

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN

Escuela de Posgrado

DOCTORADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

**EFICACIA DE *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis*
EN EL CONTROL DE LA PUDRICIÓN RADICULAR
(*Cylindrocarpon destructans*) DEL ORÉGANO (*Origanum
vulgare* L.), BAJO CONDICIONES DE INVERNADERO**

TESIS

PRESENTADA POR:

Mg. Sc. LIDUVINA SULCA QUISPE

Para optar el Grado Académico de:

DOCTOR EN CIENCIAS AMBIENTALES

TACNA - PERÚ

2023

HOJA DE JURADO





UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN

ESCUELA DE POSGRADO

DOCTORADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

EFICACIA DE *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* EN EL CONTROL DE LA PUDRICIÓN RADICULAR (*Cylindrocarpon destructans*) DEL ORÉGANO (*Origanum vulgare* L.), BAJO CONDICIONES DE INVERNADERO.

Tesis sustentada y aprobada el 21 de noviembre del 2023; estando el jurado calificador integrado por:

PRESIDENTE	:	 Dra. NELLY ARÉVALO SOLSOL
SECRETARIO	:	 Dr. EDILBERTO PABLO MAMANI LÓPEZ
MIEMBRO	:	 Dr. ELEOCADIO DIONISIO TIRADO PAZ
ASESOR	:	 Dr. ELEOCADIO DIONISIO TIRADO PAZ

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo Eleocadio Dionisio Tirado Paz en mi condición de asesor acreditado por la Resolución de Posgrado N° 11929-2022-ESPG/UNJBG de la tesis la tesis de investigación titulado: EFICACIA DE *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* EN EL CONTROL DE LA PUDRICIÓN RADICULAR (*Cylindrocarpon destructans*) DEL ORÉGANO (*Origanum vulgare* L.), BAJO CONDICIONES DE INVERNADERO, presentado por la Mg. Sc. Liduvina Sulca Quispe para optar el grado de Doctor en Ciencias Ambientales habiendo cumplido con lo establecido en el Reglamento de Originalidad y de Similitud de trabajos de investigación y producción intelectual, considerando que según la revisión, evaluación y análisis realizado a través del software de similitud textual Turnitin cuenta con el nivel de similitud permitido cuyo porcentaje es 6 %, por lo que **CERTIFICO LA SIMILARIDAD** de la tesis está de acuerdo al nivel **PERMITIDO**, para continuar con los trámites correspondientes y para su **publicación en el repositorio institucional**.

Se emite el presente certificado con fines de continuar con los trámites respectivos para su obtención del grado.



Dr. Eleocadio D. Tirado Paz

DNI: 17982254

DEDICATORIA

A Dios, por concederme una madre ejemplar, un hijo maravilloso y mis nietos Aarón y Antonella, que son la alegría de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A mis profesores del Doctorado en Ciencias Ambientales, por sus enseñanzas.

A la memoria de mi padre Juan Pablo, mi madre Bertha y mi hermano Dante; a mis hermanos Norma, Américo, Vilma y Margott por su comprensión y motivación constante para la culminación del trabajo.

A mi esposo Pablo e hijo Darwin, por la confianza depositada en la ejecución y culminación del proyecto de investigación.

Al vicerrectorado de investigación-UNJBG por el financiamiento con fondos del canon, sobre canon y regalías mineras que permitió la ejecución de la tesis de posgrado.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
PORTADA	i
HOJA DE JURADO	ii
CERTIFICADO DE SIMILITUD	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE GENERAL	vi
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
RESUMO	ii
INTRODUCCIÓN	iii
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
1.1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA	3
1.1.1. Antecedentes del problema	3
1.1.2. Problema de la investigación	4
1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	5
1.2.1. Problema general	5
1.2.2. Problemas específicos	5
1.3. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN	6
1.4. ALCANCES Y LIMITACIONES	7
1.5. OBJETIVOS	7
1.5.1. Objetivo general	7
1.5.2. Objetivos específicos	7
1.6. HIPÓTESIS	7
1.6.1. Hipótesis general	7
1.6.2. Hipótesis específica	7
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	10
2.1. ANTECEDENTES DEL ESTUDIO	10

2.2.	BASES TEÓRICAS	11
2.2.1.	Cultivo de orégano y taxonomía	11
2.2.2.	Descripción botánica del orégano	12
2.2.3.	Pudrición de raíces en orégano	13
2.2.4.	<i>Ilyonectria destructans</i> (anamorfo <i>Cylindrocarpon destructans</i>)	13
2.2.5.	Azoxystrobin	14
2.2.6.	Biocontrol	15
2.2.7.	<i>Trichoderma</i>	16
2.2.8.	<i>Trichoderma harzianum</i>	17
2.2.9.	<i>Bacillus subtilis</i>	17
2.3.	DEFINICIÓN DE TÉRMINOS	18
	CAPÍTULO III: MARCO FILOSÓFICO	9
	CAPÍTULO IV: MARCO METODOLÓGICO	25
4.1.	TIPO, ALCANCE Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	25
4.1.1.	Tipo y alcance de investigación	25
4.1.2.	Diseño de investigación	25
4.2.	POBLACIÓN Y MUESTRA	25
4.2.1.	Población	25
4.2.2.	Muestra	26
4.3.	IDENTIFICACIÓN DE VARIABLES Y OPERACIONALIZACIÓN	26
4.3.1.	Variable independiente	26
4.3.2.	Variable dependiente	26
4.3.3.	Operacionalización de la variable dependiente	27
4.4.	TÉCNICA E INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS	28
4.5.	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Cylindrocarpon destructans</i> ASOCIADO A PUDRICIÓN RADICULAR EN CULTIVO DE ORÉGANO	28
4.5.1.	Material biológico	28
4.5.2.	Aislamiento y purificación de <i>Cylindrocarpon destructans</i>	30
4.5.3.	Caracterización morfológica e identificación	30
4.6.	MULTIPLICACIÓN DEL PATÓGENO <i>Cylindrocarpon destructans</i> , PREPARACIÓN DE INÓCULO E INOCULACIÓN	31

4.7. EFICACIA DE <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Bacillus subtilis</i> SOBRE <i>Cylindrocarpon destructans</i>	31
CAPÍTULO: RESULTADOS	39
5.1 AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA E IDENTIFICACIÓN DE <i>Cylindrocarpon destructans</i>	39
5.2 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE INCIDENCIA DE LA ENFERMEDAD	40
5.3 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE REDUCCIÓN DE LA ENFERMEDAD	42
DISCUSIONES	50
CONCLUSIONES	61
RECOMENDACIONES	62
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
ANEXOS	82

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Tratamientos empleados para el control de la pudrición radicular en orégano causada por <i>Cylindrocarpon destructans</i>	33
Tabla 2. Dosis y frecuencia de aplicaciones de los productos comerciales con actividad bioestimulante y biofungicida ensayados	36
Tabla 3. Característica morfológica de los aislamientos de raíces con pudrición en plantas de orégano variedad nigra, Camilaca, Candarave, 2019	40
Tabla 4. Comparación de medias del porcentaje de incidencia mediante la prueba de Tukey con $\alpha = 0,05$ como efecto de los tratamientos en el control de <i>Cylindrocarpon destructans</i> en orégano variedad nigra, Tacna, 2019	41
Tabla 5. Comparación de medias del porcentaje de reducción de la enfermedad de tratamientos en el control de <i>C. destructans</i> en orégano variedad nigra, Tacna, 2019	42
Tabla 6. Comparación de medias de altura de la planta mediante la prueba de Tukey con $\alpha=0.05$ como efecto de los tratamientos en el control de <i>C. destructans</i> en orégano variedad nigra, Tacna, 2019	44
Tabla 7. Comparación de medias de la longitud de la raíz mediante la prueba de Tukey con $\alpha=0,05$ como efecto de los tratamientos en el control de <i>Cylindrocarpon destructans</i> en orégano variedad nigra, Tacna, 2019	45
Tabla 8. Comparación de medias del peso seco del follaje mediante la prueba Tukey con $\alpha=0,05$ como efecto de los tratamientos en el control de <i>Cylindrocarpon destructans</i> en orégano variedad nigra, Tacna, 2019	47
Tabla 9. Comparación del porcentaje de materia seca de la raíz mediante la prueba Tukey con $\alpha= 0,05$ como efecto de los tratamientos en el control de <i>Cylindrocarpon destructans</i> en orégano variedad nigra, Tacna, 2019	48

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Representación gráfica de los métodos de control para el manejo integrado de enfermedades en plantas	21
Figura 2. Raíces de plantas de orégano con pudrición radicular	28
Figura 3. Síntoma del follaje de plantas de orégano con pudrición radicular	29
Figura 4. Esquema de muestreo en cinco de oros	29
Figura 5. Distribución de tratamientos y bloques del experimento para el control de <i>Cylindrocarpon destructans</i> en orégano, en invernadero, 2019	35
Figura 6. Características culturales de los aislamientos en medio PDA. a,c) superficie de 7 y 14 días de incubación, respectivamente y b) reverso de la colonia	39
Figura 7. Comparación de medias del porcentaje de incidencia en los tratamientos para el control de <i>Cylindrocarpon destructans</i> en orégano variedad negra, Tacna, 2019	41
Figura 8. Comparación de medias del porcentaje de reducción de la enfermedad de tratamientos en control de <i>C. destructans</i> en orégano variedad negra, Tacna, 2019	43
Figura 9. Comparación de medias de altura de planta como efecto de los tratamientos en el control de <i>Cylindrocarpon destructans</i> en orégano variedad negra, Tacna, 2019	44
Figura 10. Comparación de medias de la longitud de la raíz para los tratamientos en el control de <i>Cylindrocarpon destructans</i> en orégano variedad negra, Tacna, 2019	45
Figura 11. Comparación de las medias del peso seco del follaje en los tratamientos en el control de <i>Cylindrocarpon destructans</i> en orégano variedad negra, Tacna, 2019	47
Figura 12. Comparación de las medias del peso seco de la raíz en los tratamientos para el control de <i>Cylindrocarpon destructans</i> en orégano variedad negra, Tacna, 2019	49

RESUMEN

Trichoderma harzianum y *Bacillus subtilis* actúan como biofungicidas y bioestimulantes y son considerados agentes potenciales para el manejo sostenible de enfermedades fúngicas. El objetivo fue evaluar la eficacia de *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis*, inoculados juntos y antes que el patógeno, en el control de la pudrición radicular del orégano causado por *Cylindrocarpon destructans*. Se evaluó: porcentaje de incidencia, porcentaje de reducción de la enfermedad, altura de la planta, longitud de la raíz, porcentaje de materia seca del follaje y raíz. El valor más alto del porcentaje de incidencia lo tuvo el testigo enfermo inoculado con *Cylindrocarpon destructans* (100 %) seguido de azoxystrobin (66,6 %). Los valores más bajos fueron obtenidos en el testigo absoluto (5,5 %), *Trichoderma harzianum* inoculado antes y juntos con el patógeno y *Bacillus subtilis* inoculado juntos con el patógeno (16,6 %). Los valores más altos del porcentaje de reducción de la enfermedad fueron registrados en el testigo absoluto (94,45 %), *Trichoderma harzianum* inoculado antes y juntos con el patógeno y *Bacillus subtilis* inoculado juntos con el patógeno (83,3 %). La mayor altura de la planta y mayor longitud de la raíz se registró en los tratamientos *Bacillus subtilis* (47,5 y 30 cm) y *Trichoderma harzianum* (45,1 y 29,2 cm) inoculados antes que el patógeno, respectivamente. El mayor porcentaje de materia seca del follaje y raíz fueron registrados en los tratamientos *Bacillus subtilis* inoculado antes que el patógeno (60,1 % y 80,5 %) seguido de *Trichoderma harzianum* inoculada juntas con el patógeno (57,8 %, y 78,5 %), respectivamente. En conclusión, estos resultados demuestran que los tratamientos *Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum* inoculados tanto juntos como cinco días antes que *Cylindrocarpon destructans* son una alternativa para el manejo sostenible de la pudrición radicular del orégano.

Palabras clave: *Bacillus*, biocontrol, *Cylindrocarpon*, orégano y *Trichoderma*

ABSTRACT

Trichoderma harzianum and *Bacillus subtilis* act as biofungicides and bioestimulants and are considered potential agents for the sustainable management of fungal diseases. The objective of the study was to evaluate the efficacy of *Trichoderma harzianum* and *Bacillus subtilis*, inoculated together and before the pathogen, in controlling oregano root rot caused by *Cylindrocarpon destructans*. The following were evaluated: incidence percentage, disease reduction percentage, plant height, root length, foliage and root dry matter percentage. The highest value of the incidence percentage was obtained by the control inoculated with *Cylindrocarpon destructans* (100 %) followed by azoxystrobin (66.6 %). The lowest values were obtained in the absolute control (5.5 %), *Trichoderma harzianum* inoculated before and together with the pathogen and *B. subtilis* inoculated together with the pathogen (16.6 %). The highest values of the disease reduction percentage were registered in the absolute control (94.45 %), *Trichoderma harzianum* inoculated before and together with the pathogen and *B. subtilis* inoculated together with the pathogen (83.3 %). The greatest height of the plant and the greatest length of the root were registered in the treatments *Bacillus subtilis* (47.5 and 30 cm) and *Trichoderma harzianum* (45.1 and 29.2 cm) inoculated before the pathogen, respectively. The highest percentage of foliage and root dry matter were recorded in the treatments *B. subtilis* inoculated before the pathogen (60.1 % and 80.5 %) followed by *Trichoderma harzianum* inoculated together with the pathogen (57.8 %, and 78.5 %), respectively. In conclusion, these results show that the *Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum* treatments inoculated both together and five days before *Cylindrocarpon destructans* are an alternative for the sustainable management of oregano root rot.

Keywords: *Bacillus*, biocontrol, *Cylindrocarpon*, orégano and *Trichoderma*

RESUMO

Trichoderma harzianum e *Bacillus subtilis* atuam como biofungicidas e bioestimulantes e são considerados potenciais agentes para o manejo sustentável de doenças fúngicas. O objetivo foi avaliar a eficácia de *Trichoderma harzianum* e *Bacillus subtilis*, inoculados juntos e antes do patógeno, no controle da podridão radicular do orégano causada por *Cylindrocarpon destructans*. Foram avaliados: percentual de incidência, percentual de redução da doença, altura de planta, comprimento de raiz, percentual de matéria seca de folhagem e raiz. O maior valor do percentual de incidência foi encontrado no controle doente inoculado com *Cylindrocarpon destructans* (100%) seguido de azoxistrobina (66,6%). Os menores valores foram obtidos no controle absoluto (5,5%), *Trichoderma harzianum* inoculado antes e junto com o patógeno e *Bacillus subtilis* inoculado junto com o patógeno (16,6%). Os maiores valores do percentual de redução da doença foram registrados no controle absoluto (94,45%), *Trichoderma harzianum* inoculado antes e junto com o patógeno e *Bacillus subtilis* inoculado junto com o patógeno (83,3%). A maior altura de planta e maior comprimento de raiz foram registrados nos tratamentos *Bacillus subtilis* (47,5 e 30 cm) e *Trichoderma harzianum* (45,1 e 29,2 cm) inoculados antes do patógeno, respectivamente. Os maiores percentuais de matéria seca de folhagem e raiz foram registrados nos tratamentos *Bacillus subtilis* inoculado antes do patógeno (60,1% e 80,5%) seguido de *Trichoderma harzianum* inoculado juntamente com o patógeno (57,8% e 78,5%), respectivamente. Em conclusão, estes resultados demonstram que os tratamentos com *Bacillus subtilis* e *Trichoderma harzianum* inoculados juntos e cinco dias antes de *Cylindrocarpon destructans* são uma alternativa para o manejo sustentável da podridão radicular do orégano.

Palavras-chave: *Bacillus*, biocontrole, *Cylindrocarpon*, orégano e *Trichoderma*

INTRODUCCIÓN

El orégano (*Origanum vulgare* L.; Lamiaceae) nativa de Europa y Asia es difundida, consumida y cultivada en diferentes latitudes del mundo. Es considerada una hierba culinaria primordial en la industria gastronómica, farmacéutica y terapéutica. Los principales países productores en América Latina son: México, Brasil, Chile y Costa Rica. En el Perú, la región Tacna es el principal productor y exportador de orégano, especialmente en Camilaca, Ilabaya, Susapaya, Cairani, Candarave, Huanuara y Tarata seguido por los departamentos de Arequipa, Moquegua y Ancash. En el 2021, el Perú exportó 7 355 toneladas de orégano por un valor de US\$ 20,1 millones (Agraria.pe., 2022). Sin embargo, los mercados de exportación exigen productos de calidad que cumplan con normas de inocuidad del producto y códigos de protección ambiental, lo que implica garantizar la sostenibilidad del cultivo, relativo al manejo sanitario de las plantaciones.

El orégano es una planta perenne, con una raíz fibrosa muy ramificada que puede ser afectada por hongos que habitan en el suelo en condiciones de estrés como alta humedad, elevada radiación solar y fertilización inadecuada. Una de las amenazas potenciales del cultivo de orégano observado con mayor frecuencia en las zonas productoras en Tacna, fue la pudrición radicular. En Candarave (Camilaca), se determinó a *Cylindrocarpon destructans* como agente causal de la pudrición de la raíz de las plantaciones de orégano caracterizado por el ennegrecimiento y descortezamiento de raíces y raicillas. Los síntomas observados en el follaje fueron el amarillamiento y marchitez.

Por otra parte, el control biológico se basa en la gestión de recursos naturales. Al respecto, el empleo de agentes de control biológico constituye una alternativa ecológica y eficaz en el control de enfermedades frente al uso de fungicidas químicos, asegurando reducir el impacto ambiental negativo generado por estos últimos.

Por tal razón, dada la falta de estudios sobre biocontrol de la pudrición en raíces de plantaciones de orégano y por la importancia del cultivo de orégano para la región Tacna por constituir la base fundamental para la economía de los agricultores de las provincias de Tarata y Candarave y con la finalidad de garantizar la sostenibilidad del cultivo, se realizó el estudio de alcance explicativo, cuyo objetivo fue evaluar la eficacia de *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis*, inoculados en dos momentos, en condiciones de invernadero, en el control de la pudrición radicular del orégano causado por *Cylindrocarpon destructans*.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

1.1.1. Antecedentes del problema

A nivel global, la pudrición radicular ha sido la enfermedad principal del orégano y el agente causal fue diferente, de acuerdo al lugar, las condiciones climáticas, variedad de la planta y manejo del cultivo. En Polonia, reportan a *Rhizoctonia solani* (Zimowska, 2015), en Italia, a *Phytophthora tentaculata* (Martini *et al.*, 2009), en Argentina, a *Fusarium solani* (Gaetán *et al.*, 2008) y, en Chile, reportan a *Fusarium* sp., *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Pythium* spp. y *Cylindrocarpon* sp. (Acuña, 2008). A nivel nacional, en Cajamarca, se menciona a *Fusarium moniliforme*, *Fusarium roseum* y *Fusarium oxysporum* como hongos asociados a la pudrición de raíces en orégano (Chugnas, 2018) y, a nivel local, en el distrito de Ilabaya se reporta a *Cylindrocarpon destructans* (Hume, 2007).

Por otra parte, en la actualidad, se está priorizando investigaciones sobre la aplicación de agentes de control biológico en el manejo sostenible de la pudrición de raíces en cultivos agrícolas. En Argentina, el efecto de la aplicación de *Trichoderma viridae* en el control de *Fusarium* inoculadas vía drench en plantas de orégano en macetas ha estimulado el desarrollo radicular (Caligiore, 2013). Por otra parte, en Corea, *Bacillus subtilis* tuvo un control del 65,7 % de la antracnosis del pimiento rojo causado por *Colletotrichum acutatum* y, además, promovió el desarrollo y crecimiento de las raíces en condiciones de invernadero (Lee *et al.*, 2020).

Asimismo, existen diversos estudios sobre el control biológico de *Cylindrocarpon* spp. causante de pudrición radicular en diferentes cultivos. En Corea, *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens* (10^6 ufc/ml) mostraron un buen control de la pudrición de la raíz causada por *C. destructans* en ginseng (Jang *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2017). En China, *Trichoderma* spp. aplicado en semillero de ginseng tuvo un control de la pudrición de raíz causada por *Cylindrocarpon destructans* superior al 67 % (Chen *et al.*, 2016). En Sudáfrica, la aplicación de *Trichoderma harzianum* en viveros de vid con pudrición de raíces causada por *Cylindrocarpon* spp. ha inducido a mayor crecimiento de los brotes de

vid y masa total de raíces significativamente mayor que el tratamiento estándar y control (Fourie *et al.*, 2001).

1.1.2. Problema de la investigación

El orégano es una planta herbácea, rústica, perenne, de gran importancia para la región Tacna, después del olivo, por constituir la base fundamental para la economía de los agricultores de las provincias de Tarata y Candarave. Sin embargo, su calidad y productividad puede ser afectada por problemas fitosanitarios. Una de las enfermedades fúngicas observadas, con mayor frecuencia en Candarave (Camilaca) e Ilabaya ha sido la pudrición radicular, causada por *Cylindrocarpon destructans*, un hongo que habita el suelo y que posee la capacidad para mantenerse viable aún en condiciones adversas, debido a la producción de estructuras de resistencia denominadas clamidosporas. Los síntomas observados fueron marchitez, amarillamiento del follaje y pudriciones de color café oscuro a negro con descortezamiento en raíces y raicillas de las plantas afectadas.

El control de las enfermedades transmitidas por hongos habitantes del suelo es complejo. La aplicación desmedida de fungicidas químicos de uso convencional para controlar las enfermedades en plantas constituye una grave amenaza para la salud humana y el entorno, porque genera resistencia de patógenos, contaminación de los suelos y aguas de riego y, además, afecta el equilibrio de la diversidad microbiana del suelo indispensables en el reciclaje de nutrientes.

Existe un grupo de hongos y bacterias saprófitas que presentan efectos antagónicos contra los fitopatógenos, además ejercen un efecto estimulante del crecimiento y desarrollo en las plantas como mecanismo indirecto. Esto ha sido reportado por varios autores a nivel global en estudios sobre biocontrol de enfermedades por fitopatógenos foliares y radiculares. Así, la versatilidad, la gama de mecanismos biológicos y la plasticidad ecológica que posee el hongo del género *Trichoderma*, hicieron que se convirtiera en un excelente controlador biológico; siendo *Trichoderma harzianum* la especie con mejor potencial para el control de enfermedades radiculares en plantas.

Existen diversos estudios que reportan el efecto biofungicida y bioestimulante de *T. harzianum* sobre hongos fitopatógenos que habitan el suelo como *Fusarium*,

Rhizoctonia solani, *Cylindrocarpon sp.* y *Sclerotium*. La conquista de *Trichoderma spp.*, como controladores biológicos, se debe a su rápido crecimiento, su habilidad de establecer una colonización fuerte y estable de las superficies de las raíces, su capacidad de adaptación a diversas condiciones ambientales y sustratos, la capacidad de resistir condiciones adversas, fuerte estimulación del desarrollo radicular, su eficiencia en la solubilización y absorción de nutrientes inorgánicos e inducción de resistencia. Asimismo, uno de los atributos de la bacteria *Bacillus subtilis* en el biocontrol de hongos causantes de enfermedades es su gran capacidad de adaptación por formación de biopelículas que les permite ser buenos colonizadores, lo que conduce a la exclusión de nicho de los patógenos y por ende la protección de las plantas frente al estrés biótico y abiótico.

