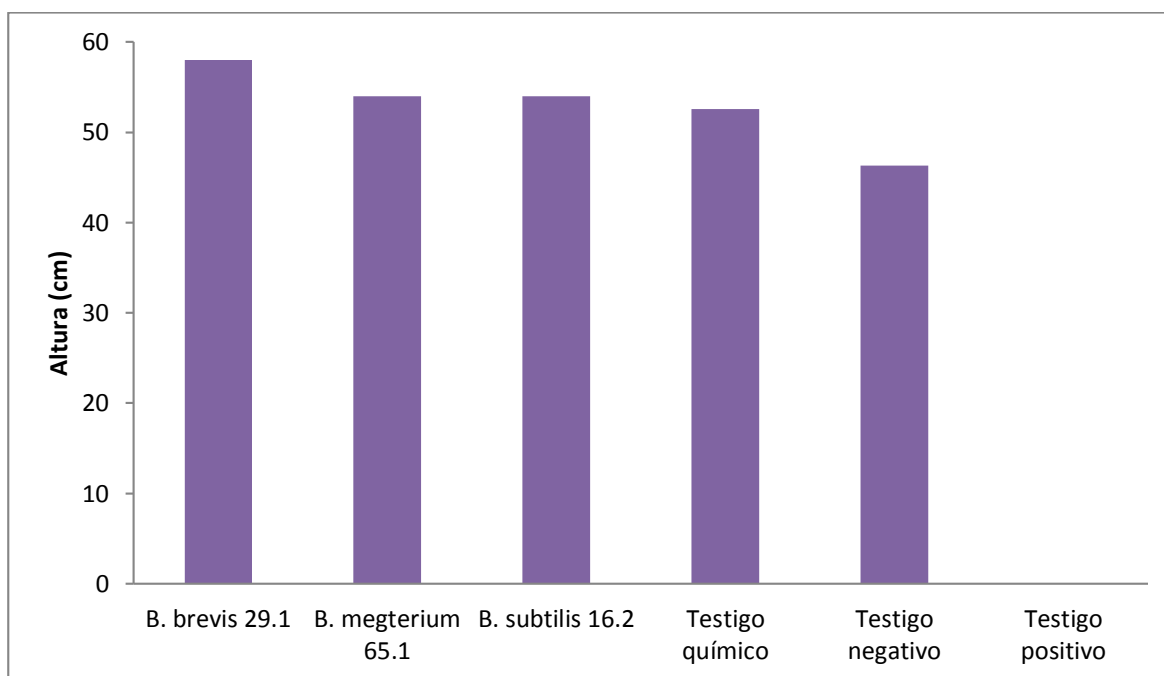


Figura 62. Altura de *Asparagus officinalis* L. 30 días después de la inoculación de *Bacillus* spp. y *Fusarium oxysporum*.

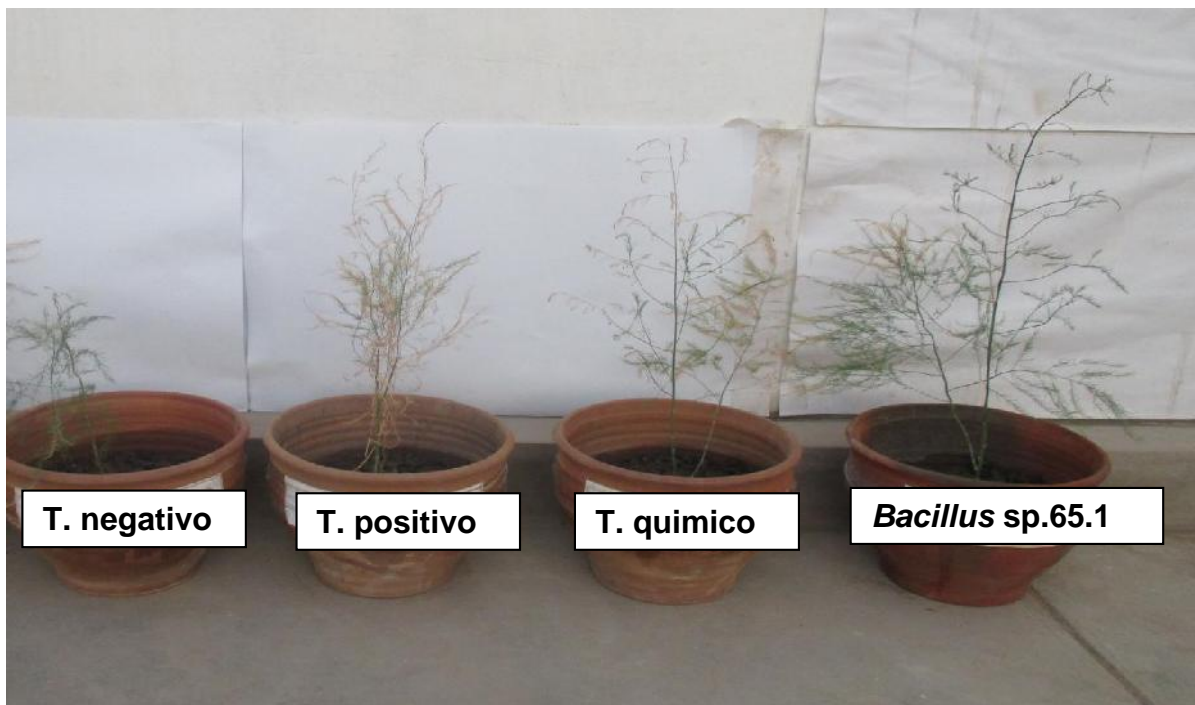


Figura 63. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 40 días después de la inoculación y la siembra de coronas con *Fusarium oxysporum*.

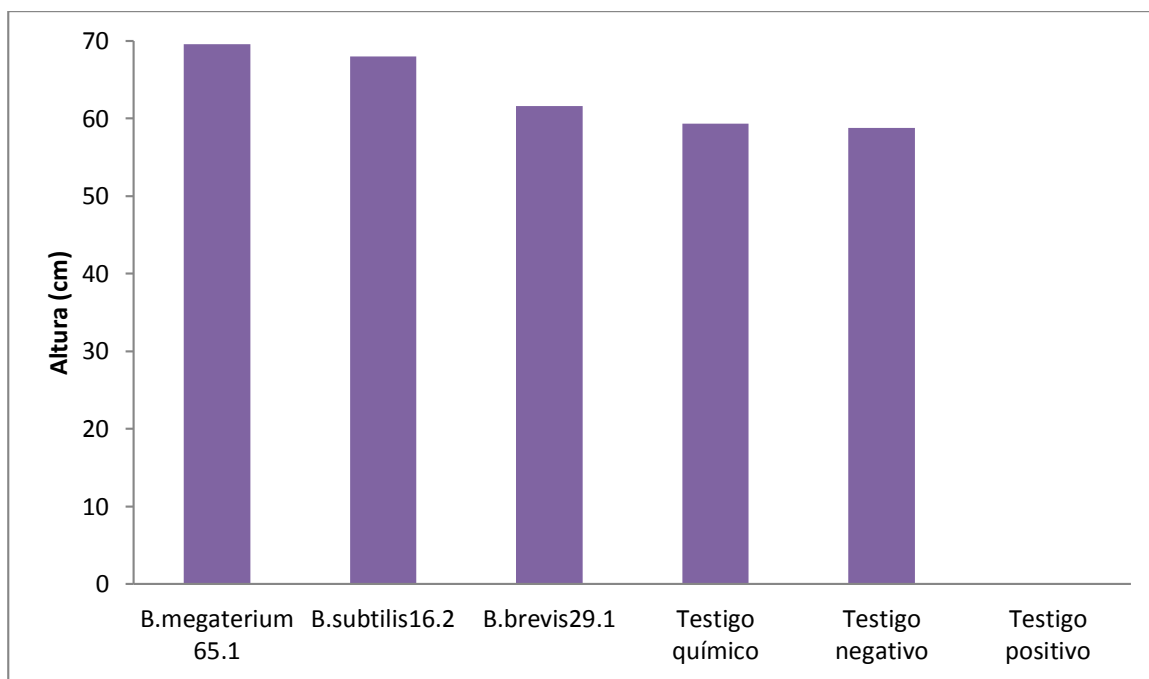


Figura 64. Altura de *Asparagus officinalis* L. 40 días después de la inoculación de *Bacillus* spp. y *Fusarium oxysporum*.

Tabla 14. Análisis de varianza de la altura de *Asparagus officinalis* L. para los factores hongo fitopatológico, tiempo y control de la pudrición

Fuente de variación	Suma de cuadrados tipo III	G'L	Media cuadrática	Fc	p	Sign.
Efectos principales						
Hongo fitopatológico (A)	1319,4	1	1319,4	28,493	0,000001	**
Tiempo (B)	17019,0	3	5673,0	122,516	0,000000	**
Control de la pudrición (C)	26989,4	4	6747,3	145,715	0,000000	**
Interacciones de primer orden						
A x B	660,3	3	220,1	4,573	0,004218	**
A x C	346,8	4	86,7	1,872	0,123397	NS
B x C	6683,7	12	557,0	12,029	0,000000	**
Interacciones de segundo orden						
A x B x C	932,1	12	77,7	1,677	0,087541	NS
Error	3704,3	80	46,3			

Tabla 15. Prueba de la Diferencia Mínima Significativa, DMS ($\alpha = 0,05$) de la altura de *Asparagus officinalis* L. para el factor hongo fitopatológico

Hongo fitopatológico	Altura (cm)	Sign.
<i>F. proliferatum</i>	47,34167	a
<i>F. oxysporum</i>	40,71000	b

Tabla 16. Prueba de la Diferencia Honestamente Significativa de Tukey ($\alpha=0,05$) de la altura de *Asparagus officinalis* L. para el factor tiempo

Tiempo (días)	Altura (cm)	Sign.
40	55,48333	a
30	50,20333	b
20	46,21667	b
10	24,20000	c

Tabla 17. Prueba de la Diferencia Honestamente Significativa de Tukey ($\alpha= 0,05$) de la altura de *Asparagus officinalis* L. para el factor control de la pudrición

Control de la pudrición	Altura (cm)	Sign.
<i>B. subtilis</i> 16.2	53,98333	a
<i>B. megaterium</i> 65.1	53,31250	a
<i>B. brevis</i> 29.1	49,37500	a
T. químico	49,16667	a
T. positivo	14,29167	b

Respecto a la interacción AxB los mayores valores en la altura se alcanzaron con *F. proliferatum*–40 días no diferenciándose significativamente de *F. proliferatum*–30 días y *F. oxysporum*–40 días pero si de las demás interacciones (Tabla 18). En la interacción BxC los mayores valores correspondieron a *Bacillus* spp.–40 días, testigo químico–40 días y *B. subtilis*–30 días, sin diferencias significativas entre ellas, pero si de las demás interacciones (Tabla 19).

Tabla 18. Prueba de la Diferencia Honestamente Significativa de Tukey ($\alpha= 0,05$) de la altura de *Asparagus officinalis* L. para la interacción hongo fitopatológico – tiempo

Hongo fitopatológico	Tiempo (días)	Altura (cm)	Sign.
<i>F. proliferatum</i>	40	59,23333	a
<i>F. proliferatum</i>	30	56,66667	a b
<i>F. oxysporum</i>	40	51,73333	a b
<i>F. proliferatum</i>	20	49,40000	b c
<i>F. oxysporum</i>	30	43,74000	c
<i>F. oxysporum</i>	20	43,03333	c
<i>F. oxysporum</i>	10	24,33333	d
<i>F. proliferatum</i>	10	24,06667	d

Tabla 19. Prueba de la Diferencia Honestamente Significativa de Tukey ($\alpha= 0,05$) de la altura de *Asparagus officinalis* L. para la interacción tiempo – control de la pudrición

Tiempo (días)	Control de la pudrición	Altura (cm)	Sign
40	<i>B. subtilis</i> 16.2	75,25000	a
40	<i>B. megaterium</i> 65.1	68,66667	a b
40	Testigo químico	63,00000	a b c
40	<i>B. brevis</i> 29.1	62,66667	a b c
30	<i>B. subtilis</i> 16.2	61,43333	a b c
30	<i>B. megaterium</i> 65.1	59,91667	b c
30	<i>B. brevis</i> 29.1	58,00000	b c
30	Testigo químico	58,00000	b c
20	<i>B. megaterium</i> 65.1	53,66667	c
20	<i>B. subtilis</i> 16.2	53,08333	c
20	<i>B. brevis</i> 29.1	52,50000	c
20	Testigo químico	52,00000	c
10	<i>B. megaterium</i> 65.1	31,00000	d
10	<i>B. subtilis</i> 16.2	26,16667	d e
10	<i>B. brevis</i> 29.1	24,33333	d e
10	Testigo químico	23,66667	d e
20	Testigo positivo	19,83333	d e f
10	Testigo positivo	15,83333	e f
30	Testigo positivo	13,66667	e f
40	Testigo positivo	7,83333	f

V. DISCUSIÓN

En raíces y tallos de plantas de espárrago con síntomas de pudrición se aislaron e identificaron hongos filamentosos del género *Fusarium*, coincidiendo con Borrego et al. (2014). La pudrición de raíz y tallo de las plantas causada por especies de *Fusarium*, es económicamente muy importante y afecta considerablemente el rendimiento de diversos cultivos agrícolas (Castillo, 2011; Lugo, 2011). En espárrago la enfermedad se denomina podredumbre de raíces y coronas (PRC) y se caracteriza por pudrición y coloración vascular de raíces, rizomas y tallos, lesiones necróticas sobre la superficie de raíces y tallos, reducción del tamaño de las plantas, amarilleo y senescencia de los tallos y turiones e inclusive muerte (Borrego, 2014).

