Universidad Autónoma de Sinaloa

Colegio en Ciencias Agropecuarias

Facultad de Agricultura del Valle del Fuerte

Maestría en Ciencias Agropecuarias

TESIS:

"Cepas de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. con efecto antagonista y promoción de crecimiento en Arándano (*Vaccinium corymbosum* L.)"

Que para obtener el grado de Maestro en Ciencias Agropecuarias

PRESENTA:

Edgar Valenzuela Cuadras

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Blanca Elvira López Valenzuela

CO-DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Quintín Armando Ayala Armenta

Juan José Ríos, Ahome, Sinaloa, México; a junio de 2024.

Universidad Autónoma de Sinaloa

Dirección General de Bibliotecas

Repositorio Institucional Buelna

Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International

Dirección General de Bibliotecas
Ciudad Universitaria
Av. de las Américas y Blvd. Universitarios
C.P. 80010 Culiacán Sin. Méx.
Tel (667) 713 78 32 y (667) 712 50 57
dgbuas@uas.edu.mx

DEDICATORIA

A MIS PADRES

Quiero dedicar está tesis a mis padres Fernando Alberto Valenzuela Escoboza y Gladys Cuadras Espinoza por siempre brindarme el apoyo para poder cumplir con todos mis objetivos personales y académicos. Por siempre confiar en mí y poder apoyarme siempre ante cualquier adversidad.

A MI HERMANA

Gracias hermana Gladys Rubí Valenzuela Cuadras por siempre apoyarme y acompañarme, sabes que siempre contarás conmigo para cualquier cosa que necesites estes donde estes.

AGRADECIMIENTOS

A MI UNIVERSIDAD

Agradecer a mi alma mater Universidad Autónoma de Sinaloa por abrirme las puertas y brindarme la oportunidad de poder prepararme académicamente y poder avanzar en mi carrera profesional.

A MI DIRECTORA DE TESIS

Le agradezco a mi directora de tesis Dra. Blanca Elvira López Valenzuela por su dedicación, paciencia y sobre todo su asesoría y guía para la realización de este Proyecto. Sin sus palabras y correcciones que me hacía no podría llegar a esta etapa tan anhelada. Gracias por sus consejos, los llevare conmigo siempre en la memoria, para mi futuro personal y profesional.

A MIS ASESORES

Agradecer a mis asesores Dr. Quintín Armando Ayala Armenta, Dr. Fernando Alberto Valenzuela Escoboza, Dra. Alma Armenta Medina y Dr. Oliver Gabriel Leal Ayala por estar siempre presente en toda etapa y apoyarme con sus consejos y palabras las cuales fueron de suma importancia.

A MIS PROFESORES

Agradecido estoy con ellos por haberme formado como estudiante y guiado para poder seguir mis metas dentro del aula y poder formarme académicamente

A MIS COMPAÑEROS

A lo largo de mis estudios me acompañaron en momentos importantes, gracias por las horas compartidas y trabajos realizados.

A MIS AMIGAS

Gracias América Jazmín Cota Álvarez por todo tu apoyo, asesoría y respaldo durante mi estancia académica para realizar el proceso de análisis molecular, así mismo agradezco enormemente a Iris Alejandrina González Molotla por apoyarme en la etapa final y poder guiarme en la etapa de gabinete.

CONTENIDO

DEDICATORIA…… i
AGRADECIMIENTOS…… ii
CONTENIDO…….. iii
ÍNDICE DE FIGURAS vi
RESUMEN viii
ABSTRACT xi
I. INTRODUCCIÓN 1
II. REVISIÓN DE LITERATURA..... 3
2.1 El Cultivo de Arándano (*Vaccinium corymbosum* L.)..... 3
2.1.1 Origen y domesticación. 3
2.2 Importancia del cultivo de arándano. 4
2.2.1 Mundial. 4
2.2.2 Nacional. 5
2.2.3 Sinaloa. 5
2.3 Clasificación Taxonómica. 6
2.4 Características Botánicas. 6
2.5 Morfología de la planta. 7
2.6 Manejo Agronómico del Cultivo. 7
2.6.1 Recomendaciones para elegir una Variedad de Arándano. 8
2.6.2 Clima en el que se desarrolla el Cultivo de Arándano. 8
2.6.3 Suelo y Sustrato. 9
2.6.4 Establecimiento del Cultivo. 9
2.6.5 Fertirriego. 10
2.7 Fitopatógenos que atacan el Cultivo de Arándano. 12
2.8 Plagas. 12
2.9 Poda. 13
2.9.1 Poda de formación. 13
2.9.2 Poda de producción..... 13
2.9.3 Poda de renovación..... 13
2.10 Bioestimulación del Cultivo. 14
2.10.1 Biológicos utilizados en el cultivo de arándano..... 15
2.10.1.1 *Trichoderma* spp. 15
2.10.1.1.1 Importancia de este hongo benéfico..... 15

2.10.1.1.2 Clasificación taxonómica. 16
2.10.1.1.3 Morfología. 16
2.10.1.1.4 *Trichoderma* comercial PHC-T22. 17
2.10.1.2 *Bacillus* spp. 17
2.10.1.2.1 *Bacillus* comercial FUNGIFREE-AB 18
2.11 Malezas. 18
2.12 Identificación morfológica y molecular de microorganismos. 18
III. HIPÓTESIS 19
IV. OBJETIVOS 20
4.1 Objetivo General. 20
4.2 Objetivos Específicos. 20
V. MATERIALES Y MÉTODOS 21
5.1 Muestreo y aislamiento de fitopatógenos. 21
5.2 Origen, aislamiento e identificación de los aislados de *Trichoderma* y *Bacillus*. 21
5.3 Identificación morfológica de los aislados. 22
5.4 Experimento a nivel *in vitro* para la selección de cepas de *Trichoderma* spp. nativas de Sinaloa y nativas de Oaxaca con potencial antagónico contra fitopatógenos aislados de arándano. 23
5.5 Experimento a nivel *in vitro* para la selección de cepas de *Bacillus* spp. nativas de Sinaloa y nativas de Oaxaca con potencial inhibitorio contra fitopatógenos aislados de arándano. 24
5.6 Análisis estadístico de resultados *in vitro*. 24
5.7 Identificación molecular de cepas seleccionadas. 24
5.7.1 Extracción de ADN. 25
5.7.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). 25
5.7.3 Electroforesis. 26
5.7.4 Purificación de productos de PCR. 26
5.7.5 Secuenciación. 27
5.7.6 Análisis filogenético. 28
5.8 Experimento en campo sobre evaluación de aislados de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. como promotores de crecimiento en el cultivo de arándano. 28
5.8.1 Preparación de inóculos con *Bacillus* spp. 28
5.8.2 Preparación de inóculo con *Trichoderma* spp. 29
5.8.3 Recolección de esporas. 29
5.8.4 Conteo de esporas. 29

5.9 Establecimiento del experimento en campo (Campo 4 y El Carrizo). 30
5.9.1 Ubicación y localización de la zona de estudio. 30
5.9.1.1 Lote experimental 1: Campo 4 “La Franca”. 30
5.9.1.2 Lote experimental 2: Campo “Grupo Sanfinsa”. 31
5.9.2 Manejo del cultivo. 31
5.9.3 Inoculación en campo. 31
5.10 Tratamientos y Diseño experimental. 32
5.11 Variables medidas. 32
5.11.1 Altura de planta. 32
5.11.2 Diámetro de tallo. 32
5.11.3 Número de ramificaciones. 32
5.11.4 Número de flores. 33
5.11.5 Producción (peso total de frutos). 33
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 34
6.1 Identificación morfológica de los aislados fitopatógenos y benéficos. 34
6.2 Selección *in vitro* de las mejores cepas de *Trichoderma* spp. nativas con potencial antagónico contra fitopatógenos aislados en arándano. 34
6.3 Selección *in vitro* de las mejores cepas de *Bacillus* spp. nativas con potencial de inhibición contra fitopatógenos aislados en arándano. 35
6.4 Identificación molecular. 36
6.4.1 Electroforesis. 36
6.4.2 Análisis filogenético. 37
6.5 Experimento en campo sobre evaluación de aislados de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. como promotores de crecimiento en el cultivo de arándano. 38
6.5.1 Altura de planta. 38
6.5.2 Diámetro de tallo. 39
6.5.3 Número de ramificaciones. 40
6.5.4 Número de flores. 41
6.5.5 Peso total de frutos. 42
VII. CONCLUSIONES 44
VIII. LITERATURA CITADA 46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Distribución geográfica de la superficie de Arándano establecida en México. Se reporta el número de hectáreas sembradas por estado. Datos obtenidos de FOSAT (2022). ……..	4
2	Esquema ilustrativo del proceso de caracterización molecular. …….	27
3	Ubicación del Campo “La Franca” en el Fuerte, Sinaloa. Correspondiente al Experimento de evaluación 1 (Google maps, 2024). ……...	30
4	Ubicación del Campo “Grupo Safinsa” en el Carrizo, Sinaloa. Correspondiente al Experimento de evaluación 2 (Google maps, 2024). ……	31
5	Gel de electroforesis de agarosa al 0.8% con amplificación de muestras de *Trichoderma* sp. para ITS 650 pb. (carril 2 y 3) y *Bacillus* sp. para 16S 750 pb (carril 1)……	37
6	Árbol filogenético del método UPGMA de las secuencias representativas del gen de los aislados fúngicos TJ3 y TJ7 para los aislados fúngicos del género *Trichoderma* y una cepa de referencia *Cladosporium cladaosporioides*……..……...	38
7	Árbol filogenético del método UPGMA de las secuencias representativas de la bacteria B17 para los asociados bacteriológicos del género *Bacillus* y una cepa de referencia *Neobacillus drentensis*, utilizando el modelo GTR+G+I por tener el mayor parámetro entre todos los modelos compatibles con un 99%, con un total de 1000 réplicas. …….…….	38
8	Resultado del parámetro Altura de planta medido en los 10 tratamientos establecidos en campo. ……	39
9	Resultado del parámetro Diámetro de tallo medido en los 10 tratamientos establecidos en campo. ….....	40
10	Resultado del parámetro Número de ramificaciones medido en los 10 tratamientos establecidos en campo. ……	41

11 Resultado del parámetro Número de flores medido en los 10 tratamientos establecidos en campo. …… 42

12 Resultado del parámetro Peso total de frutos medido en los 10 tratamientos establecidos en campo. ……. 43

RESUMEN

En este trabajo se realizó el aislamiento de hongos y bacterias del género *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. así como hongos fitopatógenos que causan enfermedades en el cultivo de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.). Todos los aislados obtenidos fueron identificados mediante claves morfológicas. Los fitopatógenos se confrontaron *in vitro* con la técnica de cultivo dual en dos ensayos, el primero donde se confrontaron cinco cepas de *Trichoderma* spp. nativas del norte de Sinaloa y nueve aislados provenientes del estado de Oaxaca, con el objetivo de evaluar su capacidad antagónica según el Porcentaje de Inhibición de Crecimiento Micelial (PICM) y la escala reportada por Bell et al. (1982). En el segundo ensayo se confrontaron 10 cepas de *Bacillus* spp. nativas de Sinaloa y 12 nativas de Oaxaca, para evaluar la capacidad antagónica mediante el halo de inhibición mostrado ante los fitopatógenos. La identificación morfológica a nivel género de los tres fitopatógenos aislados confirmaron la identidad de *Pestalotia* sp., *Alternaria* sp. y *Cladosporium* sp., de igual manera en los hongos benéficos se confirmó la identidad del género *Trichoderma* spp. y los aislados bacterianos obtenidos se identificaron con el género *Bacillus* spp. En el ensayo con *Trichoderma* spp. nativas del norte de Sinaloa, el mayor valor de PICM contra en *Pestalotia* sp. el valor más alto lo obtuvieron las cepas TJ3 (85.3 %) y TB (83.5 %); sin diferencia significativa entre ellas, pero si con el resto de cepas evaluadas ($p \geq 0.05$); en *Alternaria* spp. los valores por cepa obtenidos de mayor a menor correspondieron a: TJ3 (90.1%), TF (89.7%), TJ7 (88.4%), TB (88.3%) y TM (87.9%), sin diferencias significativas entre sí ($p \geq 0.05$); y en *Cladosporium* sp. el valor más alto lo obtuvieron las cepas TJ7 (77.5%) y TF (76.8%), sin diferencia entre sí, pero presentando diferencia significativa con el resto de las cepas ($p \geq 0.05$). En los resultados del PICM del segundo ensayo de *Trichoderma* spp. nativas del estado de Oaxaca contra los fitopatógenos: contra *Pestalotia* sp. el mayor valor lo obtuvieron TA (79.2%) y TE (78.5%) sin diferencia significativa entre ellas, pero si con el resto de tratamientos ($p \geq 0.05$), contra *Alternaria* sp. lo obtuvo TK (82.4%) y TA (78.3%) sin diferencia significativa entre ellas, pero si entre las demás cepas ($p \geq 0.05$) y contra *Cladosporium* sp. el mayor PICM lo obtuvo TK (83.7%), seguido de TJ y TL con valores de 81.4% y 80.2% respectivamente, sin diferencias significativas entre ellas pero si con el resto de los tratamientos analizados ($p \geq 0.05$).

Todas las cepas nativas de Sinaloa y nativas de Oaxaca evaluadas mostraron Clases entre 1 y 2 de capacidad antagónica contra los fitopatógenos (valores 1.0 a 2.5), según la escala de Bell et al. (1982). Los resultados demuestran que estas cepas de *Trichoderma* spp. tienen potencial para ser evaluadas como producto biotecnológico en invernadero o campo contra fitopatógenos que atacan al cultivo de arándano azúl (*Vaccinium corymbosum* L.).

En las pruebas *in vitro* para selección de cepas de *Bacillus* spp. por su mayor capacidad inhibitoria en confrontación contra fitopatógenos aislados del cultivo de arándano, se obtuvieron los siguientes resultados: En el ensayo 1: aislados nativos de Sinaloa, en inhibición contra *Pestalotia* sp. el mayor valor lo obtuvo B21 (2.42 cm), en la confrontación contra *Alternaria* sp. el valor más alto de inhibición lo mostró el aislado B17 (2.45 cm) y en la prueba contra *Cladosporium* sp. la mayor capacidad antagónica la presentó la cepa B14 con un valor de inhibición de 2.37 cm ($p \geq 0.05$), presentandose diferencias significativas en las evaluaciones contra los tres fitopatógenos. En el ensayo 2: aislados nativos de Oaxaca, en inhibición contra *Pestalotia* sp. el aislado B03 y contra *Alternaria* sp., el aislado B02, obtuvieron los mayores valores (2.04 cm y 1.97 cm) respectivamente, ($p \geq 0.05$), y contra el *Cladosporium* sp. el mayor valor lo obtuvo B05 (1.86 cm) presentando diferencias significativas con el resto de aislados ($p \geq 0.05$). Por lo resultados anteriormente descritos, con la intención de probar el efecto de biocontrol y promoción de crecimiento en campo, se seleccionaron los aislados B17 (*Bacillus* sp.) y B21 (*Bacillus subtilis*) por mostrar la mayor capacidad antagónica y con ellos se efectuaron las inoculaciones en el cultivo de arándano. Por lo tanto, con intención se probar el efecto de control biológico y promoción de crecimiento en el experimento de campo, se seleccionaron los aislados B03 (*Bacillus* sp.) y B02 (*Bacillus* sp.) que mostraron mayor efecto antagónico y con ellos se efectuaron las inoculaciones en el cultivo de arándano (Lote 1 y Lote 2).