En ese marco, en la investigación se empleó *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* comercial para ensayar su efecto sobre *Cylindrocarpon destructans*, agente causal de la pudrición radicular del orégano y se formuló la siguiente interrogante:

1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

1.2.1. Problema general

¿Cuál será la eficacia de *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis*, inoculados juntos y antes que el patógeno, en condiciones de invernadero, en el control de la pudrición radicular del orégano causado por *Cylindrocarpon destructans*?

1.2.2. Problemas específicos

¿*Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum* inoculados juntos y cinco días antes que *Cylindrocarpon destructans* causarán menor incidencia y mayor reducción de la pudrición radicular del orégano que el azoxystrobin?

¿*Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum* inoculados juntos y cinco días antes que *Cylindrocarpon destructans* causarán mayor efecto bioestimulante sobre la altura de la planta, longitud de la raíz, materia seca del follaje y de la raíz de la planta de orégano que el azoxystrobin?

1.3. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN

El estudio se justifica, porque tiene relevancia económica y social al generar utilidad mejorando la eficiencia de la producción del cultivo, debido a que los microorganismos con efecto biofungicida y bioestimulante reducen la incidencia y severidad de la enfermedad además de estimular el crecimiento y desarrollo de las plantas previniendo pérdidas económicas al agricultor y, por tanto, mayor rendimiento del cultivo. También tiene relevancia teórica, porque generó nuevos conocimientos sobre el uso de *T. harzianum* y *B. subtilis* como agentes de biocontrol en el manejo integrado de la pudrición radicular en el patosistema orégano-*Cylindrocarpon destructans* para la sostenibilidad del cultivo en la provincia de Candarave y; finalmente, tiene relevancia metodológica y práctica, porque permitirá a la entidad competente ejecutar un programa de manejo integrado considerando a estos agentes de biocontrol y reduciendo el uso de fungicidas químicos a momentos críticos, para recuperar el equilibrio microbiológico del suelo permitiendo un vigoroso crecimiento y desarrollo del cultivo.

Frente a la degradación del recurso suelo y el ambiente en general por el uso indiscriminado de fungicidas, insecticidas y fertilizantes sintéticos en la agricultura, el uso de agentes de control biológico es una alternativa saludable. Por lo que el presente estudio es de suma importancia por su trascendencia social, que inspira la confianza y predisposición del agricultor para el uso del control biológico de manera rutinaria en la prevención de la pudrición radicular ocasionada por *C. destructans* como parte del manejo integrado del cultivo de orégano. Asimismo, brinda la seguridad a toda la población tacneña resguardando el consumo del orégano libre de residuos químicos. La sostenibilidad de los cultivos agrícolas está basada en la integración de varios tipos de control como el control cultural, genético, físico, químico, biológico y medidas cuarentenarias para regular el uso excesivo de los fungicidas reduciendo de este modo el impacto ambiental, económico y el impacto en la salud humana, asimismo, los residuos de fungicidas en los alimentos.

A nivel global, la tendencia actual de los agricultores es la agricultura de conservación, esta se caracteriza por que mejora la productividad del suelo al permitir el incremento de la materia orgánica, la retención de agua en el suelo y la mejora de la estructura del suelo manteniendo en equilibrio armónico los recursos naturales y su

entorno, es decir, incrementa la salud del suelo a largo plazo. El suelo es el principal recurso de soporte de la agricultura.

1.4. ALCANCES Y LIMITACIONES

La principal limitante que se tuvo ha sido la carencia de un invernadero con equipamiento apropiado que cuente como mínimo con un controlador de parámetros climáticos que mida la ventilación, grado de luminosidad, temperatura, humedad y pH.

1.5. OBJETIVOS

1.5.1. Objetivo general

Evaluar la eficacia de *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis*, inoculados juntos y antes que el patógeno, en condiciones de invernadero, en el control de la pudrición radicular del orégano causado por *Cylindrocarpon destructans*.

1.5.2. Objetivos específicos

Determinar el porcentaje de incidencia y el porcentaje de reducción de la pudrición radicular en plantas de orégano inoculadas con *Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum* juntos y cinco días antes que *Cylindrocarpon destructans*.

Determinar el efecto bioestimulante de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum* inoculados juntos y cinco días antes que *Cylindrocarpon destructans* sobre la altura de la planta, longitud de la raíz, materia seca del follaje y de la raíz de la planta de orégano.

1.6. HIPÓTESIS

1.6.1. Hipótesis general

Bacillus subtilis y *Trichoderma harzianum* inoculados juntos y antes que el patógeno, en condiciones de invernadero, son más eficaces que el azoxystrobin en el control de la pudrición radicular del orégano causado por *Cylindrocarpon destructans*

1.6.2. Hipótesis específica

H1: *Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum* inoculados juntos y cinco días antes que *Cylindrocarpon destructans* causan menor incidencia y mayor reducción de la pudrición radicular en orégano que el azoxystrobin.

H2: *Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum* inoculados juntos y cinco días antes que *Cylindrocarpon destructans* causan mayor efecto bioestimulante sobre la altura de la planta, longitud de la raíz, materia seca del follaje y de la raíz de la planta de orégano que el azoxystrobin.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES DEL ESTUDIO

Hay reportes amplios sobre la capacidad antagónica, promoción del crecimiento e inducción de resistencia sistémica ejercida por el hongo *Trichoderma harzianum* y la bacteria *Bacillus subtilis* sobre una variedad de hongos fitopatógenos durante la interacción fitopatógeno-planta-controlador.

Chowdappa *et al.* (2013) informan que *Bacillus subtilis* y el *Trichoderma harzianum* han mostrado tener una notable capacidad para reprimir el crecimiento y reproducción de *Alternaria solani* y *Phytophthora infestans* en estudios in vitro e invernadero. También lograron incrementar significativamente el crecimiento de raíces y brotes en plántulas de tomate además de mejorar la resistencia sistémica mediante la inducción de hormonas de crecimiento y enzimas de defensa como la peroxidasa, la polifenol oxidasa y la superóxido dismutasa. Zhou *et al.* (2010) reportaron el efecto antagónico de *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus polymyxa* y *Trichoderma harzianum* aislados del suelo de la rizosfera de Ginseng en China, contra *Cylindrocarpon destructans*.

En Corea, Jang *et al.* (2011) investigaron, in vitro, la eficacia de especies de *Bacillus* sobre *Cylindrocarpon destructans* causante de la pudrición de raíz del ginseng e informaron que *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens* mostraron un buen control a la concentración de inóculo más baja (1×10^6 ufc / mL). Además, la microscopía electrónica de barrido mostró que *C. destructans* fue dañado por ambas especies de *Bacillus* a las dos concentraciones y sólo el tratamiento a concentración de 1×10^6 ufc/mL indujo a una formación prominente de peridermis en la herida, relacionada con la defensa estructural contra la infección por patógenos.

Asimismo, Kim *et al.* (2017) demostraron en ensayos in vitro que el filtrado del cultivo de *Bacillus amyloliquefaciens* ha tenido un 75,9 % de grado de inhibición del crecimiento micelial de *Cylindrocarpon destructans*. Por otra parte, los síntomas de pudrición en las raíces de ginseng fueron moderados (35 %) cuando las raíces fueron inoculadas primero con la suspensión de conidios de *C. destructans* y luego tratadas con

el filtrado de *Bacillus amyloliquefaciens* después de 24 h de incubación a 21 °C. Por el contrario, cuando las raíces se trataron primero con el filtrado de *Bacillus amyloliquefaciens* seguido de la inoculación con suspensiones de conidios de *C. destructans*, el síntoma de pudrición fue mayor.

También, Fourie *et al.* (2001), en un vivero de vid en Sudáfrica, demostraron que *Trichoderma harzianum* ha tenido mayor efecto en el crecimiento de la planta. Los brotes de las vides tratados con *T. harzianum* eran notablemente más largos que el control estándar (102,6 mm frente a 70,2 mm); además, mostraron mayor masa radicular (36,4 g) en comparación del control estándar (25,7 g).

Además, *Bacillus subtilis* ha mostrado una excelente capacidad para inhibir el crecimiento y esporulación de una amplia gama de hongos fitopatógenos. Según Zohora *et al.* (2016), *B. subtilis* mostró una reducción del 80 por ciento de la incidencia del damping-off causada por *Rhizoctonia solani* en tomate. También, Arcos y Zúñiga (2015) en ensayos en invernadero, inoculando *Bacillus subtilis* en el momento del trasplante, mostraron valores de incidencia de 15,19 y 6,99 por ciento y severidad de 5,75 a 9,06 y 5,73 a 7,31 por ciento de la enfermedad causada por *Rhizoctonia solani* en plántulas de papa variedad Ccompis y Andina, respectivamente, en comparación del testigo que presentaron de 25,24 y 12,78 por ciento de incidencia en la variedad Ccompis y Andina, respectivamente, y una severidad mayor al 30 por ciento en ambas variedades.

2.2. BASES TEÓRICAS

2.2.1. Cultivo de orégano y taxonomía

El orégano crece espontáneamente en Europa y Asia (Rodríguez, 2021). Es una de las plantas aromáticas más cultivadas a nivel mundial por su alto valor económico, medicinal y ambiental. Las subespecies de orégano más importantes son el orégano griego (*O. vulgare* spp. *hirtum*), *O. vulgare* spp. *vulgare* y *O. vulgare* spp. *viridulum* (Skowfogianni *et al.*, 2019).

En el Perú, la principal región productora de orégano es Tacna, seguido de Arequipa y Moquegua, con rendimientos superiores a 4,5 t/ha a nivel nacional. En el año 2021, la superficie cosechada en Tacna fue de 2 164 ha y la producción disminuyó en comparación al año 2018 de 11 946 toneladas a 9859 toneladas; de los cuales, el 82 % se

exporta como orégano seco y el resto es destinado al mercado interno como hierba fresca; siendo la Yarada-Los palos y Camilaca los principales distritos de mayor producción (MIDAGRI, 2021).

La adaptabilidad del orégano le permite crecer en diversos climas. Sin embargo, la elevada humedad relativa y radiación lo hacen susceptibles a enfermedades fúngicas (Aros, 2021).

Según Mostacero *et al.* (2009), el orégano presenta la taxonomía que sigue:

Reino Plantae

División Magnoliophyta

Clase Magnoliopsida

Orden Lamiales

Familia Lamiaceae

Género *Origanum*

Especie *Origanum vulgare* (L.) 1753

2.2.2. Descripción botánica del orégano

El orégano es una planta herbácea, perenne, con una duración del ciclo de vida de 5 a 8 años, con mucha variabilidad en el desarrollo morfológico, fenológico y hábito de crecimiento, debido a complejas interacciones gen-ambiente, manejo de cultivo, condiciones edafológicas y climáticas, donde el fotoperiodo es importante en el desarrollo del orégano (Davidenco *et al.*, 2014 y Aros, 2021). La planta mide entre 30 y 80 cm de altura. El tallo es recto, cuadrangular de color verde o rojizo, con pelos glandulares rellenos de esencia; ramificada en la parte superior y lignificada en la zona inferior. La raíz es fasciculada, muy ramificada. Las hojas son opuestas, simples, pecioladas, de forma aovada-oblonga, aovada o elíptica con ápice agudo u obtuso y bordes vellosos. El envés más pálido y veloso. Las flores son hermafroditas, de color blanco y se encuentran agrupadas en inflorescencias tipo cima. El fruto es un tetraquenio y las semillas con endospermo escaso o nulo. En el Perú, se cultivan dos variedades el orégano “zambito” empleado en el mercado local en su presentación fresca y la variedad “nigra” que es para exportación (Klauer, 2009).

2.2.3. Pudrición de raíces en orégano

Las enfermedades causadas por hongos habitantes del suelo constituyen una grave amenaza para el rendimiento del cultivo de orégano a nivel mundial. La elevada humedad, incidencia solar, disminución de pH son condiciones que favorecen su desarrollo (Humpire, 2012).

A nivel global, entre los hongos de suelo que causan pudrición a nivel de cuello y raíces en plantas de orégano, se mencionan a *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp. y *Phytophthora cryptogea* que también afectan a plantas de romero, tomillo y salvia (Klauer, 2009), *Pythium* sp. (Alarcón, 2011) y *Phytophthora tentaculata* (Martini *et al.*, 2009). En Chile, los hongos asociados a pudrición radicular y marchitez en el orégano fueron *Cylindrocarpon* sp., *pythium* spp., *Fusarium* sp., *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani*. Los síntomas mostrados fueron marchitez, amarillamiento y necrosis foliar; pudrición en la base del tallo y raíces de plantas jóvenes, estrías necróticas deprimidas y alargadas en cuello de planta (Acuña, 2008).

La pudrición radicular en plantas de palto causada por *Cylindrocarpon* spp. ha sido descrita en Sudafrica, Israel, España, Chile, Italia y Australia (Vitale *et al.*, 2012, Dann *et al.*, 2011, Besoain y Piontelli, 1999 y Zilberstein *et al.*, 2007). Asimismo, *Cylindrocarpon destructans* ha sido descrito como agente causal de la pudrición radicular en diversos cultivos; en mora (*Rubus glaucus*) en Venezuela (Cedeño *et al.*, 2004), en ginseng (*Panax ginseg*) en Canadá, en ginseng chino (*Panax notoginseng*) en China (Farh *et al.*, 2018), en plántulas de palta (*Persea americana*) en Colombia (Ramírez, 2013), en orégano (*Origanum vulgare*) en Chile (Acuña, 2008) y en Tacna, Perú (Hume, 2007).

2.2.4. *Ilyonectria destructans* (anamorfo *Cylindrocarpon destructans*)

Cylindrocarpon destructans ha sido considerado anamorfo de *Ilyonectria radicolica* (Chaverri *et al.*, 2011) siendo el nombre actual *Ilyonectria destructans* (Lombard *et al.*, 2015). Es de distribución cosmopolita y habita sobre suelo, raíces, madera y restos herbáceos.

Inicialmente, producen colonias blancas en Agar Papa Sacarosa (PSA) y, luego, de color óxido. El reverso de la colonia es marrón oscuro (Chaverri *et al.*, 2011). Sus conidióforos miden de 13,6 a 167,3 × 1,4 a 21,8 μm, pueden ser individuales o con hasta

cuatro niveles de ramificación y de dos a tres ramas (o phialides) por nivel. Las ramas basales a menudo son divergentes, mientras que las ramas terminales son más apretadas y no presentan esporodoquio (Dhingra y Sinclair, 1995). Mientras tanto, las microconidias son unicelulares de 4,1 a 9,5 μm de longitud \times 2,7 a 4,1 μm de ancho. Las macroconidias con 1 a 3 septas y ocasionalmente 4-septas. La base conidial es truncada o ligeramente sobresaliente y mide de 9,2 a 40,8 \times 3,5 a 6,8 μm (Lombard *et al.* (2015). Además, presentan clamidósporas abundantes color marrón de 21,8 μm de diámetro dispuestas en cadenas o grupos (Cedeño *et al.*, 2004).

Según Lombard *et al.* (2015), la taxonomía de *Ilyonectria destructans* es:

Reino Fungi

Phylum Ascomycota

Clase Sordariomycetes

Orden Hypocreales

Familia Nectriaceae

Género *Ilyonectria*

Especie *Ilyonectria destructans* (Zinssm.) (Rossmann y

Crous, 2015).

2.2.5. Azoxystrobin

El azoxystrobin es un fungicida sistémico de amplio espectro que pertenece a la clase de los Metoxiacrilatos y son derivados de las Strobilurinas de origen natural. Tiene una baja solubilidad acuosa, es no volátil y puede lixiviar a las aguas subterráneas bajo ciertas condiciones (Chopra *et al.*, 2007). Tiene una toxicidad baja para los mamíferos, pero puede bioacumularse. Entre las enfermedades controladas, figuran las royas, oidiosis, pudrición negra, sarna, antracnosis, el moho blanco, la podredumbre de la espiga, el tizón temprano y tardío, la mancha foliar (Jacobsen *et al.*, 2015).

Su actividad fungicida es la inhibición de la respiración mitocondrial de hongos (Granobles y Torres, 2013). Tiene efecto preventivo, curativo y antiesporulante sobre un amplio rango de enfermedades fúngicas (Rotan, 2015). Inhibe la producción, la germinación de las esporas y el crecimiento micelial fúngico (Jacobsen *et al.*, 2015).

2.2.6. *Biocontrol*

El biocontrol se basa en el cambio del equilibrio en poblaciones de microorganismos perjudiciales, por medio de la añadidura artificial notable del agente de control biológico, para promocionar la producción agrícola considerando los principios ecológicos como la competencia y el antagonismo (Castro y Rivillas, 2012) manteniendo finalmente la enfermedad de las plantas, en los niveles bajos del umbral de daño económico (Ezziyyani *et al.*, 2004).

La reacción de las plantas frente a la inoculación depende de la compatibilidad e interacción en la fisiología y bioquímica entre los integrantes de la microbiota presente (Bae y Knudsen, 2005 y Gutierrez *et al.*, 2013) y el ambiente abiótico. El ambiente abiótico es dinámico, variado y complejo. El logro del control biológico depende de manera importante de las condiciones ambientales, como la temperatura, potencial hídrico, radiación, pH, cargas iónicas y moléculas orgánicas con función energética. Estas condiciones y las interacciones entre ellos varían en tiempo y espacio (Melgarejo y De Cal, 2006).

Los microorganismos de la rizosfera ejercen un papel primordial para la implementación de las prácticas agrícolas sostenibles (Gutierrez *et al.*, 2013). Las actividades variadas de los microorganismos en los sistemas agrícolas dependen de la competencia con otros microorganismos, el reconocimiento planta - microorganismo y la composición microbiana del suelo. Los factores abióticos, como los factores climatológicos, los factores físicos y químicos del suelo, influyen directamente en el tipo de interacción de los microorganismos y la expresión de los efectos positivos o negativos, determinantes en el desarrollo de los cultivos (Siddiqui y Akhtar, 2008).

Es preciso enfatizar que los hongos antagonistas resultan importantes para el control biológico de los fitopatógenos (Infante *et al.*, 2009). Diversas cepas del género *Trichoderma* destacan entre las más empleadas para el control biológico de hongos fitopatógenos habitantes del suelo (Pfenning y Abreu, 2011). La eficiencia y durabilidad del control biológico dependen de la variedad de mecanismos de acción que tenga el agente de biocontrol en cuestión, virtud ausente en los fungicidas químicos. Así mismo, *Bacillus subtilis* es usada en el control de un amplio espectro de patógenos y es de aplicación foliar y radicular (Stein, 2005). La bioprospección de bacterias y hongos

antagónicos, como agentes de control biológico para el manejo de hongos fitopatógenos, es una actividad imperante para reducir el uso de fungicidas químicos (Ruiz *et al.*, 2016) y lograr un manejo sostenible de los cultivos agrícolas.

2.2.7. *Trichoderma*

Actualmente, las especies de *Trichoderma* se reconocen en todo el mundo como una alternativa al control químico de enfermedades de las plantas. Con esta finalidad, el género *Trichoderma* ha sido ampliamente investigado para ser considerado en el programa de manejo orgánico y de conservación de cultivos agrícolas. Está reportado que *Trichoderma* protege las raíces de enfermedades causadas por *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Fusarium* y fitopatógenos productores de esclerocios como *Sclerotium* y *Sclerotinia*, con lo cual permite el desarrollo de sistemas radiculares más fuertes y sanos; como consecuencia, aumenta su capacidad de captura de nutrientes y humedad (Cruzat y Ionannidis, 2008).

Trichoderma posee gran adaptabilidad a condiciones adversas gracias a la habilidad de producir estructuras de resistencia denominadas clamidosporas, a tolerar temperaturas hasta los 30 °C y al uso de una gran variedad de sustratos gracias a la amplia gama de enzimas inducibles por la presencia de hongos fitopatógenos. El rápido crecimiento y reproducción, la aptitud de modificar la rizósfera, la gran capacidad antagónica sobre hongos fitopatógenos, la eficiencia en el crecimiento y desarrollo vegetal, la solubilización de sales como fosfatos, magnesio hierro y manganeso, inducción de mecanismos de resistencia y su versatilidad metabólica explican su presencia en abundancia en diversos tipos de hábitat y sean eficientes como agentes de control biológico (Infante *et al.*, 2009).

Los principales mecanismos de *Trichoderma* que le faculta el control de fitopatógenos son la competencia por el lugar que ocupa y alimentos, la síntesis de sustancias antimicrobianas difusibles y volátiles, la desactivación de proteínas enzimáticas del patógeno, la resistencia inducida (Infante *et al.*, 2009) y el micoparasitismo, ejercida mediante enzimas hidrolíticas como la quitinasa y la β -1, 3-glucanasa ocasionando cambios estructurales a nivel citoplasmático, como la vacuolización, granulación, desorganización del citoplasma y lisis celular, registrado en los organismos afectados (Ezziyani *et al.*, 2004). También se evidenció la degradación

parcial de la pared celular del fitopatógeno restringiendo su crecimiento y actividad y la acción promotora del crecimiento de las plantas (Cano, 2011).

2.2.8. *Trichoderma harzianum*

Es empleado como un biofungicida para el control de enfermedades radiculares, foliares y tratamiento de semillas. El producto comercial en base a *T. harzianum* tiene efecto sobre *Pythium*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Thielaviopsis* y *Cylindrocladium*, (Gómez *et al.*, 2018). Mantiene las raíces saludables y erradica las enfermedades foliares (Agroterra, 2011). *Trichoderma harzianum* tiene la capacidad de colonizar y establecerse en la rizosfera. Obtiene sus nutrientes atacando a otros hongos mediante micoparasitismo en presencia de raíces saludables permitiendo el buen desarrollo de la raíz y toda la planta. Para lo cual, *Trichoderma* crece sobre las hifas del fitopatógeno y produce enzimas hidrolíticas como la B-1,3- glucanasa y quitinasa provocando la disolución de la pared y membrana celular seguida por derrame del contenido protoplasmático de la hifa del patógeno ocasionando la muerte (Harman, 2006). *T. harzianum* además produce sustancias antimicrobianas como Trichodermin y harzianopiricon que inhiben el desarrollo del fitopatógeno y enzimas líticas que desintegran las estructuras de resistencia como los esclerocios (Martínez *et al.*, 2017).

Singh *et al.* (2016) ensayaron a *Trichoderma harzianum* contra *Fusarium oxysporum f. sp. Lentis* causante de la marchitez de la lenteja y demostraron que es un hongo que tiene la capacidad de soportar diferentes tipos de estrés abiótico destacando el hecho de haber tenido mejor supervivencia, eficacia, adaptabilidad y productividad de las plantas con los siete atributos de la calidad de la semilla, como la germinación, longitud de los brotes, longitud de las raíces, longitud de las plántulas, peso seco de las plántulas, índice de vigor I y índice de vigor II.

2.2.9. *Bacillus subtilis*

B. subtilis es una bacteria con reacción positiva al test de Gram. Los mecanismos empleados para su acción y exclusión de fitopatógenos son la antibiosis, competencia y antagonismo. Además, es eficiente en la promoción del crecimiento vegetal. Producen antibióticos que son lipopeptídeos cíclicos de las familias de surfactinas, iturinas y fengicinas que además de sus propiedades antimicrobianas están involucrados en la

estimulación sistémica de respuestas de defensa de las plantas, en el proceso de colonización y en la motilidad de *Bacillus*. Producen enzimas digestivas como quitinasas, celulasas, amilasas, proteasas y glucanasas para ejercer su acción antagónica. Es de aplicación foliar y radicular (Stein, 2005; Gómez *et al.*, 2018 y Moreno *et al.*, 2018).

