UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE QUITO

CARRERA:
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

TEMA:
PRUEBAS BAJO INVERNADERO DE CEPAS DE *Bacillus subtilis* **COMO AGENTE DE BIOCONTROL DE** *Alternaria* spp**. en** *Brassica oleracea* **var** *italica* **y TÉCNICAS DE CONSERVACIÓN DE CEPAS.**

AUTORAS:
CAICEDO MORALES SUGEY ESTEFANIA
CHACÓN MUELA JESSICA ALEXANDRA

TUTOR:
RAMIRO DANIEL ACURIO VÁSCONEZ

Quito, febrero de 2017

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Nosotros, Sugey Estefania Caicedo Morales con documento de identificación N° 2000097275 y Jessica Alexandra Chacón Muela con documento de identificación N° 1719886879, manifestamos nuestra voluntad y cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del trabajo de titulación intitulado: "Pruebas bajo invernadero de cepas de *Bacillus subtilis* como agente de biocontrol de *Alternaria* spp. en *Brassica oleracea* var *italica* y técnicas de conservación de cepas", el mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniero en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de PropiedadI ntelectual, en nuestra condición de autores nos reservamos los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribimos este documento en el momento que hacemos entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

.....	.....
Sugey Estefania Caicedo Morales	Jessica Alexandra Chacón Muela
2000097275	1719886879

Quito, Febrero 2017

DECLARATORIA DE COAUTORÍA DEL DOCENTE TUTOR

Yo, declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación "Pruebas bajo invernadero de cepas de *Bacillus subtilis* como agente de biocontrol de *Alternaria* spp. en *Brassica oleracea* var *italica* y técnicas de conservación de cepas" realizado por Sugey Estefania Caicedo Morales y Jessica Alexandra Chacón Muela, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, Febrero 2017

.....

Ramiro Daniel Acurio Vásconez
1714819495

Dedicatoria

A Dios por protegerme y darme fuerzas para superar obstáculos. A mis padres Felix y Esther porque son mi fuente y motor, quienes con su perseverancia y apoyo incondicional me ayudaron a cumplir una de muchas metas.

A mi hermana por siempre creer en mí.

A toda mi familia y amigos que son lo más valioso en mi vida.

Sugey Estefania Caicedo Morales

A Dios, por bendecirme cada día.

A mis padres por su apoyo, consejos, comprensión, amor, ayuda en momentos difíciles para lograr mis sueños.

A mi hermana por ser mi cómplice, mi refugio, por ser ella y demostrarme su cariño a su manera.

A mi familia que siempre está conmigo, nunca estoy sola con ustedes. A mis abuelitos por su amor y preocupación, a mis tíos por ser ejemplo de esfuerzo y constancia. A mis primos y mi pequeño hermano por sus ocurrencias y cariño único.

A mis amigos por compartir su tiempo, conocimientos, aventuras y apoyo incondicional.

Jessica Alexandra Chacón Muela

Agradecimientos

A la Universidad Politécnica Salesiana (UPS) por formarnos como profesionales con responsabilidad y brindarnos educación de calidad.

A nuestro tutor MSc. Daniel Acurio por brindarnos sus conocimientos, asesoría, esfuerzo y dedicación.

A la familia Acurio Vásconez, por su hospitalidad, confianza y tiempo.

Al Centro de Investigación y Valoración de Biodiversidad (CIVABI), por facilitarnos con su ayuda e instalaciones para el desarrollo experimental de la investigación.

Índice de Contenido

Introducción 1
Capítulo 1 5
1. Marco teórico 5
1.1. El Brócoli (*Brassica oleracea* var *italica*) 5
1.1.1. Taxonomía 5
1.1.2. Características 6
1.2. Cultivo de brócoli 7
1.3. Variedades híbridas 8
1.3.1 Avenger 9
1.3.2. Domador 9
1.4. Factores en el aparecimiento de enfermedades 9
1.5. *Alternaria* 10
1.5.1. Taxonomía 11
1.6. Micotoxinas 12
1.7. Infección en plantas 12
1.8. Infección en brócoli 12
1.9. Importancia económica de *Alternaria* 13
1.10. *Bacillus* 13
1.10.1. Taxonomía de *Bacillus subtilis* 14
1.10.2. Morfología y Características 15
1.11. Definición de Biocontrolador 16
1.12. Mecanismo de acción de *Bacillus subtilis* como control biológico 16
1.13. Capacidad antagónica contra *Alternaria* spp. 17
1.14. Métodos de conservación para bacterias 17
1.15. Método estadístico ABCPE 19
1.16. Prueba de Post Hoc Duncan 20
1.17 Prueba de Post Hoc Tukey 20
Capítulo 2 21
2. Marco metodológico 21
2.1. Fase de laboratorio 21

2.1.1. Medios de cultivo.....21
2.1.2. Resiembra de *Bacillus subtilis* cepas IB6 y AB4 21
2.1.3. Determinación de la concentración de células bacterianas.....22
2.1.4. Preparación del controlador biológico (Antagonista).....23
2.1.5. Conservación para *Bacillus subtilis* cepas IB6 y AB4 23
2.1.6. Reactivación de las cepas de *Bacillus subtilus* IB6 y AB4 en conservación..25
2.1.7. Resiembra y reproducción de *Alternaria* spp. 27
2.1.8. Conteo de esporas 27
2.1.9. Preparación del inóculo de *Alternaria* spp. 28
2.2. Fase de campo 28
2.2.1. Preparación del terreno, parcelas y siembra de brócoli 30
2.2.2. Diseño o esquema de campo.....31
2.2.3. Aplicación de Tratamientos 32
2.2.4. Diseño experimental 33
2.2.5. Aplicación del inóculo de *Alternaria* spp. 34
2.2.6. Aplicación del controlador biológico 34
2.2.7. Aplicación del tratamiento químico.....35
2.2.8. Evaluación de la enfermedad.....35
2.2.9. Muestreo de pellas en postcosecha 36
2.2.10. Análisis estadístico 37
Capítulo 3 38
3. Resultados y discusión 38
3.1 Medición del halo de *Alternaria* spp. 38
3.2 Determinación de concentración en *Bacillus subtilis*.....38
3.3 Evaluación en campo.....39
3.3.1 Análisis del Área Bajo la curva del Proceso de la Enfermedad ABCPE.....39
3.3.2 Análisis de las muestras postcosecha.....43
3.3.3 Reactivación de *Bacillus subtilis* cepas IB6 y AB4.....46
Conclusiones 51
Recomendaciones..... 52
BIBLIOGRAFÍA 53

Anexos 62

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación Taxonómica..... 6
Tabla 2. Clasificación taxonómica de *Alternaria* spp..... 11
Tabla 3. Clasificación Taxonómica de *Bacillus subtilis*..... 14
Tabla 4. Fórmula para determinación de unidades formadoras de colonias por mL .. 26
Tabla 5. Fórmula para determinación de esporas..... 28
Tabla 6. Localización del ensayo..... 29
Tabla 7. Área total del ensayo..... 30
Tabla 8. Actividades del ensayo antes y durante la siembra de brócoli..... 31
Tabla 9. Esquema de ANDEVA..... 34
Tabla 10. Escala de severidad..... 36
Tabla 11. Análisis de varianza para la variable severidad en el Área bajo la curva del proceso de la enfermedad ABCPE (SC tipo III). 39
Tabla 12. Análisis de varianza ANDEVA para variable severidad en postcosecha ... 44
Tabla 13. Análisis de varianza ANOVA para la viabilidad de cepas (UFC/mL) en conservación..... 47

Índice de figuras

Figura 1. Ubicación Geográfica del lugar de aplicación, Izamba, Tungurahua-Ecuador. 29
Figura 2. Esquema del invernadero en el cultivo de brócoli. 32
Figura 3. Distribución de tratamientos en brócoli 33
Figura 4. Representación de Severidad en el ABCPE por tratamientos, mediante prueba de Tukey (5%) 40
Figura 5. Representación de Severidad en el ABCPE para las variedades híbridas, mediante prueba de Tukey (5%) 42
Figura 6. Severidad en la postcosecha para tratamientos, Prueba de Duncan al 5%. . 45
Figura 7. Viabilidad de cepas (UFC/mL) conservadas entre tratamientos, prueba Tukey al 5% 48
Figura 8. Prueba de Tukey al (5%) tratamientos utilizados en la conservación 49

Índice de anexos

Anexo 1. Preparación de medios y soluciones 62
Anexo 2. Preparación del estándar de McFarland 62
Anexo 3. Medición de halo de crecimiento del hongo *Alternaria* spp. en la primera resiembra. 64
Anexo 4. Medición de halo de crecimiento del hongo *Alternaria* spp. en la tercera resiembra 64
Anexo 5. Ficha uso de suelo provincia de Tungurahua. 65
Anexo 6. Fase de Laboratorio – *Alternaria* spp. 66
Anexo 7. Fase de laboratorio- *Bacillus subtilis* 67
Anexo 8. Fase de laboratorio- Conservación *Bacillus subtilis* IB6 y AB4. 68
Anexo 9. Diseño experimental 71
Anexo 10. Evaluación de la enfermedad 72
Anexo 11. Cosecha de brócoli 74
Anexo 12. Activación de cepas conservadas 76

Resumen

El brócoli es considerada una de las hortalizas más importantes del Ecuador en el mercado nacional e internacional, sin embargo, el porcentaje del cultivo de brócoli ha decaído en los últimos años debido a la presencia de enfermedades causado por el hongo del género *Alternaria*; éste se ha caracterizado por presentar manchas de color café afectando a las hojas maduras, tallos y pellas, provocando significativas pérdidas económicas.

El ensayo se realizó en dos fases, en la fase de laboratorio se procedió a la reproducción, tanto de *Alternaria* spp. como de *Bacillus subtilis* y la conservación de cepas .Y la fase de campo en la aplicación del inóculo del patógeno y el Biocontrolador. La capacidad antagónica de *Bacillus subtilis* se evaluó mediante una escala de severidad diseñada en función de la cantidad de lesiones causadas por el hongo y se realizó un ABCPE (Área Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad), lo cual indicó que existe una diferencia en al menos un tratamiento y diferencias estadísticas entre las variedades hibridas. También se realizó un análisis postcosecha evaluando el porcentaje de severidad en las pellas cosechadas.

El método utilizado para la conservación y que mejores resultados presentó en la reactivación fue el Cryobank ya que proporcionó un cultivo sin contaminación y con un alto porcentaje de recuperación.

Palabras clave: Brócoli, inóculo, agente biocontrolador, patógeno.

Abstract

Broccoli is considered one of the most important vegetables of Ecuador in the national and international market, however the percentage of the culture of broccoli for export is low due to the presence of diseases caused by fungi, mainly by the genus *Alternaria* characterized by being manifested in mature leaves, stems and flower heads causing significant economic losses.

The assay was carried out in two phases; in the laboratory phase, both *Alternaria* spp. and *Bacillus subtilis* were propagated and the strains were conserved. And in the field phase the application of the pathogen inoculum and the biocontrolator. The antagonistic capacity of *Bacillus subtilis* was evaluated using a severity scale designed as a function of the number of lesions caused by the fungus and an ABCPE (Area under the disease progress curve) was performed, that indicated that there is a difference in at least one treatment and statistical differences among the hybrid varieties. Also a post-harvest analysis was performed by a Tukey test at 5%, obtaining the percentage of severity in the harvested flower heads, being the treatment IB6; Isolated from the province of Imbabura, the best strain with antagonistic capacity and the Avenger variety which presented a lower incidence of the disease compared to the variety Domador.

The method used for conservation and the best results that were produced in the reactivation was the Cryobank, since it provided a culture without contamination and with a high percentage of recovery.

Key words: Broccoli, inoculum, biocontrol agent, pathogen.