Respecto a los resultados obtenidos en campo, sobre las inoculaciones en plantas de arándano para evaluar el efecto promotor de crecimiento de las cepas seleccionadas *in vitro*, se descibe lo siguiente: En los experimentos realizados, se observaron tendencias favorables en varios parámetros agronómicos al utilizar cepas nativas de

Bacillus y *Trichoderma* en comparación con cepas comerciales. Aunque no se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en la altura de planta, diámetro del tallo, número de ramificaciones, número de flores y producción de frutos, los tratamientos con las cepas nativas mostraron consistentemente mejores resultados. En particular, las cepas nativas de *Bacillus* (B17 de Sinaloa y B03 de Oaxaca) y *Trichoderma* (TF de Sinaloa) demostraron tener un mayor impacto positivo en la producción de frutos y otros parámetros evaluados. Estos resultados sugieren que, a pesar de la variación individual entre plantas y la alta desviación estándar, las cepas nativas de *Bacillus* y *Trichoderma* podrían ser más efectivas que las cepas comerciales en mejorar ciertos parámetros del crecimiento y productividad de las plantas. Por lo tanto, su uso podría considerarse una estrategia viable para optimizar el rendimiento agrícola en las regiones estudiadas. Como perspectiva futura, será necesario realizar estudios con poblaciones más grandes para confirmar estas tendencias y establecer conclusiones más robustas sobre la efectividad de estas cepas nativas en diferentes contextos agrícolas.

Palabras clave: microorganismos benéficos, antagonismo, reguladores de crecimiento, Berries.

ABSTRACT

In this work, the isolation of fungi and bacteria of the genus *Trichoderma* spp. and *Bacillus* spp. as well as phytopathogenic fungi that cause diseases in blueberry crops (*Vaccinium corymbosum* L.). All isolates obtained were identified using morphological keys. The phytopathogens were confronted in vitro with the dual culture technique in two trials, the first where five strains of *Trichoderma* spp. native to northern Sinaloa were confronted and nine isolates from the state of Oaxaca, with the objective of evaluating their antagonistic capacity according to the Percent Inhibition of Mycelial Growth (PICM) and the scale reported by Bell et al. (1982). In the second test, 10 strains of *Bacillus* spp. natives of Sinaloa and 12 natives of Oaxaca were compared, to evaluate the antagonistic capacity through the inhibition zone shown against phytopathogens. The morphological identification at genus level of the three isolated phytopathogens confirmed the identity of *Pestalotia* sp., *Alternaria* sp. and *Cladosporium* sp., likewise in beneficial fungi the identity of the genus *Trichoderma* spp was confirmed. and the bacterial isolates obtained were identified with the genus *Bacillus* spp. in the trial with *Trichoderma* spp. native to northern Sinaloa, the highest value of PICM against in *Pestalotia* sp. the highest value was obtained by the TJ3 (85.3%) and TB (83.5%) strains; without significant difference between them, but with the rest of the strains evaluated ($p \geq 0.05$); in *Alternaria* spp. the values per strain obtained from highest to lowest corresponded to: TJ3 (90.1%), TF (89.7%), TJ7 (88.4%), TB (88.3%) and TM (87.9%), without significant differences between them ($p \geq 0.05$); and in *Cladosporium* sp. the highest value was obtained by strains TJ7 (77.5%) and TF (76.8%), with no difference between them, but presenting a significant difference with the rest of the strains ($p \geq 0.05$). In the PICM results of the second trial of *Trichoderma* spp. native to the state of Oaxaca against phytopathogens: against *Pestalotia* sp. the highest value was obtained by TA (79.2%) and TE (78.5%) without a significant difference between them, but with the rest of the treatments ($p \geq 0.05$), against *Alternaria* sp. It was obtained by TK (82.4%) and TA (78.3%) without a significant difference between them, but between the other strains ($p \geq 0.05$) and against *Cladosporium* sp. the highest PICM was obtained by TK (83.7%), followed by TJ and TL with values of 81.4% and 80.2% respectively, without significant differences

between them but with the rest of the treatments analyzed ($p \geq 0.05$). All strains native to Sinaloa and native to Oaxaca evaluated showed Classes between 1 and 2 of antagonistic capacity against phytopathogens (values 1.0 to 2.5), according to the scale of Bell et al. (1982). The results demonstrate that these strains of *Trichoderma* spp. they have the potential to be evaluated as a biotechnological product in the greenhouse or field against phytopathogens that attack the blueberry crop (*Vaccinium corymbosum* L.).

I*n vitro* tests for selection of strains of *Bacillus* spp. due to its greater inhibitory capacity in confrontation against phytopathogens isolated from the blueberry crop, the following results were obtained: In trial 1: native isolates from Sinaloa, in inhibition against *Pestalotia* sp. the highest value was obtained by B21 (2.42 cm), in the confrontation against *Alternaria* sp. the highest inhibition value was shown by isolate B17 (2.45 cm) and in the test against *Cladosporium* sp. the greatest antagonistic capacity was presented by strain B14 with an inhibition value of 2.37 cm ($p \geq 0.05$), presenting significant differences in the evaluations against the three phytopathogens. In trial 2: native isolates from Oaxaca, in inhibition against *Pestalotia* sp. the B03 isolate and against *Alternaria* sp., the B02 isolate, obtained the highest values (2.04 cm and 1.97 cm) respectively, ($p \geq 0.05$), and against the *Cladosporium* sp. the highest value was obtained by B05 (1.86 cm), presenting significant differences with the rest of the isolates ($p \geq 0.05$). Based on the results described above, with the intention of testing the effect of biocontrol and growth promotion in the field, isolates B17 (*Bacillus* sp.) and B21 (*Bacillus subtilis*) were selected for showing the greatest antagonistic capacity and with them the tests were carried out. inoculations in blueberry cultivation. Therefore, with the intention of testing the effect of biological control and growth promotion in the field experiment, the isolates B03 (*Bacillus* sp.) and B02 (*Bacillus* sp.) that showed the greatest antagonistic effect were selected and with them the inoculations in the blueberry crop (Lot 1 and Batch 2).

Regarding the results obtained in the field, on the inoculations in blueberry plants to evaluate the growth promoting effect of the strains selected in vitro, the following is described: In the experiments carried out, favorable trends were observed in several agronomic parameters when using strains native *Bacillus* and *Trichoderma* strains

compared to commercial strains. Although no significant differences ($p \leq 0.05$) were found in plant height, stem diameter, number of branches, number of flowers and fruit production, treatments with native strains consistently showed better results. In particular, the native strains of *Bacillus* (B17 from Sinaloa and B03 from Oaxaca) and *Trichoderma* (TF from Sinaloa) demonstrated to have a greater positive impact on fruit production and other evaluated parameters. These results suggest that, despite individual variation between plants and high standard deviation, native strains of *Bacillus* and *Trichoderma* could be more effective than commercial strains in improving certain parameters of plant growth and productivity. Therefore, its use could be considered a viable strategy to optimize agricultural performance in the studied regions. As a future perspective, it will be necessary to carry out studies with larger populations to confirm these trends and establish more robust conclusions about the effectiveness of these native strains in different agricultural contexts.

Keywords: beneficial microorganisms, antagonism, growth regulators, Berries.

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad la producción total de frutillas (Berries) en México es de 51,518 t, la zarzamora (*Rubus fruticousus* L.) representa el 49%, seguido de fresa (*Fragaria* sp.) con 34.94 %, frambuesa (*Rubus idaeus*) con 8.4% y arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) con 7.64%. (Luna, *et al*., 2016). Es importante mencionar que Sinaloa se encuentra entre los cinco estados de mayor producción de este último cultivo, colocándose en la segunda posición con un volumen de 13,240.65 toneladas, con un rendimiento de 18.26 t ha^{-1} solo por debajo de Jalisco (SIAP, 2023).

Matas-Baca, *et al.* (2023) dice que el uso de productos biológicos como hongos de la especie *Trichoderma* spp. se han incentivado cada vez más su uso para el control de plagas y patógenos en diferentes cultivos, los cuales ante el medio ambiente actúan de manera efectiva, viable y económicamente rentable.

Dentro del manejo orgánico del arándano, los productos naturales derivados de las plantas representan una fuente atractiva de productos potenciales para el uso de antagonistas como *Pseudomonas, Trichodermas* o *Bacillus subtilis* a nivel de raíces, que mejoran el desarrollo y sanidad del sistema radicular, logrando buen vigor de plantas y menor susceptibilidad a las afecciones por patógenos. Los hongos del género *Trichoderma* spp. se encuentran distribuidos por todo el mundo, estos son empleados dentro de programas de control biológico, y los más utilizados son *T. harzianum, T. atroviride, T. viride, T. asperellum,* y *T. virens,* (Guzman-Guzman *et al*., 2023).

Estudios científicos realizados demuestran que *Trichoderma* tiene la capacidad de producir diferentes fitohormonas, principalmente de tipo auxinas y giberelinas, las cuales se consideran promotoras del crecimiento vegetal (Lopez-Valenzuela, *et al*., 2022).

A la fecha no existe información que sustente el impacto económico sobre la inclusión de Bioestimulantes a base de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. en los programas de fertilización del arándano en el estado de Sinaloa, así como el impacto que esta pudiera tener en el rendimiento y calidad del fruto.

Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue aislar fitopatógenos causales de enfermedades en el cultivo de arándano y evaluar el efecto antagonista de cepas de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. nativas del estado de Sinaloa y nativas del estado de Oaxaca y su impacto en la promoción de crecimiento vegetal en etapa de desarrollo y producción del cultivo de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 El Cultivo de Arándano (*Vaccinium corymbosum* L.)

2.1.1 Origen y domesticación.

Vaccinium es un género perteneciente a la familia Ericaceae la cual consta de aproximadamente 450 especies, distribuidas en el hemisferio norte; en las montañas de Asia tropical, América, y algunas especies en África y Madagascar, así como 92 especies (51 endémicas) distribuidas en China; en el Himalaya, Nueva Guinea y la región andina de América del Sur. En el mundo existen distintas especies de este cultivo, sin embargo, la mayor parte de la producción proviene de especies *Cyanococcus*, incluidos los cultivares de *Vaccinium corymbosum* L. (arándano de arbusto alto) y *Vaccinium ashei* Reade (arándano ojo de conejo; syn. *Vaccinium virgatum* Ait.), y rodales nativos de *Vaccinium angustifolium* Ait. (arándano de arbusto bajo). Los cultivares de arbusto alto se separan aún más en tipos del norte o del sur según sus requisitos de horas frio y resistencia al invierno. Antes de 1916, todas las bayas azules se cosechaban en la naturaleza. Hoy en día, casi todos los arándanos comerciales se cosechan de cuatro especies; *V. corymbosum* L. (arándano azul), *V. ashei* Reade (ojo de conejo) *V. angustifolium* y *V. myrtilloides* (Kole, 2011).

Esta especie es uno de las frutales de reciente domesticación, y en sus orígenes gran parte de las especies silvestres comestibles de *Vaccinium* habían sido recolectada manualmente durante años por los pueblos indígenas. Sin embargo, su domesticación inicia a finales del siglo XIX, extrayendo plantas de la naturaleza, las cuales se plantaron en los campos de Nueva Inglaterra y Florida. (Melendez, *et al*., 2021), mientras que los programas para su mejoramiento genético, fueron diseñados a principios del siglo XX (Muñoz, 1988.)

Figura 1. Distribución geográfica de la superficie de Arándano establecida en México. Se reporta el número de hectáreas sembradas por estado. Datos obtenidos de FOSAT (2022).

El arándano se ha clasificado en diferentes categorías las cuales comprenden las diferentes especies considerando su nombre común y su requerimiento de horas frio (H.F.) como: *V. Corymbosum* L. los cuales son arándanos altos del Norte (Highbush) requieren entre 700-1000 H.F, la especie *V. Darrowi* son altos del sur requieren entre 200-400 H.F (a veces 600 H.F), los *V. angustifolium* y *V. myrtilloides* se comprenden de arándanos bajos los cuales necesitan requerimientos menores en H.F y por ultimo *V. vigratum* y *Vashei Reade* son Rabiteye (Ojo de conejo) ocupan de 400-800 H.F (Castillo, 2008).

2.2 Importancia del cultivo de arándano.

2.2.1 Mundial.

Es una de las especies de más reciente introducción en la fruticultura mundial con un gran crecimiento, siendo un cultivo de zonas frías y húmedas originario de América del Norte. Su evolución y obtención de diferentes variedades las cuales pueden establecerse en muchas partes del mundo, junto a su importancia biológica ha despertado el interés de numerosos países para su establecimiento, lo cual impulsa

su consumo y la expansión de su área de cultivo (Hernández, et al*.,* 2021). Su importancia radica en las propiedades de sus frutos los cuales son bayas de color oscuro, rojizas o azuladas, ricos en anotícianos y minerales, de alto valor medicinal y nutricional. Algunos estudios realizados en la universidad de Clemson y el departamento de agricultura de los Estados Unidos han calificado al arándano como el alimento con mayor contenido de antioxidantes, interviniendo en el metabolismo celular humano al disminuir la acción de los radicales libres, los cuales se asocian al envejecimiento, cáncer, Alzheimer y enfermedades cardiacas (Hernández, et al., 2021).

2.2.2 Nacional.

Se destaca la producción de este cultivo por poder proporcionar empleos durante todo su proceso, más en la época de cosecha, lo cual representa una gran importancia económica a favor de los productores agrícolas y de los sectores comerciales. En cuestiones de exportación, se cuenta con el 94.5% del total que es comercializado el cual se dirige a Estados Unidos, pero también se tiene mercado para países como: Japón, China, Singapur, Países Bajos, Canadá, Bélgica, Italia, Emiratos Árabes, etc. (Pérez-C, 2018).

2.2.3 Sinaloa.

Sinaloa es una muy buena alternativa para la producción, ya que en los últimos cinco años ha incrementado en más de 300% de superficie, ya que no solo es un cultivo rentable, generador de divisas, sino que además es una excelente fuente de empleo en el estado (Senasica, 2021.)

2.3 Clasificación Taxonómica.

El género *Vaccinium* L. está integrado por más de cuarenta especies como *V. oxycoccos* L., también conocida como “verdadero arándano” (*Oxycoccus macrocarpus* Ait.) (Garrido y Perez-Urria, 2014).

Clasificación taxonómica del arándano azul (NCBI, 2023):

Superreino: Eucariota
Reino: Viridiplantae
Filo: Estreptofita
Clase: Magnoliopsida
Orden: Ericales
Familia: Ericaceae
Género: *Viccinium*
Especie: *Viccinium corymbosum*

2.4 Características Botánicas.

Los arbustos de arándano azul generalmente se caracterizan por su altura variable, que oscila entre los 10 centímetros (3.9 pulgadas) y los 4 métros (13 pies), con una tendencia a crecer de forma reclinada. Sus frutos, conocidos como bayas, presentan un diámetro que va de 5 a 16 milímetros (0.20–0.63 pulgadas) y exhiben una corona de forma acampanada. Inicialmente, las bayas tienen un tono verde que gradualmente se transforma en un matiz púrpura-rojizo, para finalmente adquirir un color azul oscuro o púrpura cuando alcanzan su madurez. Estas bayas están cubiertas por una fina capa de cera epicuticular pulverulenta, comúnmente denominada "Bloom". En términos de sabor, los arándanos azules tienden a ser dulces, aunque su nivel de acidez puede variar. Cuando están completamente maduros, su sabor es predominantemente dulce, aunque conservan una ligera acidez que puede diferir entre variedades. Una característica relevante de este cultivo es tener un sistema radicular de aspecto fibroso, superficial y también carecen de pelos absorbentes, por lo que tienen relativamente baja capacidad de absorción e incapaces de atravesar suelos compactos. En condiciones naturales estas raíces tienen relación con hongos como

Micorrizas, con las que mantiene una relación de mutuo beneficio, la asociación que se forma entre estas beneficia a la planta para poder desarrollarse en condiciones de pH bajo, se conoce que el pH ideal para la producción del cultivo de arándano es de 4.5 a 5.5 (INTAGRI, 2017).