Las especies de *Fusarium* aisladas e identificadas en raíces y tallos de espárrago fueron cuatro: *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. verticilloides* y *F. solani*. Al respecto, Borrego (2014) manifestó que en espárrago la podredumbre de raíces y coronas es de etiología compleja, con varias especies de *Fusarium* como agentes causales, predominando *F. oxysporum* f. sp. *asparagi* y *F. proliferatum*, seguidos de *F. verticillioides* (syn = *F. moniliforme*) y *F. solani*.

El mayor porcentaje (58,33%) de aislados de hongos correspondió a *F. oxysporum*, coincidiendo con Borrego et al. (2014) quienes identificaron fenotípicamente *F. oxysporum* en el 65,5% de aislados de raíces, tallos, coronas y suelo rizosférico de espárrago. Estos investigadores también identificaron *F. proliferatum* (18,3%), *F. solani* (6,4%), *F. acuminatum* (6,4%) y *F. redolens* (3,2%); no obstante, demostraron que *F. oxysporum* estuvo presente en todos los campos de cultivo muestreados y fue la especie dominante.

Los hongos filamentosos identificados fueron inoculados en plantas de espárrago, para demostrar la patogenicidad, coincidiendo con Borrego et al. (2014), Castillo (2011) y Lugo (2011), quienes inocularon *Fusarium* spp. en espárrago,

tomatillo y tomate respectivamente. Las pruebas de patogenicidad y reaislamiento de patógenos son parte de los postulados de Koch, que constituyen un protocolo a seguir, para comprobar empíricamente que un determinado microorganismo es el agente causal de una patología infecciosa en un hospedero susceptible (Robledo, 2016). En el caso de *Fusarium oxysporum*, cepas no patogénicas se encuentran entre los hongos más comúnmente aislados de plantas sanas y aunque son incapaces de producir enfermedad, éstas son colonizadoras muy efectivas de la epidermis y el cortex (Gao et al., 1995, mencionados por Castillo, 2011).

Los cuatro cultivos de *Fusarium* spp. inoculados demostraron ser patogénicos en espárrago, observándose síntomas de pudrición como altura reducida, amarillamiento, lesiones necróticas en las raíces y muerte. De igual manera, Borrego et al. (2014), 3 semanas después de la inoculación de *Fusarium* spp., en plantas de espárrago observaron lesiones necróticas de variable longitud, marrones y marrón-rojizas en las raíces.

Las plantas inoculadas con *F. oxysporum*, *F. proliferatum* y *F. solani* presentaron los mayores valores (84-68%) en la severidad de la enfermedad, descartándose *F. verticillioides* con 22%. Al respecto, Borrego et al. (2014) determinaron que solo los aislados de hongos con $\geq 20\%$ de lesiones necróticas en el sistema radicular deberían ser considerados patogénicos en espárrago. La patogenicidad de *Fusarium* spp. también fue reportada por Castillo (2011) en plantas de tomatillo, quien demostró que *F. oxysporum* y *F. solani* alcanzaron la mayor severidad. Estos hongos evidenciaron una respuesta rápida del huésped a la infección, por tener la mayor capacidad de penetrar el haz vascular y ocasionar no solo la marchitez de las plantas sino también disminución de la germinación, altura y peso seco de las plantas.

F. oxysporum ingresa en las plantas por la punta de la raíz o por las heridas naturales (formación de raíces laterales) o artificiales, se propaga intercelularmente (Lugo, 2011), avanza principalmente a través del tejido vascular, necrosándolo y obstruyendo el paso del agua y nutrientes y mayor incidencia se produce en las raíces, durante los primeros años del cultivo. Por su parte, *F. verticillioides* y *F. proliferatum* se alojan principalmente en coronas y tallos. La primera especie no

sobrevive en el suelo sin presencia del espárrago, por lo que comúnmente aparece en plantaciones más adultas, excepto en los casos en que se trasplantan coronas ya infectadas con el hongo. Por su parte, *F. solani* completa el cuadro de este complejo al infectar cualquier tejido subterráneo, principalmente en plantas debilitadas o afectadas por los hongos anteriores mencionados (Gonzáles & del Pozo, 1999).

Las bacterias del género *Bacillus* se aislaron de las muestras de rizoplasma y rizósfera de espárrago. Las especies de este género bacteriano se encuentran en el suelo, formando parte de la rizósfera de las plantas, comportándose como eficaces colonizadores debido a que son productoras de antibióticos y metabolitos termoestables que les facilitan el establecimiento en diferentes ambientes (Castillo, 2011). Las especies de *Bacillus* son ubicuas y han sido aisladas de raíces y rizósfera de diversos cultivos agrícolas como uchuva (Venner & Martin, 2009), algodón (Salaheddin et al., 2010), papa (Reinoso et al., 2007; Calvo & Zúñiga, 2010), soya (Wahyudi et al., 2011), arroz (Badía et al., 2011), tomate (Ríos & Zúñiga, 2012), piñon blanco (Aguilar & Coral, 2013), maíz (Altuna & Pelaez, 2013) e inclusive malezas (Perleche & Rentería, 2013).

Las muestras para el aislamiento de *Bacillus* spp. se calentaron, basándose en que las diferentes especies del género forman endosporas que son estructuras termoresistentes a los agentes perjudiciales como la desecación, radiación, ácidos grasos y desinfectantes químicos (Castillo, 2011). El tratamiento fue a 80°C durante 10 minutos, coincidiendo con Ríos & Zúñiga (2012), aunque también puede ser a 80°C por 15 minutos (Astorga et al., 2014), 80 °C por 20 minutos (Castillo, 2011) y 85°C por 15 minutos (Reinoso et al., 2007).

El género *Bacillus* se identificó fenotípicamente en los bacilos Gram positivos con esporas no deformantes, coincidiendo con Reinoso et al. (2007), Corrales et al. (2011), Ariza & Sánchez (2012), Corrales et al. (2012) y Suárez & Rangel (2014), aunque cuando las condiciones lo permiten, la identificación fenotípica se complementa con la caracterización molecular (Castillo et al., 2015; Ríos et al., 2016).

En la prueba de antagonismo *in vitro* el 9,02% de los cultivos de *Bacillus* spp. inhibieron el crecimiento radial de *Fusarium* spp., superando 4% reportado por Castillo (2011) para *Bacillus* spp. aisladas de suelos cultivados con maíz, tomate y sorgo, antagonistas a *F. oxysporum* y *F. solani*. Según Villa et al. (2007), el diámetro de la colonia del hongo disminuido por *Bacillus* spp. evidencia el efecto antifúngico o inhibición del crecimiento por los metabolitos excretados al medio de cultivo.

Especies de *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Streptomyces* son consideradas las bacterias más eficaces para el control de fitopatógenos (Adesemoye et al., 2008). Los mecanismos indirectos o de biocontrol incluyen la competencia por un nicho ecológico o por nutrientes, la interacción directa con el patógeno (parasitismo y lisis enzimática), antibiosis, producción de sideróforos e inducción de resistencia sistémica en las plantas (Hernández et al., 2006; Bhattacharyya & Jha, 2012). La antibiosis, competencia y actividad enzimática lítica son características de *Bacillus* spp. (Perleche & Rentería, 2013).

La antibiosis es el mecanismo por el cual los microorganismos producen sustancias tóxicas que inhiben o destruyen estructuras de la pared celular o atacan diferentes mecanismos celulares importantes en los organismos sensibles (Souto et al., 2004). Especies de *Bacillus* producen los lipopéptidos iturinas, que interrumpen la formación de la membrana plasmática de los hongos (Stein, 2005). Estos compuestos comprenden las bacilomicinas D,F y L; iturinas A-E y las micosubtilinas (Suoto et al., 2004). Las micosubtilinas tienen importante propiedad antagónica frente a hongos fitopatógenos como *F. oxysporum* (Leclere et al., 2005). *Bacillus subtilis* produce la Iturina A, que interactúa con las moléculas de colesterol, interrumpiendo la membrana citoplasmática del hongo, con aparición de canales transmembranales, por donde se pierden iones vitales como el potasio K⁺ (Ariza & Sánchez, 2012). La Iturina altera la permeabilidad de la membrana y la composición lipídica de la célula fúngica, de tal forma que inhibe el crecimiento micelial y la reproducción del hongo (Corrales et al., 2011).

B. megaterium producen amilasas, proteasas y el antibiótico Megacin además de otras sustancias antagónicas. *B. brevis* produce péptidos extracelulares que inducen a la hinchazón del citoplasma de las células que conforman las hifas, también inhiben la germinación de conidios y la formación del micelio vegetativo del hongo (Bapat & Shah., 2000 en Corrales et al., 2011).

La prueba de antagonismo *in vitro* se realizó por el método de enfrentamiento dual, coincidiendo con Villa et al. (2007), Reinoso et al. (2007) y Corrales et al. (2011, 2012), aunque también existen otros métodos, como el de Kirby-Bauer o difusión en agar (Izzedin & Medina, 2011), excavación en placa (Ariza & Sánchez, 2012) y uso de discos de papel filtro impregnados con el patógeno y los antagonistas (Ríos et al., 2016).

Especies de *Bacillus* reportadas previamente como antagonistas frente a *Fusarium* spp., son *B. subtilis* (Villa et al., 2007; Reinoso et al., 2007; Paredes et al., 2008; Izzedin & Medina., 2011; Corrales et al., 2012), *B. licheniformis* (Corrales et al., 2011, 2012); *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. brevis* (Corrales et al., 2011); *B. methylotrophicus* y *B. amyloliquefaciens* (Ríos et al., 2016). El antagonismo *in vitro* de *Bacillus* frente a *Fusarium* spp. fue reportado previamente por Villa et al. (2007) con *F. solani*, *F. sporotrichois* y *F. oxysporum*; Castillo (2011) con *F. oxysporum* y *F. solani*; Corrales et al. (2011) y Ariza & Sánchez (2012) con *Fusarium* spp. y Corrales et al. (2011) con *F. acuminatum* e Izzedin & Medina (2011) con *F. moniliforme*.

Los porcentajes máximos de inhibición del crecimiento radial (PICR) por *Bacillus* spp. fueron de 94,9% (*F. proliferatum*); 91,7% (*F. solani*) y 87,5% (*F. oxysporum*), superiores al rango 42-72% reportado para *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. licheniformis* y *B. megaterium* por Villa et al., 2007 (*F. solani*, *F. oxysporum*, *F. sporotrichois*), Corrales et al., 2011 (*F. acuminatum*) y para *B. methylotrophicus* y *B. amyloliquefaciens* por Ríos et al., 2016 (*F. oxysporum*). Los cultivos de hongos fitopatógenos con la mayor severidad en la pudrición y *Bacillus* spp. con el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los hongos, se seleccionaron para la fase experimental de la investigación, coincidiendo

con Corrales et al. (2011, 2012). Respecto a las bacterias, estos investigadores seleccionaron los cultivos de *Bacillus*, con los que los hongos fitopatógenos nunca alcanzaron igual tasa de crecimiento que el testigo, para garantizar los resultados en el ensayo en invernadero.

Todos los cultivos de *Bacillus* spp. seleccionados presentaron efecto biocontrolador de *F. oxysporum* y *F. proliferatum*, bajo condiciones de invernadero, disminuyendo la severidad de la pudrición de raíces y tallos por debajo del 50%. De esta manera, se validan los resultados obtenidos en la prueba *in vitro*, coincidiendo con Corrales et al. (2011) y Borrego (2014).