Introducción

El brócoli es uno de los cultivos de mayor importancia socioeconómica en el Ecuador, principalmente en la provincia de Cotopaxi, seguida por Pichincha e Imbabura los cuales producen el 68, 16 y el 10 por ciento respectivamente del total nacional (Sánchez, 2013; Ayala, 2013), nuestro país ha sido uno de los primeros exportadores de Sudamérica de esta hortaliza al mercado europeo, debido a su alta calidad en las pellas. En la provincia de Tungurahua, el porcentaje de brócoli para exportación es de tan solo un 2% (MCPEC, 2011), debido a que en determinadas épocas las condiciones de temperatura y humedad favorecen la presencia de enfermedades que limitan la producción reduciendo las cosechas, menoscabando la calidad del producto y provocando significativas pérdidas económicas (Arteaga, 2011).

Una de las principales enfermedades es provocada por *Alternaria* spp., un hongo fitopatógeno que se caracteriza por manifestarse en las hojas viejas y tallos, presentando manchas circulares de color café oscuro, que luego se torna amarillo alrededor de la lesión, afectando también a un florete o varios a la vez. El hongo principalmente se encuentra en la semilla, residuos de cosecha y malezas, el inóculo puede ser diseminado por el viento, salpique de agua, equipos, herramientas y el hombre (Serrato, L.; French, 2011).

La carencia de asesoramiento técnico para los agricultores ha provocado una desmesurada utilización de agroquímicos para eliminar o controlar *Alternaria* spp., los mismos que por su mal manejo han provocado una visible resistencia, además creando una dependencia en el que no solo se ve afectado el ámbito económico, sino también la salud y el entorno de los agricultores (Camacho, F.; Tello, 2012).

La propuesta de implementación de un controlador biológico es una alternativa para disminuir los problemas antes mencionados. El control biológico emplea microorganismos (bacterias, hongos), parasitoides o depredadores que interrumpe el desarrollo y/o elimina una población ya sea de plagas o microorganismos perjudiciales para un determinado cultivo (Pérez, 2012). El *Bacillus subtilis* es un bacilo gram positivo con una morfología característica que le proporciona la resistencia a condiciones no favorables en el ambiente (Layton, C.; Maldonado, E.; Monroy, L.; Corrales, L.; Sánchez, 2011), además se le atribuye propiedades de controlador biológico, ya que posee "actividad antibiótica que inhibe el crecimiento de fitopatógenos como *Alternaria* spp." (Bustos, 2016, p. 18).

La utilización de biocontroladores va en concordancia con la filosofía del Buen Vivir, según el séptimo objetivo del Plan Nacional para el Buen Vivir es: "Garantizar los derechos de la naturaleza y promover la sostenibilidad ambiental, territorial y global" (SENPLADES, 2013), donde se fortalezca la riqueza natural y promueva el cuidado de la misma, protegiéndola para las generaciones venideras.

Este trabajo tuvo como objetivo general determinar la capacidad de cepas de *Bacillus subtilis* como agente de Biocontrol de *Alternaria* spp. en pruebas bajo invernadero y conservación de cepas eficientes y como objetivos específicos: utilizar cepas autóctonas eficientes de *Bacillus subtilis* identificadas previamente, en pruebas bajo invernadero como controlador biológico de *Alternaria* spp. y evaluar diferentes técnicas de conservación de cepas de *Bacillus subtilis*.

Se planteó dos hipótesis, la nula (H_O) en la cual la inoculación de cepas de *Bacillus subtilis* no actúa como agente de biocontrol de *Alternaria* spp. en *Brassica oleracea* var *italica*; y la hipótesis alternativa (H_A) en la cual la inoculación de cepas de *Bacillus subtilis* actúa como agente de biocontrol de *Alternaria* spp. en *Brassica oleracea* var *italica*.

El proceso del ensayo fue dividido en dos fases, la de laboratorio y la de campo. La fase de laboratorio se la ejecutó en los laboratorios del área de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana, campus el Girón, en la cual se realizó la reproducción masiva de las cepas AB4 e IB6 de la bacteria *Bacillus subtilis.* Para estas cepas se aplicó cinco diferentes metodologías de conservación y fueron evaluadas en función de la viabilidad después de un periodo de siete meses de almacenamiento.

La fase de campo se desarrolló en la provincia de Tungurahua, cantón Ambato, en la parroquia Izamba, se planteó un diseño experimental de parcela dividida con cuatro bloques siendo la parcela grande las dos variedades híbridas (Avenger y Domador), donde se evaluó dos cepas de biocontrolador y se comparó con un testigo químico y un testigo absoluto que fueron las parcelas pequeñas. El ensayo fue realizado bajo invernadero en condiciones controladas (temperatura y humedad relativa), inoculando el patógeno y el biocontrolador mediante aplicación foliar, a partir de la quinta semana a partir del trasplante. Para estas pruebas se aplicó el fitopatógeno a una concentración de $1x10^4$ y las cepas bacterianas a $1x10^7$, mientras que el control químico se lo aplicó a dosis recomendadas por la casa comercial.

En cada aplicación se monitoreó la temperatura y la humedad relativa, se registró el avance de la enfermedad basándose en una escala de severidad, la cual fue diseñada en

función de la cantidad de lesiones causadas por el hongo y determinando el área de progreso de la enfermedad bajo la curva.

De la misma manera se evaluó el peso final de las pellas y se muestreó un florete por cada unidad experimental, el cual fue colocado a una cámara húmeda con el fin de comprobar aquellos que presentaban el hongo después de la cosecha. Estos datos fueron analizados mediante el programa estadístico Infostat ¨versión 2013¨.

Capítulo 1

1. Marco teórico

1.1. El Brócoli (*Brassica oleracea* var *italica*)

El brócoli es una hortaliza que posee la raíz de tipo pivotante acompañado de raíces secundarias superficiales (Ñacato, C.; Valencia, 2016). El tallo es suculento, mide entre 2 a 6 cm de diámetro y de 20 a 50 cm de longitud que es el soporte de la planta; los tallos que sujetan las pellas inician un crecimiento en longitud y se abren para sostener las flores (Coello, 2005). Las hojas son grandes, estrechas y erguidas con bordes ondulados, nervaduras marcadas y con una longitud de hasta 50 cm y de ancho unos 30 cm de largo (Telenchana, 2015). Las flores poseen cuatro pétalos amarillos con características regulares, son completas e hipógeas, los pétalos tienen forma de cruz, además tiene seis estambres y un pistilo simple, las semillas son redondas de color rosáceo y con una dimensión de 2 a 3 mm (Telenchana, 2015).

Entre las características del brócoli, Parra (2014, p. 3) menciona que "posee abundantes cabezas florales carnosas comestibles de color verde, colocadas en forma de árbol, sobre ramas que nacen de un grueso tallo floral". Las pellas presentan superficies granuladas con conglomerados cónicos de formación apical de hasta 20 cm de diámetro presentando diferentes colores, según sea la variedad (Orellana, Solórzano, Boniolla, Salazar, Falconí & Velasteguí, 2008).

1.1.1. Taxonomía

Sánchez (2013) muestra que *Brassica oleracea* se clasifica de la siguiente manera:

Tabla 1. Clasificación Taxonómica

Reino:	Plantae
Subreino	Tracheobionta
Subdivisión:	Spermatophyta
División	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Dilleniidae
Orden:	Capparales
Género:	Brassicaceae
Familia:	Brassica L.
Especie	*Brassica oleracea* L.
Variedad	*Brassica oleracea* L.var *italica*

Tomada de Sánchez, 2013.

1.1.2. Características

El brócoli es un cultivo estacional y las zonas donde se produce son los bosques secos y húmedos, cuyo clima va de templado a frío, con altas exposiciones de luz solar (Arteaga, 2011). En el Ecuador existe una superficie sembrada de 3500 hectáreas que se encuentra localizado principalmente en la Sierra y la provincia que más cultiva es Cotopaxi con el 68%, seguida por Pichincha e Imbabura que producen el 16 y el 10% del total nacional (Sánchez, 2013).

El Ecuador ha sido unos de los primeros exportadores de Sudamérica de esta hortaliza al mercado europeo debido a que las pellas del brócoli son de alta calidad y el crecimiento

de las exportaciones de brócoli fue de 13 % anual en los últimos ocho años, con 70 mil toneladas y 69 millones de dólares anuales en exportaciones (Vélez, 2015).

Los meses de siembra del brócoli empiezan desde febrero, junio y octubre y los meses de cosecha son: enero, mayo y septiembre(Arteaga, 2011). El brócoli tienes grandes propiedades anticancerígenas, puesto que contiene en particular el Indometil - glucosilato y su derivado, la glucagrasicina, es por esto que es consumida mundialmente. Además, que el brócoli es destacado en la nutrición y salud del ser humano, por su alto contenido de ácido fólico, vitaminas, minerales, hidratos de carbono, proteínas y grasas (Cadena, 2011).

1.2. Cultivo de brócoli

Para el cultivo de brócoli se requiere la preparación de los suelos, pueden ser francos y profundos, proporcionando una rápida filtración de agua y así la planta puede absorber con mayor facilidad los minerales (Subsecretaria de Fomentos a los Agronegocios, 2011), el brócoli no soporta un suelo con exceso de salinidad, el rango tolerante a la salinidad es de 4 mmho (Coello, 2005). Los problemas radiculares se observan cuando la planta no posee suficiente materia orgánica (Vallejo, 2013), así como también una deficiencia de potasio, boro y magnesio (Coello, 2005).

Puede sembrarse de forma directa, como semilla o trasplante. El trasplante se lo realiza dentro de 3 ó 4 semanas de estar en el semillero, cuando la plántula se encuentra de 12 a 15 cm de altura (Subsecretaria de Fomentos a los Agronegocios, 2011) y se recomienda realizar arados y rastras para triturar los terrones que imposibilitan un excelente desarrollo de la planta (Coello, 2005).

El pH adecuado para el cultivo de brócoli es de 6 a 7 y si los suelos se encuentran demasiados ácidos se aplica abonos alcalinos, con el fin de subir el pH y así evitar las enfermedades (Coello, 2005).

La humedad relativa óptima es de 80% y mínima del 70% en altitudes de los 2200 hasta 3000 m.s.n.m. La inducción floral y formación de pella, tanto la humedad como la temperatura debe ser adecuada para el proceso de maduración, caso contrario suele presentar floretes menos compactos, descoloridos y hasta con un sabor más fuerte de lo normal (Coello, 2005).

La cosecha se la realiza a los 70 u 80 días de la siembra y cuando la pella presenta de "25cm o 35cm de diámetro, grano fino y compacto, con tallo largo, de hasta 25 cm totales para el mercado fresco y con tallo más corto, generalmente 15 a 17 cm para la agroindustria" (Coello, 2005, p. 25).

1.3. Variedades híbridas

Existen diferentes tipos de variedades híbridas en el mercado ecuatoriano entre estas las más cultivadas son: Avenger, Domador y Fantástico (Sánchez, 2013b, p. 8). La diferencia en las variedades se da en el "tamaño de la planta, inflorescencias, color, forma de las pellas, así como su adaptabilidad a diversos climas, suelos basados en sus características genéticas" (Salazar, 2013, pp. 7–8), y sobre todo en tiempos de la formación y recolección de la pella. Los cultivos de brócoli híbridos tienen un mejor desarrollo genético y no producen semillas y se clasifican según sea su ciclo (Coello, 2005).

La mejora genética en brócoli, dan elevados rendimientos, una producción uniforme, adaptación a los factores agronómicos que influyen en el crecimiento de la planta. Son muy resistentes a enfermedades y plagas (Coello, 2005).