2.5 Morfología de la planta.

Es un arbusto el cual varía mucho en su forma dependiendo su variedad, siendo de porte erecto o rastrero. Según Infoagro (2018), se describen las características de la planta de la siguiente manera: **Raíz:** Tiene un sistema radicular el cual es compuesto por una gran cantidad de raíces, la mayoría de ellas se encuentran en la parte superficial, son fibrosas, finas y también carecen de pelos absorbentes. **Tallo:** Presenta un tallo pequeño subterráneo, el cual es recto, cuadrangular y muy ramificado, generalmente de color marrón. **Hojas:** Contienen hojas simples, alternas, con una forma elíptica y lanceoladas, con márgenes dentados y peciolo corto, siendo de color verde intensa dependiendo la especie. **Flores:** Muestran inflorescencias en racimos de 6 a 10 flores por yemas. De tamaño pequeñas, axilares, con el cáliz compuesto de 4 a 5 sépalos obtusos y la corola blanca formada por 4 a 5 pétalos fusionados dando lugar a una forma acampanada, con un pistilo simple, de ovario ínfero y con estambres en grupos de 8 a 10. **Fruto:** Este se trata de una baya de forma esférica, con diferentes tonalidades de color como puede ser azul, rojo o negro dependiendo la madurez según la especie que se cultiva. La epidermis del fruto se encuentra cubierta por secreciones cerosas, teniendo una característica de que el tamaño del fruto tiene que ver con el grosor de la rama y la posición en la misma, las cuales son de menor diámetro las que se encuentran más retiradas.

2.6 Manejo Agronómico del Cultivo.

Previo al establecimiento del arándano como cultivo, es importante considerar: las condiciones climáticas y edáficas de la región, periodo de floración y cosecha, para conseguir la mayor expresión de las características genética de las variedades que se adapten a la región, así como las densidades de plantación que más se adecuen a estas. De igual manera la disponibilidad de mano de obra y cultivos circundantes en la

región, para tener personal disponible cuando el cultivo así lo demande (INIA, 2017). Las labores básicas que permitan obtener un mayor rendimiento de este frutal, son manejo del riego, así como la fertilización con manejo convencional y orgánico, respectivamente. La poda se debe realizar inmediatamente después de la plantación, la cual tiene por objetivo remover las ramas con yemas florales, con lo que mejora el vigor e incrementa la posibilidad del establecimiento del cultivo (Muñoz-Veta et al., 2017).

2.6.1 Recomendaciones para elegir una Variedad de Arándano.

Una consideración muy importante es, si la variedad es libre o privada, existen variedades originadas por programas de mejoramiento privado, por lo tanto, están licenciadas a empresas que las propagan y entregan a los productores con cláusulas que los obligan a pagar derechos de propiedad. Otra consideración para elegir una variedad es el destino de la producción, ya que en fresco se privilegia el color, contenido de azúcares y rendimiento; en cambio, en la fruta destinada a congelado, se prioriza el calibre del fruto y su firmeza; resistencia al estrés biótico y abiótico, así como la calidad organoléptica del fruto: presencia de semillas, color, sabor, calibre y piel suave (González et al.,2017).

2.6.2 Clima en el que se desarrolla el Cultivo de Arándano.

El arándano es un frutal que se desarrolla adecuadamente en climas moderados. Dependiendo de la variedad, requieren entre 400 y 1200 horas frío con un umbral de 7 °C para cumplir su receso invernal. Una vez que las plantas rompen la latencia se vuelven sensibles a las bajas temperaturas, esto es un factor muy importante a la hora de elegir variedades, de tal suerte que la floración no se presente cuando haya riesgo de heladas. Durante el verano, la presencia de nublados reduce la calidad de la fruta y favorecen la propagación de enfermedades. Así pues, también veranos calurosos pueden acelerar el periodo de cosecha con lo que se impiden las cosechas escalonadas, disminuir el sabor y su firmeza. De igual manera, los vientos fuertes, ocasionan la caída de brotes tanto vegetativos como florales además de impedir la

polinización por insectos, caída de fruta y daño mecánico, afectando directamente la calidad y el rendimiento (Rubio *et al*., 2010; Undurraga *et al.*, 2013).

2.6.3 Suelo y Sustrato.

El arándano crece muy bien en suelos bien drenados de textura franco arenosa, con alto contenido de materia orgánica y un pH entre 4.5 y 5.5 y en fibra de coco, sin embargo, si la decisión es colocarla en suelo la recomendación es realizar un análisis de suelo para conocer sus propiedades físicas y químicas, como la disponibilidad de nutrientes, pH, materia orgánica, C.E. (Undurraga, *et al.*, 2013). Las raíces del arándano no son capaces de atravesar superficies de suelo compactos y requieren de suelos sueltos y bien drenados con un buen contenido de materia orgánica entre el 3 a 5% (INTAGRI, 2017). Pérez-Pérez (2019) comenta que la fibra de coco ha mostrado una mayor respuesta favorable para el desarrollo de arándano comparado con otros sustratos como, peat moss, zeolita, tezontle entre otros, promoviendo mejores condiciones para el crecimiento del sistema radicular, favoreciendo la aireación y permeabilidad, evitando la compactación y brindando mayor retención de agua y nutrientes.

2.6.4 Establecimiento del Cultivo.

El arándano se puede establecer de dos formas, puede ser en suelo y también sobre macetas con sustrato: Gonzales, *et al*. (2017) sugiere las siguientes recomendaciones para el cultivo de arándano: en suelo; realizar camellones o camas de 30 a 50 cm de alto y de 1 m de ancho, se debe mejorar la textura y estructura con la que se cuenta, esto puede realizarse con aserrín de pino grueso, corteza de pino, arroz o viruta y la dosis va de 200 – 800 m^3. ha, se puede aplicar compostas para permitir a las raíces que exploren de manera libre sobre la superficie y puedan cubrir todo espacio con raíces. En sistema hidropónico, se utiliza fibra de coco para anclaje de la planta en macetas de plástico o bolsas, el cual primero debe de ser lavado con agua para bajar su C.E hasta que la planta pueda soportar y ser trasplantada (Gonzales, *et al.*, 2017.)

2.6.5 Fertirriego.

Debido a sus raíces superficiales el arándano es muy sensible al déficit hídrico y a reaccionar negativamente con el exceso de agua. La calidad del agua es básica en los sistemas de producción del arándano por lo que es recomendable realizar un análisis para determinar pH, sales solubles (Conductividad Eléctrica), y Razón de Adsorción de Sodio (RAS). Además de análisis microbiológico para asegurar la inocuidad del producto final y tener la certeza de que el agua empleada en la producción de este es apta para la agricultura. Los sistemas de riego localizado permiten mantener un nivel adecuado de humedad en los primeros 15 a 20 cm del suelo, donde se encuentra gran parte de las raíces (Undurraga, et al., 2013).

Una de las practicas más importantes en la producción de este cultivo es la aplicación correcta de fertilizantes, sin embargo, en comparación con otros frutales se puede calificar como una planta con bajos requerimientos nutricionales, posiblemente se deba a la adaptación de esta misma en condiciones de suelos que carecen de nutrientes y son capaces de sobrevivir en un entorno con escasa fertilidad (Flores, et al., 2014).

Para el manejo convencional se puede emplear cualquier tipo de fertilizante en dosis y épocas oportunas, sin embargo, cuando se maneja de manera orgánica deben emplear fuentes siempre teniendo en cuenta la velocidad de liberación; en ambos casos se deben emplear fertilizantes autorizados considerando al mismo tiempo la actividad biológica, la cual es indispensable cuando trabajamos con compostas y/o abonos verdes, ya que estos últimos necesitan de más tiempo para liberar algunos de sus nutrientes, como el nitrógeno (N), fósforo (P) y azufre (S), aunque otros nutrientes, como potasio (K), calcio (Ca) y magnesio (Mg), son entregados de manera más rápida. La dosis de aplicación dependerá del rendimiento del huerto y a las propiedades químicas del suelo, por lo cual el programa de fertilización deberá ser especifico por huerto y por temporada, ya que las aplicaciones generalizadas impactaran directamente en el rendimiento y calidad de la fruta. Por ello, es necesario contar con análisis de suelo en la medida de lo posible cada 2 a 3 años, lo que permitirá evaluar el potencial productivo en el suelo. Por otro lado, los análisis foliares para el diagnóstico

nutricional ayudaran para la recomendación de programas de fertilización para un huerto en específico, con lo que se cumplirá el objetivo del productor: mayor rendimiento y calidad = mayor rentabilidad para el cultivo (González et al., 2017).

La recomendación utilizada para la fertilización de las plantas en campo en el norte de Sinaloa es la siguiente (comunicación personal):
Para cada 100,000 litros de agua:

- Nitrato de calcio: 24 kilos
- Sulfato de magnesio: 19 kilos
- Sulfato de potasio: 10 kilos
- Fosfato monopotásico: 17 kilos
- Nitrato de amonio: 10 kilos
- Zinc: 550 gramos
- Manganeso: 100 gramos
- Microelementos (cobre, zinc, hierro, maganeso y molbdeno): 2.7 kilos

Gonzales, et al. (2017) comenta sobre los siguientes elementos: El Fosforo proporciona un mejor crecimiento de raíces, floración y mejora la resistencia a plagas y enfermedades, si tenemos una alta cantidad de fosforo se puede tener problemas con la deficiencia de zinc. En el caso de Calcio nos ayuda en la firmeza de los frutos, mejorando la calidad de postcosecha y aumentando el cuajado y calibre de frutos, si se tiene una mayor cantidad de este se puede inducir deficiencias de Mg y K en la planta y en suelo puede bloquear elementos como fosforo, boro, zinc y manganeso. El potasio en arándano aumenta el rendimiento, la resistencia a condiciones por escasez de agua, mejorando el calibre, aumentando la firmeza y mejora el sabor y olor de la fruta, si tenemos exceso de este elemento se pueden inducir deficiencias de Magnesio y Calcio. La intensidad del color verde en hojas en este cultivo lo proporciona el Magnesio, al igual que promueve el vigor de los brotes, y una mayor actividad fotosintética de las hojas, sin embargo, una elevada concentración de este puede inducir la deficiencia de Ca y K y estimula una mayor absorción y utilización de nitrógeno. El Azufre en la planta contribuye a la reducción de pH del suelo y la aplicación con potasio mejora la firmeza de la fruta, sin embargo, si hay un exceso

genera un aumento de conductividad eléctrica, lo cual afecta a la planta en su desarrollo. El Boro nos mejora el cuajo de flores, acumulación de reservas para la siguiente temporada y ayuda a una mejor brotación. Su alta concentración presenta daños en hojas y tallos. El elemento Zinc ayuda en la mejora del enraizamiento de plantas nuevas y aumenta el vigor en la planta, si tenemos un exceso de este puede inducir la deficiencia de cobre y hierro. (Gonzales, et al., 2017).

2.7 Fitopatógenos que atacan el Cultivo de Arándano.

Los hongos reportados en arándano en todos los órganos de la planta en diferentes zonas productoras del mundo, que causan daños son*: Alternaria* sp*., Curvularia* sp*. Microsphaera vaccinii* sp*., Phomopsis vaccinii, Stemphyllium* sp., entre otros (Rojas, et al., 2020). Para su control se utilizan hongos del género *Trichoderma* los cuales poseen buenas cualidades para el control de enfermedades en plantas causadas por patógenos fúngicos del suelo, principalmente de los géneros *Phytophthora, Rhizoctonia, Sclerotium, Pythium* y *Fusarium* entre otros (Mondragon, et al., 2012).

2.8 Plagas.

De acuerdo con Intagri (2018) de las plagas principales que atacan al cultivo de arándano, son los coleópteros los cuales como principales causantes de daño tenemos las siguientes especies: (*Aergonius* sp*., Asynonychus* sp*., Brachysternus* sp*., Graphognatus* sp*., Sericoides* spp*,).* De los lepidópteros que lo atacan contamos con, *(Agrotis* ípsilon*, Argyrotaenia* sp*., Peridroma saucia, Proeulia* sp.), también es atacado por Trips de la especie *(Frankiniella occidentalis* y *Thrips tabaci),* pulgones (*Ericarpis fimbriata, Aphis gossypii, Myzus persicae),* chinches como (*Lygus lineolaris, Chelinidea tabulata)* y por último la mosca del vinagre (*Drosophila suzukii*). Para el control de cada una de estas especies es muy importante el tomar la recomendación adecuada para poder combatir el daño que es causado en el cultivo, tomando en cuenta el manejo integrado de plagas de la zona (Intagri, 2018).

2.9 Poda.

Existen distintos tipos de poda. Esta práctica cultural se realiza con tal de poder darle forma a la planta, permitir el paso del aire a través de ella y la luz, también poder controlar el crecimiento y su desarrollo. La falta de experiencia de esta práctica puede reducir la producción, cuando se lleva a cabo este trabajo el operador debe utilizar guantes de látex para poder evitar el daño de la fruta y usar tijeras que no sean de punta ya que puede dificultar el maniobrar su uso dentro del arbusto, se deben desinfectar las tijeras utilizando permanganato al 1% para poder evitar enfermedades de una planta a otra (Intagri, 2017).

2.9.1 Poda de formación.

Se realiza principalmente en los dos primeros años para poder eliminar diferentes brotes los cuales no son vigorosos y yemas florales con el fin de tener un balance entre la parte vegetativa y reproductiva posteriormente. Si no se realiza la poda correcta la planta podría tener problemas en la producción de frutas sin tener una parte vegetativa que pueda solventar las necesidades de ella, lo cual corre el riesgo de producir frutos muy pequeños (Intagri, 2017).

2.9.2 Poda de producción.

Se lleva a cabo cuando crece follaje o brotes en épocas que no se desean, lo cual su principal objetivo es estimular a los brotes laterales y eliminar los que ya produjeron furtos anteriormente, también el eliminar ramas demasiado largas las cuales solamente están necesitando nutrientes para su crecimiento dejando a las productivas sin alimento (Intagri,2017).

2.9.3 Poda de renovación.

Cuando ya termina el ciclo de cosecha, se realiza eliminando cañas leñosas para revitalizar a la planta como consecuencia de un vigor bajo, pocos frutos por podas sin intensidad e inducir brotes cortos, contando con tres tipos: a) A ras del suelo; se utiliza como un último recurso para una renovación completa de la planta, b) A media altura;

se elimina todo, solamente se deja la estructura inicial de planta, reduciendo el tiempo de renovación de la producción y c) Mixta; se combinan las dos, rebajando a media altura de 2 a 4 ramas de la planta dejando lo demás en producción (Intagri, 2017).