En las plantas de espárrago también se observó incremento en la altura, correspondiente a un efecto promotor de crecimiento por *Bacillus* spp. Al respecto, Ariza & Sánchez (2012) concluyeron que el efecto de especies de *Bacillus* como *B. subtilis* aplicado al suelo o a las semillas, no es exclusivamente por su antagonismo con los patógenos y la liberación de compuestos antifúngicos, sino también por la producción de sustancias promotoras de crecimiento.

El efecto de *Bacillus* spp. en el control de la severidad de la pudrición de raíz y tallo causada por *Fusarium* spp., fue demostrado previamente por Hernández et al. (2010) en tomate con *Fusarium* sp. ; Castillo (2011) en tomatillo con *F. oxysporum* y *F. solani*; Corrales et al. (2011) en romero con *F. acuminatum*; Izzedin & Medina (2011) en tomate, pimientón y cebolla con *F. moniliforme* y Corrales et al. (2012) en tomillo con *Fusarium* spp. Por el contrario, Lugo (2011) reportó diferencias no significativas en la protección de plantas de tomate con *F. oxysporum*. Este investigador no observó efecto antagonista, pero si efecto promotor del crecimiento con 10-25% de incremento en la altura de plantas de tomate inoculadas con *B. thuringiensis*.

El efecto promotor de crecimiento en las plantas por *Bacillus* spp. se evidencia con incremento en la altura (Hernández et al., 2010; Castillo, 2011; Izzedin & Medina, 2011; Lugo 2011) y también aumento de la germinación (Izzedin & Medina, 2011), biomasa de tallos, hojas, raíces y rendimiento (Hernández et al., 2010), biomasa foliar, número de flores, volumen de raíces

(Castillo, 2011), longitud de raíces y peso de biomasa aérea y radicular (Corrales et al., 2012), y biomasa de hojas, tallos y raíces (Corrales et al., 2011).

F. oxysporum y *F. proliferatum* fueron verificados como fitopatógenos, al cumplirse con los postulados de Koch, coincidiendo con Corrales et al. (2011, 2012). Los hongos siempre estuvieron asociados con la enfermedad, se aislaron e identificaron en PDA, se inocularon en plantas sanas, que posteriormente presentaron síntomas característicos de la enfermedad y fueron reaislados de estas plantas, presentando similares características macroscópicas y microscópicas (Corrales et al., 2012).

Transcurridos 90 días de la inoculación de los hongos fitopatógenos *B. subtilis* 44 y *B. megaterium* sp. superaron en el control de la severidad de la enfermedad y en el incremento en la altura inclusive el testigo químico. Al respecto, Reid et al. (2002) informaron que en un estudio de invernadero los tratamientos con el fungicida Benomilo redujeron la enfermedad de las plantas de espárrago infectadas con *F. oxysporum f. sp. asparagi* y *F. proliferatum*; no obstante, Manning & Vardero, 1977, mencionados por Borrego (2014) reportaron que el tratamiento de las coronas con fungicida reduce los niveles de pudrición, pero por un período corto y aunque también incrementa el tamaño y vigor de las plantas, no siempre es efectivo.

VI. CONCLUSIONES

- En raíces y tallos de plantas de espárrago con síntomas de pudrición se aislaron e identificaron *Fusarium oxysporum* (58,33%), *F. proliferatum* (20,83%), *F. verticillioides* (12,5%) y *F. solani* (8,33%).
- Los hongos filamentosos demostraron patogenicidad en las plantas de espárrago alcanzándose una severidad de la pudrición de 84% con *F. oxysporum*, 76% con *F. proliferatum* y 68% con *F. solani*.
- En el rizoplaneo y la rizósfera de plantas de espárrago se aislaron e identificaron 277 cultivos de *Bacillus* spp.
- El 9,02% de los cultivos de *Bacillus* spp. demostraron antagonismo a *Fusarium* spp., con halos de inhibición de 0,1 a 0,8 cm; tasas de crecimiento micelial de 0,014 a 0,486 con *F. oxysporum*; 0,014 a 0,471 con *F. proliferatum* y 0,014 a 0,429 con *F. solani* y porcentajes de inhibición del crecimiento radial de 22,5 a 87,5%; 58,9 a 94,9% y 52,8 a 91,7%, respectivamente.
- Los cultivos de *Bacillus* spp. seleccionados fueron *B. subtilis*16.2; *B. brevis*29.1 y *B. megaterium*65.1.
- Los cultivos de *Bacillus* spp. disminuyeron la severidad de la pudrición de raíz y tallo de las plantas de espárrago inoculadas con *F. proliferatum*, determinándose 0% (*B. subtilis*16.2 y *B. megaterium*65.1); 8,3% (*B. brevis*29.1) y 25% (Testigo químico), en comparación con 83,3% del control positivo. Con *F. oxysporum* se determinó 0% (*B. subtilis*16.2 y *B. megaterium*65.1); 16,6% (*B. brevis*29.1) y 33,3% (Testigo químico), en comparación del control positivo.
- Los cultivos de *Bacillus* spp. incrementaron el desarrollo vegetativo de espárrago con índices de efectividad en la altura de 79,37 a 217,46% a los 10 días, 29,06 a 39,47% a los 20 días, 25,27 a 48,60% a los 30 días y 8,16 a 40,3% a los 40 días.

VII. RECOMENDACIONES

- Caracterizar a nivel molecular *Fusarium proliferatum*, *F. oxysporum*, *Bacillus subtilis*16.2, *B. brevis*29.1 y *B. megaterium*65.1.
- Determinar el efecto de *Bacillus subtilis*16.2, *B. brevis*29.1 y *B. megaterium*65.1 en el desarrollo vegetativo y rendimiento de espárrago en condiciones de campo.
- Investigar sustratos de bajo costo para el crecimiento masivo de *Bacillus subtilis*16.2, *B. brevis*29.1 y *B. megaterium*65.1.

VIII. RESUMEN

En la rizósfera de *Asparagus officinalis* L. “espárrago” se aislaron especies de *Bacillus* con el objetivo de determinar su potencial como controladores de hongos filamentosos causantes de pudrición en raíz y tallo. Los hongos se aislaron de plantas con pudrición y se le realizó la prueba de patogenicidad en plántulas de 1 mes. Las bacterias se aislaron e identificaron fenotípicamente y se determinó el efecto antagonista *in vitro* mediante el método de enfrentamiento de cultivos duales. En invernadero se determinó el efecto de los cultivos de *Bacillus* spp. en el control de hongos fitopatógenos, bajo un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial. Se aislaron e identificaron *Fusarium oxysporum* (58,33%), *F. proliferatum* (20,83%), *F. verticillioides* (12,5%) y *F. solani* (8,33%). Los hongos demostraron patogenicidad, alcanzándose una severidad de la pudrición de 84% con *F. oxysporum*, 76% con *F. proliferatum* y 68% con *F. solani*. Se aislaron e identificaron 277 cultivos de *Bacillus* spp., de los que el 9,02% demostró antagonismo a *Fusarium* spp. Los cultivos de *B. subtilis*16.2, *B. brevis*29.1 y *B. megaterium*65.1 disminuyeron la severidad de la enfermedad en plantas de espárrago inoculadas con *F. proliferatum* y *F. oxysporum* e incrementaron el desarrollo vegetativo con índices de efectividad en la altura de 8 a 217%. Se demostró el potencial de *Bacillus* spp. en el control de hongos causantes de pudrición.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adesemoye, A., Obini, M. & Ugoji, E. (2008). Comparison of plant growth-promotion with *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis* in three vegetables. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 423-426.
- Aguilar, H. & Coral, J. (2013). *Caracterización de Bacillus spp. asociadas a la rizósfera de Jatropha curcas L., “piñón blanco”, en Lambayeque y su potencial como promotoras del crecimiento de plantas, 2012.* (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.
- Agrios, G. (1995). Fitopatología. México: Noriega Editores.
- Agrobanco (2007). Área de desarrollo. Cultivo de espárrago. Perú. Recuperado de http://www.agrobanco.com.pe/pdfs/publicacionagroinforma/2_cultivo_del_esparrago.pdf
- Altuna, H. & Pelaez, K. (2013). *Determinación del potencial como promotoras del crecimiento de plantas de las especies de Bacillus aisladas de la rizósfera de Zea mays L. “maíz” en Lambayeque, 2013* (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.
- Arias, E. & Piñeros, P. (2008). *Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelos de los páramos de Guasca y Cruz verde.* (Tesis de Licenciatura). Pontificia Universidad Javeriana, Colombia.
- Ariza, Y. & Sánchez, L. (2012). Determinación de metabolitos secundarios a partir de *Bacillus subtilis* con efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. *Nova- Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, 10(18), 135-250.
- Astorga, K., Meneses, K., Zúñiga, C., Brenes, J. & Rivera W. (2014) Evaluación del antagonismo de *Trichoderma* sp. y *Bacillus subtilis* contra tres patógenos del ajo. *Tecnología en Marcha*, 27(2), 82-91.
- Badía, M., Hernández, B., Murrel, J., Mahillon, J. & Perez, M. (2011). Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus* asociadas al cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Revista Brasileira de Agroecología*, 6(1), 90-99.

- Bhattacharyya, P. & Jha, D. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 28,1327-1350.
- Borrego, A. (2014). *Las enmiendas orgánicas del suelo en el control de la Fusariosis del espárrago y del tomate* (Tesis de Doctorado). Universidad de Córdoba, España.
- Cadena, S. & Martínez, B. (2011). *Caracterización de cepas de Pseudomonas spp y su efecto en la germinación y emergencia de Zea mays L. "maíz" en Lambayeque*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Perú.
- Calvo, P. & Zúñiga, D. (2010). Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). *Ecología Aplicada*, 9(1) 31–39.
- Camarena, G. & de la Torre, R. (2007). Resistencia sistémica adquirida en plantas: Estado Actual. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 13(2), 157-162.
- Camelo, M., Vera, S. & Bonilla, R. (2011). Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Revista Corpoica-Ciencias y Tecnología Agropecuaria*, 12 (2), 159-166.
- Castillo, O. (2011). *Nutrición y Bacillus subtilis en el control de marchitamiento por Fusarium spp. en tomatillo (Physalis ixocarpa B.) en Sinaloa* (Tesis de Maestría). Instituto Politécnico Nacional, México.
- Castillo, F., Hernández, F., Gallegos, G., Flores, A., Rodríguez, R. & Aguilar, C. (2015) Efectividad in vitro de *Bacillus* y polifenoles de plantas nativas de México sobre *Rhizoctonia solani*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6(3), 549-562.
- Carreño, C. (2009). *Efecto de la inoculación de bacterias nativas solubilizadoras de fósforo en el desarrollo y rendimiento de tres cultivos agrícolas en Mochumí, Lambayeque, Perú*. (Tesis de Doctorado). Universidad Nacional de Trujillo, Perú.

- Carreño, C. & Altamirano, C. (2016). *Manual de Prácticas de Microbiología del Suelo*. Lambayeque, Perú: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.
- Corrales, L., Sánchez, L., Cuervo, J., Bautista, D., González L. & Guevara, M. (2011). Evaluación del efecto biocontrolador de *Bacillus* spp. frente a *Fusarium* spp., bajo condiciones de invernadero en *Rosmarinus officinalis* L. *Nova-Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, 8(13), 63-75.
- Corrales, L., Sánchez, L., Cuervo, J., Joya, J. & Márquez, K. (2012). Efecto biocontrolador de *Bacillus* spp. frente a *Fusarium* sp. bajo condiciones de invernadero en plantas de tomillo (*Thymus vulgaris* L.). *Nova-Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, 10(17), 64-82.
- Corpas, C., Melero, J., Molinero, L., Zurera, C. & Basallote, J. (2006). Characterization of isolates of *Fusarium* spp. obtained from asparagus in Spain. *Plant Disease*, 90, 1441-1451.
- Cuervo, J. (2010). *Aislamiento y caracterización de Bacillus spp. como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales*. (Tesis de Grado). Pontificia Universidad Javeriana, Colombia.
- Delgado, A. (2007). *Producción y comercialización de espárrago en el valle de Virú*. (Tesis de Maestría). Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas, Perú.
- Durán, R. (2001). *Etiología de enfermedades de espárrago causadas por patógenos de suelo en Andalucía*. (Ph.D. Thesis). Universidad de Córdoba, España.
- Escobar, C.; Horna, Y.; Carreño, C. & Mendoza, G.(2011). Caracterización de cepas nativas de *Azotobacter* spp. y su efecto en el desarrollo de *Lycopersicon esculentum* Mill. "tomate" en Lambayeque. *Scientia Agropecuaria*, 2(1), 39-49.
- Elmer, H. (2001). *Fusarium diseases of Asparagus*. En P. Nelson, B. Summerell, F. Leslie, D. Backhouse, W. Bryden & W. Burgess (Eds.), *Memorial Symposium* (248-262). St. Paul Minnesota: APS Press.