Referencias del empleo de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum* en el control de *C. destructans* en orégano no existen.

2.3. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

a. Agricultura sustentable

Está relacionada con una menor dependencia de los agroquímicos y es un sistema de producción agrícola económicamente viable que considera la conservación de los recursos y la calidad ambiental para satisfacer las necesidades básicas del individuo mejorando la calidad de vida de toda la sociedad (Martínez, 2011).

b. Agente de biocontrol (ABC)

Término referido a microorganismos que pueden reducir las poblaciones de otros microorganismos como los hongos causantes de enfermedades en plantas a través de efectos antagónicos como antibiosis, parasitismo y competencia por nutrientes y espacio (Granobles y Torres, 2013).

c. Biocontrol

Está referida a la disminución de la concentración del inóculo de un microorganismo patógeno, por microorganismos antagonistas, cambiando el equilibrio en poblaciones de organismos nocivos, para favorecer la producción agrícola (Castro y Rivillas, 2012).

d. Biopelículas bacterianas

Están caracterizados por el establecimiento de una gran comunidad bacteriana rodeada por una matriz secretadas exógenamente por un conjunto de células que son incompatibles con la movilidad celular (Allard *et al.*, 2016).

e. Invernadero

Es una casa agronómica para el cultivo de plantas que tiene por finalidad reproducir las condiciones climáticas para el adecuado crecimiento y desarrollo de las plantas establecidas en su interior, con un grado de independencia del medio externo. Su estructura

es metálica con cobertura plástica transparente que permite la entrada de irradiación luminosa y no permite el ingreso de la lluvia al interior (González *et al.*, 2017).

f. *Iturina A*

Es un antibacteriano de naturaleza lipopeptídica cíclica sintetizada por *Bacillus subtilis* durante el metabolismo secundario. Presenta actividad antifúngica contra fitopatógenos, además, es inductor de respuestas de defensa en las plantas reduciendo la severidad de las enfermedades (Zohora *et al.*, 2016).

g. *Microorganismos antagonistas*

Son algunas bacterias, hongos filamentosos y levaduriformes con capacidad de ejercer un efecto de control biológico sobre una diversidad de fitopatógenos y han sido empleados para controlar enfermedades foliares y radiculares en varios tipos de cultivos agrícolas (Hernández, 2007).

h. *Rizosfera*

Es un ecosistema edáfico contiguo a la raíz, complejo, constituido por factores físicos, químicos y biológicos donde interactúan las raíces, el suelo y los microorganismos que habitan allí (Moreno *et al.*, 2018).

CAPÍTULO III

MARCO FILOSÓFICO

En las últimas décadas, se ha acrecentado la percepción de la población humana acerca de la necesidad de conservar los recursos naturales y el entorno, vitales para la sociedad actual y venidera, de tal manera que en la producción agrícola los productores deben ofrecer a los consumidores productos inocuos y de calidad producidos mediante métodos de conservación para el manejo sostenible de los recursos vegetales, respetando el medio ambiente. En ese sentido, la calidad está referido a la protección de los recursos naturales durante su producción, la conservación del ambiente en salvaguarda de la salud de los operarios y usuarios (Mondino y Vero, 2006).

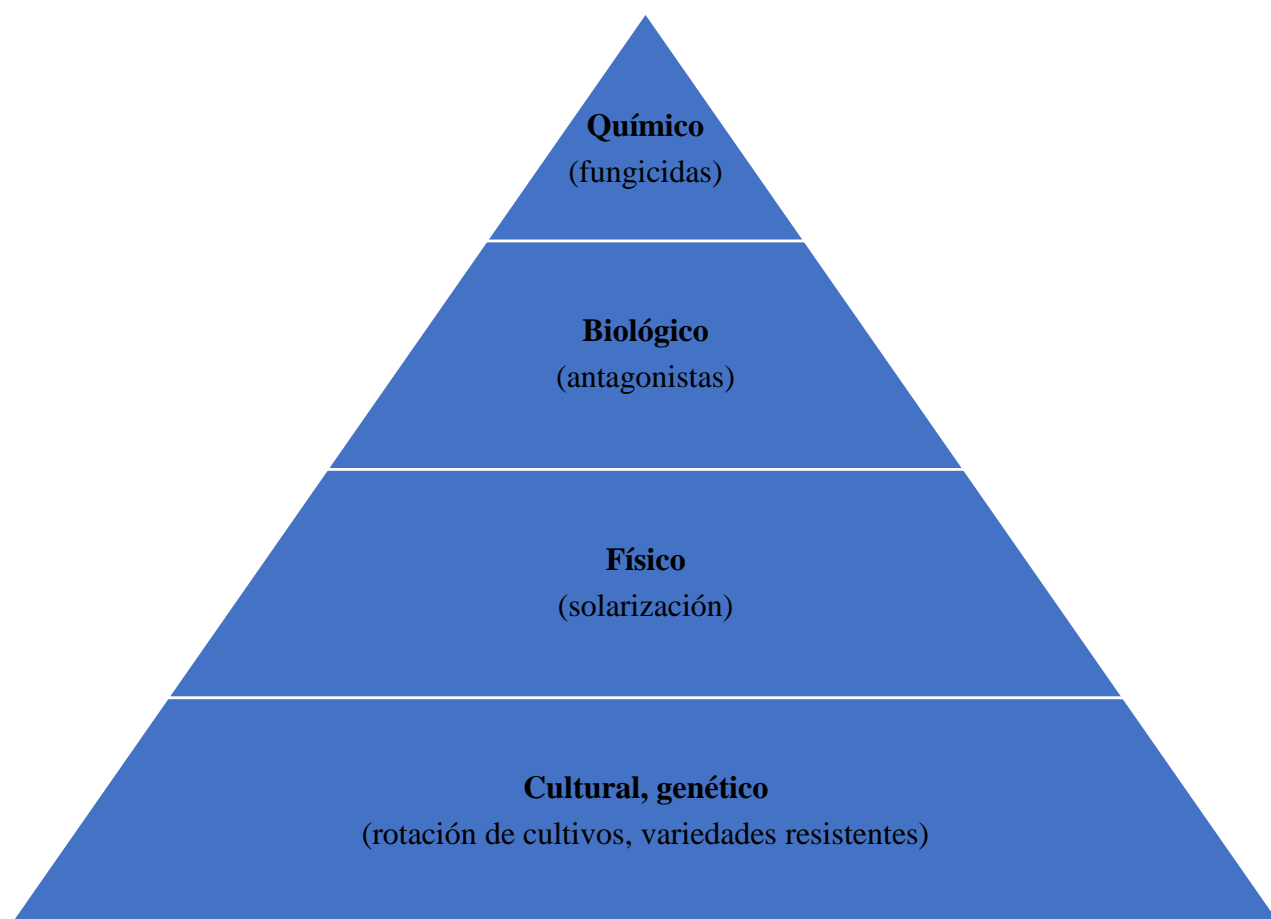
El manejo sostenible de los cultivos, empleado principalmente para la alimentación por las sociedades humanas, deben ser conducidos de una manera holística y con visión hermenéutica procurando alcanzar una relación armónica entre los organismos en general y el medio ambiente, incluido el recurso suelo. Esto exige que los agricultores y técnicos implementen complejos sistemas de Manejo Integrado de las Enfermedades con la finalidad de minimizar el uso de fungicidas solo para el momento crítico del desarrollo de la enfermedad y, de esta manera, minimizar sus efectos secundarios negativos sobre el ambiente y la salud humana (Agricultura, 2020).

La afección de cultivos agrícolas por fitopatógenos constituye una potencial amenaza al abastecimiento de alimentos a nivel global y su solución es compleja. Por lo mismo, el empleo de una variedad de estrategias de manera global e integrada para amortiguar la afección por enfermedades agrícolas que implique mínima aplicación de fungicidas es más efectivo y se denomina Manejo Integrado de Enfermedades. Gráficamente, se simboliza como una pirámide en los que el control cultural y genético son los componentes más vigorosos; por ello, ocupa la base más ancha en cambio el control químico deber ser mínimo, limitado a momentos críticos y ocupa el ápice estrecho de la pirámide (Pavone, 2021).

Las prácticas culturales y el control genético conforman la parte más ancha de la pirámide, en el segundo estrato el control físico, le sigue el control biológico y, finalmente, el control químico confinado a un estrecho vértice (**figura 1**) (Pavone, 2021).

Figura 1

Representación gráfica de los métodos de control para el Manejo Integrado de enfermedades en plantas



El Manejo Integrado implica una concepción filosófica diferente de la protección vegetal y se basa en que las poblaciones de patógenos, insectos plaga o malezas son “componentes del agro-ecosistema” y, por tanto, deben cohabitar con el cultivo. Asimismo, considera la protección del ambiente y los recursos naturales, como prioridad teniendo en cuenta, el contexto socio-económico en que se desenvuelven los cultivos (Mondino y Vero, 2006).

En la naturaleza, las plantas viven en permanente interacción con los microorganismos y estos entre sí; de manera benéfica, perjudicial o neutra. Algunos viven alrededor de las raíces (microbiota rizosférica), incluso en el interior de la raíz (microorganismos endófitos). Existen aproximadamente $4,5 \times 10^6$ microorganismos en un gramo de suelo rizosférico. Los nutrientes para el crecimiento de los microorganismos sobre la superficie radicular generados endógenamente en la planta difunden a la superficie como exudados. Estos exudados radiculares contienen azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, vitaminas y hormonas de crecimiento de la planta que son utilizados de manera eficiente como alimento por el microbiota del suelo. Asimismo, es natural que las plantas estén saludables por mecanismos de autorregulación que gobiernan los seres vivos conduciendo a una estabilidad natural. Esta autorregulación de las poblaciones de organismos vivos es denominado control biológico (Mondino y Vero, 2006).

Del mismo modo, el manejo sostenible de los recursos naturales está previsto en la Constitución Política del Perú. La Ley General del Ambiente – Ley N° 28611 señala:

Toda persona tiene el derecho a vivir en un ambiente saludable, equilibrado y adecuado para el pleno desarrollo de la vida, y el deber de contribuir a una efectiva gestión ambiental y de proteger el ambiente, así como sus componentes, asegurando particularmente la salud de las personas en forma individual y colectiva, la conservación de la diversidad biológica, el aprovechamiento sostenible de los recursos naturales y el desarrollo sostenible del país. (MINAM, 2005)

Además, como objetivos de la Política Nacional Ambiental, se considera “la promoción de conductas ambientalmente responsables, modalidades de producción y consumo responsable de bienes y servicios, así como el desarrollo y uso de tecnologías apropiadas y de prácticas de producción limpia en general” (MINAM, 2010).

El uso exclusivo de fungicidas y plaguicidas sintéticos no son una práctica de producción limpia y las leyes en nuestro país no se cumplen porque las sanciones no están bien establecidas. Por otra parte, el incremento de la población humana aumenta la presión sobre los recursos naturales como las plantas y la práctica del monocultivo por satisfacer las necesidades humanas conlleva al incremento de la población de fitopatógenos.

En ese sentido, se hace imprescindible realizar investigaciones relacionadas con la sanidad de los cultivos haciendo uso del control biológico para cada tipo de cultivo y, de ese modo, las entidades competentes implementen un programa de manejo integrado para cada enfermedad de un determinado cultivo, que involucre el control cultural, genético, físico y biológico, minimizando al control químico solo para el momento crítico del desarrollo de la enfermedad.

Entre los agentes de control biológico con acción fungicida sobre hongos transmitidos por el suelo, más destacados a nivel global, figuran el hongo *Trichoderma harzianum* y la bacteria *Bacillus subtilis*. El uso de biofungicidas, en la actualidad, representa una estrategia sustentable y constituyen una necesidad económica y ecológica. Son insumos económicamente atractivos para los productores del campo por su alta eficiencia y poco riesgo para la salud humana y el medio ambiente. Además, reducen la incidencia de la enfermedad dándole firmeza y resistencia a la planta.

CAPÍTULO IV

MARCO METODOLÓGICO

4.1. TIPO, ALCANCE Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

4.1.1. *Tipo y alcance de investigación*

El tipo de investigación es aplicada, porque se enfoca en responder si la aplicación de *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* tuvo un efecto positivo en el control de la pudrición de la raíz en orégano para el manejo sostenible del cultivo.

La investigación es de alcance explicativo, porque establece relaciones de causalidad entre las dos variables y permite explicar el efecto de la inoculación de los agentes de biocontrol (ABC), *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* (variable independiente) sobre la incidencia de la pudrición radicular y crecimiento de las plantas de orégano inoculado artificialmente con el patógeno *Cylindrocarpon destructans* (variable dependiente).

4.1.2. *Diseño de investigación*

El diseño es experimental, porque se manipula intencionalmente la variable independiente a través de la aplicación de dos agentes de biocontrol, *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* inoculados separadamente; juntas y cinco días antes de la inoculación artificial de *Cylindrocarpon destructans*. Además, permite medir su efecto sobre la incidencia de la pudrición radicular y el crecimiento de la planta (variable dependiente) en cada tratamiento. También, utiliza grupos de experimentación y grupos de control.

Se empleó el diseño completamente al azar con 8 tratamientos y 3 repeticiones. Cada unidad experimental estuvo compuesta por seis plantas, resultando 144 plantas en total. Cada planta constituyó la unidad muestral.

4.2. POBLACIÓN Y MUESTRA

4.2.1. *Población*

La población estuvo conformada por 144 plantas de Orégano de la variedad nigra común.

4.2.2. Muestra

El tamaño de la muestra corresponde al total de plantas de orégano.

4.3. IDENTIFICACIÓN DE VARIABLES Y OPERACIONALIZACIÓN

4.3.1. Variable independiente

Eficacia de *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* (causa).

4.3.2. Variable dependiente

Control de la pudrición radicular causado por *Cylindrocarpon destructans* en orégano (efecto).

4.3.3. Operacionalización de la variable dependiente

Control de la pudrición radicular causado por *Cylindrocarpon destructans* en orégano

Dimensión	Indicador	Unidad de medida
Incidencia de la enfermedad	Porcentaje de incidencia de la enfermedad	Porcentual
Estimulación del crecimiento y desarrollo de la planta	Altura de la planta	Centímetros
	Longitud de la raíz	
	Porcentaje de materia seca del follaje	Porcentual
	Porcentaje de materia seca de la raíz	

4.4. TÉCNICA E INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

La técnica que se empleó para la recolección de datos fue la experimentación y observación y el instrumento, la ficha de registro de datos.

4.5. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Cylindrocarpon destructans* ASOCIADO A PUDRICIÓN RADICULAR EN CULTIVO DE ORÉGANO

El aislamiento de *Cylindrocarpon destructans* de plantas de orégano con pudrición radicular, la purificación, caracterización e identificación se llevaron a cabo en el laboratorio de Micología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann de Tacna.

4.5.1. Material biológico

El material biológico se colectó en un campo de cultivo del distrito de Camilaca en Candarave, durante el mes de mayo de 2019. Se recolectaron plantas de orégano con síntomas característicos de pudrición radicular causado por *Cylindrocarpon destructans*, las cuales son: Ennegrecimiento y descortezamiento de raíces y raicillas (**figura 2**), amarillamiento y marchitez del follaje (**figura 3**); para corroborar el agente causal de la enfermedad.

Figura 2

Raíces de plantas de orégano con pudrición radicular



Figura 3

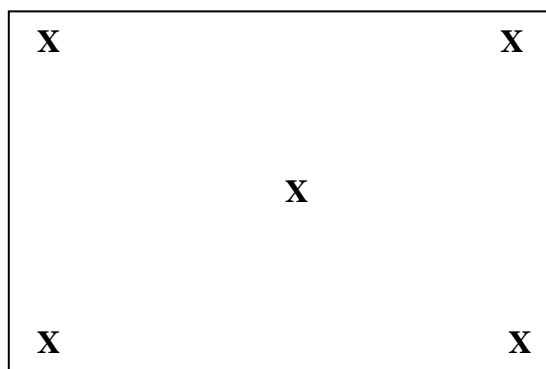
Síntomas en el follaje de plantas de orégano con pudrición radicular



Se realizaron cinco colectas mediante el método de muestreo de cinco de oros descrito por Flores (2012) (figura 4). Las muestras se colocaron en una bolsa de polietileno, se rotularon adecuadamente y se transportaron al laboratorio de Micología de la UNJBG para su aislamiento.

Figura 4

Esquema de muestreo en cinco de oros



Por otra parte, se adquirió plantas sanas de orégano, variedad negra, de la ciudad de Arequipa y se obtuvo esquejes de 10 cm. Se hicieron crecer en semilleros hasta que la

plántula tuviera 15 cm de altura. Finalmente, se trasplantó en bolsas, los que fueron usados para la experimentación en invernadero.

4.5.2. Aislamiento y purificación de *Cylindrocarpon destructans*

En primer lugar, las muestras de raíces se lavaron con agua y se obtuvieron segmentos de 3 cm de la zona de avance de la enfermedad. Luego, se sometió a desinfección con hipoclorito de sodio al 1,0 por ciento por 2 minutos y se enjuagó con agua destilada estéril y, finalmente, se secaron sobre papel toalla estéril. Por otro lado, la inducción de la esporulación se realizó mediante el método de la cámara húmeda (French y Hebert, 1980). Para ello, se colocaron unos segmentos de la raíz desinfectada y seca en una cámara húmeda.

El aislamiento del fitopatógeno se hizo mediante el método de siembra para hongos fitopatógenos indicado por French y Hebert (1980) de dos maneras: en la primera, las esporas producidas en los segmentos de raíz de la cámara húmeda fueron colocadas en el centro del medio de cultivo de Agar Papa Dextrosa suplementado con cloranfenicol ((PDAc) dispuesto en placas de Petri y, en la segunda, se obtuvo cuatro pedazos de 0,5 cm de los segmentos de raíces desinfectados restantes y se dispusieron en cuatro puntos fijos sobre PDAc. Todas las placas sembradas se incubaron en una incubadora marca Bionet S.A. modelo BN80 a temperatura de 25 ± 1 °C hasta la esporulación del hongo.

La purificación de *Cylindrocarpon destructans* se realizó mediante la técnica de cultivo monospórico descrito por French y Hebert (1980), que consistió en sembrar una suspensión de esporas del cultivo en agar agua por siembra de diseminación, luego se ubicó con el estereoscopio, se cortó un disco de agar con la espora y se dispuso sobre el medio Agar Papa Dextrosa suplementado con cloranfenicol, en placas. Finalmente, se incubó a 25 ± 1 °C en una incubadora por 4 semanas y se evaluó la presencia de estructuras reproductivas a intervalos de 3 días según Ayala *et al.* (2006).

4.5.3. Caracterización morfológica e identificación

Las características morfológicas de las colonias en Agar Papa Dextrosa fueron descritas después de 14 días de incubación a 25 °C en oscuridad de acuerdo a Cabral *et al.* (2012). La medición del diámetro de la colonia se realizó a los 7 días de incubación. El color de la colonia se describió haciendo uso de la cartilla de colores de Rayner (1970).

La caracterización de la morfología microscópica se realizó mediante observación microscópica de montajes del cultivo fúngico. El líquido de montaje empleado fue el azul de lactofenol. Se describieron las estructuras microscópicas y se midieron 30 observaciones de cada estructura como los conidióforos, macroconidias, microconidias y clamidósporas.

Las observaciones se efectuaron con un microscopio estereoscopio y un microscopio óptico marca Micros Austria. Los aislamientos se identificaron con las claves taxonómicas de Barnett y Hunter (1998), Chaverri *et al.* (2011) y Lombard *et al.* (2015).

4.6. MULTIPLICACIÓN DEL PATÓGENO *Cylindrocarpon destructans*, PREPARACIÓN DE INÓCULO E INOCULACIÓN

La multiplicación de *Cylindrocarpon destructans* se efectuó haciendo la siembra del hongo en Agar Papa Dextrosa en placas a partir del cultivo puro y luego se incubó a 25 °C por 15 días. Posteriormente, fue sometido a la luz para estimular la esporulación.

El inóculo se preparó colocando 5 discos de este cultivo en bolsas de polipropileno conteniendo 50 g de trigo estéril y se incubó a 25 °C x 15 días hasta la colonización completa.

La inoculación del patógeno se hizo en el momento del trasplante, colocando los 50 g de trigo colonizado con *C. destructans* en contacto con las raíces de cada planta para provocar la pudrición radicular de manera artificial.

4.7. EFICACIA DE *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* SOBRE *Cylindrocarpon destructans*

Se ensayó el efecto de dos productos comerciales con acción biofungicida y bioestimulante a base de *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* sobre *Cylindrocarpon destructans* agente causal de la pudrición de raíces en orégano. Se empleó azoxystrobin como testigo estándar, plantas inoculadas artificialmente con el patógeno, *C. destructans* como testigo enfermo y plantas sin inóculo como testigo absoluto. El ensayo tuvo una duración de 3 meses, del 6 de julio al 6 octubre de 2019 y se llevó a cabo en bolsas de almácigo de 1 kg de capacidad, en el invernadero de la Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann de Tacna.

4.7.1 *Distribución de tratamientos para el experimento en invernadero*

Las plantas de orégano variedad “nigra” de 15 cm de altura crecidas en semillero se trasplantaron en bolsas de almácigo. El sustrato fue una mezcla de suelo, arena y compost estéril en una proporción de 2: 2: 1. La totalidad de 144 plantas se distribuyeron en tres bloques (repeticiones): I, II y III. Cada bloque estuvo conformado por 8 tratamientos y cada unidad experimental por 6 plantas con un total de 44 plantas por bloque (**figura 5**).

4.7.2 *Descripción de los productos comerciales con acción biofungicida y bioestimulante*

En la tabla 1, se muestra los 8 tratamientos empleados, incluido el azoxystrobin (TA) que fue utilizado como testigo estándar, el testigo enfermo (TE) inoculado solamente con el patógeno *Cylindrocarpon destructans* y el testigo absoluto (T) sin inóculo de los agentes de control biológico ni patógeno. La inoculación de los agentes de control biológico y azoxystrobin se hizo en dos momentos, simultáneamente con el patógeno y 5 días antes que el patógeno.

a) *Trichoderma harzianum* (TRICHO D). Tricho D es un biofungicida de uso agrícola en formulación polvo mojable a base de *Trichoderma harzianum*. Contiene esporas a una concentración de 1×10^8 esporas viables/g. Controla la pudrición radicular causada por *Fusarium oxysporum* en alcachofa y cebolla, la pudrición radicular producida por *Phytophthora cinnamomi* en arándano y palto, la muerte regresiva causada por *Lasiodiplodia theobromae* en palto, la chupadera ocasionada por *Rhizoctonia solani* en papa y la moniliasis del cacao. Su mecanismo de acción es por competencia, micoparasitismo y antibiosis (SERFI, 2021).

b) *Bacillus subtilis* (BIO-SPLENT 70 WP). Bio-Splent es otro biofungicida de uso agrícola en formulación polvo mojable, a base de *Bacillus subtilis* AP-01. Contiene esporas a una concentración de 1×10^9 ufc/g. Se usa de modo preventivo. Su acción controladora es por colonización, competencia, y antagonismo. Además, induce resistencia sistémica adquirida. Controla el mildiu en ajo y cebolla, la oidiosis en alcachofa y arveja, la pudrición gris en arándano, chirimoya, durazno y granado, manchas foliares ocasionado por *Alternaria alternata* en arándano y granado, *Fusarium oxysporum*

y *Stemphylium vesicarium* en espárrago, moniliasis del cacao y la roya del café entre otras enfermedades fúngicas y bacterianas (Silvestre, 2015).

c) **Azoxystrobin (OFICIAL 500 WG)**. Es un fungicida de acción sistémica local, traslaminar y de contacto utilizado para prevenir y controlar enfermedades ocasionados por ascomicetos, basidiomicetos y oomicetos. Pertenece al grupo de las estrobirulinas. Está compuesto por la Azoxystrobina, 500 g/L. Su mecanismo de acción es la interferencia de la respiración celular del agente fitopatógeno interrumpiendo la germinación de las esporas y su crecimiento (Soltagro, 2018).