1.3.1 Avenger

Es un híbrido que posee altos rendimientos en las cosechas, las plantas son vigorosas de tallos gruesos aunque cortos, tienen una inserción baja en la pella; las hojas pueden proteger la pella ya que son anchas y largas, las pellas son de color verde azulado con un domo bien definido logrando un mayor peso y rendimiento, debido a su excelente calidad es cotizado en la industria de congelados. El ciclo del cultivo se da entre 13 y 14 semanas, si se pasa del tiempo debido, es muy susceptible a la pudrición del florete (Jiménez, 2016, p. 40).

1.3.2. Domador

Este híbrido tiene la capacidad de dominar las etapas de transición invierno y verano, es decir que no se ve afectado con cambios del invierno como temperaturas bajas, aunque para que exista un mayor crecimiento se recomienda temperaturas cálidas (Arteaga, 2011, p. 17). Presenta características de alto rendimiento y es el que actualmente domina la producción ecuatoriana (Alvarado, A.; Huiracocha, 2014).

1.4. Factores en el aparecimiento de enfermedades

El estrés se produce porque se excede los límites de tolerancia y conducen a la desestabilización en las funciones de las plantas, provocando un daño parcial o total en las mismas (Arteaga, 2011).

Las temperaturas altas favorecen una rápida propagación de enfermedades en las plantas, mientras que en las bajas se observa poca o nula aparición de patógenos. La humedad tiene una gran influencia en la presencia de enfermedades infecciosas, debido a varios mecanismos como el agua de riego o la lluvia y que puede acumularse en torno al suelo o en la planta misma, provocando que el patógeno se propague y desplace con mayor facilidad (Arteaga, 2011).

El cambio climático global, la contaminación de metales pesados tanto en aguas como en suelos, deficiencia de minerales en el suelo, exceso de nitrógeno y aumento de las radiaciones UV ha favorecido condiciones para que se produzcan las enfermedades en las plantas (Arteaga, 2011).

Las enfermedades de mayor incidencia causadas por hongos pueden ser: *Alternaria, Botrytis cinerea, Fusarium oxysporum, Fusarium solani, Rhizoctonia solani, Mycosphaerella brassicicola, Sclerotinia sclerotiorum* entre otros, algunos aparecen en el estado de plántula con el amarillamiento de las hojas y en los frutos suele aparecer una capa de moho provocando la pudrición de los frutos o muerte de la planta (SIPSA, 2014, pp. 2–5).

1.5. *Alternaria*

El género *Alternaria* provoca daños muy significativos a un amplio grupo de plantas de importancia agrícola**,** debido a que produce toxinas como es el alternariol (AL) y alternariol monometil eter (AME) (Sánchez, D.; Bautista, S.; Castillo, 2007, p. 24).

Las especies de *Alternaria* comparten ciertas similitudes en el proceso de infección, aunque puede haber algunas diferencias según grado de virulencia que se presente,

algunas especies pueden penetrar directamente sus esporas a la planta, mientras que las especies menos virulentas penetran al hospedante por medio de heridas causada por insectos, por el hombre o también se puede dar por los estomas (Fraire, 2007).

"Una característica común que se encuentra en algunas especies de *Alternaria*, es la baja capacidad o ausencia de esporulación en cultivo" (Guerino, J.; Dominguez, 2006).

"Alternaria spp. posee un micelio oscuro con conidióforos cortos erectos, donde forma cadenas de conidias simples o ramificadas. Las conidias son grandes, oscuras con forma de pera, multicelulares con septos transversales y longitudinales. Los conidios son llevados por el viento" (Ñacato & Valencia, 2016, p. 9).

1.5.1. Taxonomía

Según Ñacato y Valencia (2016) *Alternaria* spp. se clasifica de la siguiente manera:

Tabla 2. Clasificación taxonómica de *Alternaria* spp.

Reino:	Ascomycota
Filo:	Pezizomycotina
Clase:	Dothideomycetes
Orden:	Pleosporales
Familia:	Pleosporaceae
Género:	*Alternaria*
Especie:	*Alternaria* spp.

Tomado de Ñacato & Valencia, 2016.

1.6. Micotoxinas

Según el estudio de Pavón (2013), “las toxinas de *Alternaria* spp. se clasifican en cinco grupos atendiendo a sus estructuras químicas:

- Dibenzo-α-pironas: AOH, AME y ALT
- Perileno quinonas: ATX-I, -II, -III
- Ácidos tetrámicos: TeA
- AAL-Toxinas: AAL-TA1, AAL-TA2
- AAL-TB1, AAL-TB2” (págs. 40,41).

Se ha determinado que las micotoxinas son teratogénicos y fetotóxicos en ratones, además de presentar diferentes grados de toxicidad en ratas, embriones de pollo y cultivos celulares humanos (Pavón, 2013).

1.7. Infección en plantas

En las plantas el hongo suele manifestarse con un desarrollo de un micelio blanco que crece sobre alguna herida que empieza a ser más tupido a partir del segundo y tercer día cubriendo en forma total o parcial a la planta (Alves, P.; Pérez, E.; Oribe, 2014). En especies ornamentales aparecen en los días lluviosos y se desarrollan sobre tallos o follajes. Suele iniciar con un moteado en las hojas, éstas se agrandan y toman la forma de aros concéntricos que se quiebran destruyendo todo el follaje (Ramírez, J.; Arias, T.; Jerez, 2008).

1.8. Infección en brócoli

El hongo se desarrolla cuando existe un incremento de humedad, mayor a 80% y en temperaturas moderadas de 25-28ºC (Serrato & French, 2011). La infección se puede

manifestar a los 45 días después de la siembra de campo (Rojas, 2012) y las esporas del hongo pueden producirse en 7 días y nuevamente comenzar el ciclo de la enfermedad en otras plantas (Serrato & French, 2011).

Los síntomas inicia con pequeñas manchas cafés que aumentan su tamaño hasta formar anillos concéntricos en las hojas viejas de la planta, tornándose de color amarillo alrededor de la lesión y en aquellas heridas se pueden observar las esporas del *Alternaria* formando puntos oscuros (Serrato & French, 2011), los tallos también son afectados con una decoloración café y puede involucrar un florete o varios a la vez presenciándose la pudrición del florete durante toda la etapa de formación del mismo (Fraire, 2007). Cuando existe infección en las plántulas, se observa un retraso en el crecimiento, especialmente en los tallos o muerte de la misma (Serrato & French, 2011).

1.9. Importancia económica de *Alternaria*

Alternaria es un agente patógeno, que presenta mayor incidencia en el mes de octubre, por el aumento de lluvias en todo el callejón interandino. La presencia de la enfermedad en las inflorescencias del brócoli impide que estas puedan ser comercializadas tanto al mercado nacional como al internacional, y se ha estimado que esta enfermedad puede ocasionar un 30% de pérdidas de pellas en el cultivo nacional (Ñacato & Valencia, 2016, p. 9).

1.10. *Bacillus*

Son bacilos aerobios y anaerobios facultativos, gram positivos, producen endosporas con morfología oval o cilíndrica que le permite resistir condiciones desfavorables en el ambiente, son móviles por la presencia de flagelos laterales, son catalasa positiva,

presentando hemólisis variable y un crecimiento activo en un rango de pH entre 5.5 - 8.5 (Layton, Maldonado, Monroy, Corrales & Sánchez, 2011, pp. 178–179).

Es una de las familias bacterianas que presenta mayor importancia, ya que tiene gran actividad bioquímica, además pueden producir enzimas hidrolíticas policelulares caracterizadas por degradar compuestos que se encuentran disponibles en el suelo como por ejemplo los polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos. Por ende, es muy utilizado por sus productos metabólicos, así como también para uso de control biológico (Layton, Maldonado, Monroy, Corrales y Sánchez, 2011; Márquez, 2007).

1.10.1. Taxonomía de *Bacillus subtilis*

Según muestra Ñacato & Valencia (2015) *Bacillus subtilis* se clasifica de la siguiente manera:

Tabla 3. Clasificación Taxonómica de *Bacillus subtilis*

Reino:	Bacteria
Filo:	Firmicutes
Clase:	Bacilli
Orden:	Bacillales
Familia:	Bacillaceae
Género:	*Bacillus*
Especie:	*Bacillus subtilis*

Tomado de Ñacato & Valencia, 2015

1.10.2. Morfología y Características

Bacillus subtilis es una bacteria "Gram positiva, mesófila, productora de esporas de pared delgada, de forma oval o cilíndrica" (Ñacato & Valencia, 2016, p. 13).

En el medio de cultivo presentan una coloración blanca o crema, con un tamaño aproximado de 2 a 4 mm de diámetro y dependiendo las cepas, tienen un aspecto liso, mucoide o rugoso con bordes ondulados o extendidos (Ñacato & Valencia, 2016). Esta bacteria tiene la particularidad de producir endosporas que son muy resistente a los efectos letales del calor, pueden llegar a soportar desde 80°C a 100°C de temperatura, sequedad, congelación, radiación y químicos tóxicos, por lo tanto, pueden sobrevivir y ser aisladas desde una gran variedad de sustratos (Márquez, 2007).

La endospora es una estructura especializada del *Bacillus subtilis* que le da la capacidad para controlar ciertas enfermedades en cultivos vegetales, ya que produce antibióticos contra los hongos como la Bacitracina-A (Cuervo, 2010).

Bacillus subtilis es conocido como *Rhizobacterium* debido a que sintetiza fitohormonas, tales como ácido indolacético, ácido abscísico, giberelinas y citoquininas, que ayudan al crecimiento de la raíz y aumenta el número de pelos radiculares (Junges, Toebe, Ricardo, Fínger & Muniz, 2013).

Junges, Toebe, Ricardo, Fínger & Muniz (2013, p. 521) mencionan que la bacteria *Bacillus subtilis* además de poseer otras características ayuda a una mejor adaptación fisiológica en los suelos, debido a que esta bacteria produce un recubrimiento en forma de una película a las semillas ayudando a la salud, la germinación y el vigor de las mismas.

1.11. Definición de Biocontrolador

Un controlador biológico según Guédez, Castillo, Cañizales & Rafael (2008) es: "la utilización de organismos vivos, o de sus productos, para evitar o reducir las pérdidas o daños causados por los organismos nocivos" (pág. 52). No sólo se trata de parasitoides, depredadores y patógenos de insectos o ácaros, sino también está implicado fitófagos, feromonas, técnicas autocidas y procesos genéticos (Guédez, Castillo, Cañizales & Rafael, 2008).

Otra definición de un biocontrolador, es el empleo de microorganismos para controlar o eliminar una población de fitopatógenos, haciendo esta menos perjudicial y por tanto menos abundante (Pérez, 2012).

Las ventajas que tiene un controlador biológico es que posee poca o nula las secuelas o efecto secundario hacia los enemigos naturales o al ser humano. Además que su costo es conveniente. Sin embargo, la desventaja es que es a largo plazo y hay poca disponibilidad para su obtención (Guédez, Castillo, Cañizales & Rafael, 2008).

1.12. Mecanismo de acción de *Bacillus subtilis* como control biológico

De las moléculas producidas por el *Bacillus subtilis*, que han demostrado tener un efecto antifúngico se pueden mencionar: la bacilisina, que es un dipéptido que inhibe el crecimiento de levadura, también la fengimicina, que es un lipopolipéptido que ha demostrado tener actividad contra los hongos filamentosos y la proteína llamada bacisubina, la cual exhibió una actividad inhibidora del crecimiento de *Magnaporthe grisease, Sclerotinia sclerotiorum, Rhizoctonia solani, Alternaria oleracea, A. brassicae y Botrytis cinérea* (Ñacato & Valencia, 2016, p. 14).