2.10 Bioestimulación del Cultivo.

Un bioestimulante puede ser una sustancia o un microorganismo diseñado para ser aplicado solo o en mezcla sobre cultivos, semillas y/o raíces; con el objetivo de estimular procesos biológicos y, por tanto, mejorar la disponibilidad de nutrientes y optimizar su absorción, incrementar la tolerancia a estreses abióticos y por ende aspectos de calidad de cosecha (Seipasa, 2015).

El período de mayor estrés en la planta de arándano, se presenta después de la poda; ya que durante y después del corte de madera lignificada hay mayor probabilidad de ingreso de patógenos, lo que incrementa el riesgo de enfermedades infecciosas, por tanto, con el fin de mejorar la circulación de la savia, y favorecer la formación de nuevos brotes así como reducir la mortalidad de la planta, es recomendable el empleo de bioestimulantes, ya que estas sustancias son capaces de promover el crecimiento de las plantas. Aunque no inciden directamente en eventos fisiológicos específicos, estimulan procesos naturales para mejorar la absorción de nutrientes, la tolerancia al estrés abiótico y el calibre de los frutos (Soluciones A., 2019).

En la actualidad existen diversas alternativas de estos productos en el mercado, las cuales están formuladas con diferentes compuestos naturales. Los más frecuentes son hechos a base de extractos de vegetales, algas, semillas o combinaciones de materias primas. Otros productos importantes en este aspecto son los aminoácidos, los cuales conforman las proteínas y son precursores de varias fitohormonas, señales químicas que facilitan la comunicación entre las células y coordinan sus actividades. En esa misma línea, se utilizan algunas vitaminas, antioxidantes, carbohidratos, y macro y micronutrientes como complementos (Sheraz et al., 2010).

Por otro lado, los biofertilizantes más utilizados son los fijadores de nitrógeno, solubilizadores de potasio, de fósforo y promotores del crecimiento vegetal. Se estima

que en un gramo de suelo fértil pueden estar presentes hasta 1010 bacterias, con un peso vivo de 2000 kg.ha $^{-1}$. Las bacterias del suelo pueden ser cocos (esfera, 0.5 m), bacilos (bastoncillos, 0.5-0.3 m) o en forma de espiral (1-100 m). La presencia de bacterias en el suelo depende de las propiedades físicas y químicas del mismo, de la materia orgánica y del contenido de fósforo, así como de las actividades culturales (Nosheen et al., 2021).

2.10.1 Biológicos utilizados en el cultivo de arándano.

2.10.1.1 *Trichoderma* spp.

Las especies de *Trichoderma* actúan como hiperparásitos competitivos que producen metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas a los que se le atribuyen los cambios estructurales a nivel celular, tales como vacuolización, granulación, desintegración del citoplasma y lisis celular, encontrados en los organismos con los que interactúan (Ezziyyani, et al., 2004). Así mismo, está comprobado que al inocular semillas de maíz con cepas de *Trichoderma*, actúa como promotor o regulador del crecimiento vegetal, específicamente, por la adición de auxinas, giberelinas y ácidos orgánicos que este microorganismo es capaz de producir (López-Valenzuela et al. 2019; López-Valenzuela et al. 2022).

2.10.1.1.1 Importancia de este hongo benéfico.

De acuerdo con Endara (2019), los hongos de este género se cuentan en ambientes aeróbicos, predominando en suelos con alto contenido de materia orgánica y pH de neutro a acido. Se utilizan para combatir distintos patógenos que causan enfermedades en plantas ya que producen enzimas. Así, *Trichoderma* produce sustancias que logran estimular y desarrollar el crecimiento de las plantas, al actuar como catalizadores de los meristemos primarios en plantas jóvenes ayudando en producción de nuevas raíces y la regeneración celular desarrollándose más rápido que las que no están inoculadas con este microrganismo (Chuez, 2018).

El uso de cepas de *Trichoderma* nativas de la rizosfera de plantas de tabaco, las cuales se multiplicaron en arroz o trigo, y se aplicaron como suspensión de esporas en el cuello de las plantas de chile, maíz, chía y tabaco, mostraron un muy buen comportamiento como biocontrolador y promotor de crecimiento, según Zapata, *et al.* (2012). De igual manera, Mesa-Venegas (2019) menciona que los hongos del género *Trichoderma* y las aplicaciones de nuevos productos agrícolas como biocontroladores, son una alternativa viable en el manejo de hongos, bacterias, parásitos e insectos. Candelero, et al. (2014) evaluó 14 cepas de *Trichoderma* spp. las cuales provenientes de patosistema silvestre y agrícola del estado de Yucatán, causaron efectos positivos mostrando promoción de crecimiento en plántulas de *Capsicum chinese* Jacq. y un efecto antagónico contra *Meloidogyne incognita.*

2.10.1.1.2 Clasificación taxonómica.

Clasificación taxonómica de *Trichoderma* spp. según el National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2015).

Reino: Fungí
Subreino: Dikarya
Phylum: Ascomycota
Subphylum: Pezizomycotina
Clase: Sordariomycetes
Orden : Hypocreales
Familia: Hypocreaceae
Género: *Trichoderma*

2.10.1.1.3 Morfología.

Trichoderma es un hongo que se reproduce de manera asexual y es anaeróbico, caracterizándose por la forman en la que produce sus conidios. Muchas de las especies de este género podemos encontrarlas en cultivos artificiales, produciendo una gran cantidad de conidios los cuales se ubican al final de conidióforos ramificados mejor conocidos como fiálides (Hermosa, *et al*., 2000).

2.10.1.1.4 *Trichoderma* comercial PHC-T22.

Es un fungicida biológico de la marca Plant Health Care preventivo ayudando el control de enfermedades, teniendo como ingrediente activo *Trichoderma harzianum* cepa T-22, por cada gramo contiene $1x10^7$ unidades formadoras de colonias. Su método de acción es inhibir el crecimiento de hongos patógenos, por procesos de competencia natural protegiendo a la raíz con una coraza a su alrededor y procesos de micoparasitismo necrótrofico de hongos parásitos. Se recomienda como prevención de patógenos en raíz, reducción de fungicidas sintéticos y cuando los cultivos presentan resistencia a químicos (PHC, 2022).

2.10.1.2 *Bacillus* spp.

Las bacterias del género *Bacillus* son rizobacterias, las cuales promueven el crecimiento vegetal al promover en plantas la producción de auxinas, ácidos orgánicos, sideróforos y antibióticos (Anguiano, et al., 2019). El género *Bacillus* se encuentra entre los microorganismos que pueden transformar las formas insolubles de fosforo (P) en el suelo a formas solubles mediante la secreción de ácidos orgánicos y la reducción del pH del suelo para disolver los fosfatos unidos; también pueden solubilizar el potasio (silicatos) mediante la producción de ácidos orgánicos que descomponen los silicatos y ayudan en la eliminación de iones metálicos de tal forma que lo ponen a disposición de las plantas, además de movilizar las formas inaccesibles de potasio en el suelo, de igual manera solubilizan el zinc por protones, quelados, acidificación y por sistemas oxido- reductores; pueden producir hormonas que promuevan el crecimiento de las raíces, mejoren la disponibilidad de nutrientes incrementando el rendimiento de los cultivos (Nosheen et al., 2021). Anguiano et al. (2019) menciona que el uso de cepas de *B. subtilis* promueve distintas partes de la planta, por ejemplo, una de las tres cepas evaluadas en su experimento promovió un incremento en la tasa de germinación y otras las raíces y longitudes de los tallos en semillas de *Solanum lycopersicum* y *Arabidopsis thaliana* y plántulas de *S. lycopersicum*. Concluyendo que se debe elegir la cepa correspondiente dependiendo el requerimiento a promover en cada planta ya que su exceso puede inhibir el crecimiento de esta.

2.10.1.2.1 *Bacillus* comercial FUNGIFREE-AB.

Es una presentación en polvo humectante que contiene esporas de la bacteria *Bacillus subtilis,* en concentración de $1x10^9$ UFC g^{-1} (FMC, 2021).

2.11 Malezas.

Son especies las cuales crecen en lugares de producción comercial, las cuales no son deseadas en nuestro entorno por competir espacio, luz, nutrientes disponibles con las plantas cultivadas y llegan a modificar la cosecha afectando el rendimiento y calidad, otra de las causas por las cuales no se quieren en el terreno es por ser huéspedes de plagas y enfermedades que pueden dañar el cultivo. Para su control se utilizan diferentes métodos: Biológico, cultural y químico (INIA, 2017).

2.12 Identificación morfológica y molecular de microorganismos.

La identificación de microorganismos es de suma importancia ya que estos se encuentran en todas partes y cumplen un papel importante en para el mantenimiento de la vida humana en el planeta. Es un requisito para poder identificar y pueda ser ingresada a una colección para permitir la búsqueda de una aplicación al microorganismo, se pueden dividir en dos grupos: genotípicos y fenotípicos, lo cual el primero corresponde a las características morfológicas, requerimientos nutricionales o su comportamiento ante moléculas, y el segundo es la identificación heredada completa de un organismo codificada en su ADN (Carrasco, *et al*., 2017).

III. HIPÓTESIS

Cepas de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. nativas pueden ser una alternativa en el biocontrol de fitopatógenos y en la promoción de crecimiento del cultivo de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.).

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General.

Aislar, seleccionar, identificar y evaluar cepas de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. nativas de Sinaloa y nativas de Oaxaca, como antagonistas de fitopatógenos *in vitro* y su efecto promotor de crecimiento en arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) en condiciones de campo.

4.2 Objetivos Específicos.

1.- Aislar e identificar mediante claves morfológicas a los fitopatógenos obtenidos de tejidos con sintomatología de daño en arándano (*Vaccinium corymbosum* L.).

2.- Seleccionar a nivel *in vitro* las mejores cepas de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. nativas de Sinaloa comparadas con cepas nativas de Oaxaca con potencial antagónico contra fitopatógenos aislados del cultivo de arándano.

3. Identificar mediante análisis molecular las cepas de *Trichoderma* y *Bacillus* seleccionadas *in vitro* por su mayor potencial antagónico contra los fitopatógenos aislados.

4.- Evaluar el efecto de los mejores aislados de *Trichoderma* y *Bacillus* como promotores de crecimiento en el cultivo de arándano bajo condiciones de campo.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Muestreo y aislamiento de fitopatógenos.

Se obtuvieron muestras del cultivo de arándano variedad biloxi, directo en agrícolas de productores cooperantes: campo 4 “LA FRANCA” y el campo “GRUPO SAFINSA”, las plantas fueron observadas e identificadas con sintomatología de daño causado por fitopatógenos, tanto en hojas, tallo, raíz y frutos para su recolección. Una vez obtenidas las muestras, se embolsaron, etiquetaron y fueron trasladadas en una caja fresca (con hielo, pero sin contacto directo con las muestras) para evitar la pronta deshidratación del tejido, se llevaron al Laboratorio de Microbiología Agrícola de la Facultad de Agricultura del Valle del Fuerte, Juan José Ríos, Ahome, Sinaloa donde se procedió al aislamiento. Se preparó medio de cultivo PDA (Papa Dextrosa Agar- BD Bioxon®), para realizar el aislamiento de los fitopatógenos obtenidos. La preparación del medio de cultivo para hongos consistió en pesar 40 g de PDA y agregar a un matraz Erlenmeyer el cual se aforo a un litro con agua destilada, posteriormente se esterilizó en autoclave (Yamamoto SK101C) a 121° C durante 15 minutos. Una vez obtenido el medio de cultivo estéril, se dejó reposar a temperatura ambiente durante 24 horas, se vació a cajas Petri y posteriormente se colocaron las muestras de tejido dañado, previamente desinfectado con hipoclorito al 5%, a espera de su crecimiento e identificación.

5.2 Origen, aislamiento e identificación de los aislados de *Trichoderma* y *Bacillus*.

Los aislados de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. nativos del norte de Sinaloa, en estudios previos, se obtuvieron de la rizosfera de diversos cultivos establecidos en los municipios de Ahome y Guasave (datos reportados por López-Valenzuela et al. 2015). De igual manera, a través de muestras de la rizosfera de aguacate provenientes del estado de Oaxaca, se obtuvieron nueve aislados de *Trichoderma* spp. con la técnica de Papavisas y Davey (1959) y 12 aislados de *Bacillus* spp. según la técnica reportada por Ohba y Aizawa (1986).

Los aislados de *Trichoderma* spp. utilizados fueron 14 en total (5 originarios del estado de Sinaloa y 9 del estado de Oaxaca); los aislados de *Bacillus* spp. utilizados fueron 22 en total (10 originarios de Sinaloa y 12 de Oaxaca). Las del estado de Sinaloa fueron otorgadas por la directora de tesis las cuales son resguardadas en el cepario de Microorganismos benéficos en el Laboratorio de Microbiología Agrícola de la Facultad de Agricultura del Valle del Fuerte. Las cepas nativas de Oaxaca fueron proporcionadas en colaboración con una investigadora de dicho estado perteneciente a la Universidad Novauniversitas Oaxaca, Ocotlán de Morelos, Oaxaca, México. Esto con la finalidad de ser evaluadas y conocer su comportamiento sobre aspectos del cultivo de arándano.

5.3 Identificación morfológica de los aislados.

Se identificaron las estructuras morfológicas de los aislados fitopatogénicos obtenidos mediante las claves de Maharachchikumbura et al. (2013); Barnett y Hunter (1998) y Barnett y Hunter (1972). Utilizando microscopio biológico a 100X. En los aislados de *Trichoderma*, las características macro y microscópicas fueron comparadas con las claves taxonómicas de Barnett y Hunter (1972); Bisset (1991) y Von Arx (1981). Los aislados puros de *Trichoderma* se crioconservaron a -20 °C en tubos con PDA y glicerol al 15%.

La morfología de las colonias de *Bacillus*, se identificaron de acuerdo al Manual de Clasificación de Bergey (Claus y Berkeley, 1986). Posteriormente, las colonias se pasaron a placas por agotamiento para su purificación y se les realizó la prueba de tinción de Gram para determinar las características micromorfológicas y tintoriales. Los aislados bacterianos puros se crioconservaron a -20 °C en tubos con LB (Luria Bertani) y glicerol al 15%.

5.4 Experimento a nivel *in vitro* para la selección de cepas de *Trichoderma* spp. nativas de Sinaloa y nativas de Oaxaca con potencial antagónico contra fitopatógenos aislados de arándano.

La prueba de antagonismo se realizó contra los tres aislados patogénicos obtenidos en el muestreo, con la técnica de confrontación dual (Chérif, et al., 1990) donde se evaluó la competencia por espacio y nutrientes. Se reactivaron cepas nativas del estado de Sinaloa (TB, TF, TJ3, TJ7 y TK) y cepas nativas del estado de Oaxaca (TB, TC, TE, TG, TH, TI TJ, TK y TL), se utilizaron discos de 5 mm de diámetro, colocándose el patógeno a un extremo de la caja Petri con medio de cultivo PDA, cinco días después de crecimiento del patógeno se colocó al otro extremo de la caja Petri el *Trichoderma* spp. El porcentaje de inhibición de crecimiento micelial (PICM) fueron medidos utilizando la fórmula de (Ezziyyani, *et al*., 2004), con la siguiente formula:
PICM = (R1 – R2) / R1 x 100
Donde R1 y R2 son los radios mayor y menor respectivamente de crecimiento radial.
La clasificación antagónica de las cepas se realizó a los 10 días de crecimiento en las cajas Petri, utilizando la escala de capacidad antagónica *in vitro* para *Trichoderma* spp. (Bell, *et al*.,1982).