- Farías, V., Krarup, C. & Contreras, S. (2004). Efectos de población sobre rendimiento y calidad de turiones de cuatro cultivares de espárrago. *Scientia Agropecuaria*, 31, 119-127.
- Fernández, O. & Vega, L. (2001). Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado de Plagas*, 62, 96-100.
- García, F. & Muñoz, H. (2010). *Caracterización de cepas nativas de Azospirillum spp. y su efecto como promotoras del desarrollo vegetativo de arroz (Oryza sativa)*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Perú.
- Gonzáles, M. & del Pozo, A. (1999). *El cultivo del espárrago*. Chile: Instituto Nacional de Investigación Agraria.
- Guillén, R., Hernández, F., Gallegos, G., Rodríguez, R., Aguilar, C., Padrón, E. & Reyes, M. (2006). *Bacillus* spp., como biocontrol en un suelo infestado con *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kuhn y *Phytophthora capsici* Leonian y su efecto en el desarrollo y rendimiento del cultivo de Chile (*Capsicum annuum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24(2), 105-114.
- Hernández, A., Heydrich, M., Velázquez, M. & Hernández, A. (2006). Perspectivas del empleo de rizobacterias como agentes de control biológico en cultivos de importancia económica. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24(1), 42-49.
- Hernández, R., Fernández, C. & Baptista, P. (2010). Metodología de la Investigación. México: *Mc Graw, Hill Interamericana Editores S.A.*
- Hernández, M., Hernández, F., Lira, R. & Gallegos, G. (2010). Biocontrol de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium* sp. con microencapsulados de *Bacillus subtilis* y su efecto en crecimiento y rendimiento de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Revista Agraria-Nueva Época*, 7(1,2,3), 17-25.
- Izzedin, N. & Medina, L. (2011). Efecto del control biológico por antagonistas sobre fitopatógenos en vegetales de consumo humano. *Revista Salus*, 15(3), 8-18.

- Layton, C., Maldonado, E., Monroy, L., Corrales, L. & Sánchez, L. (2011). *Bacillus* spp., perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. *Nova-Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, 9(15), 177-187.
- Leclere, V., Bechet, M., Adam, A., Guez, J., Wathelet, B., Ongena, M., Thonart, P., Gancel, F., Chollet-Imbert, M. & Jacques, P. (2005) Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organisms antagonistic and biocontrol activities. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 4577-4584.
- Leslie, J. & Summerell, B. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing Professional, Ames, IA.
- Lugo, M. (2011). *Aplicación de Bacillus spp. para el control biológico de Fusarium oxysporum Schlechtend. f. sp. radicis-lycopersici en tomate (Solanum lycopersicum L.)*. (Tesis de Maestría). Instituto Politécnico Nacional, México.
- Martim, R., Nagpala, A. & Luis, J. (2003). *Bacillus subtilis* and its efficacy as a biocontrol agent of *Rhizoctonia*- induced diseases of potato in organically-amended soil. *Research Journal*, 40, 96–124.
- Martín, A. (2011). *Efectos de la inoculación del hongo de micorrización Tuber melanosporum y la rizobacteria Pseudomonas fluorescens en la calidad de la plántula de Pinus halepensis* (Tesis de Grado). Universidad Politécnica de Madrid, España.
- Paredes, J., Carillo, J., García, R., Allende, R., Sañudo, J. & Valdez, J. (2008). Microorganismos anagonistas para el control del complejo de hongos causantes de la rabia del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en el estado de Sinaloa, Mexico. *Revista mexicana de Fitopatología*, 27(1), 27-35.
- Perleche, C. & Rentería, M. (2013). *Determinación del Potencial como promotoras del crecimiento de Bacillus aisladas de la rizósfera de malezas asociadas a Zea mays L. "maíz" en Lambayeque, 2013*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.
- Regalado, F. (1992). *Espárrago: Conducción de viveros*. Perú: Colegio de Ingenieros del Perú.

- Reinoso, Y., Vaillant, D., Casadesús, L., Pazos, V. & García, E. (2007). Caracterización e identificación de cepas de los géneros *Bacillus*, *Brevibacillus* y *Paenibacillus* aisladas del suelo con potencialidades para el control biológico de *Rhizoctonia solani* Kühn. Recuperado de <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/2091/209116144007.pdf>
- Reyes, N. (2006). *Factibilidad de empresas productora y procesadora-exportadora de Espárrago verde*. (Tesis de Ingeniería). Pontificia Universidad Católica del Perú, Perú.
- Ríos, P. & Zúñiga, L. (2012). *Bacillus* spp. aisladas de rizósfera de *Lycopersicon esculentum* Mill. "tomate" en Lambayeque y su potencial como promotoras del crecimiento de plantas. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.
- Ríos, C., Caro, M., Berlaga, D., Ruiz, M., Ornelas, J., Salas, M., Villalobos, M., Villalobos, E. & Guerrero, V. (2016). Identification and antagonistic activity in vitro of *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp. isolates against common phytopathogenic fungi. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 34(1), 84-98.
- Rodríguez, C. (2013). *Evaluación de microorganismos promotores de crecimiento vegetal en tomate (Solanum lycopersicum) variedad Santa Clara, aislados de residuos lignocelulósicos de higuera (Ricinus communis)*. (Tesis de Especialidad). Universidad Católica de Manizales, Colombia
- Ruiz, E., Mejía, M., Cristóbal, J., Valencia, A. & Reyes, A. (2014). Actividad antagónica de filtrados de *Bacillus subtilis* contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5(7), 1325-1332.
- Salaheddin, K., Valluvaparidasan, V., Ladhakshmi, D. & Velazhahan, R. (2010). Management of bacterial blight of cotton using a mixture of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*. *Plant Protection Science*, 46(2), 41–50.
- Schallmeyer, M., Singh, A., & Ward, P. (2004). Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian Journal of Microbiology*, 50, 1-17.

- Seifert, K. (1996). *Fuskey. Fusarium interactive key*. Agriculture and agri-food. Canadá.
- Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 56, 845-857.
- Suárez, L. & Rangel, A. (2014) Aislamiento de microorganismos para control biológico de *Moniliophthora roreri*. *Acta Agronómica*, 62(4), 370-378.
- Souto, G., Correa, O., Montecchia, M., Kerber, N., Pucheu N., Bachur, M. & García, A. (2004). Genetic and functional characterization of a *Bacillus* sp. strain excreting surfactin antifungal metabolites partially identified as iturin-like compounds. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 1247-1256.
- Tejera, B., Rojas, M. & Heydrich, M. (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos Fitopatógenos. *Revista CENIC, Ciencias Biológicas*, 42(3), 131-138.
- Vallejo, J., Peral, D. & Carrasco, M., (2009). Anotaciones al conocimiento etnobotánico y medicinal de los espárragos extremeños (Género *Asparagus* L.). *Medicina Naturista*, 3(1), 41–46.
- Vásquez, A., Díaz, N., Vásquez, O. & Vásquez, W. (2012). *Metodología de la Investigación Científica*. Lambayeque, Perú: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.
- Velasco, C., Cisneros, J., Berlanga, D., Ruiz, M., Ornelas, J., Salas, M., Villalobos, E. & Guerrero, V. (2015). Identificación y actividad antagónica in vitro de aislados de *Bacillus* spp. y *Trichoderma* spp. contra hongos fitopatógenos comunes. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 34(1), 84-96.
- Venner, C. & Martín, M. (2009). *Aislamiento y selección de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal en cultivos de uchuva (Physalis peruviana L.) con capacidad antagónica frente a Fusarium sp.* (Tesis de Grado). Pontificia Universidad Javeriana, Colombia.
- Villa, P., Alfonso, I., Rivero, M. & Gonzales, G. (2007). Evaluación de cepas de *Bacillus subtilis* bioantagonistas de hongos fitopatógenos del género *Fusarium*. *ICIDCA. Sobre los derivados de la caña de azúcar*, 41(1), 52-56.

Wahyudi, A., Puji, R., Widyawati, A., Meryandini, A., &Asih, A. (2011).
Characterization of *Bacillus* sp. strains isolated from rhizosphere of soybean
plants for their use as potential plant growth for promoting *Rhizobacteria*.
Journal of Microbiology and Antimicrobials, 3(2), 34-40.

X. ANEXOS

ANEXO 1

Cálculo del número de muestras para el aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno (en Vásquez et al., 2012)

$$n = \frac{Z^2 p \cdot q}{T^2}$$

$$n = \frac{(1,96)^2 (0,90 \cdot 0,10)}{(0,06)^2}$$

$$n = 96,04 \text{ muestras}$$

Dónde:

n = Tamaño de la muestra

Z = 1,96 ($\alpha = 0,05$) valor estándar

p = Prevalencia de *Bacillus* spp. promotoras del crecimiento en plantas (0,90).

q = 1-p, ausencia (0,10).

T = Error estimado (6%).

ANEXO 2

Posición de los puntos de muestreo de raíces y suelo rizosférico de *Asparagus officinalis* L., 2016

Punto	Posición		Punto	Posición	
	Latitud	Longitud		Latitud	Longitud
1	-8.346433	-78.877472	34	-8.349107	-78.874532
2	-8.345996	-78.876798	35	-8.350052	-78.875259
3	-8.346651	-78.877240	36	-8.349319	-78.874368
4	-8.346181	-78.876637	37	-8.350157	-78.875044
5	-8.346790	-78.877055	38	-8.349503	-78.874236
6	-8.346427	-78.876465	39	-8.350293	-78.874924
7	-8.347015	-78.877073	40	-8.349662	-78.874128
8	-8.356586	-78.876327	41	-8.350477	-78.874790
9	-8.347375	-78.876920	42	-8.349812	-78.874024
10	-8.346781	-78.876196	43	-8.350715	-78.874759
11	-8.347598	-78.876808	44	-8.349974	-78.873922
12	-8.347028	-78.876006	45	-8.350782	-78.874621
13	-8.347863	-78.876651	46	-8.350102	-78.873808
14	-8.347234	-78.875860	47	-8.3508750,	-78.8744680
15	-8.348082	-78.876501	48	-8.350902,	-78.874313
16	-8.347444	-78.875711	49	-8.351045,	-78.874217
17	-8.348263	-78.876316	50	-8.351187,	-78.874113
18	-8.347675	-78.875541	51	-8.351334,	-78.874015
19	-8.348454	-78.876142	52	-8.351484,	-78.873914
20	-8.347886	-78.875387	53	-8.351624,	-78.873807
21	-8.348654	-78.876029	54	-8.351772,	-78.873710
22	-8.346538	-78.873790	55	-8.351920,	-78.873606
23	-8.349104	-78.876154	56	-8.352062,	-78.873502
24	-8.346712	-78.873676	57	-8.352219,	-78.873420
25	-8.349280	-78.876055	58	-8.352367,	-78.873319
26	-8.346899	-78.873550	59	-8.352512,	-78.873228
27	-8.349457	-78.875940	60	-8.352650,	-78.873111
28	-8.347080	-78.873411	61	-8.352765,	-78.872985
29	-8.349617	-78.875837	62	-8.352919,	-78.872894
30	-8.347273	-78.873281	63	-8.353080,	-78.872806
31	-8.349819	-78.875720	64	-8.353213,	-78.872693
32	-8.347450	-78.873183	65	-8.353352,	-78.872586
33	-8.350009	-78.875605	66	-8.353515,	-78.872498

Punto	Posición		Punto	Posición	
	Latitud	Longitud		Latitud	Longitud
67	-8.353652,	-78.872399	82	-8.349744,	-78.872050
68	-8.353767,	-78.872263	83	-8.350029,	-78.871529
69	-8.353900,	-78.872154	84	-8.350129,	-78.871337
70	-8.354038,	-78.872043	85	-8.350169,	-78.871245
71	-8.354196,	-78.871959	86	-8.350466,	-78.871266
72	-8.854319,	-78.871838	87	-8.350512,	-78.871173
73	-8.354469,	-78.871744	88	-8.350591,	-78.871014
74	-8.354595,	-78.871625	89	-8.350768,	-78.870929
75	-8.354735,	-78.871519	90	-8.350981,	-78.870863
76	-8.354885,	-78.871406	91	-8.351209,	-78.870743
77	-8.349140,	-78.872584	92	-8.351415,	-78.870716
78	-8.349220,	-78.872390	93	-8.351458,	-78.870458
79	-8.349397,	-78.872177	94	-8.351629,	-78.870485
80	-8.349454,	-78.872060	95	-8.351771,	-78.870122
81	-8.349465,	-78.871974	96	-8.352022,	-78.870255

ANEXO 3

Medios de cultivo y soluciones para el aislamiento y mantenimiento de

Bacillus spp.

a. Agar Nutritivo (en Escobar & Horna, 2011)

Componentes	gL ⁻¹
Peptona	5,0
Extracto de carne	3,0
Agar agar	15,0
Agua destilada csp	1000 mL

b. Agar Tripticasa Soya (en Cadena & Martínez, 2011)

Componentes	gL ⁻¹
Digerido pancreático de caseína	15,0
Digerido papaico de harina de soja	5,0
Cloruro sódico	5,0
Agar agar	15,0
Agua destilada csp	1000 mL

c. Agar Papa Dextrosa (en Arias & Piñeros, 2008)

Componentes	gL ⁻¹
Papa	400
Glucosa	20
Sulfato de amonio	3
Agar agar	15
Agua destilada	1000mL

ANEXO 4

Temperaturas mínima, media y máxima durante el cultivo de *Asparagus officinalis* L.