Bacillus subtilis es la principal especie que produce antibiótico llamado subtilina; un péptido que contiene lantionina y que poseen una alta actividad antimicrobiana frente a varias bacterias Gram positivas, debido a sus puentes de sulfuro: meso-lantionina y 3-metillantion (Ñacato & Valencia, 2016).

Por el efecto antifúngico que produce la bacteria, y la capacidad de producir endosporas, se lo utiliza en la industria ya que contribuye al biocontrol y para su obtención esta es aislada del medio ambiente, especialmente del suelo y tiene la gran ventaja de no ser perjudicial para la salud humana, además de ser resistentes a la desecación, por lo que puede formularse fácilmente en productos estables para venta comercial (Obiageli & Laing, 2007).

1.13. Capacidad antagónica contra *Alternaria* spp.

Bacillus subtilis tiene capacidad antagónica por competencia, es decir que compite por uno de los nutrientes esenciales como es el hierro (Fe^{3+}). *Alternaria* spp. compite con *Bacillus subtilis* por el hierro de manera ineficiente, ya que esta bacteria reconoce el hierro de una forma eficiente debido a receptores específicos de la membrana y una vez dentro de la célula, se deposita en un sitio específico por un proceso que involucra un intercambio de ligandos, mientras que en el hongo se ve afectado su sistema enzimático afectando la capacidad para sintetizar micotoxinas y así ejercer su acción patogénica (Ñacato & Valencia, 2016).

1.14. Métodos de conservación para bacterias

Un método conservación debe asegurar la perduración de al menos el 70 % de las células en un tiempo considerable, ya sea este a corto o largo plazo, en el que se mantenga las principales propiedades, y se asemeje al cultivo madre u originario. Un

método de conservación debe tener un mínimo o nulo porcentaje de contaminación, para que la pureza del cultivo se mantenga intacta y así evitar generaciones sucesivas (Hernández & Loaiza, 2014).

En los métodos conservación usualmente se utilizan un agente crioprotector en el que se guardan a bajas temperaturas, dependiendo la técnica y de esta forma se detiene el crecimiento de células (Alarcón & Irney, 2006).

El éxito de la viabilidad y estabilidad de los cultivos microbianos depende de la implementación de técnicas de conservación de las colecciones de cepas de gran importancia (Barragán & Lesmes, 2009). Para elegir un método de conservación se debe considerar ciertos parámetros según el tipo del microorganismo, como por ejemplo: la recuperación fácil en un adecuado medio de cultivo, velocidad para un crecimiento alto, la contaminación, otro parámetro a tener en cuenta es la duración del método de conservación, debido a que existen métodos que van desde los 15 días, 2 meses y hasta 20 años (Barragán & Lesmes, 2009, p. 11).

1.14.1. Glicerina o vaselina líquida

Es un alcohol triatómico, sustancia versátil que se obtiene a partir de las grasas, así también como de los petroquímicos (Posada & Cardona, 2010). El glicerol o glicerina ayuda a proteger el microorganismo para que no exista daño a las células durante la etapa de refrigeración, debido a que es “sustancia no ionizable de bajo peso molecular que evita la formación de zonas intracelulares con alta concentración de sales, por esta característica impide la deshidratación celular de los microorganismos (Hernández & Loaiza, 2014).

Además que reduce la contaminación y se lo utiliza a una concentración del 15 al 20% (Arencibia, 2008).

1.14.2. Cryobank

Esta técnica llamada también criovial, contiene perlas que han sido tratadas químicamente, éstas están en una solución especial preservante criogénica. Es un método confiable que ayuda a preservar bacterias por tiempos largos (Copan/innovation, 2015).

Este método puede almacenar aproximadamente 25 cultivos idénticos, permitiendo que un gran número de cepas sean guardadas por un largo tiempo (MAST, 2004). Para su almacenamiento debe estar a una temperatura de 80°C.

1.14.3. Agua destilada

Método alternativo de conservación que es utilizado para preservar especies como hongos mitospóricos, basidiomicetos, ascomicetos dando buenos resultados en viabilidad (Alarcón & Irney, 2006).

Es un método fiable, sencillo, económico y que asegura la supervivencia de los cultivos por duración prolongada (Hernández & Loaiza, 2014). Este método se lo realiza mediante la suspensión de conidias o esporas y se lo almacena a bajas temperaturas.

1.15. Método estadístico ABCPE

La técnica de ABCPE (Área Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad) describe el progreso de una enfermedad en un cultivo en una gráfica, indicando los intervalos de tiempo y el avance de la enfermedad presentada (Achicanoy, 2000, p. 967).

Esta técnica ayuda a discernir la magnitud de la distribución de los datos especialmente cuando existen algunas evaluaciones en el ensayo. Está diseñado para realizar comparaciones entre las evaluaciones y las correlaciones existentes, obteniéndose las diferencias significativas entre tratamientos, siendo una operación fácil donde se obtiene el promedio de las evaluaciones (Navarro, 2012).

1.16. Prueba de Post Hoc Duncan

Es conveniente aplicarla cuando los tamaños de las muestras son iguales y los tratamientos presentan una relación ordinal, es decir, pueden ordenarse de manera ascendente o descendente en una escala no numérica, a diferencia de los tratamientos que responden a variables continuas en las que procede un análisis de regresión (Wong, 2010, p. 351).

1.17 Prueba de Post Hoc Tukey

¨Esta prueba permite hacer todas las posibles comparaciones de tratamientos de dos en dos, y por eso se considera la más completa de las pruebas. Ayuda a controlar de mejor manera los dos errores¨ (Wong, 2010, p. 351).

Capítulo 2

2. Marco metodológico

El proyecto se realizó en dos fases: Fase laboratorio, en los laboratorios del área de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana (CIVABI).

Fase de campo, aplicación del Patógeno y el Antagonista en la provincia de Tungurahua, cantón Ambato, en la parroquia Izamba.

2.1. Fase de laboratorio

Las cepas de *Bacillus subtilis* (AB4 e IB6) previamente identificadas, fueron proporcionadas de la primera fase del proyecto: Aislamiento, identificación y pruebas *in vitro* de cepas autóctonas de *Bacillus subtilis* como agente de biocontrol de *Alternaria* spp. en *Brassica oleracea* var *italica* Ñacato-Valencia (2016).

2.1.1. Medios de cultivo

Los medios usados fueron AN (Agar Nutritivo), TSB (Tryptic Soy Broth) para la siembra de *Bacillus subtilis*, mientras que para *Alternaria* spp. se utilizó PDA (Potato Dextrose Agar). Su preparación se realizó mediante las especificaciones de cada medio y se dispensó en cajas Petri para su posterior uso (Ver anexo 1).

2.1.2. Resiembra de *Bacillus subtilis* cepas IB6 y AB4

Las cepas IB6 y AB4 estuvieron conservadas por dos meses en tubos de tapa rosca en medio AN con vaselina líquida. Con un asa microbiológica se tomó un volumen de la bacteria y se sembró en cajas petri con AN, mediante el método de estriado. Se incubó a 37ºC por 48h (Cuervo, 2010, p. 13).

Este método se realizó varias repeticiones con el fin de obtener cepas jóvenes y con un mayor incremento en el crecimiento (Ver anexo 7).

2.1.3. Determinación de la concentración de células bacterianas

Se utilizó 10 cajas de las cepas de *Bacillus subtilis* IB6 y AB4 respectivamente en medio Agar Nutritivo por 48 horas a 37ºC. A cada una de la cajas con las cepas se las dividió en 3 segmentos, de esta manera se sembró cada segmento en tubos Falcon con 45 mL de TSB por 24 horas a 37 ºC. Se sembró 30 tubos falcon para cada una de las cepas *Bacillus subtilis* IB6 y AB4.

Se centrifugó los tubos a 2500rpm por 15min, se retiró el medio TSB de cada tubo obteniendo un pellet bacteriano. Se adicionó 45 mL de agua destilada estéril en cada tubo para diluirlo en un vórtex por 5 minutos. Se colocó la suspensión del inóculo bacteriano en un frasco autoclavable de 500mL y se llevó al espectrofotómetro (Ver anexo 7).

2.1.3.1. Determinación de concentración de las cepas por espectrofotometría con el Estándar de McFarland

Para la medición del inóculo *Bacillus subtilis* cepas IB6 y AB4 se realizó los estándares de McFarland descritos en el manual de Herrera, Fundamentos de microbiología predictiva (Herrera Cabeza, 2013, págs. 8,9). Se tomó como referencia el estándar Nro. 4 y Nro. 10 (Ver anexo 2), se midió en el espectrofotómetro el inóculo bacteriano y los estándares a una longitud de onda de 655nm. Se obtuvo la absorbancia igual al estándar Nro. 4 y una concentración del inoculo bacteriano de $1{,}2x10^8$ para *Bacillus subtilis* cepas IB6 y AB4.

2.1.4. Preparación del controlador biológico (Antagonista)

Se realizó la siembra de las dos cepas de interés en medio AN, 10 cajas por cada cepa y se incubó a 37ºC por un periodo de 48horas, posteriormente se resembró en tubos falcon con medio líquido TSB y se incubó por 24h. Los tubos se centrifugaron a 2500rpm por 15min con la finalidad de obtener el pellet bacteriano.

Se agregó 50mL de agua destilada en cada uno de los tubos y se agito por 3 min en vortex para homogenizar el contenido, se colocó en un frasco autoclavable a y se aforó con agua destilada estéril. Determinada la concentración de $1{,}2x10^8$, las cepas fueron llevadas hasta el lugar del desarrollo de la fase de campo (Ver anexo 7).

2.1.5. Conservación para *Bacillus subtilis* cepas IB6 y AB4

Se realizó cinco técnicas de conservación para las cepas de *Bacillus subtilis* IB6 y AB4 con siete repeticiones por cada una (Ver anexo 8).

2.1.5.1. Medio Agar Nutritivo inclinado con glicerina

En cámara de flujo laminar, con un asa bacteriológica estéril se tomó una muestra de las cepas de *Bacillus Subtilis* IB6 y AB4 sembradas en medio AN a 37°C a 48h. La muestra obtenida se resembró por método estriado, en un tubo de ensayo con medio inclinado de Agar Nutritivo. Para la conservación se adicionó 5mL de glicerina el cual cubrió el medio inclinado del tubo y se almacenó a 4°C (Sánchez & Corrales, 2005).

2.1.5.2. Medio Agar Nutritivo inclinado sin glicerina

Se tomó un volumen de la muestra de las cepas *Bacillus subtilus* (IB6 y AB4) de 48h de crecimiento. La muestra obtenida se resembró por método estriado en medio inclinado de Agar Nutritivo en un tubo de ensayo de tapa rosca, se llevó a incubación a 37 ° C por 48 horas y se almacenó a 4°C.

2.1.5.3. Medio TSB con glicerina

Se sembró en medio TSB el cultivo de *Bacillus subtilus* cepas IB6 y AB4 por un periodo de 48h a 37 °C. Se colocaron en un tubo de ensayo 6mL de medio TSB con cultivo bacteriano y 4 mL de glicerina estéril. Los tubos se almacenaron a una temperatura de 4 °C (Sánchez & Corrales, 2005).

2.1.5.4. Medio TSB sin glicerina

En tubos de ensayo estériles se colocó 6mL de TSB, se procedió a sembrar el inoculo de *Bacillus subtilus* IB6 y AB4. Se incubó por un periodo de 48h a 37 °C, al final se llevó a 4°C para su almacenamiento (Sánchez & Corrales, 2005). En este procedimiento no se colocó la glicerina estéril.

2.1.5.5. Conservación en tubos de Cryobank

Con un asa micológica se tomó un volumen de muestra bacteriana *Bacillus subtilus* IB6 y AB4 contenida en una caja Petri con medio AN, se disolvió cada una en el tubo de Cryobanck agitando hasta lograr una homogenización con el medio, y así permitir que

se adhieran a las perlas. Se retiró el medio líquido de cada tubo con una micropipeta estéril y se llevó a una temperatura de -80°C (Copan/innovation, 2015).