Tabla 1

*Tratamientos empleados para el control de la pudrición radicular en orégano causada por *Cylindrocarpon destructans**

Núm.	Código	Tratamientos
T1	THa	Planta + <i>C. destructans</i> + <i>T. harzianum</i> inoculadas 5 día antes
T2	BSa	Planta + <i>C. destructans</i> + <i>B. subtilis</i> inoculadas 5 días antes
T3	THj	Planta + <i>C. destructans</i> + <i>T. harzianum</i> inoculadas juntas
T4	BSj	Planta + <i>C. destructans</i> + <i>B. subtilis</i> inoculadas juntas
T5	TAA	Planta + <i>C. destructans</i> + Azoxystrobin inoculadas 5 días antes
T6	TAj	Planta + <i>C. destructans</i> + Azoxystrobin inoculadas juntas
T7	TE	Planta + <i>C. destructans</i> (testigo enfermo)
T8	T	Planta sin inóculo (testigo absoluto)

4.7.3 Dosis y frecuencia de aplicación de *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis* y azoxystrobin

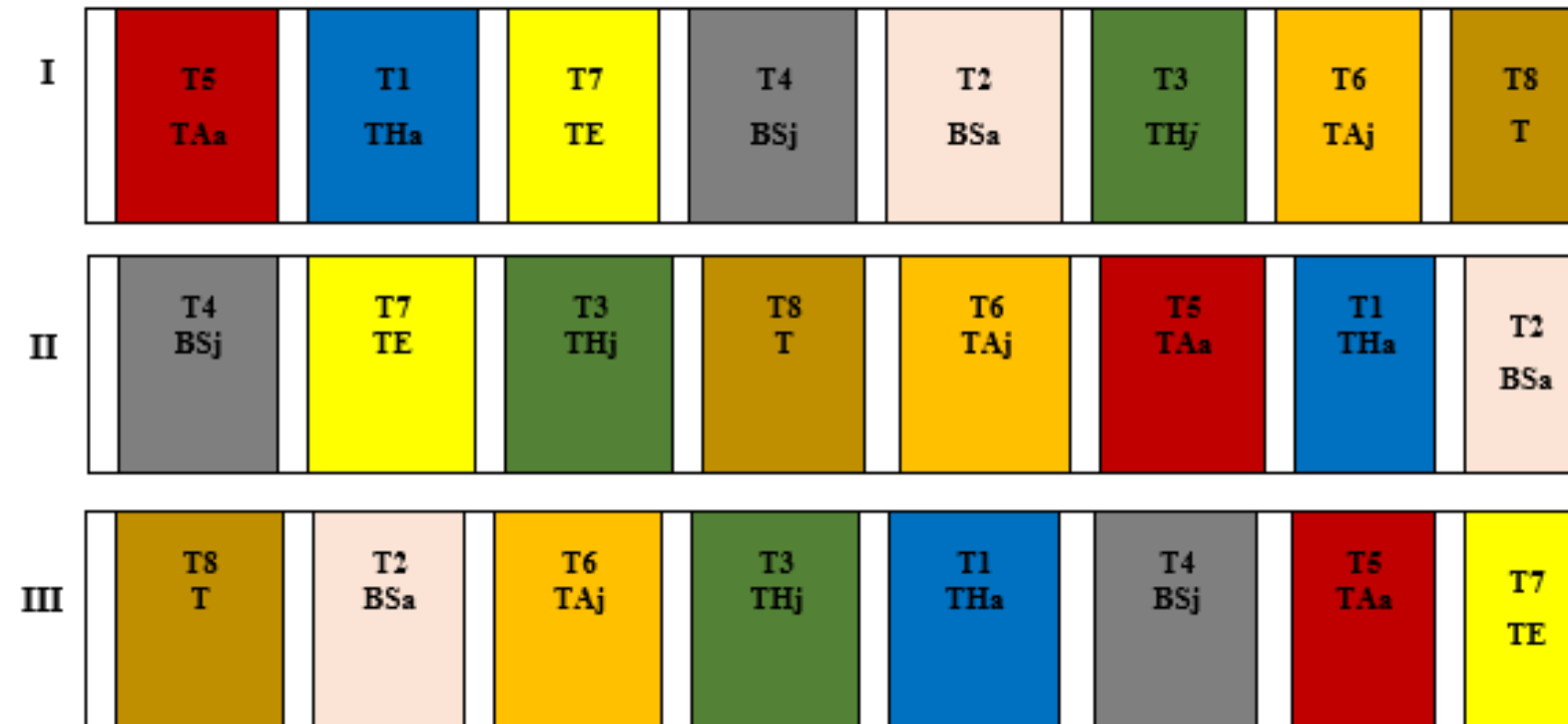
La dosis y frecuencia de aplicación de los productos comerciales *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis* y azoxystrobin utilizados para la prueba de eficacia en el control de la pudrición radicular se basó en la ficha técnica de cada producto (**tabla 2**).

La preparación de la suspensión con los agentes de biocontrol y fungicida estándar se hicieron *in situ*, para el cual se adicionó el coadyuvante Alkylaril polyethoxy etanol 14% (BB5®-PLUS) al momento de la preparación. La inoculación se llevó a cabo el 6 de julio de 2019 en horas de la mañana.

La aplicación de la suspensión de *T. harzianum*, *B. subtilis* y azoxystrobin se hizo manualmente por vía drench incorporando un volumen de 250 mL de la suspensión en la superficie del sustrato de cada planta al momento del trasplante de las plántulas de orégano simultáneamente a la inoculación del patógeno *Cylindrocarpon destructans* y 5 días antes de acuerdo a los tratamientos de la **tabla 1**.

Figura 5

Distribución de tratamientos y bloques del experimento para el control de *Cylindrocarpon destructans* en orégano, en invernadero, 2019



THj: *T. harzianum* inoculado juntos

BSj: *Bacillus subtilis* inoculado juntos

THa: *T. harzianum* inoculado 5 días antes

BSa: *Bacillus subtilis* inoculado 5 días antes

TAj: Testigo Azoxystrobin inoculado juntos

TAa: Testigo Azoxystrobin inoculado 5 días antes

TE: Testigo enfermo

T: Testigo absoluto

Las plantas de orégano se rotularon y se regaron de acuerdo a la necesidad de la planta durante todo el ensayo. La aparición de síntomas en la parte aérea de la planta se registró por inspección diaria.

Los tratamientos con *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum* y azoxystrobin se aplicaron en dos oportunidades y con una frecuencia de 10 días, 30 días y 30 días, respectivamente.

Tabla 2

Dosis y frecuencia de aplicación de Bacillus subtilis, Trichoderma harzianum y azoxystrobin

Ingrediente activo	Firma comercial	Nombre comercial	Dosis	Fecha y frecuencia de aplic.		
				6 jul	16 jul	6 agos
				1 ^{era} aplic.	10dda*	30dda
<i>B. subtilis</i>	Silvestre	Bio Spelnt 70 WP	1,5 kg/200 L	X	X	
<i>T. harzianum</i>	Serfi S.A.	Tricho D	300g/ha	X		X
Azoxystrobin	Soltagro	Oficial 500 WG	0.06 kg/Cil	X		X

Leyenda: *dda, días después de la primera aplicación.

La variable de respuesta del efecto biofungicida de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum* sobre el control de la enfermedad que se evaluó fue la incidencia de la enfermedad. Las variables de respuesta de su efecto bioestimulante sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas de orégano evaluadas, fueron los siguientes: Altura de la planta, longitud de la raíz, el peso fresco y seco de la raíz y del follaje. Todas las variables de respuesta se evaluaron al final del ensayo.

4.7.4 *Determinación del porcentaje de incidencia y porcentaje de reducción de la enfermedad (RE)*

La incidencia de la enfermedad se evaluó a los tres meses. Se consideró como unidad de análisis cada una de las plantas de orégano. Se seleccionaron y extrajeron cada una de las plantas de orégano por tratamiento y repetición y se registraron el número de plantas enfermas (PE) por observación de la presencia de síntomas en el follaje y en la raíz.

El porcentaje de incidencia se determinó utilizando la fórmula descrita por Mont (2002) y el porcentaje de la reducción de la enfermedad (RE) se calculó utilizando la fórmula referida por Hoyos *et al.* (2008) y son los siguientes:

$$\text{Incidencia (I)} = \frac{\text{Número de plantas enfermas}}{\text{Número total de plantas}} \times 100$$

$$\text{RE} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de PE en el TE} - \text{N}^\circ \text{ de PE en cada tratamiento}}{\text{N}^\circ \text{ de PE en el testigo enfermo}} \times 100$$

4.7.5 *Medición de la altura de la planta*

La medición de la altura de la planta se realizó al final del ensayo. La altura de las plantas de orégano se midió con una regla milimetrada desde el cuello de la planta hasta el ápice terminal.

4.7.6 *Medición de la longitud de la raíz*

Al finalizar el experimento, se extrajeron las plantas para medir las raíces según el método ideado por Guevara y Guenni (2013). Se hizo cuadrículas de 1 cm en un tablero de vidrio y se agregó agua con un gotero, se colocó las raíces, se extendieron sobre las cuadrículas y se midieron con una regla milimetrada desde el inicio de la raíz principal hasta el extremo más distal. La fórmula para la medición de la longitud de la raíz fue la siguiente:

$$\text{LR} = \frac{\pi * N * D}{4}$$

Dónde:

LR, es la longitud de la raíz

N, es la longitud de cuadrícula.

D, el número de intersecciones en las cuadrículas.

π (pi), 3,1416

4.7.7 Medición del peso fresco y peso seco de las plantas

Se determinó el peso fresco y seco de raíz y follaje por separado al finalizar el experimento. El sistema aéreo se separó del sistema radicular y se pesó inmediatamente para determinar el peso fresco. Se empaquetaron con papel aluminio el follaje y raíz de las plantas individuales y se colocaron en un horno de secado a temperatura de 80 °C durante 48 horas. Se utilizó una balanza digital para medir el peso en los diferentes tratamientos.

La materia seca se expresó en forma porcentual según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Materia seca} = \frac{\text{Peso seco de la muestra}}{\text{Peso fresco de la muestra}} \times 100$$

4.8 PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS

Para el análisis de datos, se empleó el software estadístico Statgraphics Centurión XVI. Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) a una probabilidad F de 0,05 y, para determinar las diferencias estadísticas entre tratamientos, se realizó la prueba de significancia de Tukey considerando un nivel de significancia estadística del 5 % ($\alpha = 0,05$).

CAPÍTULO V

RESULTADOS

5.1 AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA E IDENTIFICACIÓN DE *Cylindrocarpon destructans*

Como resultado de las cinco colectas de muestras de raíces con síntoma de ennegrecimiento y descortezamiento, se obtuvieron diez aislamientos similares (A1 – A10). A estos aislamientos, se le hizo la caracterización e identificación morfológica a nivel de especie en el laboratorio. Las características morfológicas culturales y microscópicas de los aislamientos en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) se muestran en la figura 6 y tabla 3. Estos resultados permitieron identificar a *Cylindrocarpon destructans* corroborando su presencia como agente causal de la pudrición de raíces en plantaciones del orégano procedentes de Camilaca, Candarave.

Figura 6

Características culturales de los aislamientos en medio de cultivo PDA. a) superficie de la colonia de 14 días de incubación y b) reverso de la colonia

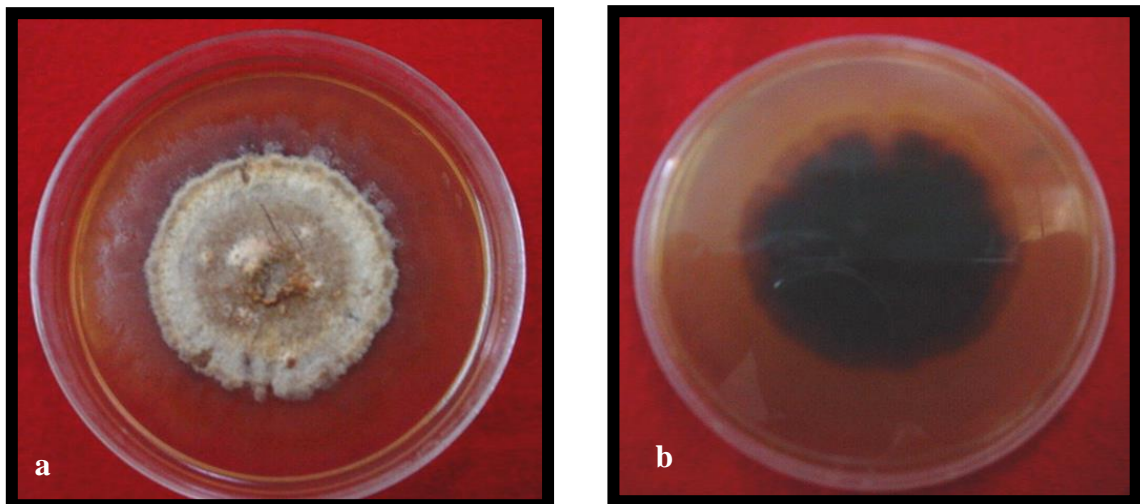


Tabla 3

Característica morfológica de los aislamientos de raíces con pudrición en plantas de orégano variedad nigra, Camilaca, Candarave, 2019

Aislamientos	Características culturales	Características microscópicas
A1 – A10	En PDA, colonia algodonosa, beige a los 7 días y aterciopelada, marrón amarillento, con anillos concéntricos a los 14 días. Reverso marrón oscuro al centro.	Conidióforo simple. Macroconidio cilíndrico, recto, hialino, 1-3 septas. Microconidio oblongo, elipsoide, hialino con 1 septa y clamidospora parda, globosa, intercalar, en cadenas.

5.2 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE INCIDENCIA DE LA ENFERMEDAD

Según el análisis de varianza (**Anexo 1**) y la comparación de medias por medio de la prueba de Tukey (**tabla 4** y **figura 7**), con un nivel de $\alpha = 0,05$, existe diferencia altamente significativa entre los tratamientos para el porcentaje de incidencia ($p = 0,000$), pero no existe diferencia estadística entre bloques. El coeficiente de variación de 8,448 % indica que el experimento fue bien manejado en condiciones de invernadero.

El testigo enfermo inoculado con el patógeno *Cylindrocarpon* (TE) presentó el valor más alto del porcentaje de incidencia del 100 %, seguido de los tratamientos azoxystrobin (TAa) inoculado 5 días antes y simultáneamente con el patógeno (TAj) con 66,67 % mostrando ser iguales entre ellos, pero con diferencias estadísticas con el testigo enfermo. Por otra parte, el testigo absoluto (T) presentó el valor más bajo del porcentaje de incidencia de 5,5 %, seguido de los tratamientos *T. harzianum* (THj) y *B. subtilis* (BSj) inoculados simultáneamente con el patógeno, *T. harzianum* (THa) y *B. subtilis* (BSa) inoculados 5 días antes que el patógeno con 16,7 %, 16,7 %, 16,7 % y 33,3 % respectivamente, sin mostrar diferencias entre los tres primeros, pero diferentes al tratamiento *Bacillus subtilis* inoculado 5 días antes que el patógeno y al testigo absoluto.

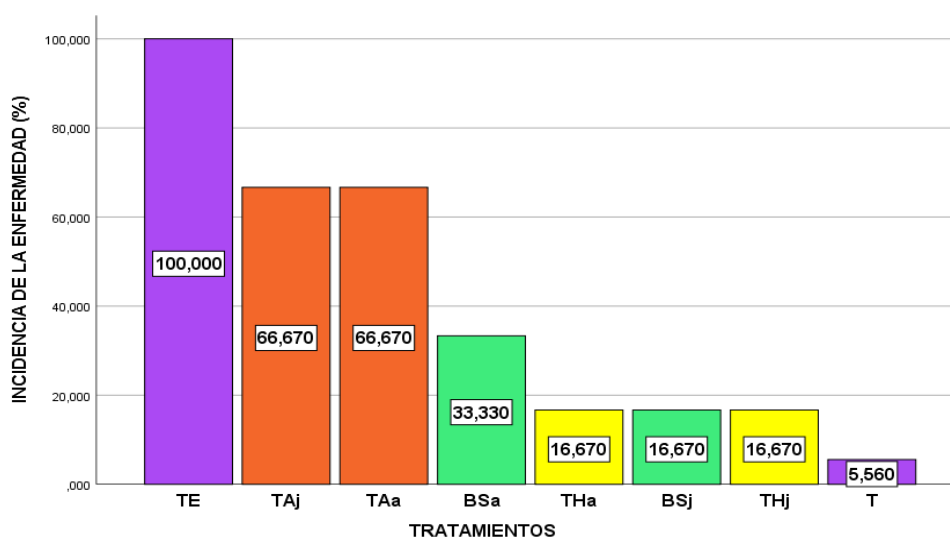
Tabla 4

Comparación de medias del porcentaje de incidencia mediante la prueba de Tukey con $\alpha = 0,05$ como consecuencia de los tratamientos para el control de *Cylindrocarpon destructans* en orégano variedad negra, Tacna, 2019

Núm.	Tratamientos	Incid.	Significancia
1	TE: Planta + <i>C. destructans</i> (testigo enfermo)	100,00	a
2	TAa: Planta + <i>C. destructans</i> + azoxys. inoculada 5 días	66,67	b
3	antes	66,67	b
4	TAj: Planta + <i>C. destructans</i> + azoxyst. inoculada juntas	33,33	c
5	BSa: Planta + <i>C. destruct.</i> + <i>B. subtilis</i> inoculada 5 días antes	16,67	d
6	THa: Planta + <i>C. destruct.</i> + <i>T. harzia.</i> inoculada 5 días antes	16,67	d
7	BSj: Planta + <i>C. destructans</i> + <i>B. subtilis</i> inoculada juntas	16,67	d
8	THj: Planta + <i>C. destructans</i> + <i>T. harzianum</i> inoculada juntas	5,56	e
	T: Planta sin inóculo (testigo absoluto)		

Figura 7

Comparación de medias del porcentaje de incidencia en los tratamientos para el control de *Cylindrocarpon destructans* en orégano variedad negra, Tacna, 2019

**Leyenda:**

THa: *T. harzianum* 5 días antes que el patógeno

BSa: *B. subtilis* 5 días antes que el patógeno

THj: *T. harzianum* y patógeno

BSj: *B. subtilis* y patógeno

TAa: Azoxystrobin 5 días antes que el patógeno

TAj: Azoxystrobin y patógeno

TE: Planta con el patógeno (testigo enfermo)

T: Planta sin inóculo (testigo absoluto)

5.3 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE REDUCCIÓN DE LA ENFERMEDAD

Según el análisis de varianza (**Anexo 2**) y la comparación de medias Tukey (**tabla 5 y figura 8**), con un nivel de significancia de 0,05, existe diferencia altamente significativa entre los tratamientos para el porcentaje de reducción de la enfermedad, pero no existe diferencia estadística entre bloques. El coeficiente de variación de 5,698 % indica que el experimento fue bien manejado en condiciones de invernadero.

El testigo absoluto (T) presentó el valor más alto de reducción de la enfermedad del 94,4 %, seguido de los tratamientos *T. harzianum* (THa) inoculado 5 días antes y simultáneamente con el patógeno (THj), *B. subtilis* (BSj) inoculado simultáneamente y 5 días antes que el patógeno (BSa) con 83,3 %, 83,3 %, 83,3 % y 66,7 %, respectivamente, sin diferencias entre los tres primeros, pero diferentes al tratamiento *B. subtilis* inoculado antes que el patógeno y al testigo absoluto. Por otra parte, el testigo enfermo (TE) presentó el valor más bajo de reducción de la enfermedad de 0,0 %, seguido de los tratamientos azoxystrobin inoculada 5 días antes (TAa) y simultáneamente con el patógeno (TAj) con 33,3 % sin diferencias estadísticas entre ellos, pero diferentes al testigo enfermo.

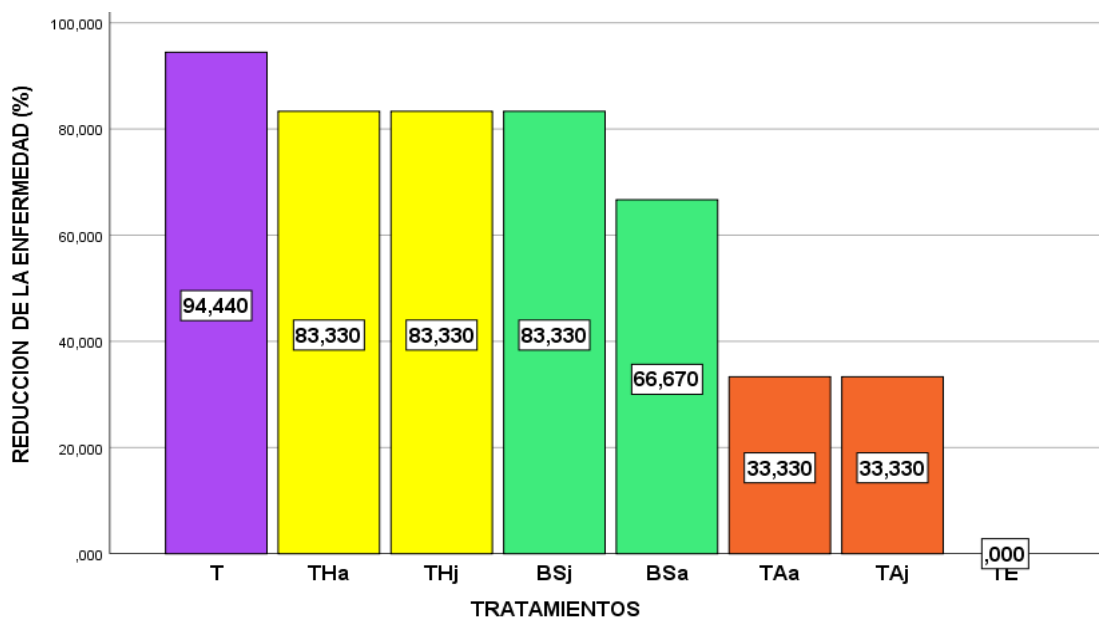
Tabla 5

Comparación de medias del porcentaje de reducción de la enfermedad de los tratamientos en el control de C. destructans en orégano variedad negra, Tacna, 2019

Núm.	Tratamientos	Red. E	Signific.
1	T: Planta sin inóculo (testigo absoluto)	94,44	a
2	THa: Planta + <i>C. destruct.</i> + <i>T. harzian.</i> inoculada 5 días antes	83,33	b
3	THj: Planta + <i>C. destructans</i> + <i>T. harzianum</i> inoculada juntas	83,33	b
4	BSj: Planta + <i>C. destructans</i> + <i>B. subtilis</i> inoculada juntas	83,33	b
5	BSa: Planta + <i>C. destruct.</i> + <i>B. subtilis</i> inoculada 5 días antes	66,67	c
6	TAj: Planta + <i>C. destructans</i> + azoxystrobin inoculada juntas	33,33	d
7	TAa: Planta + <i>C. destruct.</i> + azoxystr. inoculada 5 días antes	33,33	d
8	TE: Planta + <i>C. destructans</i> (testigo enfermo)	0,00	e

Figura 8

Comparación de medias del porcentaje de reducción de la enfermedad de los tratamientos en el control de *C. destructans* en orégano variedad negra, Tacna, 2019

**Leyenda:**

THa: *T. harzianum* 5 días antes que el patógeno

BSa: *B. subtilis* 5 días antes que el patógeno

THj: *T. harzianum* y patógeno

BSj: *B. subtilis* y patógeno

TAa: Azoxystrobin 5 días antes que el patógeno

TAj: Azoxystrobin y patógeno

TE: Planta con el patógeno (testigo enfermo)

T: Planta sin inóculo (testigo absoluto)

5.4 Determinación de la altura de la planta

De acuerdo al análisis de varianza (**Anexo 3**) y a la comparación de medias mediante la prueba de Tukey (**tabla 6 y figura 9**), con un nivel de significancia de 0,05, existe diferencia altamente significativa entre los tratamientos para la altura de la planta, pero no existe diferencia estadística entre bloques. El coeficiente de variación de 3,118 % indica que el experimento fue bien manejado en condiciones de invernadero.