Fecha	Temperatura mínima (°C)	Temperatura media (°C)	Temperatura máxima (°C)
28-12-16	18,0	23,0	27,0
29-12-16	20,0	24,0	28,0
30-12-16	19,0	24,0	28,0
31-12-16	19,0	24,0	28,0
01-01-17	20,0	24,0	28,0
02-01-17	20,0	24,0	28,0
03-01-17	19,0	24,0	28,0
04-01-17	18,0	24,0	29,0
05-01-17	20,0	25,0	29,0
06-01-17	21,0	25,0	28,0
07-01-17	20,0	24,0	28,0
08-01-17	21,0	25,0	29,0
09-01-17	20,0	24,0	29,0
10-01-17	21,0	26,0	31,0
11-01-17	20,0	24,0	28,0
12-01-17	19,0	24,0	28,0
13-01-17	20,0	25,0	29,0
14-01-17	21,0	25,0	29,0
15-01-17	21,0	25,0	29,0
16-01-17	20,0	25,0	30,0
17-01-17	22,0	26,0	30,0
18-01-17	22,0	26,0	30,0
19-01-17	21,0	25,0	29,0
20-01-17	22,0	27,0	31,0
21-01-17	22,0	26,0	30,0
22-01-17	22,0	26,0	30,0
23-01-17	23,0	27,0	31,0
24-01-17	22,0	27,0	31,0
25-01-17	22,0	27,0	31,0
26-01-17	22,0	26,0	29,0
27-01-17	23,0	27,0	31,0
28-01-17	23,0	28,0	32,0
29-01-17	24,0	28,0	31,0
30-01-17	23,0	28,0	33,0
31-01-17	23,0	27,0	30,0
01-02-17	23,0	27,0	30,0
02-02-17	23,0	26,0	29,0
03-02-17	23,0	27,0	30,0
04-02-17	24,0	27,0	30,0
05-02-17	23,0	26,0	29,0

ANEXO 5

Características macroscópicas de *Fusarium* spp.

Blanco, algodonoso, pigmento purpura oscuro	Durazno, algodonoso, sin pigmento	Salmón, flooso, sin pigmento	Crema, micelio escaso, sin pigmento
P4(4.1)	P2(3.3)	P9(2.1)	P7(3.3)
P4(7)	P8(3.2)	P9(2.2)	P13(6.3)A
P5(5)	P10(4.3)	P11(2.2)	
P8(3.1)A	P11(2.3)		
P8(3.1)B	P17(4.1)		
P10(4.4)			
P12(6.2)			
P12(6.4)			
P12(6.5)			
P13(6.1)			
P13(6.3)R			
P15(5.1)			
P18(6.6)			
P19(3.1)			

ANEXO 6

Cálculo de la severidad(%) de la enfermedad en plantas de *Asparagus officinalis* L. inoculadas con *Fusarium oxysporum* (en Lugo,2011)

$$\text{Severidad (\%)} = \sum \frac{n.t}{5.N} \times 100$$

$$(\%) = \frac{(0)(1)}{(5)(10)} + \frac{(0)(2)}{(5)(10)} + \frac{(2)(3)}{(5)(10)} + \frac{(4)(4)}{(5)(10)} + \frac{(4)(5)}{(5)(10)} \times 100$$

$$(\%) = 0,84 \times 100$$

$$(\%) = 84,0$$

Donde:

n = Número de plantas en cada categoría (0,0,2,4,4)

t= Valor numérico según escala asignada por categoría (1,2,3,4,5)

5= Valor máximo de la escala por severidad

N= Número total de plantas por unidad experimental (10)

ANEXO 7

Crecimiento radial (cm) de *Fusarium* spp. por efecto de *Bacillus* spp. durante 3 días

<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Crecimiento radial (cm)		
	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. solani</i>
Testigo	1,5	1,7	1,5
1.1	0,9	1,5	1,5
1.2	1,0	1,7	1,0
2.1	1,8	1,5	0,9
2.2	1,4	1,4	1,0
3.2	1,5	1,1	1,1
4.2	1,6	1,2	1,0
4.4	1,7	1,9	1,1
5.1	1,4	1,4	1,0
7.1	2,0	1,5	1,2
7.3	2,4	1,5	1,2
8.1	1,6	1,4	1,1
8.3	1,5	1,7	1,3
9.2	1,3	1,3	1,5
10.1	1,5	1,2	1,6
13.1	1,9	1,3	1,4
16.1	1,8	1,6	1,3
16.4	2,0	1,4	1,5
17.4	1,5	1,3	1,4
21.2	1,7	1,5	1,0
24.1	1,7	1,6	1,0
24.2	0,9	1,7	1,0
25.6	0,8	1,6	1,0
28.4	0,9	1,0	1,0
29.2	0,7	0,9	0,9
30.3	0,5	1,7	0,9
31.1	0,5	1,5	0,8
32.1	0,8	1,0	0,7
32.2	1,2	1,1	1,0
32.3	0,6	1,5	0,9
34.1	0,6	1,0	1,0
37.1	0,5	1,1	0,9
37.3	0,9	1,0	0,7
38.1	0,7	1,3	1,0
38.2	0,7	1,1	1,1
39.4	0,8	1,4	0,9
40.1	1,1	1,9	0,9
41.3	0,3	0,8	0,3
42.2	0,5	0,9	1,0
45.3	0,6	0,8	0,7
45.5	0,7	1,0	0,8
45.6	0,5	1,1	0,8
46.1	1,2	0,1	0,6
47.1	1,4	1,6	1,0
47.2	1,3	1,2	1,2
47.4	1,1	1,1	1,1
48.1	0,9	1,0	1,0
48.2	1,5	1,2	1,6
48.3	1,2	1,7	1,9
48.4	0,4	0,4	0,5

Continuación...

<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Crecimiento radial (cm)		
	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. solani</i>
49.2	1,2	0,9	1,8
53.3	1,0	0,6	1,6
54.3	1,1	0,6	1,6
55.1	1,2	1,0	1,1
66.2	1,4	0,6	1,1
55.3	1,4	1,9	1,4
55.5	1,5	1,7	1,3
56.1	1,1	1,2	1,6
56.2	1,2	1,9	2,0
57.1	1,3	2,0	1,4
57.2	1,3	1,1	1,2
57.3	0,9	0,8	1,2
57.6	0,8	0,9	1,3
62.2	0,6	0,7	0,1
58.3	0,8	0,7	1,9
59.2	0,9	0,7	1,5
59.3	0,8	0,8	1,4
59.4	1,9	1,1	1,6
60.1	1,2	1,0	1,5
60.3	1,1	1,9	1,6
60.4	1,3	1,6	1,7
60.5	0,9	1,7	1,7
61.1	1,5	1,6	1,5
61.2	0,7	1,8	1,3
61.3	0,8	1,3	1,8
61.5	1,1	0,6	1,2
62.1	0,2	0,4	0,6
62.4	1,1	1,0	1,5
63.1	1,6	0,8	1,6
65.2	1,0	1,6	0,9
65.4	0,8	1,3	1,1
65.5	1,0	1,3	1,2
65.6	1,5	1,4	1,1
66.4	1,1	1,0	1,2
67.4	1,0	1,1	1,3
67.5	1,3	1,7	1,5
68.6	1,4	1,8	1,5
70.1	1,7	1,4	1,3
70.3	1,5	1,2	1,4
71.1	1,4	1,1	1,5
71.2	1,1	1,0	1,4
71.3	0,5	0,9	0,3
74.1	1,0	1,3	1,4
74.2	1,5	1,4	1,6
74.4	0,3	1,5	0,5
74.5	1,4	1,4	1,5
76.1	1,3	1,3	1,8
76.3	1,7	1,7	1,8
76.5	1,8	1,7	1,6
77.2	0,7	1,4	1,5
77.3	0,8	1,3	1,2
77.5	0,6	0,5	0,8
78.2	0,6	1,5	1,4

Continuación...

<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Crecimiento radial (cm)		
	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. solani</i>
78.3	0,7	1,1	1,6
78.4	0,5	1,2	1,2
78.6	1,6	1,7	1,5
79.4	1,5	1,7	1,5
80.6	1,2	1,4	1,4
81.1	1,1	1,5	1,4
82.3	1,3	1,6	1,1
82.4	0,3	0,5	0,7
4.1	1,4	1,1	0,2
11.2	1,5	0,5	0,4
14.2	0,3	0,4	0,1
15.2	1,4	0,8	1,0
15.3	1,3	1,6	1,3
16.2	0,2	0,1	0,1
17.2	1,0	0,9	1,4
21.1	1,6	1,9	1,2
22.1	1,4	1,6	1,5
24.3	1,4	1,2	1,3
25.2	1,7	1,8	1,5
25.3	1,4	1,5	1,3
26.4	1,3	1,4	1,2
28.2	1,5	0,8	1,0
29.3	1,6	1,0	1,7
29.4	1,7	0,9	1,6
37.2	0,9	0,9	0,2
39.6	0,6	0,8	0,3
39.7	1,0	0,9	1,0
45.1	0,2	0,9	0,6
46.3	0,8	0,6	0,2
50.1	1,4	1,9	0,4
50.4	0,4	0,4	0,4
52.3	1,3	1,3	1,3
48.5	0,6	0,9	1,0
64.2	0,9	0,3	0,5
65.1	0,2	0,1	0,2
67.1	1,0	0,3	1,0
68.1	1,2	1,3	1,3
72.1	1,5	1,5	2,0
72.2	1,4	1,2	1,4
73.1	1,7	1,8	2,1
73.2	1,4	1,1	1,0
75.3	1,0	1,1	1,2
75.6	1,5	1,6	0,9
78.1	1,6	1,6	1,3
82.7	1,3	1,6	1,5
83.9	1,6	1,7	1,3
84.1	1,7	1,8	1,4
84.5	1,5	1,6	1,2
85.2	1,2	1,4	1,0
85.6	1,1	1,4	1,0
86.3	1,2	1,1	1,0
86.4	1,0	1,0	1,0

Continuación...

<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Crecimiento radial (cm)		
	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. solani</i>
86.5	0,9	1,4	1,4
86.7	1,2	1,4	1,4
87.4	1,3	1,5	1,3
89.1	1,2	1,3	1,4
90.2	1,2	1,0	0,4
91.3	1,3	1,0	0,3
92.1	1,6	1,2	0,9
92.3	1,6	1,3	1,0
94.4	1,3	1,3	1,6
96.5	1,5	1,6	1,7
9.1	1,3	0,9	1,0
11.3	1,4	1,1	1,0
15.1	1,4	1,1	1,3
18.1	1,0	1,0	1,4
20.3	1,2	1,2	1,4
22.3	1,2	1,0	1,5
26.6	1,2	0,9	1,1
27.1	1,5	1,1	1,3
28.3	1,3	1,4	1,2
28.5	1,5	1,4	1,2
29.1	0,6	0,2	0,2
30.1	0,5	0,6	1,1
34.4	1,3	1,1	1,3
34.5	1,4	1,4	1,4
42.1	1,0	1,6	1,2
44.1	0,9	0,9	1,1
46.4	1,1	1,4	0,8
50.2	1,0	1,2	0,9
50.3	1,1	1,0	0,8
51.4	1,0	1,0	1,2
52.4	1,3	1,2	1,2
53.1	1,5	1,6	1,4
53.2	1,1	1,0	1,6
54.1	1,0	1,2	1,2
54.2	0,9	1,0	1,1
56.3	1,0	1,1	1,3
67.2	1,1	0,2	0,2
67.3	1,0	0,2	0,2
80.4	0,3	0,6	0,5
82.2	1,5	0,8	0,5
84.6	1,2	0,9	1,3
93.3	1,6	0,2	0,4
6.2	1,3	1,6	1,0
80.5	1,0	1,3	1,1
7.2	1,7	1,6	1,1
10.2	1,8	1,5	1,0
76.7	1,2	1,4	1,0
3.1	1,4	1,7	1,3
31.2	1,5	1,6	1,4
76.6	1,5	1,6	1,3
43.1	1,7	1,7	1,6
43.3	1,6	1,4	1,6
49.1	0,7	1,0	0,9

Continuación...