En el primer ensayo se evaluaron 15 tratamientos, correspondientes a 5 cepas de *Trichoderma* y 3 aislados patogénicos, y en el segundo ensayo se evaluaron 27 tratamientos correspondientes a 9 aislados de *Bacillus* y 3 aislados patogénicos en ambos experimentos se contó con un testigo absoluto. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con cuatro repeticiones, en total 60 unidades experimentales (UE) en el primer ensayo y 108 UE en el segundo.

5.5 Experimento a nivel *in vitro* para la selección de cepas de *Bacillus* spp. nativas de Sinaloa y nativas de Oaxaca con potencial inhibitorio contra fitopatógenos aislados de arándano.

Se efectuaron dos ensayos para seleccionar los aislados bacterianos con capacidad antagónica. En el primer ensayo se probaron los 10 aislados bacterianos nativos de Sinaloa, con evaluaciones en previos estudios a nivel *in vitro*, en placas Petri en medio de cultivo agar nutritivo (AN). En el segundo ensayo se evaluaron 12 aislados de *Bacillus* nativos de Oaxaca, colocando el aislado de *Bacillus* a un extremo de la caja Petri y al otro extremo el fitopatógeno, técnica de confrontación dual y se incubaron a 37 °C. En ambos ensayos se utilizaron cuatro repeticiones (placas) en un diseño experimental completamente al azar, obteniendo 40 UE y 48 UE respectivamente. Se seleccionaron las bacterias que mostraron el mayor halo de inhibición en mm contra el patógeno confrontado.

5.6 Análisis estadístico de resultados *in vitro*.

Los resultados de ambos ensayos de selección *in vitro*: aislados de *Trichoderma* por su capacidad antagónica y aislados de *Bacillus* por su halo de inhibición, se sometieron a un ANOVA y comparación de medias de Tukey ($p \geq 0.05$) en el SAS (software versión 9.4, 2004). Sólo para el caso de los ensayos con *Trichoderma*, los resultados se transformaron con la escala de capacidad antagónica de Bell et al. (1982) y fueron sometidos a un análisis de varianza no paramétrico utilizando el mismo software SAS versión 9.4 (SAS, 2004).

5.7 Identificación molecular de cepas seleccionadas.

La técnica de identificación molecular se realizó sólo a los aislados benéficos que no habían sido identificados previamente en otros experimentos, mismos que obtuvieron los mejores resultados en la prueba de antagonismo *in vitro* realizada en este proyecto. Entonces, se definió llevar a cabo este análisis molecular a dos aislados de *Trichoderma* (TJ3 y TJ7) y uno de *Bacillus* (B17) que estaban identificados sólo a nivel morfológico en trabajos previos. La extracción de ADN de los aislados y la

caracterización molecular fue realizada con apoyo del Laboratorio de Inocuidad Agroalimentaria del CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa.

5.7.1 Extracción de ADN.

La extracción de ADN se realizó a partir de aislados fúngicos en medio PDA y bacterianos LB incubados a 25°C ± 2°C durante 7 días, se recurrió al protocolo del kit de extracción de ADN vegetal basado en CETAB SYNERGY 2.0 con algunas modificaciones.

Se colocaron 100 mg de micelio en un tubo eppendorf y se agregaron 500 µl de buffer CTAB. Se mezclo y agito a fondo, colocando lo homogenizado a un baño a 65°C durante 20 minutos (3% CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA pH 8, 100 mM Tris H pH 8, 0.2% Mercaptoetanol y Agua ultra pura). Tras periodo de incubación se macero y centrifugo a 13000 rpm durante 2 minutos, posterior a esto se recuperó el sobrenadante. Se añadió un volumen de 600 µl igual de cloroformo/alcohol (24:1), y se mezcló por inversión de 3 a 4 veces; se centrifugó nuevamente a 13000 rpm por 10 minutos; se transfirió la fase superior acuosa a un tubo (300 a 400 µl) y se agrego un volumen de 500 µl de isopropanol frio, invirtiendo de 3 a 4 veces y se incubo a -20° C durante 10 minutos para precipitar el ADN, posteriormente se centrifugo a 14000 rpm por 8 minutos decantando el sobrenadante sin alterar el pallet, el cual posteriormente se lavó con 500 µl de etanol al 70% frio y se disolvió. Se centrifugo a 14000 rpm por 5 minutos y se decantó. Se dejo secar el pallet a temperatura ambiente el tiempo suficiente para eliminar el alcohol, pero sin dejar secar completamente el ADN. Finalmente, se resuspendió en 500 µl de agua ultrapura y se almacenó a -20° C.

5.7.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La identificación a nivel especie se realizó recurriendo la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en ingles), como complemento de las características morfológicas para lo cual se realizó la amplificación de algunas regiones del genoma que codifican para diferentes proteínas; la región completa de los espaciadores internos transcritos (ITS) ITS1- (5’-TCCGTAGGTGAGCCTGCGG-3’)

e ITS4- (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al*., 1990) que amplifican de 650 a 750 pb. Los utilizados en bacterias fueron los siguientes; 357F (5'TAC GGG AGG CAG 3') y 1100R (GGG TTG CGC TCG TTG). (Yang, et al,. 2016).

La mezcla de reacción para lX consiste en agua ultrapura (UP) 17.25 µl; buffer IDX 2.5 µl; MGCL 50 µM 0.75 µl; dNTPS 10 µM 1.25 µl; primer 1 1 µl; primer 2 1 µl y DNA TAQpol (5 µ/ml) 0.25 µl, para cada uno de los iniciadores utilizados dando un volumen de mix de 24 µl para PCR al cual se le adiciona 1 µl de ADN para obtener un volumen final de 25 µl. Los cebadores utilizados fueron sintetizados por T4 Oligo/DNA Artificial (Irapuato, Guanajuato, México). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (MULTIGENE, Labnet International, Inc.) bajo las siguientes condiciones: La región de ITS del ADN ribosómico se amplifico utilizando los cebadores ITS1/ITS4 (White *et al*., 1990). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes, en la etapa inicial de desnaturalización a 95° C por cinco minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 95° C durante un minuto; alineación a 55° C; una extensión a 72° C durante un minuto y un paso final de extensión a 72° C durante 10 minutos y se finalizó con una temperatura de 12° C.

5.7.3 Electroforesis.

La calidad y concentración del ADN se cuantificó mediante un gel de agarosa al 2 y 0-8 %, la programación de la fuente de poder fue a 100 Voltios, 400 Hampers por un tiempo de 25 minutos. Los productos de PCR resultantes fueron visualizados en un espectrofotómetro NanoDrop 2000c de la marca Thermo Scientifc los cuales se preservaron a 4° C para su posterior purificación.

5.7.4 Purificación de productos de PCR.

La purificación de productos de PCR se llevó a cabo con base al protocolo QIA quick PCR Purification Kit (250) Cat. No. 28106. Inicialmente se agregaron cinco volúmenes de buffer PB por cada volumen de reacción de PCR; la mezcla se colocó en una columna QIA quick y se centrifugo a 13000 rpm por un minuto (para que el ADN se una a la columna) y se decantó el líquido que paso por la columna; para lavar se agregaron 750 µl de Buffer PEA a la columna y se dejó reposar por un minuto;

posteriormente se centrifugo a 13000 rpm por un minuto se decantó el líquido que paso por la columna y se centrifugó nuevamente a 13000 rpm por un minuto para secar la columna; posteriormente se colocó un tubo nuevo y limpio de 1.5 ml para eluir el ADN por lo que se agregaron 40 µl de H_2O de UP limpia tibia (50° C), se dejó reposar dos minutos y se centrifugo a 13000 rpm por un minuto. Finalmente se desechó la columna y se almaceno a -20° C.

Los amplicones resultantes fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa TAE 1X al 2 y 0.8%.

Figura 2. Esquema ilustrativo del proceso de caracterización molecular.

5.7.5 Secuenciación.

La secuenciación de los productos de PCR se realizó en el Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Medica Y Ambiental del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnología A.C. Los procedimientos de secuenciación automatizada se basaron en el método enzimático de la técnica de Sanger y Tecnología capilar, que suple el marcaje radioactivo con métodos quimio luminiscentes usando fluorocromos. Con este protocolo el fragmento de ADN fluorescente pasa por un punto de tensión del secuenciador automático y estas señales se envían a una computadora con un programa especial así, un golpe de laser excita la tinción fluorescente, la señal de fluorescencia emitida se digitaliza y se capta por detectores de una computadora que

analiza y descifra permitiendo observar los resultados en tiempo real. Para cada muestra secuenciada se crean curvas de cuatro colores uno por cada nucleótido y debajo de cada pico de la secuencia se indican los nucleótidos correspondientes al fragmento analizado (Gómez et al., 2013).

5.7.6 Análisis filogenético.

Las secuencias de los genes analizados se editaron en el programa SerialCloner 2.6.1 y se compararon con la base de datos del GenBank del NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) utilizando el algoritmo BLAST. La representación gráfica de una clasificación jerárquica es una dendograma o árbol filogenético que indica como se asocian los individuos objeto del análisis, a medida que disminuye su grado de semejanza entre ellos estos árboles generalmente van acompañados por un eje que indican la distancia y/o similitud a la que se han producido las diferentes uniones y se denominan índice de jerarquía. Para dividir o clasificar los individuos en grupos distintos basta con trazar una línea recta para el valor de índice determinado y observar los ¨clusters¨ construidos por debajo de dicho valor y se ignoran los agrupamientos que se producen a un valor superior (Bramardi, 2007).

5.8 Experimento en campo sobre evaluación de aislados de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. como promotores de crecimiento en el cultivo de arándano.

5.8.1 Preparación de inóculos con *Bacillus* spp.

Se preparo agar nutritivo para crecer las cuatro cepas de *Bacillus* spp. (B17, B21, B02 y B03) correspondiente las primeras dos al estado de Sinaloa y las otras dos al estado de Oaxaca. Una vez listas las cajas Petri con medio de cultivo (AN) se trabajó en campana de flujo laminar (Luzuren, Model: BBS-DDC) la cual se desinfecto con agua destilada, cloro y alcohol al 70, a lo último se encendiendo luz ultravioleta durante 15 minutos para eliminar todo tipo de patógeno que se encontrara en ella. Se sembraron 5 repeticiones de cada bacteria con un total de 20 cajas Petri y se dejaron en crecimiento en incubadora a 28° C durante 24 horas. Ya crecidas las bacterias se tomaron con una aza bacteriológica todas las esporas y se colocaron en caldo nutritivo

(BD Bioxon – Caldo Nutritivo), ya obtenido el producto final se montó sobre un agitador orbital (LUZEREN – KJ-201BD) durante 36 horas.

5.8.2 Preparación de inóculo con *Trichoderma* spp.

Se realizó la producción de inoculo mediante la técnica de Lewis y Papavisas (1984). Consistió en poner a crecimiento las cepas de *Trichoderma* nativas de Sinaloa (TJ3, TJ7) y *Trichoderma* nativas de Oaxaca (TK y TA) durante 5 a 7 días en cajas Petri con medio de cultivo PDA.

Se trituró paja de trigo en trozos entre 1 a 5 cm, se colocaron 200 g de paja en bolsas de polipapel, se le agregaron 200 mL de agua destilada. Se esterilizaron las bolsas a 121 °C por 15 minutos en autoclave a 20 lbs/pugd x 1 hora y al día siguiente de igual manera 1 hora. Después, ya esterilizada la paja se introdujo a la campana de flujo laminar (Luzuren, Model: BBS-DDC) y se sembró el micelio de *Trichoderma* dentro de la bolsa, se cerró y se observó que no tuviera perforaciones la bolsa para evitar cualquier contaminación, se dejó reposar en incubadora (BTC-9100 TERLAB) durante 28 días para que el hongo tuviera la oportunidad de reproducir sus esporas llenando completamente la paja de trigo.

5.8.3 Recolección de esporas.

En la cámara de aislamiento (Luzuren, Model: BBS-DDC) se realizó la extracción de inoculo madre de cada una de las cepas de *Trichoderma* spp. mediante el lavado de esporas contenidas en las bolsas con paja de trigo, las cuales se añadieron a matraces Erlenmeyer con capacidad de 1 L previamente esterilizados, después el inoculo recolectado se resguardó en refrigeración a 4°C hasta su utilización.

5.8.4 Conteo de esporas.

Se determinó la concentración de 1 mL mediante la técnica del conteo de esporas, utilizando una cámara de neubauer. Ésta consiste de una lámina de cristal de una dimensión aproximada a la de una lámina de portaobjetos, pero de mayor grosor, tiene ranuras en forma de H, con rieles a cada lado que sostienen un cubre objeto grueso

especial a una distancia de 0.1 mm por encima de las dos porciones interiores de la H, que forman dos cámaras entre éstas y el cubreobjetos. El fondo de cada una de las cámaras tiene un rayado de 9 mm^2 (3 mm por lado) dividido en 9 cuadrados principales (C.P.) de 1 mm por lado, de los cuales se cuenta arbitrariamente el contenido de cinco: los cuatro de las esquinas y el central. Esto con el fin de calcular la concentración de esporas y mediante la técnica de dilución se logró el inoculo a una concentración de $1x10^7$ esporas mL^{-1} para su aplicación.

5.9 Establecimiento del experimento en campo (Campo 4 y El Carrizo).

Se llevo a cabo la aplicación de inóculos de *Triochoderma* y *Bacillus* en campo durante el mes de febrero y marzo 2024, en dos lotes de productores cooperantes correspondientes al Campo 4 y El Carrizo.

5.9.1 Ubicación y localización de la zona de estudio.

5.9.1.1 Lote experimental 1: Campo 4 “La Franca”.

El experimento 1 de evaluación de inóculos con *Trichoderma* y *Bacillus* se llevó a cabo en el Campo 4 “La Franca”, El Fuerte, Sinaloa, en un campo de producción de arándano de un productor cooperante, ubicado en la siguiente coordenada: 25°52'16.8"N 108°55'11.1"W (Figura 3).

Figura 3: Ubicación del Campo “La Franca” en el Fuerte, Sinaloa. Correspondiente al Experimento de evaluación 1 (Google maps, 2024).

5.9.1.2 Lote experimental 2: Campo “Grupo Sanfinsa”.

El experimento 2 de evaluación de inóculos con *Trichoderma* y *Bacillus* se llevó a cabo en el Campo “Grupo Sanfinsa” Carrizo, Ahome, Sinaloa, en un campo de producción de arándano de un productor cooperante, ubicado en la siguiente coordenada: 26°14'19.5"N 108°52'13.0"W (Figura 4).

Figura 4: Ubicación del Campo “Grupo Safinsa” en el Carrizo, Sinaloa. Correspondiente al Experimento de evaluación 2 (Google maps, 2024).