2.1.6. Reactivación de las cepas de *Bacillus subtilus* IB6 y AB4 en conservación

Trascurrido siete meses se reactivó las dos cepas conservadas de *Bacillus subtilis* IB6 y AB4 de los cinco tratamientos, con el fin de determinar su viabilidad.

2.1.6.1. Obtención de la cepa conservada

Con un asa bacteriológica se tomó una muestra de las cepas de *Bacillus subtilus* IB6 y AB4 de cada uno de los métodos de conservación. Se sembró en un volumen de 20mL de TSB contenidos en tubos falcon y se incubó a 37°C por 48 horas. Para la reactivación de las cepas en cryobank se colocó dos perlas en 20mL de medio TSB.

2.1.6.2. Dilución de las muestras conservadas

Se preparó 30 tubos de ensayo con 9 mL de solución salina estéril, 6 por cada método de conservación. Con una micropipeta se tomó 1mL de la solución madre y se colocó en el primer tubo con solución salina estéril que corresponde a la dilución 10^{-1}, se homogenizó la mezcla. Se transfirió 1mL del tubo disuelto 10^{-1} al segundo tubo, obteniéndose la dilución 10^{-2}; el proceso se repitió hasta obtener la dilución 10^{-6}. Se siguió la metodología del Manual de Microbiología de Gamazo, López, Goñi, & Díaz (2005, pp. 43–44).

Cada una de las diluciones se sembró en cajas petri con AN y se llevó a la incubadora a 37ºC por 24h.

2.1.6.3. Método de extensión superficial para la siembra

Con una micropipeta calibrada se colocó 0,1 mL de la dilución 10^{-1} en el centro de una caja petri con medio Agar nutritivo, se extendió la gota sobre la superficie del medio con el asa de Drigalski previamente esterilizada. Se repitió el procedimiento para cada una de las diluciones de cada método de conservación, se llevó a incubación en posición invertida a 37° C por 24 horas. Se fundamentó en la práctica del Manual de Microbiología de Gamazo, Sánchez, & Camacho (2005, pp. 201-202).

2.1.6.4 Cuantificación de colonias

Se examinó las cajas para determinar las Unidades formadoras de colonias (UFC) que apareció sobre la superficie del Agar, se contó únicamente aquellas que contenían entre 30 y 300 colonias por caja. La existencia de colonias menores a 30 representa errores en el procedimiento y colonias mayores a 300 son excesivas para contarlas como se nombra en Gamazo, Sánchez, & Camacho (2013), por lo tanto no se tomaron en cuenta para el conteo.

Se utilizó la siguiente fórmula para el conteo de colonia:

Tabla 4. Fórmula para determinación de unidades formadoras de colonias por mL

$$\text{Número de UFC/mL} = \frac{\text{Número de colonias x inverso delFactor de dilución}}{\text{0,1mL sembrados en la placa}}$$

Tomado de Gamazo, Sáchez, & Camacho, 2013.

2.1.7. Resiembra y reproducción de *Alternaria* spp.

La cepa de *Alternaria* spp. se sembró en medio PDA y con la ayuda de una pipeta pasteur se obtuvo discos de PDA. Para la ubicación de los discos en el medio de cultivo, se los puso en contacto directo del hongo con el medio PDA.

Se dejó en incubación a 27ºC por 12 horas a exposición a la luz y 12 horas en la oscuridad. El proceso se realizó varias repeticiones con el fin de obtener cepas jóvenes.

2.1.7.1 Medición del halo de crecimiento

A partir del segundo día de la siembra del hongo se realizó la medición con la ayuda de un pie de rey con el cual se midió el diámetro del halo vista al reverso de la caja petri. Se efectuó las mediciones cada 24h, se registró los datos y se tabularon hasta que el hongo complete la caja petri y esté apto para la esporulación (Ver anexo 3).

Las mediciones se realizaron con el objetivo de establecer un tiempo exacto en el que crece el hongo y su tiempo de esporulación para realizar el conteo.

2.1.8. Conteo de esporas

El hongo estuvo en periodo de crecimiento de 8 días en las condiciones adecuadas, del cual se hizo un raspado total de 12 cajas petri y se colocó en un tubo falcon con 3mL de tween y 5 mL de agua, se agitó por 10min y con una micropipeta se colocó la solución en la cámara de neubauer. El conteo se realizó mediante la observación de esporas en un microscopio a 40x (Ver anexo 6).

Para Contar las conidias según las autoras Cañedo y Ames (2004) mencionan que: “generalmente se cuentan en los cuadrados de los cuatro ángulos y el centro, empezando

por el primero de la parte superior izquierda. Se cuentan en total 10 cuadrados, cinco en cada cámara cinco arriba y cinco abajo" (pp. 41-42).

Para determinar el número de esporas por mL y el número total de esporas se utilizó la siguiente fórmula que se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Fórmula para determinación de esporas

Esporas / mL = # de esporas contadas x 25,000 x factor de dilución

Tomado de Cañedo & Ames, 2004.

La concentración de esporas de *Alternaria* obtenida en laboratorio fue de $1{,}0x10^5$ para la posterior aplicación en campo.

2.1.9. Preparación del inóculo de *Alternaria* spp.

Se sembró 15 cajas petri de hongo en medio PDA, se incubó a 37° por siete días. Con un asa se realizó un raspado total de las 15 cajas, el hongo fue añadido en 1000mL de agua destilada para ser llevado hasta el campo a una concentración de $1{,}0x10^5$.

2.2. Fase de campo

El presente trabajo de campo se realizó en la parroquia Izamba, cantón Ambato, provincia de Tungurahua.

Tabla 6. Localización del ensayo

Provincia:	Tungurahua
Cantón:	Ambato
Parroquia:	Izamba/San francisco
Altitud:	2590 m.s.n.m
Coordenadas:	X77034.76815062 Y9864922.60691711
Temperatura Media:	14.6 °C
Humedad Media:	68.57%

Nota: En el lugar referenciado se realizaron la siembra de brócoli y aplicación de tratamientos; m.s.n.m =metros sobre el nivel del mar; Coordenadas obtenidas por GPS Fuente Imágenes Digital Globe, GeoEye, Google maps 2016.

Mapa de localización de siembra de brócoli y aplicación de tratamientos

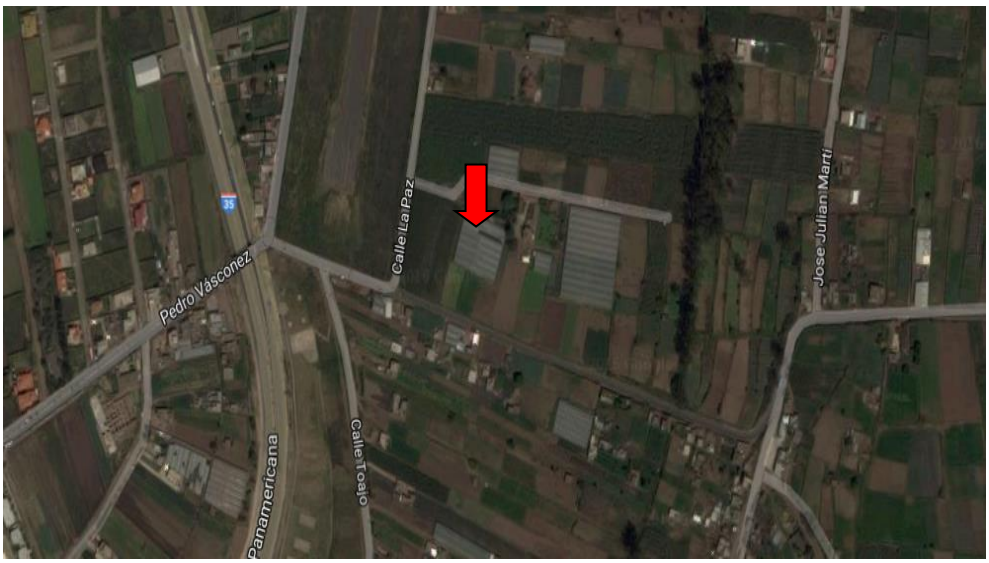


Figura 1. Ubicación Geográfica del lugar de aplicación, Izamba, Tungurahua-Ecuador.
Fuente: Imágenes Google Earth, GeoEye, Google 2016.

2.2.1. Preparación del terreno, parcelas y siembra de brócoli

El ensayo fue instalado bajo invernadero en un área aproximada de 170 m^2 donde se utilizó cuatro camas (bloques) cada una con una dimensión de 28m x 0,6m. Se sembró las plantas a una distancia de 0,4m entre plantas y 0,30m entre líneas, con dos líneas de riego al goteo por cada cama como se muestra en la tabla 7. Cada unidad experimental contó con 18 plantas de brócoli de las cuales se evaluaron 14 descartando así las plantas que estaban unidas a otros tratamientos.

Tabla 7. Área total del ensayo

Superficie del ensayo:	170 m^2
Número de tratamientos	4
Distancia entre surcos	0.30m
Distancia entre plantas	0.40m
Número de plantas en el ensayo	448
Número de planta a evaluar	384

Nota: m^2=metros cuadrados; m= metros.
Realizado por las Autoras, 2016.

Las principales actividades culturales antes y durante la siembra de brócoli, se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 8. Actividades del ensayo antes y durante la siembra de brócoli

Fecha	Actividad	Materiales
21 de Mayo de 2016	Abonado de fondo	40 Kg de pollinaza
30 de Mayo de 2016	Transplante Fumigación contra gusano cogollero (*Agrotis* spp)	Variedad Avenger y Domador Abamectina 0,6 cc/lt
13 de Julio de 2016	Rascadillo	5Kg 8-20-20 2 Kg Nitrofoska Perfect (15-5-20- 2MgO 15 Kg de Abono Orgánico FertiPlus
1 Agosto de 2016	Aporque	15 Kg 8-20-20
12 Agosto de 2016	Inicio de evaluación	
21 Septiembre de 2016	Cosecha	

Realizado por las Autoras, 2016.

2.2.2. Diseño o esquema de campo

Se sembraron dos variedades de híbridos del brócoli Avenger y Domador. (Ver figura2).

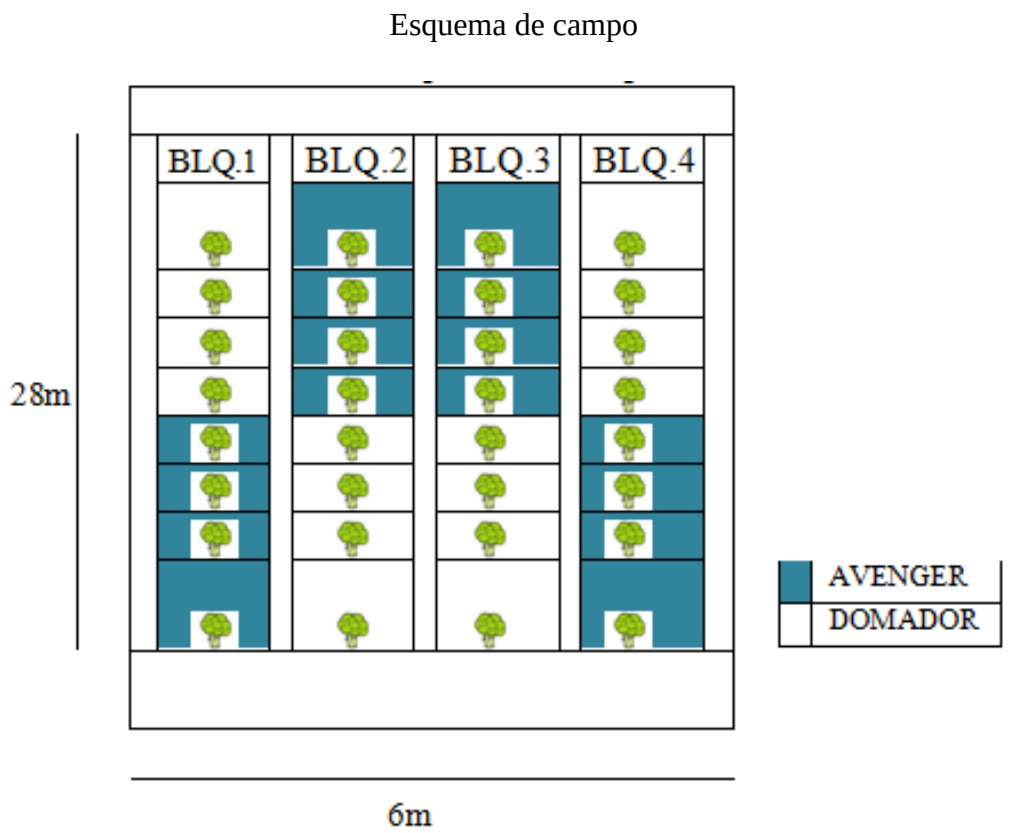


Figura 2. Esquema del invernadero en el cultivo de brócoli.
Elaborado por las Autoras, 2016
.