<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Crecimiento radial (cm)		
	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. solani</i>
58.1	1,8	1,2	1,6
75.2	1,0	1,3	1,0
80.8	1,0	1,1	1,6
7.5	1,5	1,6	1,6
35.1	1,5	1,8	1,6
78.5	1,4	1,3	0,7
81.3	1,5	1,2	0,5
68.6	1,4	1,8	1,6
88.2	1,0	2,3	1,6
72.4	1,6	1,1	1,4
80.1	1,7	1,4	1,7
80.2	1,0	1,1	0,7
80.7	1,2	1,3	0,6
81.2	1,3	1,2	1,6
82.1	1,5	0,6	1,5
82.5	1,1	1,3	0,8
83.3	0,3	1,0	0,7
83.4	0,9	0,1	0,7
84.2	1,5	1,6	1,5
84.3	1,4	1,5	1,4
84.4	1,5	1,7	1,2
85.8	1,6	1,7	1,4
87.3	1,5	1,6	1,3
91.1	1,6	1,9	1,5
91.4	1,6	2,0	1,5
92.2	1,7	1,9	1,7
93.2	1,7	2,0	2,0
94.1	1,3	1,6	1,5
95.1	1,3	1,7	1,3
60.2	1,2	1,7	1,1
96.2	1,2	1,3	1,1
23.2	0,9	0,8	1,0
58.4	1,3	1,2	1,5
6.1	1,5	1,5	1,6
93.7	1,4	1,6	1,6
11.1	1,0	1,1	1,1
70.2	1,1	1,3	1,0
83.7	1,0	1,2	1,5
90.3	1,0	1,2	1,5
8.2	1,3	1,4	1,2
15.4	1,0	1,2	1,0
30.2	1,2	1,4	1,5
36.3	1,2	1,4	1,3
39.2	1,6	1,6	1,4
43.2	1,2	1,7	1,3
57.4	1,8	1,9	2,0
75.5	1,3	1,5	1,4
26.1	0,9	1,0	1,0
59.1	1,2	1,5	1,0
79.1	1,3	1,6	1,2
79.2	1,4	1,5	1,3
94.2	1,7	1,1	1,4

Continuación...

<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Crecimiento radial (cm)		
	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. solani</i>
94.3	1,8	0,9	1,4
6.3	1,1	1,2	1,5
35.3	1,2	1,2	1,4
44.2	1,7	1,3	1,4
49.4	1,1	1,2	1,2
41.1	1,4	1,2	1,5
61.4	1,2	1,1	1,4
12.2	1,0	1,7	1,5
26.2	1,3	1,0	1,5
39.1	1,3	1,4	1,4
63.3	1,9	1,6	1,6
12.1	1,6	1,7	1,6
68.4	1,4	1,2	1,5
68.3	1,5	1,0	1,6
79.3	1,1	1,2	1,4
96.1	1,4	1,2	1,4
85.3	1,6	1,3	2,2
94.4	1,2	1,3	2,0

ANEXO 8

Crecimiento radial (cm) de *Fusarium* spp. por efecto de *Bacillus* spp. durante 5 días

<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Crecimiento radial (cm)		
	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. solani</i>
Testigo	3,0	3,0	2,5
1.1	1,6	2,1	2,3
1.2	1,6	2,4	2,0
2.1	2,5	2,6	1,7
2.2	2,7	2,5	1,7
3.2	2,4	2,6	2,1
4.2	2,5	2,7	2,0
4.4	2,6	2,5	2,0
5.1	2,5	2,4	1,9
7.1	2,8	2,0	1,9
7.3	2,4	2,0	2,0
8.1	2,4	2,1	2,1
8.3	2,1	2,4	2,3
9.2	2,4	2,1	2,0
10.1	2,0	2,0	2,0
13.1	2,2	2,1	1,9
16.1	2,0	2,4	2,1
16.4	3,1	2,2	1,8
17.4	2,5	2,4	1,9
21.2	2,1	2,3	1,8
24.1	2,1	2,3	1,8
24.2	1,5	2,3	1,9
25.6	1,0	2,7	2,0
28.4	1,9	1,9	1,7
29.2	1,9	1,9	1,8
30.3	1,8	2,4	1,6
31.1	1,8	2,4	1,7
32.1	1,9	1,8	1,9
32.2	2,0	1,9	1,7
32.3	1,4	2,0	1,9
34.1	1,5	1,9	2,0
37.1	0,5	2,0	1,8
37.3	1,9	2,1	1,8
38.1	1,4	2,3	1,8
38.2	1,7	1,9	1,8
39.4	1,7	2,0	2,0
40.1	1,9	2,0	2,0
41.3	0,5	1,2	0,5
42.2	1,0	0,9	1,9
45.3	1,7	1,6	1,9
45.5	1,8	2,0	1,8
45.6	1,9	1,8	2,0
46.1	2,0	0,4	0,7
47.1	1,7	2,1	2,1
47.2	2,1	2,0	2,0
47.4	1,9	2,0	2,1
48.1	1,8	2,2	2,2
48.2	2,6	1,8	2,5
48.3	2,1	1,1	2,6
48.4	0,4	0,7	1,0

Continuación...

<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Crecimiento radial (cm)		
	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. solani</i>
49.2	1,2	1,6	2,6
53.3	2,1	1,2	1,9
54.3	2,0	0,8	1,6
55.1	2,6	1,5	1,9
66.2	2,5	1,2	1,8
55.3	2,1	2,1	2,5
55.5	2,4	2,1	2,0
56.1	2,0	1,8	2,9
56.2	1,9	2,0	2,8
57.1	1,3	2,0	2,5
57.2	1,2	1,5	2,3
57.3	1,9	1,2	1,9
57.6	2,4	1,4	1,9
62.2	0,9	0,9	1,0
58.3	1,4	1,1	2,8
59.2	1,1	1,5	2,6
59.3	1,4	1,5	2,3
59.4	2,8	1,5	2,5
60.1	1,9	1,3	2,3
60.3	1,7	1,9	2,4
60.4	1,8	2,0	2,4
60.5	1,3	1,9	2,5
61.1	1,5	2,0	2,4
61.2	1,3	1,9	2,2
61.3	1,5	2,2	2,8
61.5	1,9	1,3	1,8
62.1	0,4	0,5	0,6
62.4	1,9	2,1	2,5
63.1	1,9	2,1	2,7
65.2	1,7	2,5	2,8
65.4	1,9	2,7	2,7
65.5	2,0	2,1	1,8
65.6	2,1	2,2	2,0
66.4	2,5	1,9	3,6
67.4	2,0	2,0	1,3
67.5	1,8	2,3	2,4
68.6	1,9	2,3	2,2
70.1	2,4	1,9	2,3
70.3	2,2	2,0	2,3
71.1	2,3	2,1	2,4
71.2	2,4	2,2	2,6
71.3	1,2	1,3	0,5
74.1	1,8	1,9	2,4
74.2	2,2	2,3	1,9
74.4	0,4	2,0	0,7
74.5	2,5	1,9	2,8
76.1	2,4	1,9	2,9
76.3	2,0	2,3	2,4
76.5	2,2	2,1	2,1
77.2	1,2	2,0	2,2
77.3	1,8	1,7	1,6
77.5	1,0	0,8	0,9

Continuación...

<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Crecimiento radial (cm)		
	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. solani</i>
78.2	2,7	2,0	2,0
78.3	1,7	1,7	2,8
78.4	1,0	1,8	1,8
78.6	2,2	2,1	2,1
79.4	2,0	2,2	2,1
80.6	2,3	2,4	2,7
81.1	2,4	2,3	2,7
82.3	2,3	2,3	0,8
82.4	0,5	1,0	0,8
4.1	2,0	1,8	0,5
11.2	2,1	0,8	0,6
14.2	0,6	0,9	0,2
15.2	1,7	1,3	2,0
15.3	2,3	2,4	2,0
16.2	0,3	0,5	0,2
17.2	1,4	2,5	2,3
21.1	2,2	2,1	2,1
22.1	2,1	2,2	2,3
24.3	2,3	1,3	2,0
25.2	2,1	2,5	2,1
25.3	2,3	1,9	2,7
26.4	2,2	2,0	2,0
28.2	2,1	0,7	1,9
29.3	2,5	1,6	2,9
29.4	2,8	1,3	2,9
37.2	1,0	1,0	0,3
39.6	0,6	1,0	0,3
39.7	1,4	1,5	2,4
45.1	0,4	2,0	2,5
46.3	1,1	0,8	2,6
50.1	1,9	2,6	2,4
50.4	0,6	0,9	2,0
52.3	2,6	2,2	2,6
48.5	0,9	2,3	2,7
64.2	0,9	0,4	0,7
65.1	0,5	0,2	1,3
67.1	2,0	0,7	2,1
68.1	1,7	1,8	2,7
72.1	2,4	2,4	2,3
72.2	2,2	2,0	2,0
73.1	2,4	2,4	2,2
73.2	2,1	1,6	2,3
75.3	2,0	1,6	2,7
75.6	2,1	2,1	1,7
78.1	2,3	2,3	2,2
82.7	2,4	2,4	2,5
83.9	2,5	2,1	2,8
84.1	2,3	2,2	2,6
84.5	2,2	2,0	2,5
85.2	1,7	2,4	2,0
85.6	1,7	1,8	2,0
86.3	1,9	2,2	2,0
86.4	2,0	1,9	2,0

Continuación...

<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Crecimiento radial (cm)		
	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. solani</i>
86.5	1,2	2,0	2,5
86.7	2,1	2,0	2,6
87.4	2,3	2,3	2,6
89.1	1,7	1,7	2,4
90.2	2,2	1,7	0,8
91.3	2,0	1,9	0,7
92.1	2,0	2,0	1,9
92.3	2,6	2,5	2,0
94.4	2,2	2,5	2,7
96.5	2,0	2,0	2,5
9.1	2,3	1,9	1,8
11.3	2,3	2,0	1,9
15.1	2,0	1,8	2,6
18.1	2,0	2,0	2,4
20.3	2,0	1,8	2,0
22.3	2,0	1,5	2,0
26.6	2,1	1,7	1,9
27.1	2,1	1,7	2,0
28.3	2,1	1,9	1,7
28.5	2,0	1,8	2,1
29.1	0,8	0,3	0,5
30.1	0,9	0,7	0,3
34.4	2,1	1,5	2,0
34.5	2,7	2,4	2,4
42.1	1,8	2,1	2,1
44.1	1,3	0,9	1,5
46.4	1,9	2,0	0,9
50.2	2,2	2,0	1,3
50.3	1,9	2,2	1,5
51.4	1,2	1,7	1,5
52.4	1,8	1,8	2,0
53.1	2,1	2,2	2,3
53.2	1,8	1,9	2,3
54.1	1,2	1,7	2,0
54.2	2,1	1,8	1,8
56.3	1,4	1,9	2,2
67.2	1,3	0,3	0,4
67.3	1,6	0,4	0,4
80.4	0,6	0,6	0,7
82.2	1,9	1,0	0,8
84.6	1,9	2,0	2,2
93.3	1,8	0,6	0,5
6.2	2,1	2,3	2,0
80.5	2,2	2,1	2,1
7.2	2,7	2,0	2,4
10.2	2,4	2,2	2,4
76.7	2,5	2,0	2,0
3.1	2,6	2,1	2,6
31.2	2,7	2,0	2,3
76.6	2,5	2,4	2,5
43.1	2,2	2,4	2,7
43.3	2,2	1,9	2,6
49.1	0,9	2,0	2,6

Continuación...