El tratamiento *B. subtilis* y *T. harzianum* inoculada 5 días antes que el patógeno presentó el valor más alto de la altura de la planta de 45,7 y 45,1 cm seguido de los tratamientos *B. subtilis* y *T. harzianum* inoculados simultáneamente con el patógeno con 42,5 y 41,9 cm, respectivamente, sin diferencias estadísticas entre ellos, pero diferentes a los tratamientos inoculados antes que el patógeno. Entre tanto, el testigo estándar azoxystrobin inoculada antes (TAa) presentó el valor más bajo de altura de la planta de

39,1 cm, sin diferencias estadísticas con respecto al testigo absoluto (T), 38,2 y el testigo enfermo (TE), 37,2.

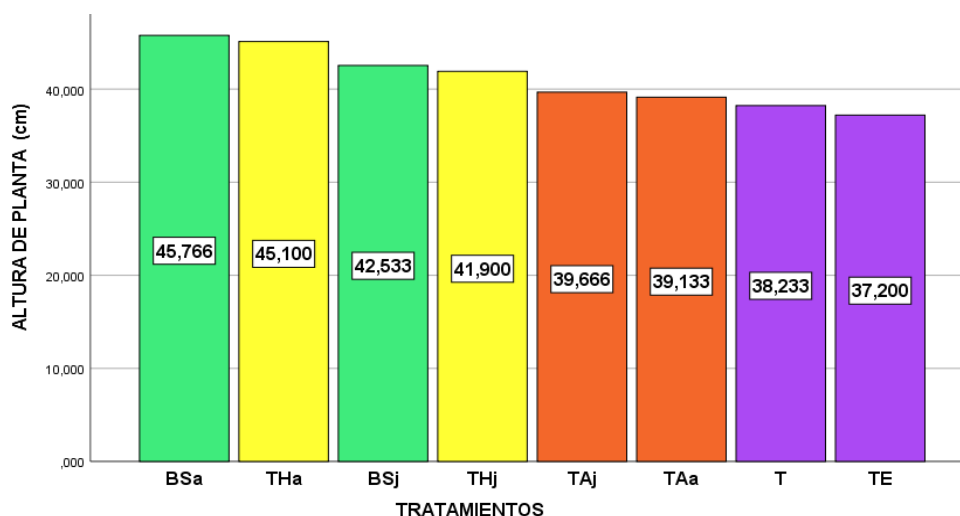
Tabla 6

*Comparación de medias de la altura de la planta mediante Tukey con $\alpha=0.05$ como consecuencia de los tratamientos para el control de *C. destructans* en orégano variedad negra, Tacna, 2019*

Núm.	Tratamientos	Altura	Signific.
1	BSa: Planta + <i>C. destruct.</i> + <i>B. subtilis</i> inoculada 5 d antes	45,766	a
2	THa: Planta + <i>C. destruct.</i> + <i>T. harzian.</i> inoculada 5 d antes	45,100	a
3	BSj: Planta + <i>C. destruct.</i> + <i>B. subtilis</i> inoculada juntas	42,533	b
4	THj: Planta + <i>C. destruct.</i> + <i>T.harzianum</i> inoculada juntas	41,900	bc
5	TAj: Planta + <i>C. destruct.</i> + azoxyst. inoculada juntas	39,666	cd
6	TAA: Planta + <i>C. destruct.</i> + azoxyst. inoculada 5 d antes	39,133	de
7	T: Planta sin inóculo (testigo absoluto)	38,233	de
8	TE: Planta + <i>C. destructans</i> (testigo enfermo)	37,200	e

Figura 9

*Comparación de medias de altura de planta como efecto de los tratamientos en el control de *Cylindrocarpon destructans* en orégano variedad negra, Tacna, 2019*



Leyenda:

THa: *T. harzianum* 5 días antes que patógeno

BSa: *B. subtilis* 5 días antes que el patógeno

THj: *T. harzianum* y patógeno juntos

BSj: *B. subtilis* y patógeno juntos

TAA: Azoxystrobin 5 días antes que el patógeno

TAj: Azoxystrobin y patógeno juntos

TE: Planta con el patógeno (testigo enfermo)

T: Planta sin inóculo (testigo absoluto)

5.5 Determinación de la longitud de la raíz

Acorde al análisis de varianza (**anexo 4**) y la comparación de medias mediante la prueba de Tukey (**tabla 7 y figura 10**), con un nivel de significancia del 5 %, $\alpha= 0,05$, existe diferencia altamente significativa entre los tratamientos para la longitud de la raíz, pero no existe diferencia estadística entre bloques. El C.V. de 3,878 % indica que el experimento fue bien manejado.

B. subtilis inoculada antes que el patógeno (BSa) presentó el valor más alto de la longitud de la raíz de 30,1 cm, seguido del tratamiento *T. harzianum* inoculada antes que el patógeno (THa), *B. subtilis* (BSj) y *T. harzianum* (THj) inoculados simultáneamente con el patógeno con 29,3, 28,2 y 27,7 cm, respectivamente, mostrando diferencias entre los biocontroladores inoculados junto con el patógeno y el tratamiento *B. subtilis* inoculado antes. Por otra parte, el tratamiento testigo enfermo (TE) presentó el valor más bajo de longitud de la raíz de 16,9 cm, seguido del testigo absoluto (T) y azoxystrobin inoculada antes (TAa) y simultáneamente con el patógeno (TAj) con 18,5, 20,4 y 20,9 cm, respectivamente, con diferencia estadística entre el testigo absoluto y los tratamientos azoxystrobin inoculadas tanto antes como junto con el patógeno, pero similar al testigo enfermo.

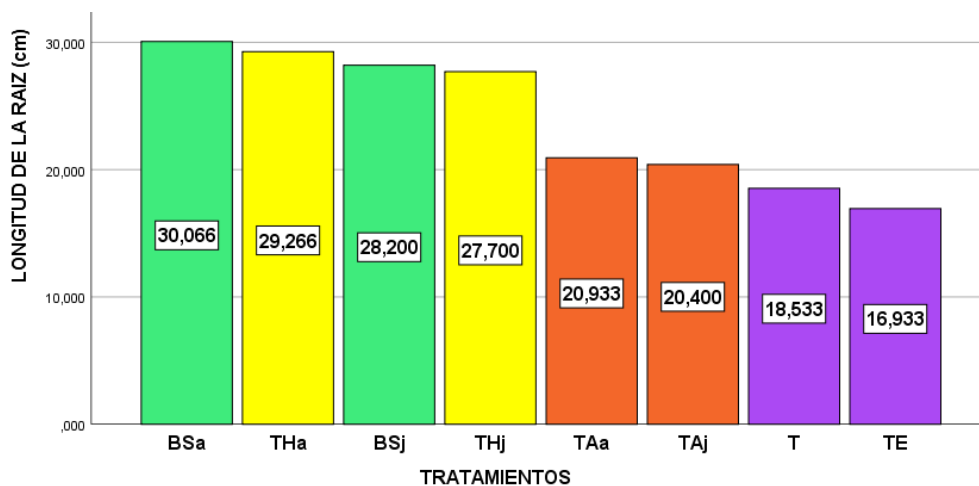
Tabla 7

*Comparación de medias de la longitud de la raíz por medio de la prueba de Tukey con $\alpha=0,05$ como resultado de los tratamientos en el control de *Cylindrocarpon destructans* en orégano variedad nigra, Tacna, 2019*

Núm.	Tratamientos	Long. raíz	Signific.
1	BSa: Planta + <i>C. destruct.</i> + <i>B. subtilis</i> inoculada 5 días antes	30,066	a
2	THa: Planta + <i>C. destruct.</i> + <i>T. harzian.</i> inoculada 5 días antes	29,266	ab
3	BSj: Planta + <i>C. destructans</i> + <i>B. subtilis</i> inoculada juntas	28,200	b
4	THj: Planta + <i>C. destruct.</i> + <i>T. harzian.</i> inoculada juntas	27,700	b
5	TAa: Planta + <i>C. destructans</i> + azoxys. inoculada 5 días antes	20,933	c
6	TAj: Planta + <i>C. destruct.</i> + azoxys. inoculada juntas	20,4	c
7	T: Planta sin inóculo (testigo absoluto)	18,533	d
8	TE: Planta + <i>C. destructans</i> (testigo enfermo)	16,933	d

Figura 10

Comparación de medias de longitud de la raíz para los tratamientos en el control de *Cylindrocarpon destructans* en orégano variedad negra, Tacna, 2019

**Leyenda:**

THa: *T. harzianum* 5 días antes que el patógeno

BSa: *B. subtilis* 5 días antes que el patógeno

THj: *T. harzianum* y patógeno juntos

BSj: *B. subtilis* y patógeno juntos

TAa: Azoxystrobin 5 días antes que el patógeno

TAj: Azoxystrobin y patógeno juntos

TE: Planta con el patógeno (testigo enfermo)

T: Planta sin inóculo (testigo absoluto)

5.6 Determinación del porcentaje de materia seca del follaje

Conforme al análisis de varianza (**anexo 5**) y a la comparación de medias de la prueba Tukey (**tabla 8** y **figura 11**), con un $\alpha = 0,05$, existe diferencia altamente significativa entre los tratamientos para el porcentaje de materia seca del follaje, pero no existe diferencia estadística entre bloques. El C.V. de 2,962 % indica que el experimento fue bien manejado en condiciones de invernadero.

El tratamiento *B. subtilis* inoculada 5 días antes que el patógeno (BSa) presentó el valor más alto de materia seca del follaje de 60,2 %, seguido del tratamiento *T. harzianum* inoculado simultáneamente (THj) y antes que el patógeno (THa), y *B. subtilis* inoculada junto con el patógeno (BSj) con 57,8, 56,3, y 54,2 %, respectivamente, sin mostrar diferencias estadísticas entre ellos, pero diferentes al tratamiento *B. subtilis* inoculada antes que el patógeno. Por otra parte, el tratamiento testigo enfermo (TE) presentó el valor más bajo de materia seca del follaje de 31,8 %, seguido de los tratamientos testigo absoluto (T) y azoxystrobin inoculada antes (TAa) y simultáneamente con el patógeno (TAj) con 34,0, 34,5, y 36 %, respectivamente, sin

diferencia estadística entre ellos. Sin embargo, el tratamiento azoxystrobin fue diferente al testigo enfermo.

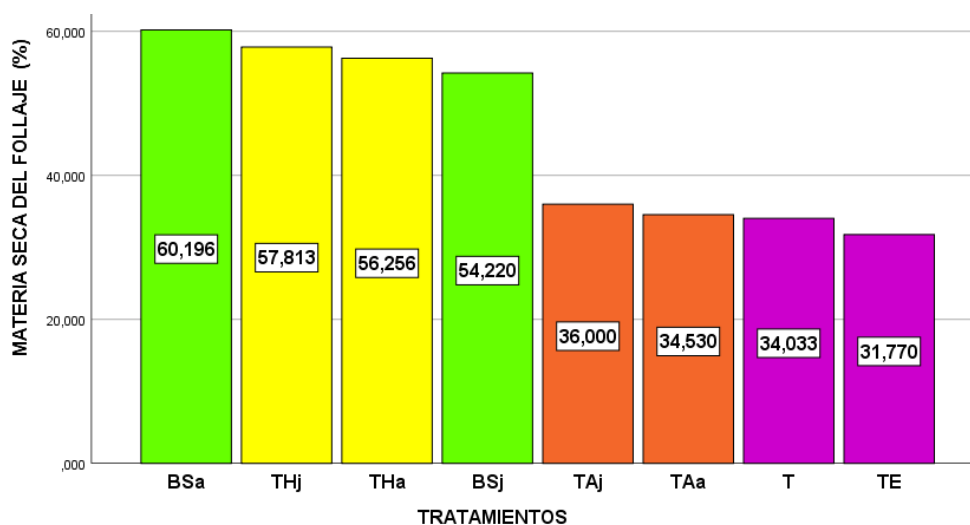
Tabla 8

*Comparación de medias del peso seco del follaje por medio de la prueba Tukey con $\alpha=0,05$ como resultado de los tratamientos en el control de *Cylindrocarpon destructans* en orégano variedad negra, Tacna, 2019*

Núm.	Tratamientos	Peso	Signific.
1	BSa: Planta + <i>C. destruct.</i> + <i>B. subtilis</i> inoculada 5 d antes	60,196	a
2	THj: Planta + <i>C. destructans</i> + <i>T. harzian.</i> inoculadas juntas	57,813	b
3	THa: Planta + <i>C. destruct.</i> + <i>T. harzian.</i> inoculada 5 d antes	56,256	b c
4	BSj: Planta + <i>C. destruct.</i> + <i>B. subtilis</i> inoculadas juntas	54,220	c
5	TAj: Planta + <i>C. destruct.</i> + azoxystr. inoculadas juntas	36,00	d
6	TAA: Planta + <i>C. destruct.</i> + azoxystr. inoculada 5 d antes	34,533	d
7	T: Planta sin inóculo (testigo absoluto)	34,033	de
8	TE: Planta + <i>C. destructans</i> (testigo enfermo)	31,770	e

Figura 11

*Comparación de medias del peso seco del follaje en los tratamientos en el control de *Cylindrocarpon destructans* en orégano variedad negra, Tacna, 2019*



Leyenda:

THa: *T. harzianum* 5 días antes que el patógeno

BSa: *B. subtilis* 5 días antes que el patógeno

THj: *T. harzianum* y patógeno

BSj: *B. subtilis* y patógeno

TAA: Azoxystrobin 5 días antes que el patógeno

TAj: Azoxystrobin y patógeno

TE: Planta con el patógeno (testigo enfermo)

T: Planta sin inóculo (testigo absoluto)

5.7 Determinación del porcentaje de materia seca de la raíz

Concorde al análisis de varianza (**anexo 6**) y a la comparación de medias de la prueba Tukey (**tabla 9 y figura 12**), con un $\alpha= 0,05$, existe diferencia altamente significativa entre los tratamientos para el porcentaje de materia seca de la raíz, pero no existe diferencia estadística entre bloques. El C.V. de 2,166 % indica que el experimento fue bien manejado en condiciones de invernadero.

El tratamiento *B. subtilis* inoculada 5 días antes (BSa) presentó el valor más alto de materia seca de la raíz de 80,6 %, seguido del tratamiento *T. harzianum* inoculada juntas (THj) y 5 d antes que el patógeno (THa) y *B. subtilis* inoculado simultáneamente con el patógeno (BSj) con 78,5, 76,7 y 76,6 %, respectivamente, sin diferencias estadísticas entre ellos, pero diferentes al tratamiento *B. subtilis* inoculado 5 días antes que el patógeno. Por otra parte, el tratamiento testigo enfermo (TE) presentó el valor más bajo de materia seca de 40,6 g, seguido del testigo absoluto (T) y el tratamiento azoxystrobin inoculada antes (TAa) y junto con el patógeno (TAj) con 52,6, 55,6, y 57,8 %, respectivamente, con diferencia estadística entre el tratamiento azoxystrobin, el testigo absoluto y el testigo enfermo.

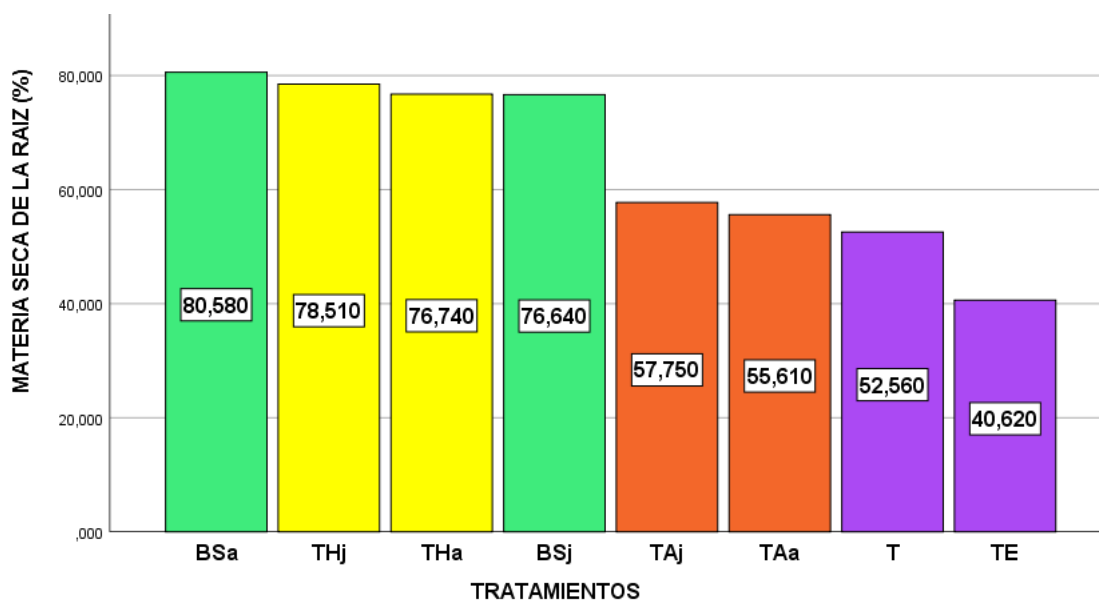
Tabla 9

*Comparación del porcentaje de materia seca de la raíz por medio de la prueba Tukey con $\alpha= 0,05$ como resultado de los tratamientos en el control de *Cylindrocarpon destructans* en orégano variedad nigra, Tacna, 2019*

Núm.	Tratamientos	Peso	Signific.
1	BSa: Planta + <i>C. destruc.</i> + <i>B. subtilis</i> inoculada 5 días antes	80,58	a
2	THj: Planta + <i>C. destruc.</i> + <i>T. harzian.</i> inoculadas juntas	78,51	ab
3	THa: Planta + <i>C. destructans</i> + <i>T. harzian.</i> inoculada antes	76,74	b
4	BSj: Planta + <i>C. destructans</i> + <i>B. subtilis.</i> inoculadas juntas	76,64	b
5	TAj: Planta + <i>C. destructans</i> + Azoxystr. inoculadas juntas	57,750	c
6	TAa: Planta + <i>C. destruc.</i> + Azoxystr. inoculada 5 días antes	55,61	c
7	T: Planta sin inóculo (testigo absoluto)	52,563	d
8	TE: Planta + <i>C. destructans</i> (testigo enfermo)	40,62	e

Figura 12

*Comparación de las medias del peso seco de la raíz en los tratamientos para el control de *Cylindrocarpon destructans* en orégano variedad negra, Tacna, 2019*

**Leyenda:**

THa: *T. harzianum* 5 días antes que patógeno

BSa: *B. subtilis* 5 días antes que el patógeno

THj: *T. harzianum* y patógeno

BSj: *B. subtilis* y patógeno

TAa: Azoxystrobin 5 días antes que el patógeno

TAj: Azoxystrobin y patógeno

TE: Planta con el patógeno (testigo enfermo)

T: Planta sin inóculo (testigo absoluto)

DISCUSIONES

Según Khorasani (2013), *Cylindrocarpon destructans* posee la capacidad de crecer a temperaturas entre 5 y 30 °C, siendo la temperatura óptima entre 18 y 22 °C. Así, Rahman y Punja (2005) reportaron que la pudrición de raíces en ginseng por *C. destructans* fue más severa a 20 °C, pH 5 y a una densidad de inóculo de $1,86 \times 10^3$ UFC/g; sin embargo, hubo crecimiento micelial a pH 7. Las condiciones meteorológicas en la que se condujo este estudio en invernadero fueron favorables para el crecimiento de *C. destructans* e infección de las plantas de orégano. De esta manera, durante el periodo del estudio, la temperatura promedio fue de 25 °C, HR de 75 % y el suelo con pH 7, condiciones que permitieron el crecimiento de *C. destructans* e infección de las plantas de orégano en los diferentes tratamientos.

Los síntomas observados al final del ensayo fueron necrosis de las raicillas de algunas plantas de orégano color castaño que empezó por el ápice, descortezamiento de raíces, amarillamiento de hojas basales con necrosis apical, defoliación y marchitez del follaje; síntomas similares al observado en campos de orégano en Camilaca, Candarave, pero con menor severidad. Hume (2007) reportó a *Cylindrocarpon destructans* como agente causal de la pudrición radicular de plantas de orégano de un año de edad en Ilabaya, Tacna. Asimismo, Acuña (2008) reportó a *Cylindrocarpon* sp., *Pythium* spp., *Fusarium* sp., *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani* como hongos asociados a la pudrición radicular y marchitez en plantas de orégano en Chile; sin embargo, registró además síntomas adicionales como pudrición en la base del tallo, estrías necróticas deprimidas y alargadas en cuello de planta.

Los tratamientos azoxystrobin, tanto inoculado antes (TAa) como juntos con el patógeno (TAj), tuvieron los valores más altos en el porcentaje de incidencia de la enfermedad y el valor más bajo de reducción de la enfermedad, estadísticamente diferentes al testigo enfermo inoculado con *C. destructans*. Se apreció que hubo bajo control de la pudrición de raíces con este producto. Por otra parte, los tratamientos *T. harzianum* inoculado, tanto antes (THa) como simultáneamente con el patógeno (THj), y *B. subtilis* inoculado juntos con el patógeno (BSj) mostraron los valores más bajos del porcentaje de incidencia y el valor más alto de reducción de la enfermedad estadísticamente diferentes al tratamiento *B. subtilis* inoculado cinco días antes (BSa) y

al testigo absoluto. Esto puede deberse a que *B. subtilis* inoculado antes que el patógeno no logró colonizar completamente los tejidos de la raíz en ausencia del patógeno. Jang *et al.* (2011) demostraron que *Bacillus subtilis* a una concentración de 10^6 UFC/mL no logró colonizar los tejidos de la raíz de ginseng cuando fueron inoculados solos, pero sí colonizó cuando fueron inoculados simultáneamente con *C. destructans*.