2.2.3. Aplicación de Tratamientos

La aplicación de los tratamientos se lo realizó después de doce horas de haber sido inoculado el patógeno, con una periodicidad de ocho días por cinco semanas. Antes de cada aplicación se controló la humedad relativa y la temperatura (Ver figura3).

Distribución de tratamientos

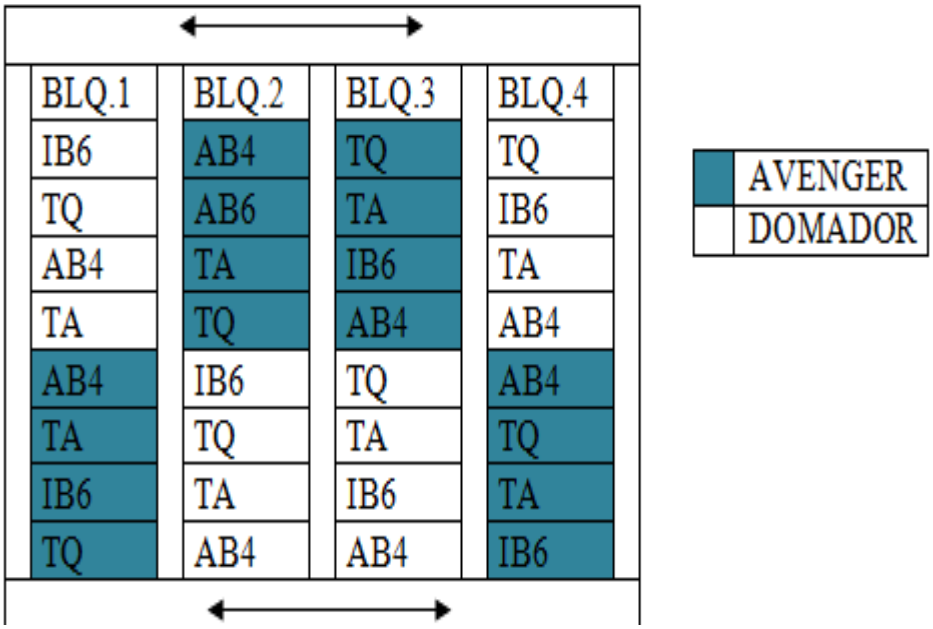


Figura 3. Distribución de tratamientos en brócoli
Nota: *Bacillus subtilis* AB4 e IB6, Tratamiento químico TQ y Tratamiento absoluto TA.
Elaborado por las Autoras, 2016.

2.2.4. Diseño experimental

Para el análisis estadístico en campo se utilizó un DBCA en parcela dividida en función del siguiente esquema de ANDEVA en la tabla 9.

Tabla 9. Esquema de ANDEVA

Fuente de variación	GL
Variedad	1
Bloque	3
Error a	3
Tratamiento	3
Variedad x Tratamiento	3
Error b	18
Total	31

Nota: GL: Grados de libertad
Realizado por las Autoras, 2016.

2.2.5. Aplicación del inóculo de *Alternaria* spp.

A partir de la quinta semana de haber trasplantado las plantas se aplicó el hongo a una concentración de $1{,}0x10^4$ en volumen de 10L, donde 9L fue de agua potable y 1L de suspensión de conidios en agua destilada. La inoculación se la hizo mediante aplicación foliar con una bomba manual inyectora, cada ocho días (Ver anexo 8) (Fraire, Nieto, Cárdenas, Gutiérrez, Bujanos, Vaquera, 2010).

Antes de cada inoculación se controló el porcentaje de humedad relativa y temperatura, en el que se obtuvo un promedio de 68,5% de humedad y 14.6 °C de temperatura.

2.2.6. Aplicación del controlador biológico

Se obtuvo previamente 500 mL por cada una de las cepas preparadas en el laboratorio a una concentración de $1{,}2x10^8$ las cuales fueron llevadas a campo. Se agregó en 4L de

agua potable la cepa IB6 y 5mL de fijador (Agrofix), este es un coadyuvante no iónico que mejora la adherencia y favorece la humectación en la planta.

El mismo procedimiento se realizó para la cepa AB4. Los tratamientos se aplicaron a una concentración de $1,2x10^7$ y se la realizó mediante la aspersión directa con una bomba manual inyectora a las hojas, tallo y pella del brócoli (Ver anexo 9).

2.2.7. Aplicación del tratamiento químico

En una bomba inyectora manual con 5L de agua, se agregó 10g de Mancozeb en gránulos dispersables en agua (GDA) al 75% (fungicida que actúa por contacto sobre las hojas, para el control preventivo hongos en los cultivos) y 5mL del fijador (Agrofix). Se realizó la aspersión foliar a las plantas de brócoli.

2.2.8. Evaluación de la enfermedad

La valoración se desarrolló una semana después de haber aplicado el hongo y los tratamientos correspondientes (Ver anexo 10).

Se basó en una escala de severidad diseñada en función de la cantidad de lesiones causadas por el hongo, para determinar el área de progreso de la enfermedad bajo la curva como se observa en la Tabla 10.

Tabla 10. Escala de severidad

Número de manchas	**Características de daños en brócoli**	**Grado de severidad**
1-3	Manchas pequeñas cafés en hojas	1
4-6	Manchas pequeñas cafés en hojas	2
7-9	Manchas pequeñas cafés en hojas	3
10-12	Manchas pequeñas cafés en hojas	4
13-15	Manchas pequeñas cafés en hojas	5
16-18	Manchas pequeñas cafés en hojas	6
19-21	Manchas pequeñas cafés en hojas	7
Más de 21 y 1-3 en tallo	Manchas en hojas maduras y tallos.	8
Más de 3 en tallo	Manchas medianas y oscuras en las hojas maduras y en tallos.	9
1-3 en pella	Anillos concéntricos en las hojas maduras, presentando coloración amarillo alrededor de la lesión y esporas. También manchas en el tallo y en la pella.	10

Realizado por las Autoras, 2016.

2.2.9. Muestreo de pellas en postcosecha

Se muestreó un florete por cada unidad experimental, el cual fue incubado a una temperatura de 24±2°C y 80% de humedad en una cámara húmeda (fundas ziploc), se etiquetó según el número de bloque, variedad y tratamiento al que pertenecía (Fraire, Nieto, Cárdenas, Gutiérrez, Bujanos, Vaquera, 2010).

Esta evaluación con el fin de identificar las unidades experimentales que desarrollaban la enfermedad después de la cosecha (Ver anexo 11).

2.2.10. Análisis estadístico

Se realizó la técnica de área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE), para procesar la información de severidad en el tiempo, con las cuales se determinó la existencia de diferencias estadísticas entre los tratamientos aplicados en el cultivo y sus variedades híbridas.

Para los análisis estadísticos de ANDEVA se aplicó un diseño experimental de parcela divida y los datos fueron procesados en el programa Infostat ¨versión 2013¨. En caso de encontrar diferencia significativa en la evaluación de severidad en la planta de brócoli, se desarrolló la prueba Post Hoc de Tukey al 5% o Duncan al 5% en función de una adecuada diferenciación de las poblaciones comparadas.

Capítulo 3

3. Resultados y discusión

Detalle de los resultados obtenidos durante la investigación en laboratorio y campo a través de las metodologías aplicadas.

3.1 Medición del halo de *Alternaria* spp.

En las primeras resiembras del hongo se observó que el crecimiento era lento o nulo y crecía a partir del tercer día, presentando una coloración amarillenta y su estructura poca esponjosa que no cubría el total de la caja petri, llegando tan solo un 30% a los ocho días, además de una contaminación pronunciada.

A partir de la cuarta resiembra se colocó tres discos de PDA con hongo por cada caja petri y a los 7 días llenó el total de la caja petri presentando características morfológicas, como es la coloración oscura u olivácea con bordes irregulares y la superficie visiblemente plana polvosa-algodonosa; esto pudo deberse a la competencia de alimento, además que fueron resiembras de cepas jóvenes. La competencia surge cuando al menos dos organismos, en este caso de la misma especie, requieren para su funcionamiento del mismo alimento (Robles, 2014) (Ver anexo 6).

3.2 Determinación de concentración en *Bacillus subtilis*

Al evaluar las suspensiones bacterianas por espectrofotometría, se evidenció que a una turbidez de 0.200 de absorbancia en una longitud de onda de 655nm, se obtuvo un inóculo de 10^8, para una aplicación en campo a una concentración de 10^7. “La turbidez mide la estimación del total de bacterias vivas y muertas” (Niño, 2009, p. 38) y a

medida que la concentración celular aumenta, el cultivo se hace más turbio y se reduce la cantidad de luz (Niño, 2009).

Las suspensiones no deben tener una absorbancia mayor a 0.3 ya que "la absorbancia será directamente proporcional a la concentración de la sustancia responsable de la adsorción", y se alteraría la ley de Beer- Bouger (Galeano, 2007, p. 31).

3.3 Evaluación en campo

3.3.1 Análisis del Área Bajo la curva del Proceso de la Enfermedad ABCPE.

En la Tabla 11 se observa el análisis para la variable severidad en el Área bajo la curva del proceso de la enfermedad. Se detectó diferencias estadísticas significativas en el valor –p menores a 0,05 entre tratamientos y variedades. Indica que existe una diferencia en al menos un tratamiento y diferencias estadísticas entre las variedades hibridas, por lo cual se acepta la hipótesis alternativa determinando que la bacteria *Bacillus subtilis*, presenta actividad biocontroladora del hongo *Alternaria* spp.

Tabla 11. Análisis de varianza para la variable severidad en el Área bajo la curva del progreso de la enfermedad ABCPE (SC tipo III).

Análisis de varianza (SC tipo III)					
F.V	**SC**	**GL**	**CM**	**F**	**P-VALOR**
Variedad	609,62	1	609,62	13,61	0,0345
Bloque	2652,95	3	884,32	9,32	0,0006
Error a	134,37	3	44,79	0,47	0,7056
Tratamiento	9928,47	3	3309,49	34,87	<0,0001
Variedad*Tratamiento	52,65	3	17,55	0,18	0,9053
Error b	1708,17	18	94,9		
Total	15086,22	31			

Nota: GL: grados de libertad; SC: suma de cuadrados; CM: Media de cuadrados; F: estadístico; P: probabilidad.
Elaborado por las Autoras, 2016.