5.9.2 Manejo del cultivo.

El manejo de la planta inició desde la instalación de macetas, con el sustrato a base de fibra de coco, el cual fue lavado durante 10 días con riegos largos para poder bajar la conductividad eléctrica, ya era CE de 2.6 $ds.m^{-1}$ y la óptima para el cultivo de arándano es de 1.5 $ds.m^{-1}$, posteriormente se realizó la plantación y se colocó el sistema de riego para realizar fertilización en campo. El pH que manejan dentro de la membrana para la fertiirrigación es de 6.9 a 7.2, aplicando fertilización dependiendo la etapa en la que se encontraba el cultivo y acidificando con ácido sulfúrico, bajando el pH a 4.8 para que la planta pudiera asimilar todos los nutrientes proporcionados.

5.9.3 Inoculación en campo.

En ambos experimentos (1 y 2) de campo, la inoculación se llevó a cabo vía foliar y vía drench, aplicando foliar un total de 25 veces con un atomizador de 1 L y drench se agregaron 20 mL de inoculo directamente a la raíz, realizando 5 aplicaciones, con un intervalo de 15 días entre cada aplicación.

5.10 Tratamientos y Diseño experimental.

Para los dos experimentos de campo (1-Campo 4: La Franca y 2-Campo: Grupo Sanfinsa), se evaluaron 10 tratamientos, descritos a continuación: 2 cepas de *Trichoderma* nativas de Sinaloa (TF y TJ3); 2 cepas de *Trichoderma* nativas de Oaxaca (TA y TK), 2 cepas de *Bacillus* nativas de Sinaloa (B17 y B21); 2 cepas de *Bacillus* nativas de Oaxaca (B02 y B03) y 2 testigos comerciales (*Trichoderma*=T22 y *Bacillus*=FUNGIFREE) con 3 repeticiones, bajo un diseño experimental completamente al azar, con un total de 30 unidades experimentales en cada lote experimental.

5.11 Variables medidas.

5.11.1 Altura de planta.

La altura de planta se tomó de la siguiente manera: Se identificó el tallo principal con la longitud más alta para su medición, se colocó un flexómetro desde la base de la corona de la planta hasta el ápice de este mismo. La primera medición se tomó en el mes de febrero y la segunda medición se tomó en marzo de 2024. Las medidas se reportaron en centímetros (cm).

5.11.2 Diámetro de tallo.

Se tomó la medida del ancho del tallo con un calibrador vernier digital (HER-411) Steren, considerando como punto clave los tallos emergentes después de la guía de la poda anterior. Las medidas se reportaron en milímetros (mm).

5.11.3 Número de ramificaciones.

Las ramificaciones se tomaron en todos los tallos y se contó los números de ramificaciones o yemas que dieron producción. Se contaron visualmente y se marcó con etiquetas cada tallo medido, se utilizó un contador manual (CON-10M PRETUL) para su apoyo y se reportaron en números naturales (N).

5.11.4 Número de flores.

En el conteo se realizó con el apoyo de un contador manual (CON-10M PRETUL), identificando cada flor, etiquetándose después de ser contados para que no se repitiera el conteo y se reportaron en números naturales (N).

5.11.5 Producción (peso total de frutos).

La cosecha se realizó en marzo-abril, a plantas con 4 años de edad (Campo 4: La Franca, El Fuerte) y 4.5 años (Campo: Grupo Safinsa, El Carrizo), mediante cortes de fruta de forma manual, se llevó al pesado del fruto obtenido en cada tratamiento, con una báscula digital (SF-400), se tomaron los datos después de cada corte (en total 10 cortes). Al final se obtuvieron los datos y fueron reportados en gramos (g).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Identificación morfológica de los aislados fitopatógenos y benéficos.

La identificación morfológica de *Pestalotia* sp. mostró; Colonias de color blanco, con zonas amarillentas en la parte aérea del micelio, los conidios son estrechos en los extremos, rectos o curvos, el apéndice basal es hialino, simple y rara vez se ramifica coincidiendo con la clave taxonómica de Maharachchikumbura (2013).
En el caso de *Alternaria* sp. se observaron las siguientes características coincidiendo con la clave taxonómica de Barnett y Hunter (1998): micelio algodonoso, incrustado en la parte interna del medio de cultivo, conidios en cadenas ramificadas, colonias verdes y/o grises, de 45 mm de diámetro. Y para *Cladosporium* sp. las características fueron; Hifas finas, septadas, ramificadas de color hialino a marrón, las hifas sostienen cadenas ramificadas de conidios unicelulares o cilíndricos, forman colonias vellosas, según con Barnett y Hunter (1998).

Los aislados de *Trichoderma* spp. (TJ3 y TJ7) obtenidos en estudios previos, pero sin identificación morfológica reportada, presentaron: micelio septado, conidióforo hialino muy ramificado, fiálides individuales o en grupos y conidios color verde pardo en forma ovoide, lo cual coincide con la clave taxonómica reportada por Barnett y Hunter (1972).

6.2 Selección *in vitro* de las mejores cepas de *Trichoderma* spp. nativas con potencial antagónico contra fitopatógenos aislados en arándano.

En cuanto a los resultados del PICM del primer ensayo a los 10 días en cultivo dual de *Trichoderma* spp. nativas del norte de Sinaloa contra los fitopatógenos obtuvimos: en *Pestalotia* sp. el valor más alto lo obtuvieron las cepas TJ3 (85.3 %) y TB (83.5 %); sin diferencia significativa entre ellas, pero si con el resto de cepas evaluadas ($p \geq 0.05$); en *Alternaria* spp. los valores por cepa obtenidos de mayor a menor correspondieron a: TJ3 (90.1%), TF (89.7%), TJ7 (88.4%), TB (88.3%) y TM (87.9%), sin diferencias significativas entre sí ($p \geq 0.05$); y en *Cladosporium* sp. el valor más alto lo obtuvieron las cepas TJ7 (77.5%) y TF (76.8%), sin diferencia entre sí, pero presentando diferencia significativa con el resto de las cepas ($p \geq 0.05$). En los resultados del PICM

del segundo ensayo a los 10 días en cultivo dual de *Trichoderma* spp. nativas del estado de Oaxaca contra los fitopatógenos: contra *Pestalotia* sp. el mayor valor lo obtuvieron TA (79.2%) y TE (78.5%) sin diferencia significativa entre ellas, pero si con el resto de tratamientos ($p \geq 0.05$), contra *Alternaria* sp. lo obtuvo TK (82.4%) y TA (78.3%) sin diferencia significativa entre ellas, pero si entre las demás cepas ($p \geq 0.05$) y contra *Cladosporium* sp. el mayor PICM lo obtuvo TK (83.7%), seguido de TJ y TL con valores de 81.4% y 80.2% respectivamente, sin diferencias significativas entre ellas pero si con el resto de los tratamientos analizados ($p \geq 0.05$). Todas las cepas evaluadas en ambos ensayos mostraron Clases 1 y 2 de capacidad antagónica contra los fitopatógenos (valores 1.0 a 2.5), según la escala de Bell et al. (1982). Los resultados coinciden con Zuñiga-Mendoza et al. (2017) donde el PICM fue de 17.4% frente a *Sclerotium rolfsii* y 22.2% contra *S. cepivorum* a los 3 y 5 días, respectivamente. *Trichoderma harzianum* obtuvo el grado 1 de antagonismo sobre *S. cepivorum* y grado 2 contra *S. rolfsii,* en la escala. Lo que garantiza que estas cepas poseen características significativas por su elevada velocidad de crecimiento y buena competencia por espacio y nutrientes a nivel *in vitro.* Por los resultados anteriores, se seleccionaron las cepas TJ3 (*T. harzanum*) y TF (*T. virens*) nativas de Sinaloa y los aislados TK y TA (ambos *Trichoderma* sp.) nativos de Oaxaca, para posteriormente ser inoculadas en el experimento de evaluación en campo, para medir su efecto como promotores de crecimiento en arándano.

6.3 Selección *in vitro* de las mejores cepas de *Bacillus* spp. nativas con potencial de inhibición contra fitopatógenos aislados en arándano.

De las muestras de la rizosfera de aguacate, se obtuvieron 12 aislados de *Bacillus* spp. nativos de Oaxaca: (B01, B02, B03, B04, B05, B06, B07, B08, B09, B010, B011 y B012). De los 10 aislados de *Bacillus* spp. nativos de Sinaloa seleccionados por su mayor capacidad antagónica desmostrada en evaluaciones de previas (B14, B6, B21, B18, B15, B13, B23, B27, B8 y B17). En el ensayo 1: aislados nativos de Oaxaca, en inhibición contra *Pestalotia* sp. el aislado B03 y contra *Alternaria* sp., el aislado B02, obtuvieron los mayores valores (2.04 cm y 1.97 cm) respectivamente, ($p \geq 0.05$), y contra el *Cladosporium* sp. el mayor valor lo obtuvo B05 (1.86 cm) presentando

diferencias significativas con el resto de aislados ($p \geq 0.05$). Por lo tanto, con intención se probar el efecto de control biológico y promoción de crecimiento en el experimento de campo, se seleccionaron los aislados B03 (*Bacillus* sp.) y B02 (*Bacillus* sp.) que mostraron mayor efecto antagónico y con ellos se efectuaron las inoculaciones en el cultivo de arándano (Lote 1 y Lote 2). En el ensayo 2: aislados nativos de Sinaloa, en inhibición contra *Pestalotia* sp. el mayor valor lo obtuvo B21 (2.42 cm), en la confrontación contra *Alternaria* sp. el valor más alto de inhibición lo mostró el aislado B17 (2.45 cm) y en la prueba contra *Cladosporium* sp. la mayor capacidad antagónica la presentó la cepa B14 con un valor de inhibición de 2.37 cm ($p \geq 0.05$), presentandose diferencias significativas en las evaluaciones contra los tres fitopatógenos. Por lo resultados anteriemente descritos, con la intención de probar el efecto de biocontrol y promoción de crecimiento en campo, se seleccionaron los aislados B17 (*Bacillus* sp.) y B21 (*Bacillus subtilis*) por mostrar la mayor capacidad antagónica y con ellos se efectuaron las inoculaciones en el cultivo de arándano.

6.4 Identificación molecular.

6.4.1 Electroforesis.

Se obtuvo ADB de buena calidad, con una concentración en µg/µL con un rango de aproximación de pureza de 1.85 en el espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop 2000c. Los productos de PCR fueron de aproximadamente 750 pares de bases (pb) para ITS y 1000 pb para 357F (Figura 5).

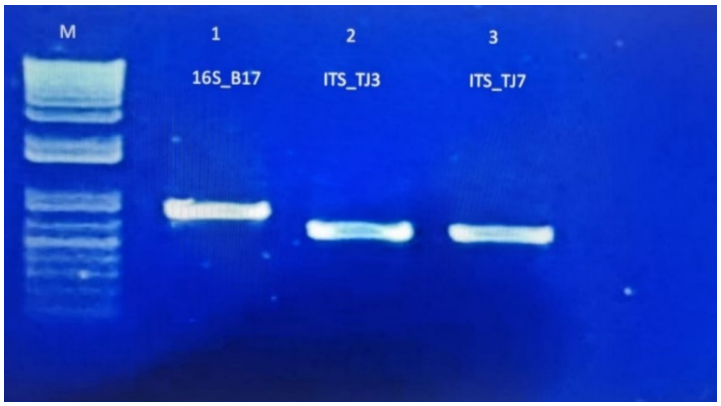

Figura 5. Gel de electroforesis de agarosa al 0.8% con amplificación de muestras de *Trichoderma* sp. para ITS 650 pb. (carril 2 y 3) y *Bacillus* sp. para 16S 750 pb (carril 1).

Electroforesis en gel de agarosa (1.2 %) de productos de PCR de la región de los espaciadores internos transcritos (ITS) de los aislados fúngicos de arándano. En la línea MM se muestra el marcador molecular 1 kb (Promega@). En los carriles 2 y 3 se muestran los productos de PCR de los aislados TJ3 y TJ7, también se presentan la bacteria con productos de PCR 357F y 1100R de los aislados bacteriológicos de arándano. En el carril 1 se muestra el producto del aislado B17.

6.4.2 Análisis filogenético.

Los aislamientos de la especies de *Trichoderma* se identificaron a partir de los análisis filogenéticos de estimación por parámetros UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) y una prueba de filogenia Bootstrap method de 1000 repeticiones y un modelo Gamma Distributed (G) de la región completa de ITS (ITS1 y ITS4) de acuerdo con la filogenia se obtuvieron clados bien definidos correspondientes a las especies de *Trichoderma* previamente descritas, agrupando los aislados TJ3 y TJ7. Donde a TJ3 y TJ7 los confirma como *Trichoderma harzianum* (Figura 6), y al aislado B17 lo identifica con *Bacillus cereus* (Figura 7).

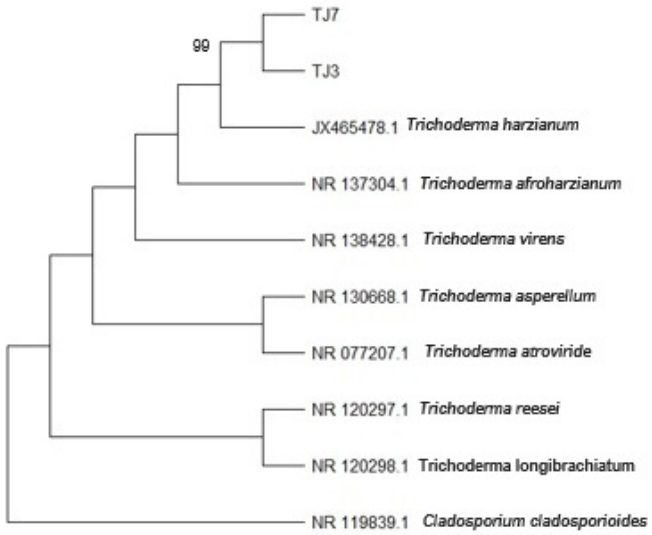

Figura 6. Árbol filogenético del método UPGMA de las secuencias representativas del gen de los aislados fúngicos TJ3 y TJ7 para los aislados fúngicos del género *Trichoderma* y una cepa de referencia *Cladosporium cladaosporioides*.

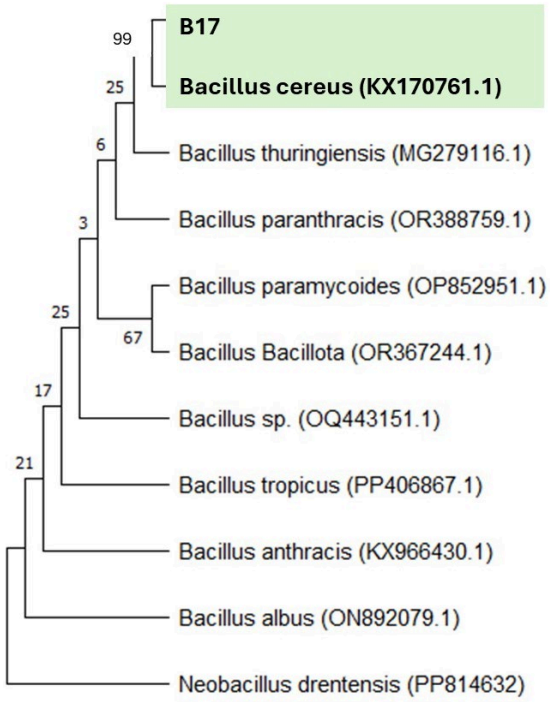

Figura 7. Árbol filogenético del método UPGMA de las secuencias representativas de la bacteria B17 para los asociados bacteriológicos del género *Bacillus* y una cepa de referencia *Neobacillus drentensis,* utilizando el modelo GTR+G+I por tener el mayor parámetro entre todos los modelos compatibles con un 99%, con un total de 1000 réplicas.