<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Crecimiento radial (cm)		
	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. solani</i>
58.1	2,8	2,1	2,6
75.2	2,0	2,0	1,3
80.8	2,0	2,3	2,5
7.5	2,3	2,4	2,2
35.1	2,0	2,2	2,3
78.5	2,1	1,6	1,8
81.3	1,6	1,4	0,9
68.6	2,8	2,8	2,7
88.2	2,7	2,8	2,6
72.4	2,9	1,0	2,0
80.1	2,6	2,3	2,5
80.2	2,8	1,7	1,0
80.7	2,8	2,1	1,0
81.2	2,2	2,6	2,3
82.1	2,2	1,5	2,2
82.5	1,6	1,7	1,6
83.3	0,6	0,9	1,0
83.4	1,1	0,6	0,9
84.2	2,1	2,3	2,5
84.3	2,7	2,5	2,6
84.4	2,8	2,1	2,5
85.8	2,6	2,0	2,2
87.3	2,5	2,0	2,0
91.1	2,1	2,4	2,3
91.4	2,5	2,8	2,6
92.2	2,7	2,6	2,6
93.2	2,7	3,3	3,4
94.1	2,1	2,5	2,1
95.1	1,8	2,3	2,0
60.2	2,4	2,7	2,2
96.2	2,4	2,3	2,3
23.2	1,7	1,2	2,4
58.4	2,1	1,9	2,5
6.1	2,1	2,0	2,0
93.7	2,5	2,6	3,0
11.1	1,4	1,2	2,4
70.2	1,7	1,9	2,5
83.7	1,6	2,0	2,3
90.3	1,5	2,0	2,0
8.2	2,3	2,4	2,5
15.4	2,0	2,2	1,8
30.2	2,2	2,3	2,5
36.3	1,5	1,7	1,5
39.2	1,9	1,8	2,0
43.2	1,5	1,9	1,5
57.4	2,5	2,4	2,5
75.5	2,0	2,0	1,6
26.1	2,1	1,6	1,9
59.1	2,0	2,0	1,7
79.1	2,0	2,1	1,9
79.2	2,1	2,2	1,9
94.2	2,7	1,5	2,5

Continuación...

<i>Bacillus</i> spp. código UNPPRG	Crecimiento radial (cm)		
	<i>F.oxysporum</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. solani</i>
94.3	2,7	1,7	2,9
6.3	1,1	1,7	1,6
35.3	1,7	1,7	1,5
44.2	2,5	2,1	1,6
49.4	1,8	1,6	1,2
41.1	2,2	1,9	2,4
61.4	1,3	1,7	2,0
12.2	2,3	2,6	2,6
26.2	2,5	2,2	2,2
39.1	1,7	1,7	1,9
63.3	2,6	2,2	2,1
12.1	2,0	2,3	2,6
68.4	2,3	1,8	2,5
68.3	2,3	2,0	2,6
79.3	1,5	1,5	1,9
96.1	2,2	1,7	2,4
85.3	2,6	2,5	3,5
94.4	2,5	2,4	3,2

ANEXO 9

Crecimiento radial (cm) de *Fusarium* spp. por efecto de *Bacillus* spp. durante 7 días

<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Crecimiento radial (cm)		
	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. solani</i>
Testigo	4,0	3,9	3,6
1.1	2,1	4,2	2,8
1.2	1,8	3,5	2,5
2.1	3,7	3,3	2,9
2.2	3,6	3,3	3,0
3.2	3,6	4,0	3,0
4.2	3,7	3,5	3,0
4.4	3,4	4,3	3,0
5.1	3,8	3,2	3,1
7.1	3,6	3,5	3,1
7.3	4,0	3,5	3,0
8.1	3,0	2,8	3,1
8.3	2,1	3,5	2,9
9.2	3,4	3,5	2,9
10.1	3,4	3,0	2,9
13.1	2,4	2,8	2,8
16.1	2,2	3,2	2,7
16.4	3,9	3,8	2,6
17.4	4,5	3,7	2,7
21.2	3,2	3,5	2,2
24.1	3,1	2,5	2,6
24.2	2,0	2,8	2,3
25.6	2,9	3,7	2,7
28.4	2,5	2,5	2,7
29.2	2,5	3,1	3,0
30.3	2,5	4,1	2,9
31.1	2,5	3,8	2,9
32.1	3,6	3,3	3,0
32.2	3,4	3,5	3,1
32.3	2,7	1,9	3,0
34.1	2,5	2,3	3,1
37.1	0,9	2,7	3,0
37.3	2,2	2,9	2,9
38.1	2,4	3,5	3,3
38.2	2,8	2,3	2,9
39.4	2,8	3,2	3,2
40.1	3,2	3,0	2,9
41.3	0,9	1,6	0,6
42.2	2,2	1,4	3,1
45.3	2,7	2,6	3,0
45.5	2,8	3,0	3,3
45.6	3,1	3,4	3,0
46.1	3,1	0,8	0,8
47.1	2,0	3,0	3,1
47.2	3,0	3,1	3,5
47.4	2,6	3,6	3,3
48.1	2,6	3,1	3,1
48.2	3,5	2,0	2,5
48.3	3,0	2,2	2,8
48.4	0,6	0,7	1,0

Continuación...

<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Crecimiento radial (cm)		
	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. solani</i>
49.2	1,9	2,1	2,1
53.3	3,0	4,0	1,9
54.3	3,0	2,9	1,8
55.1	3,0	2,4	2,5
66.2	3,0	1,9	2,8
55.3	3,1	3,6	1,9
55.5	3,0	2,8	1,9
56.1	3,2	2,7	3,7
56.2	2,8	2,6	3,7
57.1	2,1	2,1	2,2
57.2	2,5	1,9	3,0
57.3	2,2	2,0	2,6
57.6	2,1	2,0	2,8
62.2	1,0	1,0	1,7
58.3	2,2	1,9	3,8
59.2	2,3	1,5	2,5
59.3	2,1	1,9	3,0
59.4	3,8	2,1	3,2
60.1	3,5	2,0	3,0
60.3	2,0	2,0	3,5
60.4	2,4	2,0	3,4
60.5	2,3	2,7	2,7
61.1	2,0	2,8	3,5
61.2	1,8	3,1	2,8
61.3	2,0	3,5	3,5
61.5	2,3	2,0	2,7
62.1	0,5	0,5	0,6
62.4	2,8	2,5	3,7
63.1	3,0	2,9	4,0
65.2	2,2	3,1	3,5
65.4	2,9	4,2	3,6
65.5	3,8	3,9	3,0
65.6	3,9	3,9	3,5
66.4	3,9	3,7	4,3
67.4	3,3	3,5	1,8
67.5	2,7	2,3	3,0
68.6	2,0	2,2	2,7
70.1	2,9	2,1	2,5
70.3	3,3	2,8	3,2
71.1	3,7	3,9	2,6
71.2	3,6	3,8	2,9
71.3	1,9	1,5	0,6
74.1	2,5	3,0	3,4
74.2	3,3	3,5	2,5
74.4	0,8	2,4	0,8
74.5	2,2	2,0	3,8
76.1	3,4	4,2	3,8
76.3	2,8	2,2	2,7
76.5	2,9	2,1	3,2
77.2	1,7	2,8	3,2
77.3	2,3	2,6	2,1
77.5	1,1	0,9	1,1
78.2	3,6	2,0	2,8

Continuación...

<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Crecimiento radial (cm)		
	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. solani</i>
78.3	4,3	2,3	4,2
78.4	4,2	2,0	2,9
78.6	3,8	2,3	2,9
79.4	3,8	4,2	3,0
80.6	3,4	2,9	3,9
81.1	3,6	3,0	3,9
82.3	3,2	2,8	2,9
82.4	0,8	1,0	1,0
4.1	3,0	2,0	0,9
11.2	3,5	1,0	1,1
14.2	0,7	1,0	0,3
15.2	2,6	2,1	2,3
15.3	2,8	2,4	2,4
16.2	0,8	0,4	0,3
17.2	2,5	2,8	2,9
21.1	2,0	2,5	2,9
22.1	3,3	2,5	3,2
24.3	3,3	2,7	3,1
25.2	3,2	2,8	3,0
25.3	3,5	2,7	2,9
26.4	3,1	2,5	3,1
28.2	2,9	2,6	2,4
29.3	3,4	1,9	3,8
29.4	3,5	2,1	3,6
37.2	1,8	1,1	0,3
39.6	0,7	1,1	0,5
39.7	2,2	2,0	2,9
45.1	0,5	2,1	2,9
46.3	1,3	0,9	0,6
50.1	1,5	2,0	3,1
50.4	0,9	1,0	1,0
52.3	3,0	2,3	3,3
58.5	1,2	2,6	3,0
64.2	1,6	0,4	1,1
65.1	0,6	0,2	1,3
67.1	2,7	1,7	3,0
68.1	2,9	2,5	3,0
72.1	2,3	1,9	3,4
72.2	2,9	2,5	3,9
73.1	3,0	2,7	3,3
73.2	3,1	2,2	3,5
75.3	3,0	1,7	3,6
75.6	3,0	3,2	2,3
78.1	2,6	3,1	2,5
82.7	3,3	3,2	3,0
83.9	3,2	3,4	3,2
84.1	2,6	2,0	3,1
84.5	2,6	2,4	3,2
85.2	2,6	2,4	3,0
85.6	3,9	2,6	3,0
86.3	2,8	2,7	3,4
86.4	3,4	2,8	3,3
86.5	3,3	2,9	3,8

Continuación...

<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Crecimiento radial (cm)		
	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. solani</i>
86.7	3,4	3,0	3,5
87.4	3,6	2,3	2,9
89.1	3,0	2,3	2,9
90.2	3,2	2,4	1,0
91.3	3,5	2,0	0,9
92.1	3,5	2,6	3,7
92.3	3,5	3,1	3,6
94.4	3,4	3,4	3,9
96.5	3,3	3,0	3,6
9.1	2,9	1,9	2,6
11.3	3,2	2,0	2,8
15.1	2,8	2,0	3,5
18.1	3,0	1,2	3,5
20.3	2,9	2,3	2,7
22.3	3,0	2,0	3,0
26.6	3,3	2,2	2,7
27.1	2,9	2,0	2,8
28.3	3,3	3,0	2,5
28.5	3,0	2,9	3,0
29.1	1,0	0,3	0,5
30.1	1,0	0,7	0,9
34.4	2,6	2,3	2,8
34.5	4,0	2,7	3,4
42.1	2,6	3,1	3,1
44.1	1,4	1,1	1,3
46.4	2,1	2,3	1,0
50.2	2,9	2,0	1,3
50.3	2,7	2,8	2,1
51.4	1,8	1,7	1,6
52.4	2,7	2,1	2,4
53.1	3,0	3,0	2,3
53.2	2,9	3,1	3,2
54.1	1,5	2,4	2,9
54.2	2,5	2,5	2,8
56.3	1,6	2,0	2,6
67.2	2,0	0,5	0,6
67.3	3,6	0,6	0,7
80.4	0,9	0,8	1,0
82.2	2,4	1,0	1,0
84.6	3,2	3,0	2,9
93.3	2,3	0,6	0,7
6.2	2,8	2,0	3,3
80.5	3,0	2,9	3,4
7.2	3,7	2,6	4,1
10.2	2,4	2,3	4,0
76.7	2,9	3,0	3,0
3.1	3,2	3,4	3,5
31.2	3,7	3,8	3,9
76.6	3,8	3,5	3,4
43.1	2,4	2,4	2,7
43.3	2,1	2,1	2,2
49.1	1,1	2,7	3,0

Continuación...

<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Crecimiento radial (cm)		
	<i>F. oxysporum</i> P19(3.1) ₂	<i>F. proliferatum</i> P10(4.3)	<i>F. solani</i> P13(6.3)
58.1	2,8	2,7	3,0
75.2	3,0	2,6	2,0
80.8	3,0	2,5	3,5
7.5	3,3	1,9	3,1
35.1	3,2	2,1	3,1
78.5	3,3	1,7	2,6
81.3	2,9	1,3	1,2
68.6	3,5	2,7	2,9
88.2	3,4	2,7	2,4
72.4	3,2	2,6	2,9
80.1	3,2	2,7	3,1
80.2	3,4	2,4	1,2
80.7	3,5	2,6	1,3
81.2	3,1	4,0	4,0
82.1	3,2	1,5	3,1
82.5	2,3	2,0	2,5
83.3	1,2	1,7	1,8
83.4	1,3	1,2	1,0
84.2	2,9	2,8	3,0
84.3	3,5	3,5	3,5
84.4	2,9	2,7	3,4
85.8	3,2	2,6	4,1
87.3	3,4	3,3	4,2
91.1	3,1	4,1	3,5
91.4	3,2	4,2	4,1
92.2	4,1	4,2	3,7
93.2	4,1	4,3	4,1
94.1	3,1	4,2	4,1
95.1	2,7	2,7	3,0
60.2	3,4	3,7	3,0
96.2	3,4	3,2	3,1
23.2	2,6	2,3	3,1
58.4	2,8	2,9	3,2
6.1	2,7	1,8	2,0
93.7	4,1	4,0	4,1
11.1	4,2	4,2	2,9
70.2	2,0	2,3	3,0
83.7	2,2	2,8	3,0
90.3	1,6	2,4	2,7
8.2	3,0	3,0	3,0
15.4	3,1	2,9	2,9
30.2	3,3	3,0	3,6
36.3	2,8	1,7	2,6
39.2	4,2	2,5	2,5
43.2	4,1	4,1	2,6
57.4	4,1	4,0	4,1
75.5	4,1	1,7	1,9
26.1	2,9	2,0	3,0
59.1	1,3	3,0	2,9
79.1	3,6	3,5	3,6
79.2	3,9	2,9	3,6
94.2	4,1	2,2	4,2

Continuación...