3.3.1.1 Severidad en el Area bajo la curva del proceso de enfermedad ABCPE por tratamientos, Prueba de Tukey (5%)

Se diferenciaron tres rangos de significación (A), (B) y (C) como se observa en la Figura 4 de la prueba de Tukey por tratamientos, en el rango A se ubica el testigo absoluto, el cual mostró un ABCPE promedio de 105.37 de la enfermedad. En el rango B se ubica la cepa AB4 con un ABCPE promedio de 90.41. El tratamiento IB6 se encuentra en el rango C con un ABCPE promedio de 70.92 y el tratamiento químico con un ABCPE promedio de 59.59 presentan una mínima diferencia significativa entre sí, mostrando así que la cepa IB6 tiene una actividad biocontroladora sobre *Alternaria* spp. en brócoli y una relación con el tratamiento químico. Todos los tratamientos fueron previamente contaminados con la enfermedad.

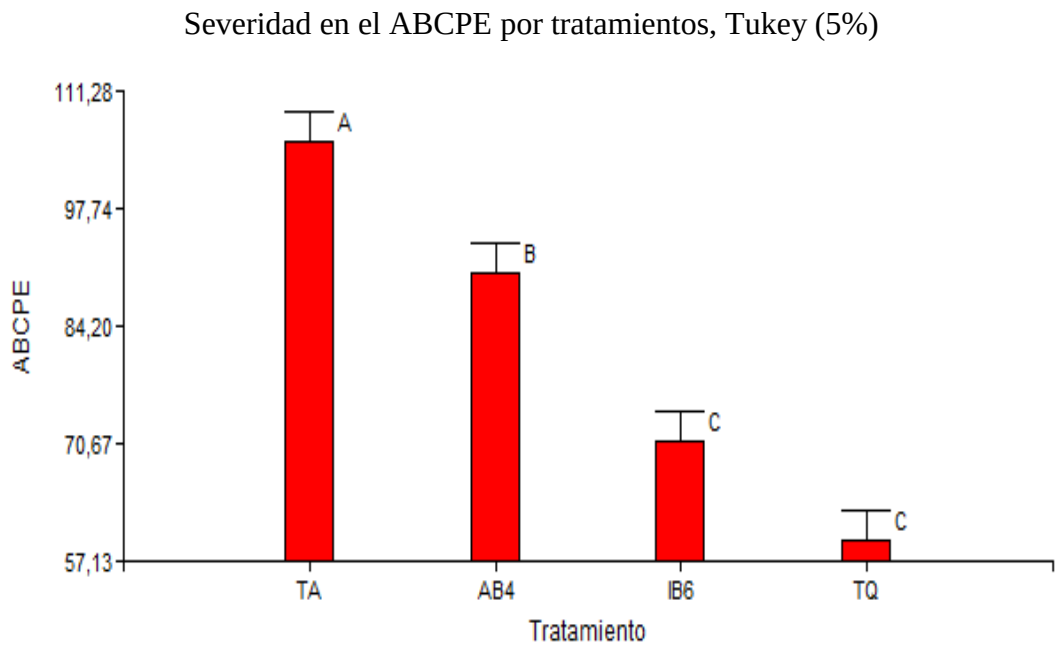


Figura 4. Representación de Severidad en el ABCPE por tratamientos, mediante prueba de Tukey (5%)
Elaborado por las Autoras, 2016.

De los valores analizados del ensayo, el tratamiento Absoluto o testigo seguido de la cepa *Bacillus subtilis* AB4 presentan mayor severidad, es decir son más susceptibles a la enfermedad. El tratamiento con la cepa *Bacillus subtilis*, IB6 presentó un potencial biocontrolador de *Alternaria* spp. en brócoli ya que se relaciona con el tratamiento químico y es menos susceptible a la enfermedad.

Según los resultados expresados, puede deberse a que la bacteria con el código IB6 aislada de la provincia de Imbabura presentó una mayor concentración de metabolitos antifúngicos que contribuyeron a la inhibición del crecimiento de patógenos (Tenorio, Portugal, Violante, 2012). Metabolitos como las surfactinas, iturinas y fengicinas que presentan actividad fungitóxica fuerte, especialmente contra hongos filamentosos, "además de una gran variedad de enzimas líticas entre las cuales se destacan lipasas, proteasas y β glucanasas" (Ñacato & Valencia, 2016, p. 40).

Según Hoyos (2011) *Bacillus subtilis* posee un mecanismo de *Quorum sensing* que consiste en la percepción de la densidad celular, es decir que permite a las bacterias actuar de manera coordinada, dando la característica de supervivencia ayudándolas a mantenerse en la naturaleza, ya que responde a las condiciones ambientales debido a la disponibilidad de nutrientes, este mecanismo se debe gracias a los "péptidos señal que son los que controlan la expresión de genes involucrados en la esporulación y desarrollo de competencia" (p. 77).

Ñacato & Valencia (2016) mencionan que *Bacillus subtilis* compite por nutrientes esenciales como el hierro (Fe3+), por ende, el hongo *Alternaria* spp. al competir con *Bacillus subtilis* por el hierro, "su sistema enzimático se ve afectado impidiéndole

sintetizar micotoxinas necesaria para ejercer su acción patogénica" (Ñacato & Valencia, 2016, p. 39).

3.3.1.2 Severidad en el Area bajo la curva del proceso de enfermedad ABCPE para las Variedades híbridas , Prueba de Tukey (5%)

Se diferencian dos rangos de significación (A) y (B) como se observa en la figura 5, en el rango A se ubica la variedad Domador mostrando un ABCPE de 85,94 y en el rango B se encuentra la variedad Avenger con un ABCPE de 77,2. Se demuestra que la variedad híbrida Domador es más susceptible a la enfermedad comparada en relación a la variedad Avenger.

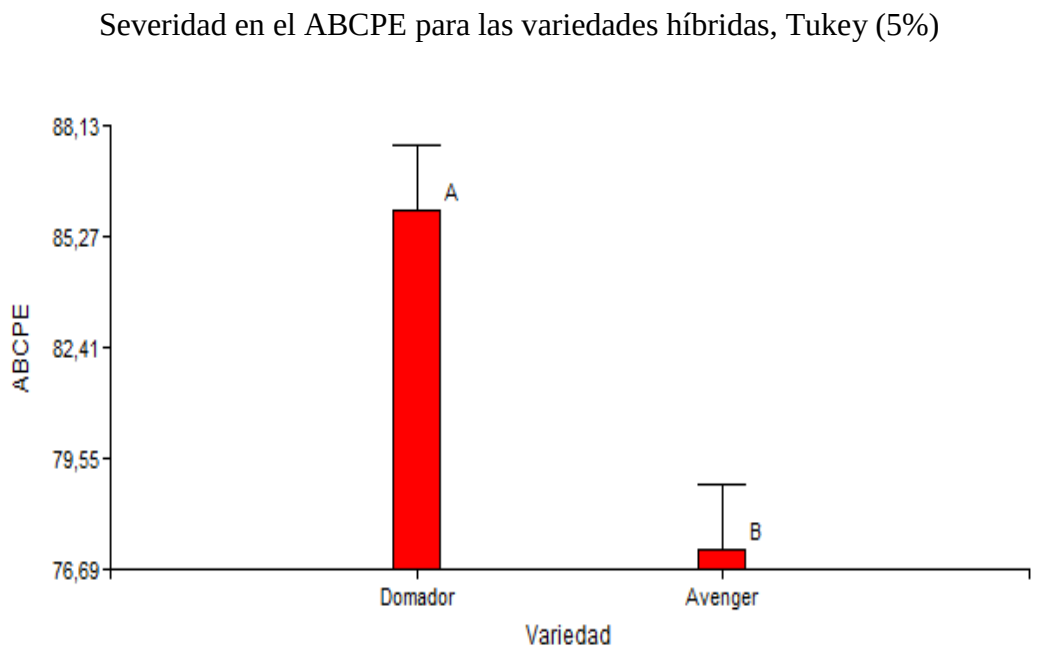


Figura 5. Representación de Severidad en el ABCPE para las variedades híbridas, mediante prueba de Tukey (5%)
Elaborado por las Autoras, 2016.

La variedad Avenger presentó menor severidad de la enfermedad en hojas, tallos y pellas y según la investigación de Arteaga (2011), Avenger se obtiene en menos días la cosecha de la pella. La cosecha se encuentra en un rango de 70 a 80 días después del trasplante, su floración se da antes que las demás variedades y esta característica es importante ya que su duración en el campo depende para que la planta sea susceptible a enfermedades.

Este híbrido "posee un amplio rango de adaptación para su producción incluyendo condiciones de calor" (Llerena, 2013, p. 13). Además que es considerado líder en el mercado debido a sus características de fácil adaptación y excelentes rendimientos siendo utilizado ampliamente en la industria de los congelados ya que sus pellas son bien formadas y tiene buena consistencia (Montalvo, 2014).

3.3.2 Análisis de las muestras postcosecha

En la tabla 12 se observa el ANDEVA para la variable severidad en postcosecha, se detectó diferencias estadísticas significativas entre tratamientos, con un valor de p=0.002, lo que nos indica que existe una diferencia en al menos un tratamiento, por lo cual se acepta la hipótesis alternativa determinando que la bacteria *Bacillus subtilis*, presenta actividad biocontroladora del hongo *Alternaria* spp.

Tabla 12. ANDEVA para variable severidad en postcosecha

Análisis de varianza (SC tipo III)					
F.V.	**GL**	**SC**	**CM**	**F**	**P-VALOR**
Variedad	1	1.2E-03	1.2E-03	0.04	0.8482
Bloque	3	0.06	0.02	0.35	0.7885
Error a	3	0.09	0.03	0.53	0.6691
Tratamiento	3	0.20	0.40	7.35	0.0020
Variedad*Tratamiento	3	0.11	0.04	0.65	0.5933
Error b	18	0.98	0.05		
Total	31	2.44			

Nota: GL: grados de libertad; SC: suma de cuadrados; CM: Media de cuadrados; F: estadístico; P: probabilidad.
Elaborado por las Autoras, 2016

3.3.2.1 Severidad en la postcosecha para tratamientos, Prueba de Duncan al 5%.

Se diferenciaron tres rangos de significación (A), (B) y (C) en la prueba Post Hoc de Duncan al 5% para tratamientos, como se observa en la Figura 6, en el rango A se ubica el testigo absoluto, el cual mostró la mayor severidad (77%) de la enfermedad. El rango B comparte diferencia estadística, con la cepa AB4 con un (64%) de severidad y que se encuentra en el rango B, mientras que en el tratamiento IB6 se encuentra en un rango BC con un (42%) y el tratamiento químico en un rango C con una severidad del (30%), lo que indica que no tienen diferencia significativa entre sí al compartir con el rango C, mostrando que la cepa IB6 tiene un actividad biocontroladora sobre *Alternaria* spp. en pellas cosechadas, que fueron previamente contaminadas con la enfermedad.

Severidad en la postcosecha para tratamientos, Prueba de Duncan al 5%.