6.5 Experimento en campo sobre evaluación de aislados de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. como promotores de crecimiento en el cultivo de arándano.

6.5.1 Altura de planta.

La Altura de planta varió desde 1.40 hasta 1.12 m. En este parámetro no se presentaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$), probablemente por la variación entre plantas que nos dan una gran desviación estándar, los valores más altos en cuanto a altura de planta se dan en aquellos tratamientos de cepas nativas de Sinaloa, tanto de *Bacillus* (B21= *B. subtilis*) como de *Trichoderma* (TF= *T. virens*) (Figura 8).

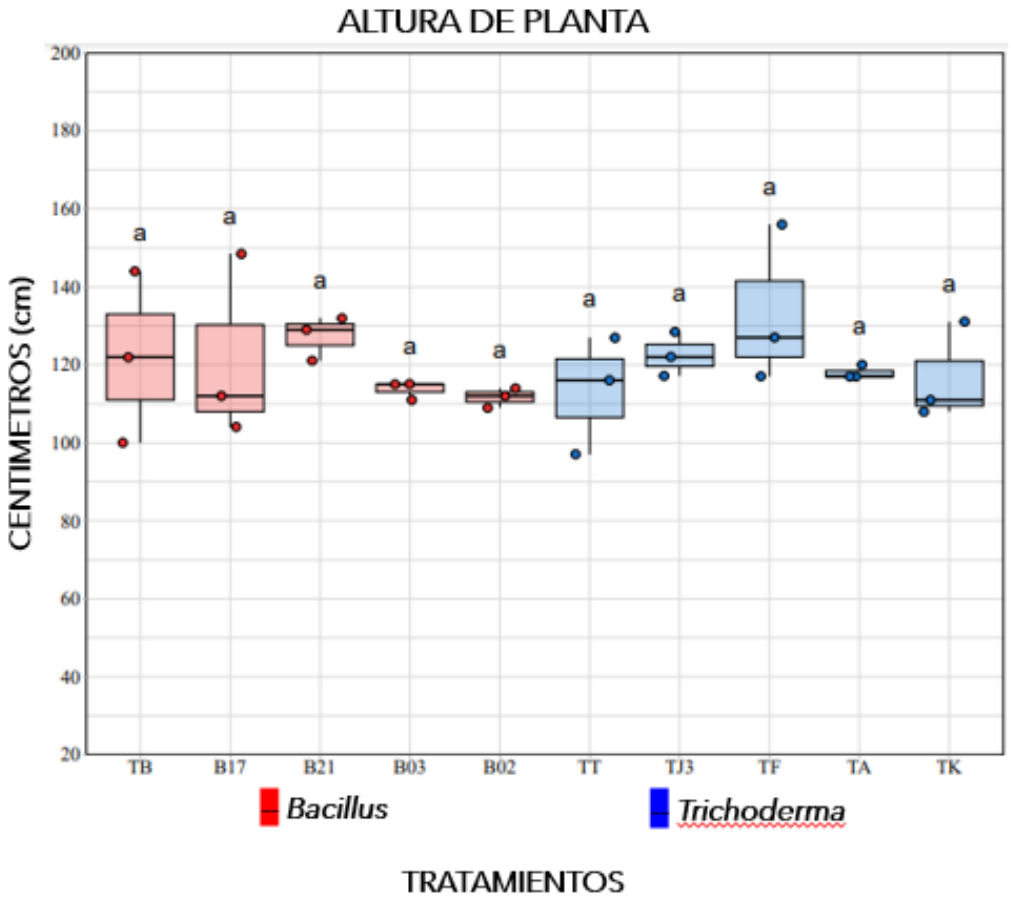

Figura 8. Resultado del parámetro Altura de planta medido en los 10 tratamientos establecidos en campo.

6.5.2 Diámetro de tallo.

El Diámetro del tallo varió desde 8 hasta 13 mm. No se presentaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$), probablemente por la variación entre plantas, sin embargo, el tratamiento con tendencia a una mayor respuesta es el de *Trichoderma* (TF= *Trichoderma virens*), específicamente, los aislados nativos de Sinaloa (Figura 9).

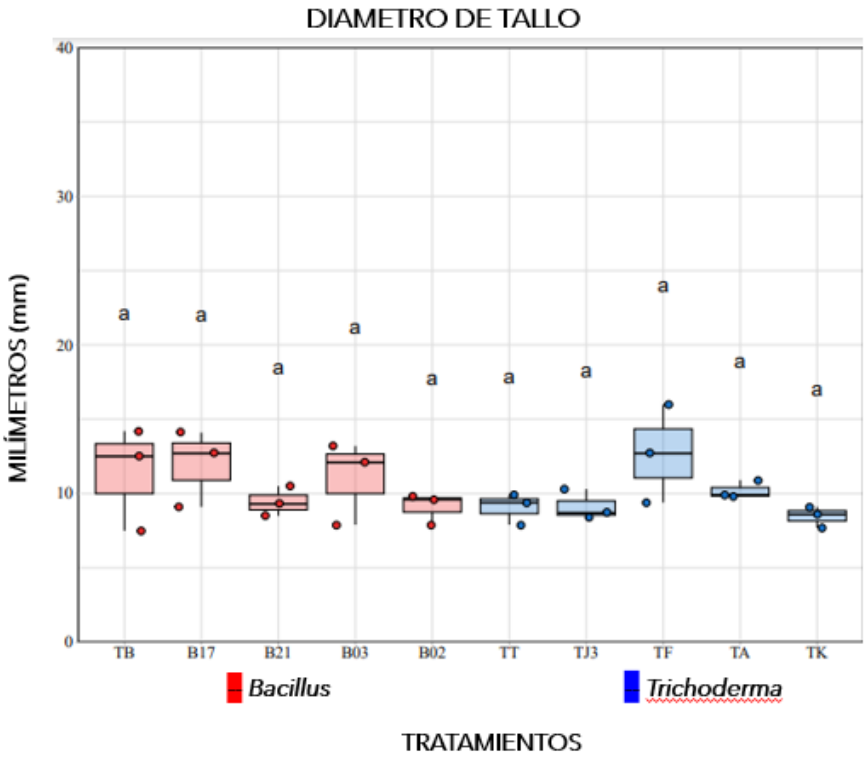

Figura 9. Resultado del parámetro Diámetro de tallo medido en los 10 tratamientos establecidos en campo.

6.5.3 Número de ramificaciones.

El Número de Ramificaciones varió entre 38 hasta 83. No se presentaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en cuanto al número de ramificaciones, sin embargo, los tratamientos con medias más altas son aquellos donde se inoculo con la cepa de *Bacillus* nativa de Sinaloa (B17=*B. cereus*) y el nativo de Oaxaca B03 (*Bacillus* sp.) cuando se compara con una cepa de *Bacillus* comercial, los aislados nativos tanto de Sinaloa como de Oaxaca parecen tener mejor respuesta en este parámetro (Figura 10).

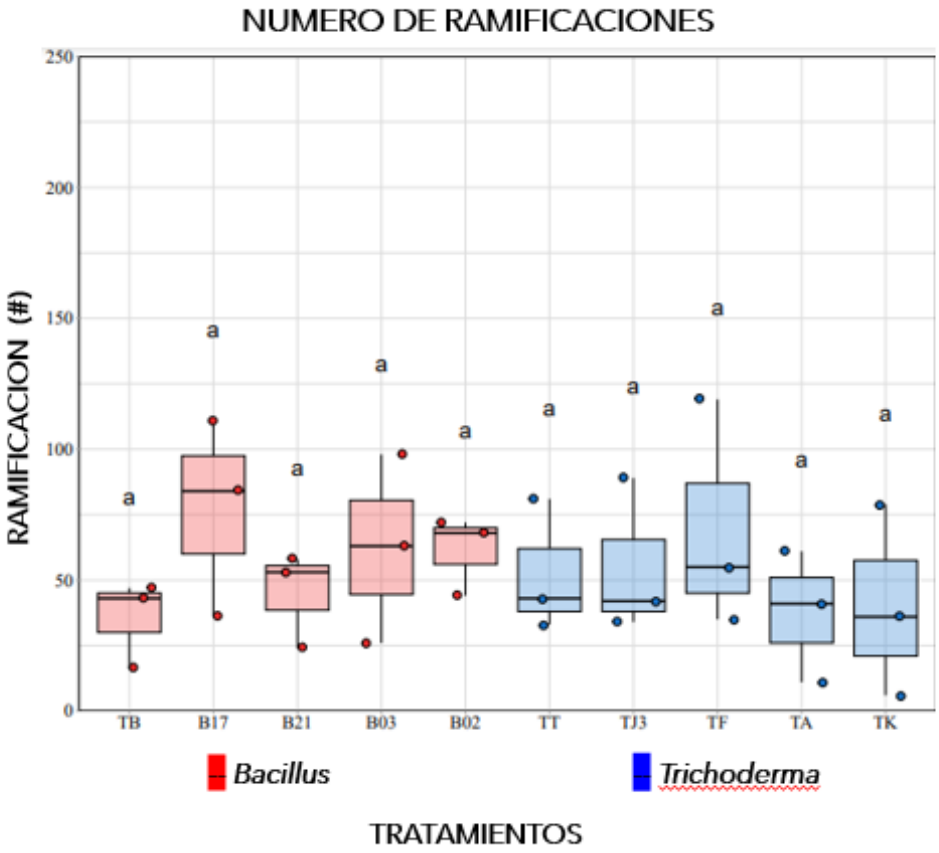

Figura 10. Resultado del parámetro Número de ramificaciones medido en los 10 tratamientos establecidos en campo.

6.5.4 Número de flores.

El Número de flores varió de 150 a 42. Y aun cuando no se presentan diferencias significativas ($p \leq 0.05$), probablemente por la variación entre plantas, el tratamiento que induce mayor floración es el aislado B03 (*Bacillus* sp.*)* nativo de Oaxaca, y la cepa de *Trichoderma* (TF= *T. virens*) nativa de Sinaloa (Figura 11).

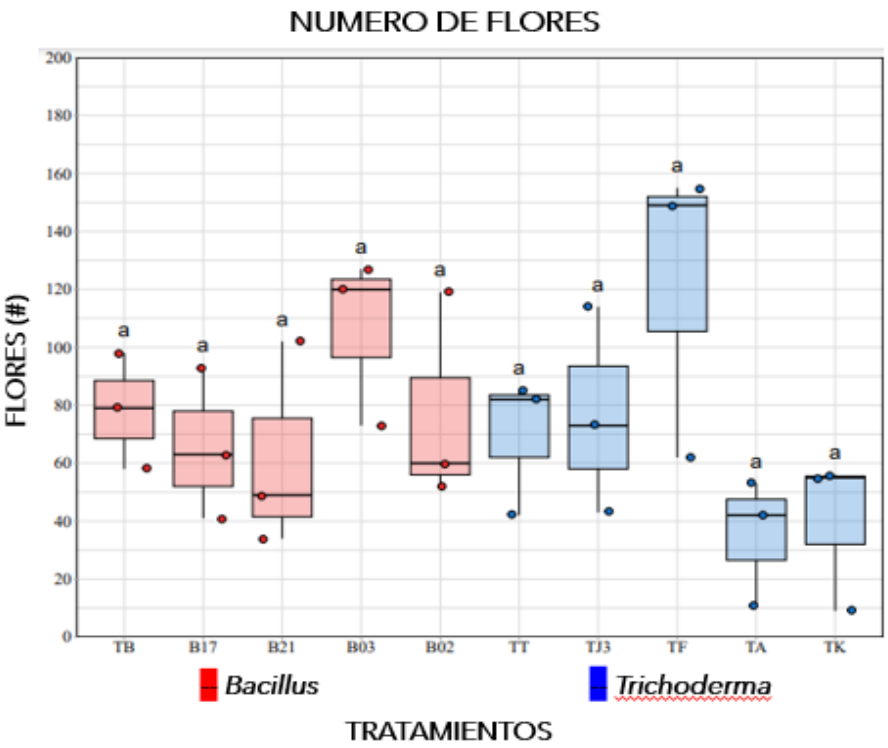

Figura 11. Resultado del parámetro Número de flores medido en los 10 tratamientos establecidos en campo.

6.5.5 Peso total de frutos.

La producción varió entre 1000 a 1600 gramos (1.0 a 1.6 kg), y no se presentaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$), probablemente por la variación entre plantas que nos dan una gran desviación estándar, los valores más altos en cuanto a Peso total de Frutos se da en los tratamientos B17 (*Bacillus cereus*) y B03 (*Bacillus* sp.), el primero un *Bacillus* aislado de Sinaloa y el segundo un *Bacillus* aislado de Oaxaca, en cuanto a este rasgo agronómico parece tener un mayor efecto los tratamientos con *Bacillus* que con *Trichoderma*, y la mayoría de los aislados de Sinaloa y Oaxaca parecen tener una mayor respuesta que el *Bacillus* comercial (Figura 12).

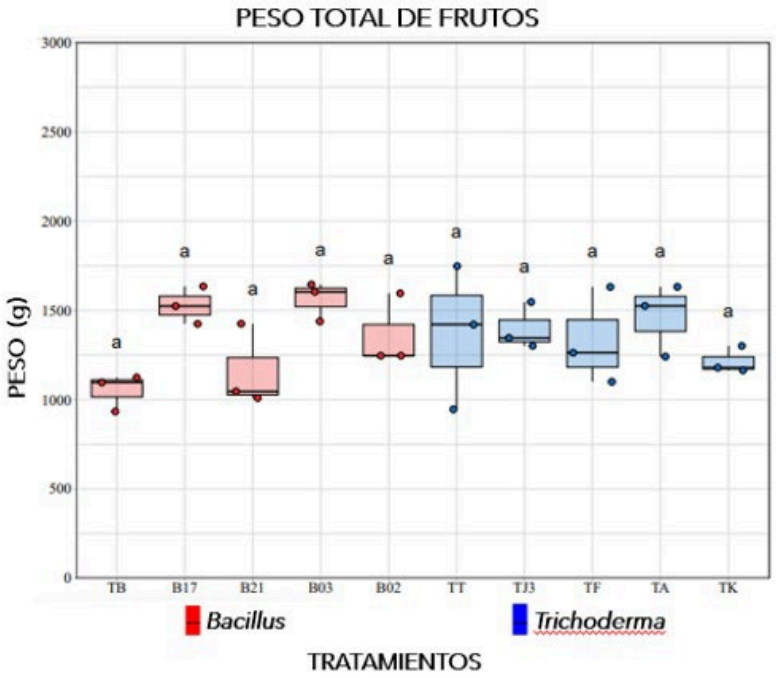

Figura 12. Resultado del parámetro Peso total de frutos medido en los 10 tratamientos establecidos en campo.