Respecto al biocontrol con *Bacillus subtilis*, nuestros resultados concuerdan con Jang *et al.* (2011), quienes en un ensayo en macetas mostraron que las raíces de ginseng de cuatro años inoculadas solamente con *C. destructans* se pudrieron severamente; mientras que los tratamientos con *Bacillus spp.* redujeron significativamente el desarrollo de la pudrición de la raíz en ginseng mostrando mayor eficacia de control con *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens* a la concentración de 10^6 UFC/mL. Además, en estudios *in vitro*, la actividad antagónica de ambas especies para *C. destructans* se incrementó con el aumento de la temperatura mostrando máxima actividad antifúngica a 21 y 25 °C, temperatura que permitió el incremento de la defensa de los tejidos de la raíz al ataque del patógeno. También Lee *et al.* (2020), en un estudio *in vitro*, observaron que *Bacillus subtilis* cepa YGB36 posee una fuerte actividad antifúngica contra el patógeno *Cylindrocarpon destructans*. La cepa mostró celulasa, proteasa, amilasa, producción de sideróforos y solubilidad en fosfato. Asimismo, de acuerdo a Garzón *et al.* (2015), *Bacillus subtilis* a una dosis de 5 ml del producto /L de agua, aplicado en campo, para el control de la pudrición blanda (*Erwinia carotovora*) del cultivo de cartucho, redujo significativamente la incidencia de la enfermedad en comparación del testigo. Estas aseveraciones confirman los resultados obtenidos en la presente investigación.

Bacillus subtilis es un microorganismo bacteriano con reacción positiva al test de Gram. Su acción de biocontrol de fitopatógenos se da por antibiosis, competencia y antagonismo (Stein, 2005) por medio de la producción de antibióticos, compuestos orgánicos volátiles (VOCs), producción de proteínas enzimáticas hidrolíticas, establecimiento y formación de biofilm y estimulación de resistencia vegetal. Diferentes cepas de *B. subtilis* produjeron iturinas, bacilomicina L y fengicina, en suelo rizosférico, durante el control de plantas infectadas con *Rhizoctonia solani* (Zohora *et al.*, 2016). Estos compuestos están regulados genéticamente y son de naturaleza lipoheptapéptido cíclicas con fuerte acción antibiótica y moderada acción surfactante. La fengicina inhibe

hongos filamentosos. Dichos compuestos actúan formando poros en la cubierta celular de los hongos patógenos de plantas, lo que conlleva a la detención de su desarrollo e indirectamente a la inducción de las defensas de la planta (Shafi *et al.*, 2017).

B. subtilis tiene la capacidad de formar biopelículas que les permite ser buenos colonizadores (Allard *et al.*, 2016) siendo una condición adaptativa que permite proteger a la población de condiciones ambientales adversas y factores mecánicos conduciendo a la exclusión de nicho de los patógenos (Rafique *et al.*, 2015). La secreción de exudados radiculares como ácido málico, fumárico, oxálico permiten la colonización de *Bacillus* sp. y el estímulo de genes vinculados en la creación de biofilms y quimiotaxis en la bacteria (Allard *et al.*, 2016). La concurrencia de fitopatógenos en la rizosfera provoca cambios en los exudados radiculares, lo que permite el establecimiento de interacciones entre la planta y los microorganismos benéficos. Esto se evidenció en la rizósfera de plantas de pepino, en la que la infección del hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* subsp *cucumerinum* ha tenido un efecto positivo sobre el establecimiento y la formación de biofilm de la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9. La presencia del fitopatógeno permite incrementar la excreción de los ácidos cítrico y fumárico en la raíz, que atraen al agente de control biológico acrecentando su habilidad de colonización y consecuentemente la reducción en los síntomas de la enfermedad ocasionada por el fitopatógeno (Li *et al.*, 2014).

Asimismo, los exudados de las plantas de tabaco han estimulado la síntesis de surfactina por *B. amyloliquefaciens* SQY 162 y con ello la formación de la biopelícula, necesario para el control de *Ralstonia solanacearum* agente causal del marchitamiento bacteriano (WU *et al.*, 2015). También, Yu *et al.* (2011) informaron que el control de *B. subtilis* CAS 15 sobre *Fusarium* en plantas de pimienta se debió a la producción de bacilibactina, un sideróforo tipo catecólico, lo que permitió disminuir la incidencia de *Fusarium*. De acuerdo a Aguado *et al.* (2012), los sideróforos bacterianos tienen potencial para el control biológico de hongos y bacterias fitopatógenas y constituyen un mecanismo de promoción de crecimiento en rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal.

Un aspecto importante de *Bacillus* en el control biológico de fitopatógenos es la formación de biopelículas, la cual está relacionada con su habilidad de ser buenos colonizadores. Esta relación involucra cuatro puntos fundamentales (Pandín *et al.*, 2017):

i) la eliminación directa del fitopatógeno por exclusión de nicho, debido a la competencia por espacio y nutrientes, ii) Participación cooperativa ente microorganismos benéficos e interferencia entre benéficos y patógenos (Chen *et al.*, 2015), iii) síntesis de antibióticos por los microorganismos componentes de la biopelícula y iv) la estimulación de la planta (Wu *et al.*, 2015).

En lo relacionado al biocontrol con *Trichoderma harzianum*, nuestro resultado fue similar al obtenido por Oña (2018), quien evaluó la eficacia de productos químicos, orgánicos y biológicos en el control de *Ilyonectria torresensis*, teleomorfo de *Cylindrocarpon* en plantas de mora castilla en condiciones de invernadero. En su estudio, mostró que los tratamientos de carbendazim y *Trichoderma* a una concentración de 1×10^5 UFC/mL tuvieron valores bajos en el porcentaje de incidencia estadísticamente diferentes respecto al azoxystrobin y al testigo inoculado con el patógeno. Asimismo, Fourie *et al.* (2001) demostraron que el porcentaje de incidencia de la enfermedad causada por *Cylindrocarpon* sp. en raíces de vid aplicadas con *T. harzianum* fue significativamente menor en comparación del tratamiento estándar de quintozeno/procimidona. Finalmente, Michel *et al.* (2013), en estudios en condiciones de invernadero, reportaron que *T. harzianum* contribuyó al desarrollo de la planta de cacahuete y la protección de la infección de *Sclerotium rolfsii* de un modo más eficiente que el pentacloronitrobenceno (PCNB). Sin embargo, Jarrín (2017) en estudios *in vitro*, demostró que azoxystrobin a una concentración de 100 ppm tuvo un mayor control (100 %) del crecimiento de *Cylindrocarpon destructans*. Esto puede deberse a que, en este caso, el ensayo fue *in vitro* y la acción de azoxystrobin fue directa.

Asimismo, Hoyos *et al.* (2008) mostraron que *Trichoderma asperellum* tuvo una baja incidencia logrando una alta reducción de la enfermedad causada por *Sclerotium rolfsii* en plantas de frijol, en tanto que *Trichoderma longibachiatrum* tuvo una reducción media de la enfermedad. Por otro lado, Chen *et al.* (2016) aplicaron clamidosporas de cinco cepas de *Trichoderma* sp. en plántulas de ginseng en semillero y mostraron que los cinco tratamientos con cepas de *Trichoderma* sp. tuvieron mayor efecto de control de la pudrición de la raíz causada por *C. destructans* con diferencia significativa respecto al testigo. La actividad antagónica de *Trichoderma harzianum* sobre *Cylindrocarpon destructans* demostrado en nuestro estudio y confirmado por investigadores citados

previamente, se debe a que las especies de *Trichoderma* actúan de manera parasítica por competencia a través de metabolitos tóxicos y enzimas hidrolíticas ocasionando desintegración protoplasmática y lisis celular (Camargo y Ávila, 2014).

Trichoderma spp. son hongos de vida libre comunes en los ecosistemas del suelo y de las raíces. Actualmente, es sabido que son simbioses vegetales oportunistas y avirulentos, además de ser micoparásitos. Ciertos linajes establecen colonizaciones vigorosas y perdurables en la capa superficial de las raíces y penetran en la epidermis y en unas cuantas células por debajo de ella. Excretan diferentes tipos de sustancias que elicitán respuestas de resistencias localizadas o sistémicas, por lo que no poseen carácter patogénico para las plantas. La interacción raíz-microorganismo genera cambios importantes en el proteoma y el metabolismo de la planta. Las plantas están protegidas de la diversidad de fitopatógenos por respuestas similares a la resistencia sistémica adquirida y la resistencia sistémica inducida por rizobacterias (Harman *et al.*, 2004).

La colonización de raíces por *Trichoderma* spp. incrementa el crecimiento y desarrollo de las raíces, la productividad de los cultivos, la resistencia al estrés abiótico y la absorción y uso de nutrientes. La evidencia reciente indica que *Trichoderma harzianum*, entre otras especies, pueden inducir resistencia sistémica y localizada en una variedad de plantas a una variedad de patógenos de plantas. *Trichoderma* spp. sintetiza principalmente péptidos, proteínas y compuestos de bajo peso molecular que estimulan respuestas de defensa de las plantas. La resistencia inducida por *Trichoderma* spp. aumenta la expresión de genes relacionados con la defensa en toda la planta, al menos a corto plazo y, por lo tanto, es similar a la resistencia sistémica adquirida (SAR) (Harman *et al.*, 2004).

De este modo, de acuerdo a Garnica (2017), la 6-pentil-2H-piran-2-ona (6PP) un compuesto orgánico volátil secretado por *Trichoderma atroviride* reguló los programas de crecimiento y defensa en *Arabidopsis thaliana*. Esta molécula bioactiva estimula las cascadas de señalización molecular en plantas. Promueve la formación de raíces laterales a través de los receptores de auxinas y factores transcripcionales. Asimismo, Cooney *et al.* (2001) demostraron que el 6PP podía inhibir eficazmente la secreción de la micotoxina deoxinivalenol (DON) de *Fusarium graminearum*. Finalmente, Jin *et al.* (2020), identificaron un metabolito activo, la 6-pentil-2H-piran-2-ona (6PP), mediante análisis

del transcriptoma y metaboloma en *Trichoderma atroviridae* T2 y mostraron que era el responsable de alterar significativamente la homeostasis metabólica de *Cylindrocarpon destructans*, en particular el metabolismo de los aminoácidos.

Sin embargo, Onán (2013) afirma que los productos comerciales de *Trichoderma* spp. y *Bacillus subtilis*, utilizados en campo para el control de *Fusarium oxysporum* en arveja dulce, no mostraron diferencia estadística significativa en la reducción de la incidencia de *Fusarium oxysporum* con respecto al testigo. Esto podría deberse a que, en el invernadero, las condiciones son controladas; en cambio, en el campo intervienen otros factores como la alta presión de la enfermedad, presencia de lluvia en el área y tiempo de estudio. Asimismo, Pinto (2014), en un estudio in vitro sobre el efecto antagónico de antagonistas sobre *Cylindrocarpon macrodidymum* causante del pie negro de la vid, demostró que todas las cepas de *Trichoderma* tuvieron un mayor porcentaje de inhibición del crecimiento micelial significativamente diferentes a *Bacillus* spp. De forma contradictoria, Pérez y García-Godos (2019), evaluando el efecto antagónico in vitro de *Bacillus* sp., *Trichoderma* sp. y *Trichoderma viridae* sobre *Fusarium* sp. causante del marchitamiento vascular en tara (*Caesalpinia spinosa*), demostraron que las cepas de *Bacillus* tuvieron mayores niveles de inhibición del crecimiento micelial significativamente diferentes a *T. viridae* y *Trichoderma* sp. En el presente estudio, ambos antagonistas *Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum* mostraron mayor reducción de la pudrición de raíces ocasionada por *C. destructans* sin diferencia estadística entre ellos. Esta diferencia puede deberse al tipo de cepa de la especie empleada como agente de biocontrol, la especie patógena y las condiciones del estudio. En condiciones de invernadero, se suma la interacción de la planta con el patógeno y antagonista. El control de la enfermedad por parte de las especies de *Trichoderma* implica una interacción múltiple entre el patógeno, el agente de biocontrol y la planta huésped (Harman, 2006).

Los biocontroladores sintetizan enzimas líticas como quitinasas, β -1,3-glucanasas, peroxidases, proteasas y lipasas (Mota *et al.*, 2017). Las quitinasas y β -1,3-glucanasas degradan la pared celular de hongos y pueden causar lisis celular, a su vez liberan oligómeros de quitina y glucanos, los cuales participan como elicitores de las defensas de la planta (Jha, *et al.*, 2014). Así *Bacillus* sp. BT 42 disminuye la incidencia

de *Colletotrichum gloeosporoides* y *Fusarium oxysporum* en plántulas de café, debido a la producción de β -1,3-glucanasas en relación con los controles de enfermedad que presentaron una alta incidencia (Kejela *et al.*, 2016).

En lo referente a la promoción en el desarrollo y crecimiento de la planta estimulado por biocontroladores, los tratamientos de *B. subtilis* y *T. harzianum* inoculados antes que el patógeno presentaron el valor más alto de la altura de la planta y longitud de la raíz, estadísticamente diferentes a los tratamientos *B. subtilis* y *T. harzianum* inoculados simultáneamente con el patógeno, el testigo absoluto y el testigo enfermo inoculado con *C. destructans*. Por otra parte, el testigo estándar azoxystrobin inoculado antes y simultáneamente con el patógeno presentaron el valor más bajo de la altura de la planta y longitud de la raíz mostrando diferencias estadísticas respecto al testigo absoluto y al testigo enfermo inoculado con *C. destructans*.

Igualmente, el tratamiento *B. subtilis* inoculado antes que el patógeno presentó el valor más alto del porcentaje de materia seca del follaje y materia seca de la raíz diferentes estadísticamente a los tratamientos *B. subtilis* inoculado junto con el patógeno; *T. harzianum* inoculados antes y juntos con el patógeno, el testigo azoxystrobin, el testigo absoluto y el testigo enfermo. Por su parte, el testigo estándar azoxystrobin presentó el valor más bajo de materia seca del follaje y materia seca de la raíz.

Nuestro estudio concuerda con Fourie *et al.* (2001), quienes demostraron los atributos estimulantes de *Trichoderma harzianum* en el crecimiento de la vid y su efecto sobre la aparición de *Cylindrocarpon* en raíces y portainjertos de vides de vivero en comparación de un tratamiento estándar de quintozeno/procimidona y observaron que la masa total de raíces fue significativamente mayor para las vides tratadas con *Trichoderma* que el tratamiento estándar. Por otra parte, Uddin *et al.* (2018) evaluaron el efecto de *Trichoderma harzianum* en el crecimiento de plantas de tomate y su actividad antagónica contra *Pythium ultimum* y *Phytophthora capsici* y demostraron que la infestación artificial del suelo con *T. harzianum* aumentó significativamente el peso fresco y peso seco de la raíz en presencia de *P. ultimum* y *P. capsici* en comparación con las plantas de tomate inoculadas solo con los dos patógenos. Asimismo, Cubillos *et al.* (2009) evaluaron el efecto promotor del crecimiento vegetal del maracuyá aplicando diferentes cepas de *Trichoderma harzianum* en semillas en condiciones de invernadero y observaron mayor

efecto sobre la longitud del tallo, longitud de la raíz y peso seco total de la planta con diferencia estadísticamente significativa con respecto al testigo absoluto. Finalmente, Caligiore (2013) reportó que la aplicación de *Trichoderma viridae* en plantas de orégano infectadas por *Fusarium* en un estudio en macetas estimuló el desarrollo radicular y el rendimiento.

En estudio de antagonismo de cinco cepas de *Trichoderma* spp. para el manejo del amarillamiento de arveja causado por *Fusarium oxysporum* en invernadero, mostró mayor altura de la planta, longitud de raíces y materia seca de raíces en los tratamientos con tres cepas de *Trichoderma*, en la que una de ellas es comercial, con diferencias altamente significativas a los tratamientos con otras cepas de *Trichoderma* y el testigo *F. oxysporum* (Eraso *et al.*, 2014). Asimismo, *Trichoderma harzianum*, *T. asperellum* y *T. longibrachiatum* inoculados antes que los patógenos *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani* y *Phytophthora infestans* en el sustrato en plántulas de jitomate en invernadero, promovieron el crecimiento vegetal de jitomate obteniendo el mayor efecto significativo en peso fresco y seco en raíz y longitud de raíz y altura de planta respecto al testigo enfermo (Ruiz-Cisneros *et al.*, 2018).

Estas respuestas son el resultado de los efectos directos de *Trichoderma* en las plantas por disminución de la actividad de los patógenos de la raíz y la inactivación de compuestos tóxicos en la raíz. Asimismo, *Trichoderma* spp. tiene la capacidad de incrementar la absorción de nutrientes y la eficiencia en el uso de nitrógeno, y puede solubilizar los nutrientes en el suelo (Harman *et al.*, 2004). Además del efecto biocontrolador de patógenos *T. harzianum* por ser eficiente en la descomposición de materia orgánica, libera nutrientes mediante la solubilización de fosfatos, impulsa el crecimiento y desarrollo de los cultivos, produciendo metabolitos que estimulan el crecimiento y desarrollo vegetal y la capacidad de multiplicarse en el suelo y colonizar las raíces de las plantas (Singh *et al.*, 2016), contribuyendo de esta manera una mejor nutrición vegetal (Cubillos *et al.*, 2009). *Trichoderma* spp. se usa principalmente como agente de biocontrol contra diferentes patógenos transmitidos por el suelo y son conocidos por suprimir el ataque patógeno de las plantas y mejorar el crecimiento y el rendimiento de las plantas mediante la mejora de las hormonas de crecimiento y el incremento del microbioma beneficioso para las plantas (Pedraza *et al.*, 2020)

Así mismo, libera factores de crecimiento como auxinas, giberelinas y citoquininas que aceleran la reproducción celular en los tejidos meristemáticos primarios de raíz y tallo permitiendo un mayor desarrollo de las plantas (Ezziyani *et al.*, 2004). *T. harzianum* ha sido destacado como promotor del crecimiento vegetal en cultivos de berenjena, frijol, café, tomate, papa y especies forestales, entre otros (Camargo y Ávila, 2014) y en plántulas de tres forestales *Eucalyptus grandis*, *E. globulus* y *Pinus taeda* (Romero *et al.*, 2008). Por esta razón Cibrián y Cibrián (2017) recomiendan aplicar *Trichoderma* de forma preventiva en los viveros forestales para la prevención de enfermedades radiculares.

En ese contexto, Santana y Castellanos (2018), evaluando el efecto bioestimulante de *Trichoderma harzianum* en diferentes plantas forestales, mostraron el incremento de las variables altura, número de hojas a los 60 y 90 días y biomasa seca de la parte aérea en posturas de cedro a diferencia de Leucaena y Samán que no presentaron incremento de estas variables. Las plantas responden de forma diferente a los metabolitos bioestimulantes que produce *T. harzianum*.

Asimismo, Lee *et al.* (2020) demostraron la promoción en el desarrollo y crecimiento de las raíces de pimiento cuando las semillas fueron tratadas con *Bacillus subtilis* cepa YGB36 a una concentración de 10^6 UFC/mL en el control de la antracosis en pimiento rojo causada por *Colletotrichum acutatum* mejorando la tasa de germinación de las semillas. El crecimiento de las plantas se ve mejorado por las PGPR mediante la inducción de resistencia sistémica mejorando la tolerancia al estrés ambiental, antibiosis y supresión competitiva (Hashem *et al.*, 2019).

B. subtilis es un rizobacteria promotora del crecimiento vegetal (PGPR) que activa la resistencia sistémica inducida en la planta incrementando la resistencia del huésped a los patógenos de las plantas (Hashem *et al.*, 2019). Esta activación induce la síntesis de ácido jasmónico (JA), etileno y el gen regulador NPR1 en plantas (García-Gutiérrez *et al.*, 2013). La activación de ISR está asociada con la degradación de la pared celular, la producción de proteínas de novo de glucanasas y quitinasas y la producción de fitoalexinas vinculadas a la resistencia a enfermedades. Las PGPR emiten VOCs (benzotiazol, benzaldehído, fenilacetaldehído, el ciclohexanol, el 2,3-butanodiol, el n-decanal, nonanal) que pueden elicitar inducción de resistencia y tolerancia sistémicas en

la planta, reduciendo el estrés biótico y abiótico en los cultivos y, por lo tanto, mejora la salud vegetal (Bitas *et al.* 2013). Además, los VOCs causan daños en el genoma del agente patógeno de modo indirecto. La inducción de resistencia sistémica (ISR) por microorganismos benéficos puede darse a través de otros elicitores como el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (MANPs) como la quitina presente en la pared celular del patógeno, compuestos asociados a la degradación de la pared celular, sideróforos y lipopéptidos (NRPs) (Chandler *et al.*, 2015). Tanto en la inducción de resistencia sistémica (ISR) como en la resistencia sistémica adquirida (SAR), la señalización se encuentra mediada por fitohormonas como el ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico (JA) y el etileno (ET) (Pieterse *et al.*, 2014).

Las cepas de *Bacillus* no solo inducen la IRS mediada por JA/ET, sino pueden estimular la SAR produciendo SA sobre la superficie de la raíz. La combinación de ISR y SAR puede incrementar la protección contra diferentes patógenos (Li *et al.*, 2014).

A nivel *in vivo*, Ryu *et al.* (2003) informaron que *Bacillus subtilis* GB03 y *B. amyloliquefaciens* IN937a producen el 2,3-butanediol, un metabolito capaz de inducir la resistencia en *Arabidopsis thaliana* contra *Pectobacterium carotovorum* subs *carotovorum*. Las diferentes estirpes de *Bacillus* utilizan un mecanismo complicado en el biocontrol de organismos fitopatógenos que incluye la producción de antibióticos, síntesis de enzimas hidrolíticas y los VOCs y la inducción de respuestas de resistencia en la planta. Es de suponer que las razas de *Bacillus* reconocidas como excelentes biocontroladores posean varios mecanismos de biocontrol que actúan de manera sinérgica.

En síntesis, *Bacillus subtilis* manifiesta un mecanismo de biocontrol directo e indirecto para exterminar las enfermedades causadas por patógenos. El mecanismo directo incluye la producción de varios tipos de metabolitos secundarios, hormonas, enzimas degradadoras de la pared celular y antioxidantes que participan en la defensa de la planta contra el ataque de patógenos. El mecanismo indirecto incluye la promoción del crecimiento de las plantas y la inducción de resistencia sistémica adquirida. Además, tiene la capacidad de solubilizar el fósforo presente en el suelo, mejorar la fijación de nitrógeno y producir sideróforos que promueven el crecimiento de la planta (Hashem *et al.*, 2019).

T. harzianum y *B. subtilis* son organismos endófitos que actúan como biofungicidas y bioestimulantes, por lo que son considerados agentes potenciales para el biocontrol de enfermedades fúngicas.

CONCLUSIONES

1. *Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum* inoculados juntos y cinco días antes que *Cylindrocarpon destructans*, causan menor incidencia y mayor reducción significativa de pudrición radicular en plantas de orégano respecto al azoxystrobin.
2. *Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum* inoculados juntos y cinco días antes que *Cylindrocarpon destructans* causan efecto bioestimulante significativo sobre la altura de la planta, longitud de la raíz, materia seca del follaje y la raíz de la planta de orégano respecto al azoxystrobin.