<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Crecimiento radial (cm)		
	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. solani</i>
94.3	4,2	2,1	4,3
6.3	1,2	1,7	2,6
35.3	2,0	1,8	2,1
44.2	2,2	1,8	1,7
49.4	1,2	1,3	1,3
41.1	3,3	2,1	3,7
61.4	1,6	1,5	2,8
12.2	4,1	4,3	3,8
26.2	4,0	4,2	3,4
39.1	4,1	1,6	2,7
63.3	4,3	3,8	3,0
12.1	3,9	3,1	3,5
68.4	3,9	2,3	3,0
68.3	4,0	2,7	4,2
79.3	1,8	1,7	2,3
96.1	3,0	2,0	3,4
85.3	4,2	3,8	4,1
94.4	4,2	3,3	4,2

ANEXO 10

Tasa de crecimiento (cm día⁻¹) de *Fusarium oxysporum*, *F. proliferatum* y *F. solani* por efecto de *Bacillus* spp.

<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Tasa de crecimiento micelial		
	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. solani</i>
Testigo	0,500	0,486	0,443
1.1	0,229	0,529	0,329
1.2	0,186	0,429	0,286
2.1	0,457	0,400	0,343
2.2	0,443	0,400	0,357
3.2	0,443	0,500	0,357
4.2	0,457	0,429	0,357
4.4	0,414	0,543	0,357
5.1	0,471	0,386	0,371
7.1	0,443	0,429	0,371
7.3	0,500	0,429	0,357
8.1	0,357	0,329	0,371
8.3	0,229	0,429	0,343
9.2	0,414	0,429	0,343
10.1	0,414	0,357	0,343
13.1	0,271	0,329	0,329
16.1	0,243	0,386	0,314
16.4	0,486	0,471	0,300
17.4	0,571	0,457	0,314
21.2	0,386	0,429	0,243
24.1	0,371	0,286	0,300
24.2	0,214	0,329	0,257
25.6	0,343	0,457	0,314
28.4	0,286	0,286	0,314
29.2	0,286	0,371	0,357
30.3	0,286	0,514	0,343
31.1	0,286	0,471	0,343
32.1	0,443	0,400	0,357
32.2	0,414	0,429	0,371
32.3	0,314	0,200	0,357
34.1	0,286	0,257	0,371
37.1	0,057	0,314	0,357
37.3	0,243	0,343	0,343
38.1	0,271	0,429	0,400
38.2	0,329	0,257	0,343
39.4	0,329	0,386	0,386
40.1	0,386	0,357	0,343
41.3	0,057	0,157	0,014
42.2	0,243	0,129	0,371
45.3	0,314	0,300	0,357
45.5	0,329	0,357	0,400
45.6	0,371	0,414	0,357
46.1	0,371	0,043	0,400
47.1	0,214	0,357	0,371
47.2	0,357	0,371	0,429
47.4	0,300	0,443	0,400
48.1	0,300	0,371	0,371
48.2	0,429	0,214	0,286

Continuación...

<i>Bacillus</i> spp, código UNPRG	Tasa de crecimiento micelial		
	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. solani</i>
48.3	0,357	0,243	0,329
48.4	0,014	0,029	0,071
49.2	0,200	0,229	0,229
53.3	0,357	0,500	0,200
54.3	0,357	0,343	0,186
55.1	0,357	0,271	0,286
66.2	0,357	0,200	0,329
55.3	0,371	0,443	0,200
55.5	0,357	0,329	0,200
56.1	0,386	0,314	0,457
56.2	0,329	0,300	0,457
57.1	0,229	0,214	0,243
57.2	0,286	0,200	0,357
57.3	0,243	0,214	0,300
57.6	0,229	0,214	0,329
62.2	0,071	0,071	0,171
58.3	0,243	0,200	0,471
59.2	0,257	0,143	0,286
59.3	0,229	0,200	0,357
59.4	0,471	0,229	0,386
60.1	0,429	0,214	0,357
60.3	0,214	0,214	0,429
60.4	0,271	0,214	0,414
60.5	0,257	0,314	0,314
61.1	0,214	0,329	0,429
61.2	0,186	0,371	0,329
61.3	0,214	0,429	0,429
61.5	0,257	0,214	0,314
62.1	0,000	0,000	0,014
62.4	0,329	0,286	0,457
63.1	0,357	0,343	0,500
65.2	0,243	0,371	0,429
65.4	0,343	0,529	0,443
65.5	0,471	0,486	0,357
65.6	0,486	0,486	0,429
66.4	0,486	0,457	0,543
67.4	0,400	0,429	0,186
67.5	0,314	0,257	0,357
68.6	0,214	0,243	0,314
70.1	0,343	0,229	0,286
70.3	0,400	0,329	0,386
71.1	0,457	0,486	0,300
71.2	0,443	0,471	0,343
71.3	0,200	0,143	0,014
74.1	0,286	0,357	0,414
74.2	0,400	0,429	0,286
74.4	0,043	0,271	0,043
74.5	0,243	0,214	0,471
76.1	0,414	0,529	0,471
76.3	0,329	0,243	0,314
76.5	0,343	0,229	0,386
77.2	0,171	0,329	0,386
77.3	0,257	0,300	0,229

Continuación...

<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Tasa de crecimiento micelial		
	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. solani</i>
77.5	0,086	0,057	0,086
78.2	0,443	0,214	0,329
78.3	0,543	0,257	0,529
78.4	0,529	0,214	0,343
78.6	0,471	0,257	0,343
79.4	0,471	0,529	0,357
80.6	0,414	0,343	0,486
81.1	0,443	0,357	0,486
82.3	0,386	0,329	0,343
82.4	0,043	0,071	0,071
4.1	0,357	0,214	0,057
11.2	0,429	0,071	0,086
14.2	0,029	0,071	0,000
15.2	0,300	0,229	0,257
15.3	0,329	0,271	0,271
16.2	0,043	0,000	0,000
17.2	0,286	0,329	0,343
21.1	0,214	0,286	0,343
22.1	0,400	0,286	0,386
24.3	0,400	0,314	0,371
25.2	0,386	0,329	0,357
25.3	0,429	0,314	0,343
26.4	0,371	0,286	0,371
28.2	0,343	0,300	0,271
29.3	0,414	0,200	0,471
29.4	0,429	0,229	0,443
37.2	0,186	0,086	0,000
39.6	0,029	0,086	0,000
39.7	0,243	0,214	0,343
45.1	0,000	0,229	0,343
46.3	0,114	0,057	0,357
50.1	0,143	0,214	0,371
50.4	0,057	0,071	0,386
52.3	0,357	0,257	0,400
48.5	0,100	0,300	0,357
64.2	0,157	0,000	0,386
65.1	0,014	0,000	0,114
67.1	0,314	0,171	0,357
68.1	0,343	0,286	0,357
72.1	0,257	0,200	0,414
72.2	0,343	0,286	0,486
73.1	0,357	0,314	0,400
73.2	0,371	0,243	0,429
75.3	0,357	0,171	0,443
75.6	0,357	0,386	0,257
78.1	0,300	0,371	0,286
82.7	0,400	0,386	0,357
83.9	0,386	0,414	0,386
84.1	0,300	0,214	0,371
84.5	0,300	0,271	0,386
85.2	0,300	0,271	0,357

Continuación...

<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Tasa de crecimiento micelial		
	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. solani</i>
85.6	0,486	0,300	0,357
86.3	0,329	0,314	0,357
86.4	0,414	0,329	0,414
86.5	0,400	0,343	0,400
86.7	0,414	0,357	0,471
87.4	0,443	0,257	0,429
89.1	0,357	0,257	0,343
90.2	0,386	0,271	0,343
91.3	0,429	0,214	0,071
92.1	0,429	0,300	0,057
92.3	0,429	0,371	0,457
94.4	0,414	0,414	0,443
96.5	0,400	0,357	0,486
9.1	0,343	0,200	0,443
11.3	0,386	0,214	0,300
15.1	0,329	0,214	0,329
18.1	0,357	0,100	0,429
20.3	0,343	0,257	0,429
22.3	0,357	0,214	0,314
26.6	0,400	0,243	0,357
27.1	0,343	0,214	0,314
28.3	0,400	0,357	0,329
28.5	0,357	0,343	0,286
29.1	0,071	0,000	0,357
30.1	0,071	0,029	0,000
34.4	0,300	0,257	0,057
34.5	0,500	0,314	0,329
42.1	0,300	0,371	0,414
44.1	0,129	0,086	0,371
46.4	0,229	0,257	0,114
50.2	0,343	0,214	0,071
50.3	0,314	0,329	0,114
51.4	0,186	0,171	0,229
52.4	0,314	0,229	0,157
53.1	0,357	0,357	0,271
53.2	0,343	0,371	0,257
54.1	0,143	0,271	0,386
54.2	0,286	0,286	0,343
56.3	0,157	0,214	0,329
67.2	0,214	0,000	0,300
67.3	0,443	0,014	0,014
80.4	0,057	0,043	0,029
82.2	0,271	0,071	0,071
84.6	0,386	0,357	0,343
93.3	0,257	0,014	0,029
6.2	0,329	0,214	0,400
80.5	0,357	0,343	0,414
7.2	0,457	0,300	0,514
10.2	0,271	0,257	0,500
76.7	0,343	0,357	0,357
3.1	0,386	0,414	0,429
31.2	0,457	0,471	0,486

Continuación...

<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Tasa de crecimiento micelial		
	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. solani</i>
76.6	0,471	0,429	0,414
43.1	0,271	0,271	0,314
43.3	0,229	0,229	0,243
49.1	0,086	0,314	0,357
58.1	0,329	0,314	0,357
75.2	0,357	0,300	0,214
80.8	0,357	0,286	0,429
7.5	0,400	0,200	0,371
35.1	0,386	0,229	0,371
78.5	0,400	0,171	0,300
81.3	0,343	0,114	0,100
68.6	0,429	0,314	0,343
88.2	0,414	0,314	0,271
72.4	0,386	0,300	0,343
80.1	0,386	0,314	0,371
80.2	0,414	0,271	0,100
80.7	0,429	0,300	0,114
81.2	0,371	0,500	0,500
82.1	0,386	0,143	0,371
82.5	0,257	0,214	0,286
83.3	0,100	0,171	0,186
83.4	0,114	0,100	0,071
84.2	0,343	0,329	0,357
84.3	0,429	0,429	0,429
84.4	0,343	0,314	0,414
85.8	0,386	0,300	0,514
87.3	0,414	0,400	0,529
91.1	0,371	0,514	0,429
91.4	0,386	0,529	0,514
92.2	0,514	0,529	0,457
93.2	0,514	0,543	0,514
94.1	0,371	0,529	0,514
95.1	0,314	0,314	0,357
60.2	0,414	0,457	0,357
96.2	0,414	0,386	0,371
23.2	0,300	0,257	0,371
58.4	0,329	0,343	0,386
6.1	0,314	0,186	0,214
93.7	0,514	0,500	0,514
11.1	0,529	0,529	0,343
70.2	0,214	0,257	0,357
83.7	0,243	0,329	0,357
90.3	0,157	0,271	0,314
8.2	0,357	0,357	0,357
15.4	0,371	0,343	0,343
30.2	0,400	0,357	0,443
36.3	0,329	0,171	0,300
39.2	0,529	0,286	0,286
43.2	0,514	0,514	0,300
57.4	0,514	0,500	0,514
75.5	0,514	0,171	0,200
26.1	0,343	0,214	0,357

Continuación...

<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Tasa de crecimiento micelial		
	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. solani</i>
59.1	0,114	0,357	0,343
79.1	0,443	0,429	0,443
79.2	0,486	0,343	0,443
94.2	0,514	0,243	0,529
94.3	0,529	0,229	0,543
6.3	0,100	0,171	0,300
35.3	0,214	0,186	0,229
44.2	0,243	0,186	0,171
49.4	0,100	0,114	0,114
41.1	0,400	0,229	0,457
61.4	0,157	0,143	0,329
12.2	0,514	0,543	0,471
26.2	0,500	0,529	0,414
39.1	0,514	0,157	0,314
63.3	0,543	0,471	0,357
12.1	0,486	0,371	0,429
68.4	0,486	0,257	0,357
68.3	0,500	0,314	0,529
79.3	0,186	0,171	0,257
96.1	0,357	0,214	0,414
85.3	0,529	0,471	0,514
94.4	0,529	0,400	0,529