VII. CONCLUSIONES

- Se aislaron e identificaron morfológicamente tres fitopatógenos causales de enfermedades en el cultivo de arándano provenientes de la región norte de Sinaloa: *Pestalotia* sp., *Alternaria* sp. y *Cladosporium* sp.
- Se obtuvieron nueve aislados de *Trichoderma* spp. y 12 aislados de *Bacillus* spp. de muestras de la rizosfera de aguacate provenientes del estado de Oaxaca, las cuales se identificaron con claves morfológicas.
- Las cepas de *Trichoderma* spp. nativas de Sinaloa seleccionadas *in vitro* por su mayor capacidad antagónica coincidiendo frente a los tres fitopatógenos aislados fueron TJ3 y TF (*T. virens*), lo que las hace potenciales para futuras evaluaciones en el biocontrol de enfermedades en el cultivo de arándano.
- Los aislados de *Trichoderma* nativos de Oaxaca seleccionados *in vitro* por mostrar la mayor capacidad de inhibición fueron TK, TA y TJ contra *Pestalotia* sp., *Alternaria* sp. y *Cladosporium* sp. respectivamente, sin embargo, presentaron valores de antagonismo más bajos en comparación con las cepas nativas de Sinaloa.
- Todas las cepas de *Trichoderma* seleccionadas mostraron capacidad en clases 1 y 2 de antagonismo a nivel *in vitro* contra los fitopatógenos, según la escala de Bell et al. (1972).
- Las cepas de *Trichoderma* spp. nativas de Sinaloa tuvieron un crecimiento micelial más rápido a comparación con las nativas de Oaxaca, en igualdad de condiciones a temperatura ambiente, lo cual es un indicativo de que las cepas de Sinaloa están mayormente adaptadas a las condiciones climáticas de nuestra región, comparadas con las cepas provenientes de otra región del país.
- La identificación molecular y análisis filogenético de los mejores aislados de *Trichoderma* (TJ3 y TJ7) mostraron ambos un 99% de similitud con *T. harzianum*, así mismo, con el análisis filogenético se logró confirmar la identidad del aislado B17 como *Bacillus cereus*.

- En ambos experimentos de inoculación en campo, se observaron tendencias favorables en varios de los parámetros agronómicos medidos al utilizar bioinoculantes a base de *Bacillus* y *Trichoderma* nativas en comparación con las cepas comerciales. Aunque en este trabajo de investigación, no se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en los parámetros: Altura de planta, Diámetro de tallo, Número de ramificaciones, Número de flores y Producción de frutos, los tratamientos con las cepas nativas mostraron consistentemente mejores resultados. En particular, las cepas de *Bacillus* (B17 nativa de Sinaloa y B03 nativa de Oaxaca) y *Trichoderma* (TF nativa de Sinaloa) demostraron claramente tener un mayor impacto positivo en la producción de frutos y otros parámetros evaluados, por lo que podrían ser consideradas para posteriores evaluaciones como promotores de crecimiento en el cultivo de arándano contemplando estas y otras variables en campo.
- Estos resultados sugieren que, a pesar de la variación individual entre plantas y la alta desviación estándar, las cepas de *Bacillus* y *Trichoderma* nativas podrían ser más efectivas que las cepas comerciales en mejorar ciertos aspectos del crecimiento y productividad de las plantas en nuestra región. Por lo tanto, su uso podría considerarse una estrategia viable para optimizar el rendimiento agrícola en las regiones estudiadas.
- Como perspectiva futura, será necesario realizar estudios con poblaciones más grandes para confirmar estas tendencias y establecer conclusiones más robustas y fundamentadas sobre la efectividad de estas cepas nativas en diferentes contextos agrícolas.

VIII. LITERATURA CITADA

Anguiano Cabello, J. C., Flores Olivas, A., Olalde Portugal, V., Arredondo Valdés, R., Laredo Alcalá, E. I. 2019. Evaluation of *Bacillus subtilis* as promoters of plant growth. Revista Bio Ciencias 6, e418. doi: https://doi.org/10.15741/revbio.06.e418

Barnett HL, Hunter BB. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. 3th. Ed. Minneapolis: Burgess Publishing Company. Minneapolis. 241 p.

Bell D, Well H, Markham C. 1982. "*In vitro*" antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Phytopathology 72: 379-382.

Candelero, D., Cristobal, A., Reyes, R., Tun, S., Gamboa, A., & Ruiz, S. 2014. Trichoderma spp. promotoras del crecimiento en plántulas de *Capsicum chinense*. OYTON, 113-119. Obtenido de https://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1003/519/1/2015_AI_id37069_Marcela_Gamboa.pdf

Carrasco F., Jorge, Millas O., Paz, Santelices S., Cecilia y Castro F., Jean Franco. 2020. Identificación de microorganismos [en línea]. Chillan: Boletin INIA - Instituto de Investigaciones Agropecuarias. no. 428. p. 157-182. Disponible en: https://hdl.handle.net/20.500.14001/67169

Castillo, C. (2008). Manual de Buenas Prácticas Agrarias Sostenibles. Obtenido de https://donana.es/source/MANUAL%20FRUTOS%20ROJOS.pdf

Chuez Cepeda, J. M. 2018. *Trichoderma harzianum* en el control de *Rhizoctonia solani* y *Gaeumannomyces graminis* en el cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.), en la zona de Babahoyo (Bachelor's thesis, Babahoyo: UTB, 2018).

Eck, P. (1989). Blueberry Management. Small Fruit Crop Management., 273-333.

Flores, D., Vázquez, M., y Beltrano, J. M. 2014. Efecto de la fertilización cálcica sobre el rendimiento y tamaño de fruto en arándano alto del sur (*Vaccinium corymbosum* L.). Horticultura Argentina, 31-36.

Endara, B. M. 2009. Reproducción del hongo *Trichoderma harzianum* (biofungicida) aprovechando desechos agroindustriales (residuos de papa, tamo de frejol, bagazo de caña). ecuador: universidad técnica del norte. Facultad de ingeniería en ciencias agropecuarias y ambiental e industrial. chilean journal of agricultural & animal sciences, 35(1), 98-112 doi.org/10.4067/s0719-38902019005000205.

Ezziyyani, M., Perez, C., Sid A., Requena, M., Candela, M. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). Anales de la biología, 35-45. Disponible en línea: https://www.um.es/analesdebiologia/numeros/26/PDF/05-TRICHODERMA.pdf

Flores, D., Vázquez, M., & Beltrano, J. M. (2014). Efecto de la fertilización cálcica sobre el rendimiento y tamaño de fruto en arándano alto del sur (*Vaccinium corymbosum* L.). Horticultura Argentina, 31-36.

FMC. (30 de 11 de 2021). FICHA TECNICA - FUNGIFREE. Obtenido de https://fmcagroquimica.com.mx/wp-content/uploads/2023/03/Ficha-Tecnica-Fungifree-AB.pdf

García, J., González, G., Ciordia, M. (2013). Situación actual del cultivo del arándano en el mundo. Tecnología agroalimentaria, 5-8. Disponible en: http://serida.org/pdfs/5566.pdf

González A., Carillanca J. R. S., Raihuén A.F., Quilamapu H.U.Q., Quilamapu P.R., Morales A.C.G., Hirzel C.R.J., Quilamapu A.P. L., Bruno, C.D.B., Becerra, C. 2017. Manual de manejo agronómico del arándano. Boletín INIA Nº 371. Santiago, Chile. NR40907.pdf (inia.cl) Disponible en:

https://biblioteca.inia.cl/bitstream/handle/20.500.14001/6673/NR40907.pdf?sequence=41

Guzmán-Guzmán, P., Kumar, A., de los Santos-Villalobos, S., Parra-Cota, F.I., Orozco-Mosqueda, M.d.C., Fadiji, A. E., Hyder S., Babalola O.O & Santoyo, G. 2023. *Trichoderma* Species: Our Best Fungal Allies in the Biocontrol of Plant Diseases—A Review. Plants, 12 (3), 432. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/367204204_Trichoderma_Species_Our_Best_Fungal_Allies_in_the_Biocontrol_of_Plant_Diseases-A_Review

Hermosa, M. R., Grondona, I., Iturriaga, E. T., Diaz-Mínguez, J. M., Castro, C., Monte, E. y García-Acha, I. J. A. E. M. 2000. Caracterización molecular e identificación de aislados de biocontrol de *Trichoderma* spp. Microbiología Aplicada y Ambiental, 66(5), 1890-1898.

Hernandez M., Inglada L., Millan C., Bernabé N., Ayala J., 2021. Aportacion social, económica y ambiental del sector obtentor al cultivo, distribución y consumo del arandano. Disponible en: https://www.anove.es/wp-content/uploads/2021/11/Documento-Arandano-vF2.pdf

Infoagro. (2018) Articulos técnicos INFOAGRO. Disponible en: https://www.infoagro.com/documentos/el_cultivo_del_arandano.asp

INTAGRI. (2017). Articulos tecnicos INTAGRI, 3. Disponible en: https://biblioteca.inia.cl/bitstream/handle/20.500.14001/6673/NR40907.pdf?sequence=41.

Kole, C. 2011. Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources. Springer Heidelberg Dordrecht London New York. 264 pp DOI 10.1007/978-3-642-16057-8

Lewis, J.A. & G.C. Papavizas. 1984. A new approach to stimulate population proliferation of *Trichoderma* species and other potential biocontrol fungi introduced into natural soils. Phytopathology 74: 1240-1244.

López-Valenzuela, BE., Tzintzun-Camacho, O., Armenta-Bojórquez, AD., Valenzuela-Escoboza, FA., Lizárraga-Sánchez, GJ., Ruelas-Islas, JR. y González-Mendoza, D. 2022. Microorganisms of genus *Trichoderma* as phytohormone promoters and pathogen suppressors. Bioagro. 34(2): 163-172. http://www.doi.org/10.51372/bioagro342.6

Luna, R., Rivera, A., Tovar, G., Vázquez D. 2016. DIAGNÓSTICO DE LA PRODUCCIÓN DE ZARZAMRA (*Rubus* sp.) EN LA ZONA CENTRO DE VERACRUZ, MEXICO. Agroproductividad, 34-38. Disponible en: https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/768/634

Matas-Baca, M. A., Flores-Córdova, M. A., Pérez-Álvarez, S., Rodríguez-Roque, M. J., Salas-Salazar, N. A., Soto-Caballero, M. C., & Sánchez-Chávez, E. 2023. *Trichoderma* fungi as an agricultural biological control in Mexico. Revista Chapingo Serie Horticultura, 29(3), 79-114. doi: https://www.scielo.org.mx/pdf/rcsh/v29n3/2007-4034-rcsh-29-03-79.pdf

Mesa, A., Marin, A., & Calle, J. 2019. Metabolitos secundarios en Trichoderma spp. y sus aplicaciones. Actualidades Biologicas, 32-44. Obtenido de http://www.scielo.org.co/pdf/acbi/v41n111/0304-3584-acbi-41-111-32.pdf

Mondragon, F. A., López M. J., Ochoa A. S., Gutierrez C., M. 2012. Hongos Asociados a la Parte Aérea del Arándano en Los. Revista mexicana de fitopatologia , 141-144. Disponle en: https://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v30n2/v30n2a4.pdf

Muñoz S., Carlos. 1988. Arándano: Antecedentes generales [en línea]. Temuco, Chile: Serie Carillanca. Seminario: El cultivo del arándano. no. 02 (p. 5-13). Disponible en: https://hdl.handle.net/20.500.14001/31243

Muñoz-Vega1, P. Serri, H., Lopéz, M.D. Faundez, M. y Palma, P. 2017. EFECTO DE DIFERENTES INTENSIDADES DE PODA SOBRE EL RENDIMIENTO Y CALIDAD DE FRUTA EN ARÁNDANO (*Vaccinium corymbosum* L.) Cv. BRIGITTA. Chilean J. Agric. Anim. Sci., ex AgroCiencia. 33(3):285-294

Nosheen, S., Ajmal, I., Song, Y. 2021. Microbes as Biofertilizers, a Potential Approach for Sustainable Crop Production. Sustainability. 13, 1868. http://doi.org/10.3390/ su13041868

Ohba M, Aizawa K. 1986. Insect Toxicity of *Bacillus thuringiensis* isolated from soil in Japan. Journal Invertebrate Pathology 47(1): 12-20.

Pérez-Pérez, L.G. 2019. Evaluación de diferentes sustratos y sus mezclas en arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) CV. biloxi en maceta en condiciones de invernadero. Guasave, Sinaloa, México. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Occidente. 56 p.

Rojas, M., Bello M. Ríos, Y., Lugo, D., Rodríguez, Y. 2020. Utilización de cepas de Bacillus como promotores de crecimiento. Acta Agronómica, 54-60. http://www.scielo.org.co/pdf/acag/v69n1/0120-2812-acag-69-01-54.pdf

Reyes, I., Álvarez, L., El Ayoubi, H. y Valery, A. 2008. Selección y Evaluación de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento en Pimentón y Maíz. Bioagro 20(1): 37-48.

SAS Institute. 2004. Statistical and Graphical Guide. SAS Institute Inc. Cary, North Caroline

Seipasa. (2015). Bioestimulantes. Disponible en: https://www.seipasa.com/es/blog/bioestimulantes-preguntas-clave/

Senasica, 2021. Crece más de 300 % superficie de arándano en Sinaloa. Disponible en: https://prod.senasica.gob.mx/ALERTAS/inicio/pages/single.php?noticia=7883

Sheraz, M.S., Hassan, G.I., Samoon, S.A., Rather, A., Showkat A. D. and B. Zehra. 2010. BIO-FERTILIZERS IN ORGANIC AGRICULTURE. In Journal of Phytology, 2(10): 42-54. Available Online: www.journal-phytology.com.

SIAP. (AGOSTO de 2023). PRODUCEPAY. Obtenido de https://www.gob.mx/agricultura/prensa/mexico-octavo-exportador-mundial-de-arandano-mayoritariamente-azul-agricultura

Soluciones Agrícolas. 2019. La importancia de la bioestimulación del arándano tras la poda. Disponible en: http://www.spsolucionesagricolas.es/bioestimulacion-del-arandano-tras-poda/

Undurraga, P., Vargas, S., Rebolledo, C;. Manual de arándano. Instituto de investigaciones agropecuarias. 2013 Pag 6. Chillan-Chile. Disponible en línea: http://biblioteca.inia.cl/medios/biblioteca/boletines/NR39094.pdf

Pérez, C., 2018 Cultivo del arándano en México, reto superado. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Disponible en: https://www.gob.mx/agricultura/articulos/cultivo-del-arandano-en-mexico-reto-superado

PHC. (s.f.). FICHA TECNICA T-22, 2022. Obtenido de: https://phcmexico.com.mx/wp-content/uploads/FT_T22.pdf

Rubio, J.C., García, G., Ciordia, M. 2010. Situación actual del cultivo del arándano en el mundo. Tecnología Agroalimentaria - n.º 12. Disponible en línea: http://www.serida.org/pdfs/5566.pdf

Undurraga, P., Vargas, S., & Rebolledo, C. 2013. Manual de arándano. Obtenido de Instituto de Investigaciones Agropecuarias: http://biblioteca.inia.cl/medios/biblioteca/boletines/NR39094.pdf

Yang, X., Blagodatsky, S., Lippe, M., Liu, F., Hammond, J., Xu, J., Cadisch, G. (2016) Land-use change impact on time-averaged carbon balances: Rubber expansion and reforestation in a biosphere reserve, South-West China. Forest Ecology and Management. 149-163. https://www.researchgate.net/publication/301284859_Yang_et_al_2016

Zapata, R., Quiroga, M., Murillo, B., Agüero, D., Lissi, B., & Mena, P. 2012. TRICHODERMA spp BIOCONTROLADOR Y PROMOTOR DE CRECIMIENTO: UNA ALTERNATIVA. Avances en Energías Renovables y Medio Ambiente, 47-55. Obtenido dehttps://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/129694/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y