RECOMENDACIONES

1. Complementar con la identificación molecular del agente causal de la pudrición radicular del orégano.
2. Desarrollar pruebas del efecto de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum* a diferentes dosis sobre plantas de orégano con pudrición radicular en el campo.
3. Evaluar la biodiversidad de los hongos endófitos en el cultivo del orégano.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abo-Elyousr, K. A. M., Sobhy, I., Abdel-Hafez, I. y Abdel-Rahim, I. (2014). Isolation of *Trichoderma* and evaluation of their antagonistic potential against *Alternaria porri*. *J. Phytopathol.*, 162(9), 567-574. DOI: <https://doi.org/10.1111/jph.12228>
- Acuña, R. (2008). *Compendio de fitopatógenos de cultivos agrícolas. Servicio agrícola y ganadero. División Protección agrícola.*
<https://biblioteca.sag.gob.cl/DataFiles/25-2.pdf>
- Agraria.pe. (2022). *Exportaciones peruanas de orégano y palillo crecieron en valor 30 % y 5 % en 2021.* <https://agraria.pe/noticias/exportaciones-peruanas-de-oregano-y-palillo-crecieron-en-val-27212>
- Agricultura (2020). La agricultura sostenible: Un nuevo concepto de cultivo.
<https://eos.com/es/blog/agricultura-sostenible/#:~:text=El%20concepto%20de%20agricultura%20sostenible,y%20salud%20de%20los%20agricultores.>
- Agrotterra. (2011). Biofungicidas. Disponible en:
<https://www.agrotterra.com/blog/actualidad/los-biofungicidas/71007/>
- Aguado, G. A., Moreno, B., Jiménez, B., García, E. y Preciado, R. E. (2012). Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 35(1), 9-21. Disponible en:
<https://www.scielo.org.mx/pdf/rfm/v35n1/v35n1a4.pdf>
- Alamri, S., Mostafa, Y. S., Hashem, M. y Alrumman, S. (2016). Enhancing the biocontrol efficiency of *Trichoderma harzianum* JF419706 through cell wall degrading enzyme production. *International Journal of Agriculture and Biology*, 18(4), 765–772. <https://doi.org/10.17957/IJAB/15.0164>
- Alarcón, J. J. (2011). *Plantas aromáticas y medicinales. Enfermedades de importancia y sus usos terapéuticos.*

- Allard-Massicotte, R., Tessier, L., Lécuyer, F., Lakshmanan, V., Lucier, J., Garneau, D., Caudwell, L., Vlamakis, H., Bais, HP. y Beauregard, PB. (2016). *Bacillus subtilis* early colonization of *Arabidopsis thaliana* roots involves multiple chemotaxis receptors. *mBio* 7(6). DOI: 10.1128/mBio.01664-16
- Arcila-Lozano, C. C., Loarca-Pina, G., Lecona-Urbe, S. y González, E. (2004). El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *ALAN* (online) 54 (1), 100-111. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222004000100015#:~:text=El%20or%C3%A9gano%20tiene%20una%20buena,%20Staphylococcus%20epidermidis%20entre%20otros.
- Arcos, J; Zúñiga, D. 2015. Efecto de rizobacterias en el control de *Rhizoctonia solani* en el cultivo de papa. *Ecología Aplicada*, 14(2), 95-101. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/ecol/v14n2/a02v14n2.pdf>
- Aros, F. E. (2021). *Caracterización morfo-fenológica de orégano cultivadas bajo invernadero* [Memoria de Título, Universidad de Talca. Chile]. <http://dspace.otalca.cl/bitstream/1950/12532/3/2021A000259.pdf>
- Astorga-Quirós, K., Meneses-Montero, K., Zúñiga-Vega, C., Brenes-Madriz, J. y Rivera-Méndez, W. (2014). Evaluación del antagonismo de *Trichoderma* sp. y *Bacillus subtilis* contra tres patógenos del ajo. *Tecnología en marcha*, 27(2), 82-91. <file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/Dialnet-EvaluacionDelAntagonismoDeTrichodermaSpYBacillusSu-4835434.pdf>
- Ayala, V., Yáñez, M., Braun, U., Groenewald, J. y Crous, P. (2006). *Pseudocercospora opuntiae* sp. nov., the causal organism of cactus leaf spot in México (en línea). *Fungal Diversity*, 21, 1-9. https://www.researchgate.net/publication/40114607_Pseudocercospora_opuntiae_sp_nov_the_causal_organism_of_cactus_leaf_spot_in_Mexico
- Bae, YS; Knudsen, GR. 2005. Soil microbial biomass influence on growth and biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum*. *Biological control*, 32 (2), 236-242. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964404001914>

- Barnett, H. y Hunter, B. (1998). Illustrated Genera of Imperfect Fungi. (T. A. P. Society, Ed.), *Transactions of the British Mycological Society* (Vol. 38). Minnesota, USA: The American Phytopathological Society. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(55\)80058-7](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(55)80058-7)
- Barrios, M. B. y Sandoval, M. C. (2018). Caracterización de hongos presentes en suelos con usos contrastantes. *Revista de divulgación técnica Agropecuaria, Agroindustrial y Ambiental*, 5(1), 3-9. UNLZ, Argentina. <http://revistafcaunlz.gramaweb.com.ar/wp-content/uploads/2018/03/Barrios-y-Sandoval.pdf>
- Besoain, X. y Piontelli, E. (1999). Pudrición negra en raicillas de palto (*Persea americana* Mill.) por *Cylindrocarpon destructans*: patogenicidad y aspectos epidemiológicos. *Boletín Micológico*, 14, 41-47. DOI: <https://doi.org/10.22370/bolmicol.1999.14.0.917>
- Bitas, V., Kim, H.S., Bennett, J.W., Kang, S. (2013). Sniffing on microbes: diverse roles of microbial volatile organic compounds in plant health. *Mol Plant Microbe Interact.*, 26(8), 835-843. DOI: <https://doi.org/10.1094/MPMI-10-12-0249-CR>
- Blanco, E. L. y Castro, Y. (2021). Antagonismo de rizobacterias sobre hongos fitopatógenos, y su actividad microbiana con potencial biofertilizante, bioestimulante y biocontrolador. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 23(1), 6-16. DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v23n1.84808
- Cabral, A., Groenewald, J. Z., Rego, C., Oliveira, H. y Crous, P. W. (2012). *Cylindrocarpon* root rot: multi-gene analysis reveals novel species within the *Ilyonectria radicola* species complex. *Mycological progress*, 11, 655-688. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11557-011-0777-7>
- Caligiore, P. (2013). *Efecto de la aplicación de Trichoderma en la respuesta de orégano a la infección por Fusarium*. INTA. https://www.researchgate.net/publication/263540133_Efecto_de_la_aplicacion_de_Trichoderma_en_la_respuesta_de_oregano_a_la_infeccion_por_Fusarium_Effect_of_the_application_of_Trichoderma_on_the_response_of_origanum_to_th

e_Fusarium_infection

- Camargo Cepeda, D.F. & Ávila, E.R. (2014). Efectos de *Trichoderma* sp. sobre el crecimiento y desarrollo de la arveja (*Pisum sativum* L.). *Ciencia y Agricultura*, 11(1), 91-100. <https://www.redalyc.org/pdf/5600/560058658011.pdf>
- Cano, M. A. (2011). Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp . y *Pseudomonas* spp. Una Revisión. *Rev.U.D.C.A Act. e Div. Cient.*, 14(2), 15–31. <http://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v14n2/v14n2a03.pdf>
- Castro, A. y Rivillas, C. (2012). *Trichoderma* spp.: Modos de acción, eficacia y usos en el cultivo de café. <https://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/577/1/038.pdf>
- Cedeño, L., Carrera, C., Quintero, K., Pino, H. y Espinoza, W. (2004). *Cylindrocarpon destructans* var. *destructans* and *neonectria discophora* var. *rubi* associated with black foot rot on blackberry (*Rubus glaucus* Benth.) in Mérida, Venezuela. *Interciencia*, 29(8), 455–460. https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442004000800011
- Chandler, S., Van, N., Coutte, F., Jacques, P., Höfte, M., De Vlesschauwer, D. (2015). Role of cyclic lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* in mounting induced immunity in rice (*Oriza sativa* L.). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 91, 20-30. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2015.05.010>
- Chaverri, P., Salgado, C., Hirooka, Y., Rossman, A. Y. y Samuels, G. J. (2011). Delimitation of *Neonectria* and *Cylindrocarpon* (Nectriaceae, Hypocreales, Ascomycota) and related genera with *Cylindrocarpon*-likes anamorphs. *Studies in Mycology*, 68, 57-78. DOI:10.3114/sim.2011.68.03
- Chen, Y., Gozzi, K., Yan, F. y Chai, Y. (2015). Acetic acid acts as a volatile signal to stimulate bacterial biofilm formation. *MBio*, 6(3) e00392. DOI: <https://doi.org/10.1128/mBio.00392-15>
- Chen, S., Li, M., Jiang, X., Ji, T., Zhang, N., Wang, H. y Bai, L. (2016). Selection of *Trichoderma* spp. antagonistic to *Cylindrocarpon destructans*, pathogen of ginseng root rot disease. *Chinese Journal of Biological Control*, 32(2), 265-269. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20173060539>

- Chopra, D., Mohan, T. P., Rao, K. S. y Guru Row, T. N. (2007). Azoxystrobin. *Acta Crystallographica Section E Structure Reports Online*, 63(11), o4493–o4493. DOI: <https://doi.org/10.1107/S1600536807052956>
- Chowdappa, P., Mohan, SP., Jyothi, M. y Upreti, K. K. (2013). Growth stimulation and induction of systemic resistance in tomato against early and late blight by *Bacillus subtilis* OTP B1 or *Trichoderma harzianum* OTP B3. *Biological control* 65: 109-117. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.11.009>
- Chugnas, I. (2018). *Etiología y patogénesis de fungosis del orégano (Origanum vulgare L.) en la provincia de Cajamarca* [Tesis de Pregrado para optar el Título Profesional de Ing. Agr.] <https://repositorio.unc.edu.pe/handle/20.500.14074/3165>
- Cibrián, D. & Cibrián, J. (2017). Estado del arte de la línea de investigación de plagas y enfermedades de importancia en viveros forestales. Texoco, México: Red temática en salud forestal.
- Cooney, J.M., Lauren, D.R., di Menna, M.E., Impact of competitive fungi on trichotecene production by *Fusarium graminearum*. *J Agric Food Chem*, 49(1), 522-526. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf0006372>
- Cruz, L. (2007). Estandarización del proceso de producción masiva del hongo *Trichoderma koningii* Th003 mediante fermentación bifásica a escala piloto. Pontificia Universidad Javeriana. Pontificia Universidad Javeriana. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(82\)90112-6](https://doi.org/10.1016/0166-2236(82)90112-6)
- Cruzat G., R. y Ionannidis N., D. (2008). Biocontrol de Enfermedades Fungosas con *Trichoderma*. (G. González, Ed.), Experiencias de Innovación para el Emprendimiento Agrario *FIA* (Vol. 62). Chile: Ograma Ltda. http://itas.cl/wp/wp-content/uploads/2014/04/62_Libro_Trichoderma.pdf
- Cubillos-Hinojosa, J., Valero, N. y Mejía, L. (2009). *Trichoderma harzianum* como promotor del crecimiento vegetal del maracuyá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener). *Agronomía Colombiana*, 27(1), 81-86. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99652009000100011

- Dann, E. K., Forsberg, L. I., Cooke, A. W., Pegg, K. G., Shivas, R. G. y Tan, Y. P. (2011). The 'Cylindro' complex of avocado root pathogens. Actas VII Congreso Mundial del Aguacate. Cairns, Australia. <https://www.avocado.org.au/wp-content/uploads/2017/02/The-Cylindro-Complex-of-Avocado-Root-Pathogens-E-Dann-QAAFI-et-al..pdf>
- Davidenco, V., Seisededos, L., Núñez, S. B. y Argüello, J. A. (2014). Floral transition in *Origanum vulgare* L.: Anatomical analysis across phenological stages in response to different photoperiodic regimes. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 74(3), 349-354. Disponible en: <https://www.scielo.cl/pdf/chiljar/v74n3/at14.pdf>
- Dhingra, O. D. y Sinclair, J. B. (1995). Basic plant pathology methods. Second Edition. United States of America. 434 pp.
- Domínguez, S., Rubio, M. B., Cardoza, R. E., Gutiérrez, S., Nicolás, C., Bettioli, W., Hermosa, R. y Monte, E. (2016). Nitrogen metabolism and growth enhancement in tomato plants challenged with *Trichoderma harzianum* expressing the *Aspergillus nidulans* acetamidase *amdS* gene. *Frontiers in Microbiology*, 7: 1182. doi: 10.3389/fmicb.2016.01182
- Eraso, C., Acosta, J., Salazar, C. y Betancourth, C. (2014). Evaluación de cepas de *Trichoderma* spp. para el manejo del amarillamiento de arveja causado por *Fusarium oxysporum*. *Revista Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 15(2), 237-249. DOI: https://doi.org/10.21930/rcta.vol15_num2_art:263
- Ezziyyani, C., Sánchez, A. y Ahmed, M. (2004). *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). *Anales de Biología*, 26, 35-45. <https://www.um.es/analesdebiologia/numeros/26/PDF/05-TRICHODERMA.pdf>
- Farh, M. E., Kim, Y. J., Yang, D. C. (2018). *Cylindrocarpon destructans/Ilyonectria radicola*-species complex: causative agent of ginseng root-rot disease and rusty symptoms. *Journal of Ginseng Research*, 42(1), 9-15. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2017.01.004>
- Flores, F.R. (2012). Identificación de hongos asociados a la mancha negra del nopal (*Opuntia ficus indica* Mill) y su sensibilidad al quitosano. Tesis Mag. Sc. Manejo

- agroec. de plagas y enf. Instituto politécnico Nacional. Morelos. México. 66p.
 Disponible en:
<http://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/12450/Tesis%20Octubre%202012%20Rosalba%20Flores%20Flores..pdf?sequence=1>
- Fourie, P. H., Hallen, F., Van, J. y Schreuder, W. (2001). Effect of *Trichoderma* treatments on the occurrence of decline pathogens in the roots and rootstocks of nursery grapevines. *Phytopathologia Mediterranea*, 40, 473-478.
<file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/4908-Article%20Text-4836-1-1-20190716.pdf>
- French, E. R. y Hebert, T. T. (1980). *Métodos de investigación fitopatológica*. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas.
- Gaetán, S. A., Madia, M. S., Rubio, M., Paunero, I. E. (2008). *Ocurrencia de la podredumbre de la base del tallo y raíz del orégano asociada a Fusarium solani en lotes experimentales de la provincia de Buenos Aires. Avances en la investigación en plantas aromáticas en la región pampeana y sur del litoral*.
https://repositorio.inta.gob.ar/bitstream/handle/20.500.12123/13439/INTA_CRB_sAsNorte_EEASanPedro_Paunero_IE_Avances_en_investigacion_plantas_aromaticas.pdf?sequence=1&isAllowed=y#page=17
- García-Gutierrez, L., Zeriuoh, H., Romero, D., Cubero, J., de Vicente, A., Pérez-García, A. (2013). The antagonistic strain *Bacillus subtilis* UMAF6639 also confers protection to melon plants against cucurbit powdery mildew by activation of jasmonate and salicylic acid dependent defence responses. *Microb Biotechnol.*, 6(3), 264-274. DOI: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12028>
- Garnica Vergara, A. (2017). Mecanismos de bioestimulación de la 6-pentil-2H-piran-2-ona de *Trichoderma atroviride* y su papel en la regulación de la arquitectura radicular de *Arabidopsis thaliana*. *Universidad Michoacana de san Nicolás de Hidalgo*. [Tesis para optar el grado de Doctora en Ciencias en Biología Experimental].
http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/bitstream/handle/DGB_UMICH/5585/IIQB-D-2017-1352.pdf?sequence=1&isAllowed=y

- Garzón-Gutiérrez, L.N., Herrera-Martínez, J.I., Clavijo-Gómez, D.A. (2015). *Bacillus subtilis* como biocontrolador de la pudrición blanda (*Erwinia carotovora*) en el cultivo de cartucho (*Zantedeschia aethiopica* L.). *Rev. Protección Veg.*, 30, 75. <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v30s1/rpv052s15.pdf>
- González, M., Rodríguez, N., Escobedo, J. y Domínguez, I. (2017). Diseño y simulación de un invernadero asistido con energía renovable para Durango. *Revista de Innovación Sistemática*, 1(1), 33–45. https://www.ecorfan.org/taiwan/research_journals/Innovacion_Sistematica/vol1num1/Revista_de_Innovacion_Sistem%C3%A1tica_V1_N1_4.pdf
- Granobles, O. A. y Torres, C. (2013). Efecto de biocontroladores sobre la dinámica poblacional de hongos de suelo en un cultivo de maracuyá (*Passiflora edulis* Sims var. flavicarpa). *Revista de Ciencias*, 17(2), 151–162. Retrieved from <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=fua&AN=116614294&lang=es&site=ehost-live>
- Gómez, M. I., Alarcón, A., León, M., Oehlschlager, C. y Solórzano, L. (2018). Comercialización de agentes de control biológico en: *Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros*, Capítulo 16. 763-793. https://www.researchgate.net/publication/329197016_Comercializacion_de_agentes_de_control_biologico
- Guevara, E. y Guenni, O. (2013). *Densidad y longitud de raíces en plantas de Leucaena leucocephala (Lam) De Wit. Multiciencias.* <http://www.redalyc.org/pdf/904/90430055005.pdf>
- Gutierrez, A., Robles, A., Santillan, C., Ortiz, M. y Cambero, O. (2013). Control biológico como herramienta sustentable en el manejo de plagas y su uso en el estado de Nayarit, México. *Revista Bio Ciencias Junio*, 2(3), 102–112. <https://doi.org/10.15741/revbio>
- Gutiérrez-Alonso, J. G., Gutiérrez-Alonso, O., Nieto-Ángel, D., Téliz Ortiz, D., Zavaleta-Mejía, E., Delgadillo-Sánchez, F. y Vaquera-Huerta, H. (2003). Evaluación de resistencia a imazalil, prochloraz y azoxystrobin en aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. y control de la antracnosis

- del mango (*Mangifera indica* L.) en postcosecha. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21, 379-383.
file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/EvaluacindeResistenciaaImazalilProchlo
razyAzoxystrobinenAislamientosdeColletotrichumgl.pdf
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species: Opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 43-56. <https://www.nature.com/articles/nrmicro797>
- Harman, G. E. (2006). Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 96(2), 190–194. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0190>
- Hashem, A., Tabassum, B. y Abd, E. F. (2019). *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(6), 1291-1297. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.05.004>
- Hassanein, N. M. (2012). Biopotential of some *Trichoderma* spp. against cotton root rot pathogens and profiles of some of their metabolites. *African Journal of Microbiology Research*, 6(23), 4878–4890. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJMR11.1088>
- Hernández-Lauzardo, A. N., Bautista-Baños, S., Velázquez-del Valle, G. y Hernández-Rodríguez. (2007). Uso de microorganismos antagonistas en el control de enfermedades Postcosecha en frutos. *Revista mexicana de fitopatología*, 25(1), 66-74. <https://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v25n1/v25n1a9.pdf>
- Hernández, J. L., Sánchez, M.I., García, J. G., Pérez, N. M., González, J. M., Quiróz, J. (2011). Caracterización molecular y agronómica de aislados de *Trichoderma* spp. nativos del noreste de México. Centro de Biotecnología Genómica. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13 (2). http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-34752011000200017
- Hoyos, L., Chaparro, P., Abramsky, M., Chet, I. y Orduz, S. (2008). Evaluación de aislamientos de *Trichoderma* spp. contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* bajo condiciones *in vitro* y de invernadero. *Agronomía Colombiana*, 26 (3), 451-

458. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/1803/180314731010.pdf>
- Hume, V. (2007). *Efecto protector de diferentes dosis de Glomus spp frente al hongo patógeno principal causante de pudrición radicular en plantas de Origanum vulgare "orégano" bajo condiciones de invernadero. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna, Perú* [Tesis para optar el título profesional de Biólogo Microbiólogo].
- Humpire, A. (2012). *Asistencia técnica dirigida en manejo integrado de plagas en el cultivo de orégano. Guía técnica.* https://www.agrobanco.com.pe/wp-content/uploads/2017/07/028-a-oregano_MANEJO_INTEGRADO_PLAGAS.pdf
- Infante, D., Martínez, B., González, N. y Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Rev. Protección Veg.*, 24(1), 14–21. <https://doi.org/10.3917/espri.1507.0095>
- Jacobsen, R.E., Fantke, P. y Trapp, S. (2015). Analysing half-lives for pesticide dissipation in plants. *SAR and QSAR in Environmental Research*, 26(4), 325–342. <https://doi.org/10.1080/1062936X.2015.1034772>
- Jang, Y. L., Kim, S. G. y Kim, Y. H. (2011). Biocontrol efficacies of *Bacillus* species against *Cylindrocarpon destructans* causing ginseng root rot. Korean Society of Plant Pathology. *The Plant Pathology Journal*, 27(4), 333-341. <https://doi.org/10.5423/PPJ.2011.27.4.333>
- Jarrin, M. A. (2017). Evaluación in vitro de productos convencionales y alternativos para el control de *Cylindrocarpon destructans* en mora de castilla (*Rubus glaucus*). Tesis para optar título de Ingeniera Agroindustrial y de Alimentos. Ecuador. Disponible en: <https://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/7389/3/UDLA-EC-TIAG-2017-04.pdf>
- Jha, S., Kumar, C., Modi, H.A., Saraf, M. (2014). Microbial chitinases: Manifestation and prospective. In: Neelam & Aeron, A. editors. Industrial Microbiology: Microbes in process. Nova Science Publishers, USA. p. 147-162. *Chilean J. Agric. Anim. Sci., ex Agro-Ciencia*, 31(3), 32-45. https://www.scielo.cl/pdf/chjaasc/v32n1/art_04.pdf
- Jin, X, Guo, L., Jin, B., Zhu, S., Mei, X., Wu, J., Liu, T. y He, X. (2020). Inhibitory

- mechanism of 6-pentil-2H-pyran-2-one secreted by *Trichoderma atroviridae* T2 against *Cylindrocarpon destructans*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 170. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104683>
- Kejela, T., Thakkar, V.R., Thakor, P. (2016). Bacillus species (BT 42) isolated from *Coffea arabica* L. rizosphere antagonizes *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum* and also exhibits multiple plant growth promoting activity. *BMC Microbiol.*, 16(1), 277. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12866-016--0897-y>
- Kim, Y. S., Balaraju, K. y Jeon, Y. H. (2017). Biological characteristics of *Bacillus amyloliquefaciens* AK-0 and suppression of ginseng root rot caused by *Cylindrocarpon destructans*. *Journal of Applied Microbiology*, 122, 166-179. <https://doi.org/10.1111/jam.13325>
- Klauer, D. F. (2009). *Manual técnico de cultivo ecológico de orégano (Origanum sp. L.)*.
- Khorasani, M. (2013). *Cylindrocarpon* species in Pacific Northwest Douglas-fir nurseries: Diversity and effects of temperature and fungicides on mycelial growth. Tesis degree of Master of Science. University of Washington. 78 pp. https://digital.lib.washington.edu/researchworks/bitstream/handle/1773/23693/Khorasani_washington_02500_11731.pdf;sequence=1
- Lee, Y. Y., Lee, Y., Kim, Y. S., Kim, H. S. y Jeon, Y. (2020). Control of red pepper anthracnose using *Bacillus subtilis* YGB36, a plant growth promoting rhizobacterium. *Research in Plant Disease*, 26 (1), 8-18. DOI: <https://doi.org/10.5423/RPD.2020.26.1.8>
- Li, B., Li, Q., Xu, Z., Zhang, N., Shen, Q. y Zhang, R. (2014). Responses of beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to different soilborne fungal pathogens through the alteration of antifungal compounds production. *Frontiers in Microbiology*, 5, 1-10. Doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00636>
- Lombard, L., Van, N. A., Groenewald, J. Z. y Crous, P. W. (2015). Generic concepts in Nectriaceae. *Studies in Mycology*, 80(1), 189-245. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.simyco.2014.12.002>
- Manhunat, N., Singh, A., Tripathi, A.N., Prasanna, R., Rai, A. B. y Singh, B. (2017). Bioprospecting the Fungicides compatible *Trichoderma asperellum* isolate

- effective against multiple plant pathogens in vitro. *Journal of Environmental Biology*, 38, 553–560. DOI: <http://doi.org/10.22438/jeb/38/4/MRN-339>
- Martínez, C. (2011). *Agricultura sustentable y seguridad alimentaria..* <http://infoagro.go.cr/bibliotecavirtual/P01-10651.pdf>
- Martínez-Padrón, H. Y., Osorio-Hernández, E.O., Estrada-Drouaillet, B., López-Santillán, J.A., Varela-Fuentes, S. E. y Torres-Castillo, J. A. (2017). Control biológico de fitopatógenos mediante aislados de *trichoderma* spp. *Agroproductividad*, 10(3), 9-14. <https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/961/820>
- Martini, P., Pane, A., Raudino, F., Chimento, A., Scibetta, S. y Cacciola, S. O. (2009). First Report of *Phytophthora tentaculata* Causing Root and Stem Rot of Oregano in Italy. *The American Phytopathological Society*, 93(8), 843. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-8-0843B>
- Melgarejo, P., De Cal, A. (2006). Biofungicidas y control biológico de hongos fitopatógenos: Aplicación en la filósfera. Comunicación técnica. Phytohemeroteca n° 182. s.p. Disponible en: <https://www.phytoma.com/la-revista/phytohemeroteca/182-octubre-2006/biofungicidas-y-control-biologico-de-hongos-fitopatgenos-aplicacin-en-la-filosfera>
- Michel-Aceves, A. C., Otero-Sánchez, M. A., Ariza-Flores, R., Barrios-Ayala, A. y Alarcón-Cruz, N. (2013). Eficiencia biológica de cepas nativas de *Trichoderma* spp., en el control de *Sclerotium rolfsii* Sacc., en cacahuate. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 17(3), 89-107. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=83728497008>
- Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego (MIDAGRI). (2021). *Anuario de producción agrícola - 2021*. Sistema integrado de estadística agraria. <https://siea.midagri.gob.pe/portal/publicacion/boletines-anuales/4-agricola>
- Ministerio del Ambiente (MINAM). (2005). Ley General del Ambiente. Ley N° 28611. Perú. <https://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2017/04/Ley-N%C2%B0-28611.pdf>
- Ministerio del Ambiente (MINAM). (2010). Política Nacional del ambiente. Perú.

<https://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2013/08/PoI%C3%ADtica-Nacional-del-Ambiente.pdf>

Mondino, P y Vero, S. (2006). *Control biológico de patógenos de plantas*. file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/FAGRO_MondinoP_2006_ControlBiol%C3%B3gico%20(1).PDF

Mont, R. M. (2002). *Manejo integrado de enfermedades de las plantas*.

Mora, J.R. (2001). *Control biológico de la pudrición radicular por Fusarium oxysporum en semilleros de café usando endomicorriza y Trichoderma harzianum* [Tesis para optar Título de Ingeniero Agrónomo. Zamorano, Honduras]. <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/688437c8-1e43-4b1a-9170-eb806be284cc/content>

Moreno-Velandia, C. A., Cotes, A.M, Beltrán-Acosta, C., Bettioli, W. y Elad, Y. (2018). Capítulo 2: Control biológico de fitopatógenos del suelo. *En: Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros. Volumen 1. Agentes de control biológico.* AGROSAVIA Editorial. Colombia. 144-221. file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/33829-reducido4.pdf

Mostacero, J., Mejía, F., Gamarra, O. (2009). *Fanerógamas del Perú: Taxonomía, utilidad y ecogeografía*.

Mota, M.S., Gomes, C.B., Souza, I.T., Moura, A.B. (2017). Bacterial selection for biological control of plant disease: criterion determination and validation. *Bras. J. Microbiol.*, 48(1), 62-70. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.09.003>

O'Brien, P. A. (2017). Biological control of plant diseases. *Australasian Plant Pathology*, 46(4), 293–304. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13313-017-0481-4>

Ochoa, F. (2008). *Efecto in vitro y en invernadero de cepas mejoradas de trichoderma spp. en el control de Rhizoctonia solani (Kühn)*. [Tesis para optar el título profesional de Ingeniero Agrónomo, Universidad de Chile]. https://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/101706/ochoa_f.pdf?sequence=4&isAllowed=y

Onán Cruz, E. (2013). Evaluación de cuatro fungicidas para el control de *Fusarium*

- oxysporum* f. sp. *pisi* en el cultivo de arveja dulce (*Pisum sativum* L.); Tecpán Guatemala, Chimaltenango. [Tesis para optar el grado académico de Licenciado]. <http://biblio3.url.edu.gt/Tesario/2013/06/14/Onan-Elder.pdf>
- Oña, C. I. (2018). Evaluación de la eficacia de productos convencionales y alternativos para el control de marchitez descendente (*Ilyonectria torresensis*) en mora de castilla. [Tesis para optar el Título de Ing. Agrónoma]. <http://www.dspace.uce.edu.ec:8080/bitstream/25000/17068/1/T-UCE-0004-CAG-042.pdf>
- Palacios, L. P. (2021). *Caracterización de microorganismos asociados a la pudrición de raíces de aguacate Persea americana Mill. en viveros del valle de Cauca, Colombia* [Tesis para optar el Título de Magister en Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia]. <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/80343/1098710933.2021.pdf?sequence=2&isAllowed=y>
- Pandin, C., Le Coq, D., Canette, A., Aymerich, S. y Briandet, R. (2017). Should the biofilm mode of life be taken into consideration for microbial biocontrol agents? *Microbial Biotechnology*, 10(4), 719-734. DOI: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12693>
- Pavone, D. (2021). *El manejo integrado de plagas agrícolas: la alternativa inteligente para cultivos más productivos y sostenibles. Tecnovita*. <https://tecnovitaca.com/manejo-integrado-plaga-agricola/>
- Pedraza, L.A., López, C.A., Uribe-Vélez, D. (2020). Mecanismos de acción de *Bacillus* spp. (Bacillaceae) contra microorganismos fitopatógenos durante su interacción con plantas. *Acta Biológica Colombiana*, 25(1), 112-125. <https://biblat.unam.mx/hevila/Actabiologicacolombiana/2020/vol25/no1/11.pdf>
- Pérez, D. y García-Godos, P. (2019). Identificación del agente causal del marchitamiento en *Caesalpinia spinosa* "tara" y el efecto antagónico de aislados de *Bacillus* spp. y *Trichoderma* sp. *Ecología aplicada*, 18(1). DOI: <http://dx.doi.org/10.21704/rea.v18i1.1306>
- Pinto, G. F. (2014). *Evaluación in vitro de antagonistas sobre cepas seleccionadas de*

Cylindrocarpon macrodidymum Halleen, Schroers & Crous, agente causal de la enfermedad del pie negro de la vid (*Vitis vinifera* L.) [Tesis para optar el Título Profesional de Ing. Agrónomo. Santiago, Chile].
<https://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/148277/Pinto-%20Evaluaci%C3%B3n%20de%20antagonistas%20%282014%29.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Rafique, M., Hayat, K., Mukhtar, T., Amna, A., Khan, A., Afridi, M. S., Hussain, T., Sultan, T., Munis, M.F.H., Imran, M. y Chaudhary, H.J. (2015). Bacterial biofilm formation and its role against agricultural pathogens. The battle against microbial pathogens: Basic science, technological advances and educational programs. Formatex. https://www.researchgate.net/profile/Muhammad-Afridi-14/publication/282440188_Bacterial_biofilm_formation_and_its_role_against_agricultural_pathogens/links/5c2cdeb0458515a4c70775c7/Bacterial-biofilm-formation-and-its-role-against-agricultural-pathogens.pdf
- Rahman, M. y Punja, S. K. (2005). Factors influencing development of root rot on ginseng caused by *Cylindrocarpon destructans*. *Phytopathology*, 95, 1381-1390. DOI: 10.1094/PHYTO-95-1381
- Ramírez G, G. y Morales O, J. G. (2013). Primer informe de *Cylindrocarpon destructans* (Zinss) Scholten afectando plántulas de aguacate (*Persea americana* Mill) en Colombia. *Revista de Protección Vegetal*, 28(1), 27–35. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522013000100004
- Rayner, R. W. (1970). A Mycological colour chart. British Mycological Society and CAB International Mycological Institute, Kew. 33pp
- Rios-Velsaco, C., Caro-Cisneros, J., Berlanga-Reyes, D., Ruíz-Cisneros, M. F., Ornelas-Paz, J., Salas-Marina, M. y Guerrero-Prieto, V. (2015). Identification and antagonistic activity in vitro of *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp. isolates against common phytopathogenic fungi. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 34(1), 84-99. DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1507-1>
- Rodríguez, C. A. (2013). Evaluación de microorganismos promotores de crecimiento

- vegetal en tomate (*Solanum lycopersicum*) variedad santa clara , aislados de residuos lignocelulósicos de higuera (*Ricinus communis*) [Trabajo de Grado para optar Título de Especialista en Microbiología Industrial]. <https://repositorio.ucm.edu.co/bitstream/10839/578/1/Cristian%20Alonso%20Rodriguez%20Gonzalez.pdf>
- Rodríguez, Y. H. (2021). *Producción orgánica de orégano (Origanum vulgare L.) para exportación por pequeños agricultores de Puquina, Moquegua* [Trabajo de suficiencia profesional para optar el título de Ing. Agrónoma. Lima, Perú]. <https://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/4990/rodriguez-z-vidal-yazmin-hellen.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Romero, G., Crosara, A., Baraibar, A. (2008). *Trichoderma harzianum*, un biocontrol y biopromotor en vivero de especies forestales. *Ciencia e investigación forestal*, 14(2), 335-345. DOI: <https://doi.org/10.52904/0718-4646.2008.294>
- Rotan, R. (2015). Fungicida - metoxiacrilato, azoxystrobin. *Rotan Road*. China: JIANGSU ROTAM CHEMISTRY CO, LTD. <http://www.redalyc.org/pdf/904/90430055005.pdf>
- Ruiz-Cisneros, M. F., Ornelas-Paz, J. J., Olivas-Orozco, G. I., Acosta-Muñis, C. H., Sepúlveda-Ahumada, D. R., Pérez-Corral, D. A., Ríos-Velazco, C., Salas-Marina, M. A. y Fernández-Pavía, S. P. (2018). Efecto de *Trichoderma* spp. y hongos fitopatógenos sobre el crecimiento vegetal y calidad del fruto de jitomate. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 36 (3), 444-456. DOI: <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1804-5>
- Ruiz-Sánchez, E., Mejía-Bautista, M. Á., Serrato-Díaz, A., Reyes-Ramírez, A., Estrada-Girón, Y. y Valencia-Botín, A.J. (2016). Antifungal activity and molecular identification of native strains of *Bacillus subtilis*. *Agrociencia*, 50(2), 133–148. DOI: <https://doi.org/10.1109/5289.685491>
- Ryu, C.M., Farag, M.A., Hu, C.H. (2003). Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(8), 4927-4932. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0730845100>
- Sandheep, A. R., Asok, A. K. y Jisha, M. S. (2013). Combined inoculation of

- Pseudomonas fluorescens* and *Trichoderma harzianum* for enhancing plant growth of vanilla (*Vanilla planifolia*). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 16(12), 580–584. DOI: <https://doi.org/10.3923/pjbs.2013.580.584>
- Santana-Díaz, T. y Castellanos-González, L. (2018). Efecto bioestimulante de *Trichoderma harzianum* Rifai en posturas de Leucaena, Cedro y Samán. *Colombia Forestal*, 21(1), 81-90. DOI: <https://doi.org/10.14483/2256201X.11744>
- SERFI. (2021). TRICHO D. Ficha técnica. Disponible en: <https://s3.amazonaws.com/serfi-cdn/uploads/2020/02/13203632/Ficha-T%C3%A9cnica-TRICHO-D-v06.2021.pdf>
- Shafi, J., Tian, H, Ji, M. (2017). *Bacillus* Species as versatile weapons for plant pathogens: a review. *Biotechnology & Biothechnological Equipment*, 31(3), 446-459. DOI: <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1286950>
- Siddiqui, Z.A. y Akhtar, M. S. (2008). Synergistic effects of antagonistic fungi and a plant growth promoting rhizobacterium, an arbuscular mycorrhizal fungus, or composted cow manure on populations of *Meloidogyne incognita* and growth of tomato. *Biocontrol Science and Technology*, 18(3), 279–290. <https://doi.org/10.1080/09583150801896043>
- Silvestre. (2015). Bio-Splent. Ficha técnica 18: 1-4. Disponible en: http://www.silvestre.com.pe/site/images/Fichas_Tecnicas/FT_BIO-SPLENT_70_WP_18.pdf
- Singh, A., Srivastava, M., Shahid, M., Pandey, S., Trivedi, S., Kumar, V., Kumar, Y. (2016). *Trichoderma harzianum* (Th Azad): A promising bio-control agent against lentil wilt. *International Journal of bio-resource and stress management*, 7(4). DOI: <https://doi.org/10.23910/IJBSM/2016.7.4.1388c>
- Skowfogianni, E., Solomou, A. D. y Danalatos, N. G. (2019). Ecology, cultivation and utilization of the aromatic Greek orégano (*Origanum vulgare* L.) : A review. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 47 (3), 545-552. DOI: 10.15835/nbha47111296

- Soltagro. (2018). Oficial 500 WG. Disponible en: https://www.soltagro.com/images/productos/hoja-tecnica/oficial_ft.pdf
- Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: Structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 56(4), 845–857. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x>
- Tamayo, J. P. (2007). Enfermedades del aguacate. *Politécnica*, 4(4), 51–70. DOI: <https://doi.org/10.1093/carcin/16.8.2007>
- Tucci, M., Ruocco, M., De Masi, L., De Palma, M. y Lorito, M. (2011). The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by the plant genotype. *Molecular Plant Pathology*, 12 (4), 341-354. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2010.00674.x
- Uddin, M.N., Rahman, Uu., khan, W., Uddin, N. y Muhammad, M. (2018). Effect of *Trichoderma harzianum* on tomato plant growth and its antagonistic activity against *Phythium ultimum* and *Phytophthora capsici*. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 28(1), 32. DOI: 10.1186/s41938-018-0032-5
- Vitale, A., Aiello, D., Guarnaccia, V., Perrone, G., Stea, G. y Polizzi, G. (2012). First report of root rot Caused by *Ilyonectria* (= *Neonectria*) *macrodidyma* on Avocado (*Persea americana*) in Italy. *Journal of Phytopathology*, 160 (3), 156-159. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2011.01869.x>
- Wu, K., Fang, Z., Guo, R., Pan, B., Shi, W., Yuan, S., Guan, H., Gong, M., Shen, B. y Shen, Q. (2015). Pectin enhances bio-control efficacy by inducing colonization and secretion of secondary metabolites by *Bacillus amyloliquefaciens* SQY162 in the rhizosphere of tobacco. *Plose one*, 10(5). DOI: 10.1371/journal.pone.0127418
- Yu, X., Ai, C., Xin, L. y Zhou, G. (2011). The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. *European Journal of Soil Biology*, 47(2), 138-145. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2010.11.001>
- Zhou, R., Fu, J., Shi, H., Yan, X. y Sun, J. (2010). Screening and identification of antagonistic strains against *Cylindrocarpon destructans*. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 41 (4), 422-426. <https://agris.fao.org/agris->

search/search.do?recordID=CN2011002707

- Zilberstein, M., Noy, M., Levy, E., Elkind, G., Zeidan, M., Teverovski, E. y Ben Ze'ev, I. (2007). Wilting disease of young avocado trees caused by *Neonectria radicola* in Israel. Proceedings VI World Avocado Congress. <http://www.avocadosource.com/wac6/en/Extenso/2b-76.pdf>
- Zimowska, B. (2015). Fungi threatening the cultivation of oregano (*Origanum vulgare* L.) in South-Eastern Poland. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 14(4), 65-78. <https://czasopisma.up.lublin.pl/index.php/asphc/article/view/2594/1834>
- Zohora, U.S., Ano, T. y Rahman, M. S. (2016). Biocontrol de *Rhizoctonia solani* K1 by iturina A producer *Bacillus subtilis* RB14 seed treatment in tomato plants. *Advances in Microbiology*, 6, 424-431. DOI: <http://dx.doi.org/10.4236/aim.2016.66042>

ANEXOS

Anexo 1. Análisis de varianza para el porcentaje de incidencia de los tratamientos en el control de *C. destructans*, bajo condiciones de invernadero. Tacna 2019.

Fuentes de variabilidad	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado Medio	F calculado	p-valor 0.05
Bloques	2	23,164	11,582	1,000	0,392 NS
Tratamientos	7	23656,960	3379,566	291,888	0,000 *
Error	14	162,096	11,578		
Total	23	23842,220			

C. V. 8,448 %

Anexo 2. Análisis de varianza para el porcentaje de reducción de la enfermedad de los tratamientos en el control de *C. destructans*, bajo condiciones de invernadero. Tacna 2019.

Fuentes de variabilidad	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado Medio	F calculado	p-valor 0.05
Bloques	2	23,171	11,585	1,000	0,392 NS
Tratamientos	7	23656,970	3379,567	291,882	0,000 *
Error	14	162,099	11,578		
Total	23	23842,240			

C.V. 5,698 %

Anexo 3. Análisis de varianza para la altura de la planta de los tratamientos en el control de *C. destructans* bajo condiciones de invernadero. Tacna, 2019.

Fuentes de variabilidad	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	p-valor 0,05
Bloques	2	7,054	3,527	2,138	0,154 NS
Tratamientos	7	209,260	29,894	18,121	0,000 *
Error	14	23,095	1,649		
Total	23	239,410			

C.V. 3,118 %

Anexo 4. Análisis de varianza para la longitud de la Raíz de los tratamientos para el control de *C. destructans*, bajo condiciones de invernadero. Tacna, 2019.

Fuentes de variabilidad	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	p-valor 0,05
Bloques	2	0,461	0,230	0,266	0,770 NS
Tratamientos	7	594,179	84,882	97,948	0,000 *
Error	14	12,132	0,866		
Total	23	606,792			

C.V. 3,878 %

Anexo 5. Análisis de varianza para el porcentaje de materia sea del follaje de los tratamientos para el control de *C. destructans*, bajo condiciones de invernadero. Tacna, 2019.

Fuentes de variabilidad	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	p-valor 0,05
Bloques	2	4,187	0,505	1,148	0,3448 NS
Tratamientos	7	3269,566	467,080	256,083	0,000 *
Error	14	25,535	1,823		
Total	23	3299,288			

C.V. 2,962 %

Anexo 6. Análisis de varianza para el porcentaje de materia seca de la raíz de los tratamientos para el control de *C. destructans*, bajo condiciones de invernadero. Tacna, 2019.

Fuentes de variabilidad	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	p-valor 0,05
Bloques	2	2,234	1,117	0,565	0,579 NS
Tratamientos	7	4764,716	680,674	344,634	0,000 *
Error	14	27,651	1,975		
Total	23	4794,601			

C.V. 2,166 %

Anexo 7. Porcentaje de incidencia de la enfermedad de los tratamientos en el control de *C. destructans*, bajo condiciones de invernadero. Tacna, 2019.

Tratamientos	I	II	III
T ₁ (THa)	16,67	16,67	16,67
T ₂ (BSa)	33,33	33,33	33,33
T ₃ (THj)	16,67	16,67	16,67
T ₄ (BSj)	16,67	16,67	16,67
T ₅ (TAa)	66,67	66,67	66,67
T ₆ (TAj)	66,67	66,67	66,67
T ₇ (TE)	100	100	100
T ₈ (T)	16,67	0	0

Anexo 8. Porcentaje de reducción de la incidencia de la enfermedad de los tratamientos en el control de *C. destructans*, en invernadero. Tacna, 2019.

Tratamientos	I	II	III
T ₁ (THa)	83,33	83,33	83,33
T ₂ (BSa)	66,67	66,67	66,67
T ₃ (THj)	83,33	83,33	83,33
T ₄ (BSj)	83,33	83,33	83,33
T ₅ (TAa)	33,33	33,33	33,33
T ₆ (TAj)	33,33	33,33	33,33
T ₇ (TE)	0	0	0
T ₈ (T)	83,33	100	100

Anexo 9. Altura de la planta de los tratamientos en el control de *C. destructans*, bajo condiciones de invernadero. Tacna, 2019.

Tratamientos	I	II	III
T ₄ (BSj)	42,9	41,9	42,8
T ₃ (THj)	41,2	41,6	42,9
T ₂ (BSa)	47,2	44,5	45,6
T ₁ (THa)	47	44,5	43,8

T ₅ (TAa)	40,5	38,8	38,1
T ₆ (TAj)	39,8	40,2	39
T ₇ (TE)	37,4	34,4	39,8
T ₈ (T)	38,3	37,9	38,5

Anexo 10. Longitud de la raíz de los tratamientos en el control de *C. destructans*, bajo condiciones de invernadero. Tacna, 2019.

Tratamientos	I	II	III
T ₂ (BSa)	31,4	29,8	29
T ₁ (THa)	29,8	29	29
T ₃ (THj)	26,7	27,4	29
T ₄ (BSj)	27,4	29,8	27,4
T ₅ (TAa)	20,4	21,2	21,2
T ₆ (TAj)	19,6	20,4	21,2
T ₇ (TE)	17,2	17,2	16,4
T ₈ (T)	18,8	18,8	18

Anexo 11. Materia seca de follaje de los tratamientos en el control de *C. destructans* bajo condiciones de invernadero. Tacna, 2019.

Tratamientos	I	II	III
T ₂ (BSa)	59,35	60,56	60,68
T ₁ (THa)	54,59	57,5	56,58
T ₃ (THj)	56,89	58,76	57,79
T ₄ (BSj)	56,74	53,34	52,58
T ₅ (TAa)	33,47	36,59	33,53
T ₆ (TAj)	36,78	36,96	34,26
T ₇ (TE)	31,69	31,74	31,88
T ₈ (T)	35,07	33,58	33,45

Anexo 12. Materia seca de raíz de los tratamientos en el control de *C. destructans*, bajo condiciones de invernadero. Tacna 2019.

Tratamientos	I	II	III
T ₁ (THa)	76,25	75,05	78,93
T ₂ (BSa)	79,94	80,93	80,87
T ₃ (THj)	79,49	77,44	78,59
T ₄ (BSj)	78,95	73,84	77,14
T ₅ (TAa)	54,39	56,92	55,53
T ₆ (TAj)	57,2	58,89	57,16
T ₇ (TE)	40,72	40,04	41,1
T ₈ (T)	52,74	52,64	52,31

Anexo 13. Síntomas en el follaje y raíz observados en campo en cultivo de orégano con pudrición radicular. Candarave, Tacna.

Síntomas en el follaje	Síntomas en la raíz
Amarillamiento de hojas basales	Ennegrecimiento de raíces y raicillas
Necrosis apical de hojas basales	Descortezamiento de raíces y raicillas
Necrosis de ramas	
Disminución del crecimiento	
Ramas delgadas con poco vigor	
Hojas pequeñas	