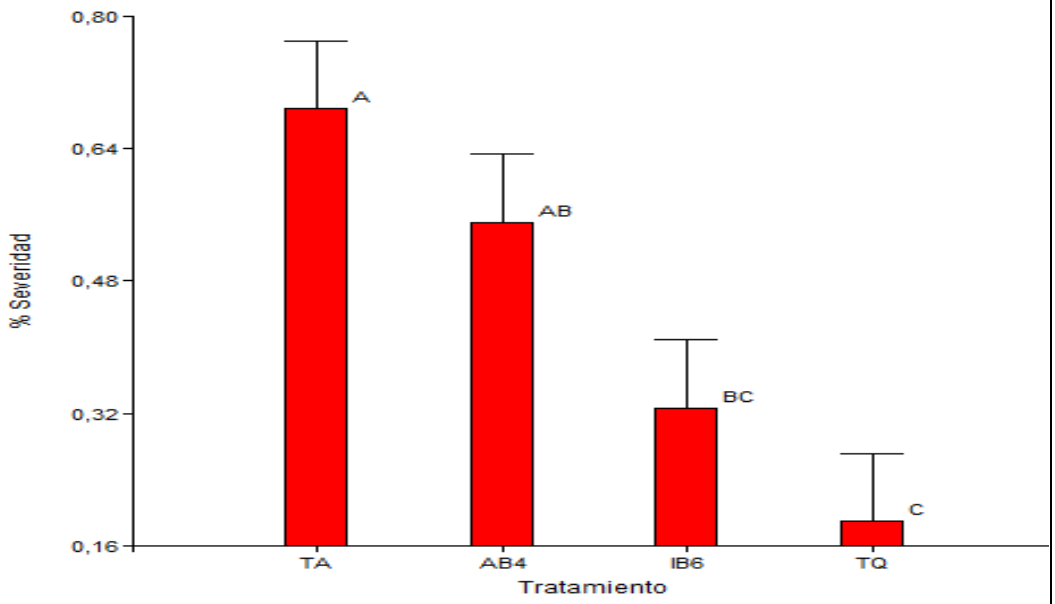


Figura 6. Severidad en la postcosecha para tratamientos, Prueba de Duncan al 5%.
Elaborado por las Autoras, 2016

De los valores analizados del ensayo, se obtuvo que el tratamiento con la cepa *Bacillus subtilis*, IB6 presentó una relación con el tratamiento químico y es menos susceptible a la enfermedad. El tratamiento Absoluto o testigo y la cepa *Bacillus subtilis* AB4 presentan mayor severidad revelando que son más susceptibles a la enfermedad.

Se observó que las pellas que fueron aplicadas con el tratamiento IB6 presentaron menor susceptibilidad a la enfermedad, esto puede deberse a que *Bacillus subtilis* es una bacteria rizosférica que promueve el crecimiento vegetal que sintetiza fitohormonas como son; el ácido indolacético, ácido abscísico, giberelinas y citoquininas, que beneficia al crecimiento de la raíz y aumenta el número de pelos radiculares, además

que ayuda a una buena motilidad que le facilita la colonización de la planta permite un desarrollado crecimiento en pellas (Tejera, Heydrich & Rojas, 2011).

Esta bacteria ayuda a fijar nitrógeno biológicamente gracias a producción de la enzima nitrogenasa y las fitasas solubilizan minerales como el fósforo ya que excretan ácidos orgánicos al medio (Tejera, Heydrich & Rojas, 2011).

Se ha desarrollado productos biológicos a base de *Bacillus subtilis* que son ampliamente comercializados para controlar enfermedades por hongos como oídios, moho gris, hongos de pudrición ácida (Blanco, 2012, p. 16).

3.3.3 Reactivación de *Bacillus subtilis* cepas IB6 y AB4

En la Tabla 13 se muestra el análisis de varianza para la viabilidad de cepas (UFC/mL) en conservación. Se muestra diferencias estadísticas significativas menores al valor-p (0,05) entre tratamientos y medios de conservación. Por lo cual se acepta la hipótesis alternativa ya que existe diferencia en al menos un tratamiento de la conservación, al igual que los medios utilizados. No hay diferencia estadística entre cepas y su interacción.

Tabla 13. Análisis de varianza ANOVA para la viabilidad de cepas (UFC/mL) en conservación.

Análisis de varianza DCA					
F V	**S.C**	**GL**	**CM**	**F**	**P-VALOR**
Tratamientos	5159.3	9	573.26	3.14	0.0157
Cepas	670.52	1	670.52	3.68	0.0695
Medios	3376.79	4	844.2	4.63	0.0083
Cepas x Medio	1111.99	4	278	1.52	0.233
Error	3646.45	20	182.32		
Total	8805.74	29			

Nota: GL: grados de libertad; SC: suma de cuadrados; CM: Media de cuadrados; F: estadístico; P: probabilidad.
Elaborado por las Autoras, 2016.

3.3.3.1 Viabilidad de cepas (UFC/mL) conservadas entre tratamientos, prueba Tukey al 5%

La prueba Post Hoc Tukey al 5% para tratamientos en la conservación, se diferencian dos rangos A y B como se observa en la Figura 7. En el rango A se ubica el tratamiento 6 que representa el método de Cryobank de la cepa *Bacillus subtilis* IB6, presentando una mejor conservación y recuperación de la cepa. En el rango B del tratamiento 3 en medio TSB con Glicerina la cepa de *Bacillus subtilis* AB4 y el tratamiento 2 en medio TSB de la cepa de *Bacillus subtilis AB4, s*e muestra diferencia estadística entre los tratamientos. El mejor tratamiento para recuperación de cepas en conservación es el Cryobank y el tratamiento con menor recuperación de cepas en conservación son los tratamientos en medios líquidos TSB con y sin glicerina.

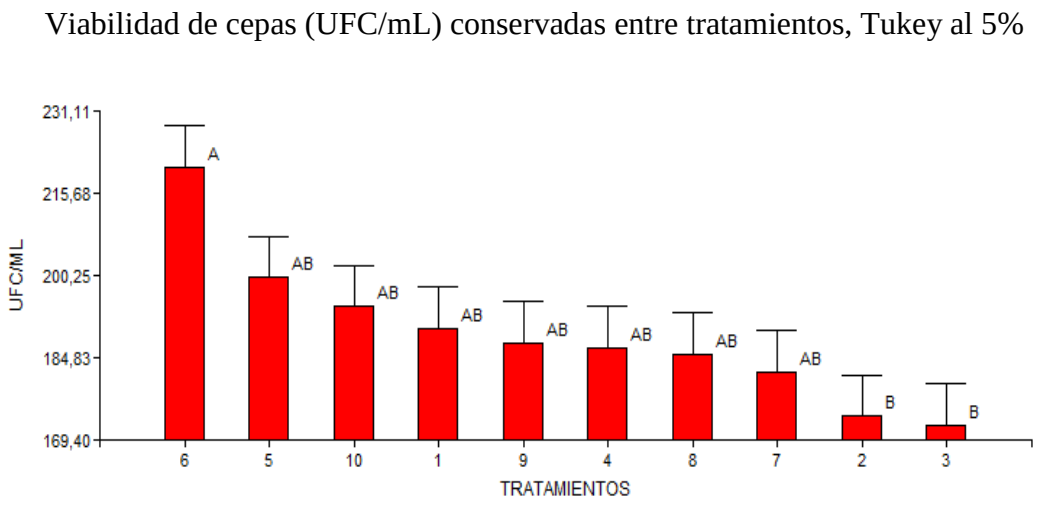


Figura 7. Viabilidad de cepas (UFC/mL) conservadas entre tratamientos, prueba Tukey al 5%
Elaborado por las Autoras, 2016

3.3.3.2 Viabilidad de cepas (UFC/mL) conservadas en medios, prueba Tukey al 5%

En la prueba Post hoc de Tukey al 5% para medios, se diferencian cada uno de los medios utilizados en la conservación con dos rangos de significación (A) y (B) como se observa en la figura 8. En el rango A se ubica el medio de conservación de cepas *Bacillus subtilis* IB6 y AB4 en Criobank, el cual mostro una mejor conservación y recuperación de la cepa en relación al rango B del medio líquido TSB con y sin glicerina para las cepas *Bacillus subtilis* IB6 y AB4. Se demuestra que el medio con mayores unidades formadoras de colonias por mL (UFC/mL) y mejor recuperación de cepas en conservación es el Criobank. El medio con menor unidades formadoras de colonias por mL (UFC/mL) y menor recuperación de cepas en conservación son los tratamientos en medio líquido TSB con y sin glicerina.

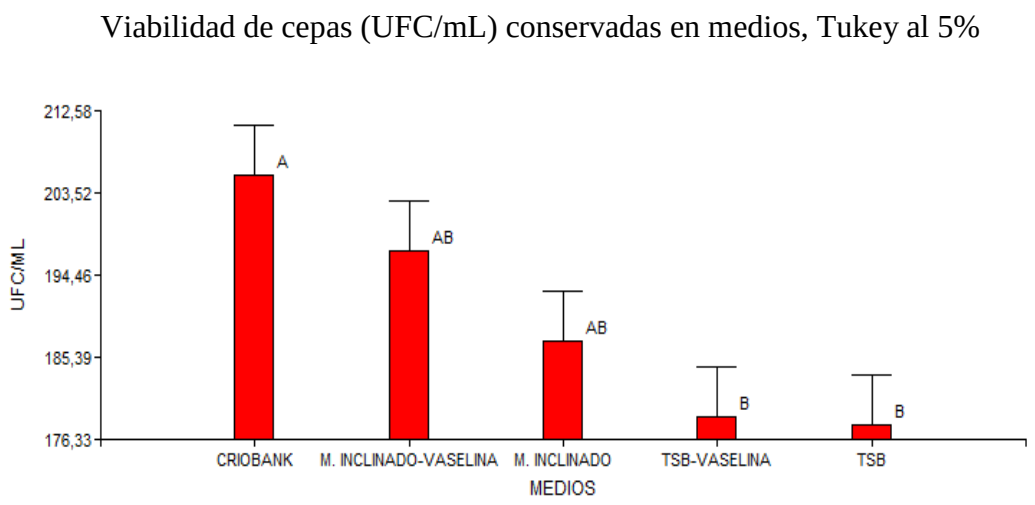


Figura 8. Prueba de Tukey al (5%) tratamientos utilizados en la conservación
Elaborado por las Autoras, 2016

En ningún método de conservación se observó contaminación y se mantuvo la viabilidad por un periodo de siete meses. No pudo evidenciar de igual forma que no hubo diferencias estadísticas entre las dos cepas IB6 y AB4. .

El método de conservación Cryobank, es un sistema que contiene una solución hipertónica para preservar hasta 25 cultivos a largo plazo. Además de contener tubos esterilizables, altamente resistentes a congelación y con un cierre hermético, permite llevar un proceso de muy baja contaminación, fácil ejecución, poco laborioso, rápido, tubos y sobre todo mantiene las características genéticas de las cepas conservadas (Arencibia, Rosario & Gámez, 2016).

La temperatura es un factor que ayuda al mantenimiento de la conservación, ya que los microorganismos se mantienen mejor a -70°C y -80°C, mientras que las otras técnicas de conservación se almacenaron a una temperatura de 4°C. Sin embargo, hay que controlar la velocidad de disminución de la temperatura, porque si es muy pausada, el

líquido que se encuentra contenido en la célula forma cristales y rompen la membrana celular (Hernández, 2003). Además el estado de congelación ayuda a la reducción de su ritmo metabólico, favoreciendo a la estabilidad genética (Arencibia, Rosario & Gámez, 2016).

Otra característica que presenta el cryobank, es la homogeneidad que puede proporcionar a un cultivo puro y un alto porcentaje de recuperación (Parra, Pérez, Bernal, Suárez & Montoya, 2006).

Las cepas conservadas en glicerina también dieron buenos resultados aunque en menor proporción, y esto puede deberse a que la temperatura de almacenamiento fue de 4°C, sin embargo, las bacterias pueden vivir por años o por periodo largos de tiempo que a temperatura ambiente de 37 °C (Díaz, 1995).

La glicerina contiene propiedades específicas debido a que es una buena sustancia lioprotectora, es decir que ayuda a mantener la estabilidad y viabilidad protegiendo a la célula tanto internamente como externa porque se difunde a través de la membrana (Belmonte, Nogueras, Contigiani, Gandini & Sutich, 2008) y se la utiliza a una concentración del 15 al 20% (Arencibia, Rosario & Gámez, 2016).

Los autores Burguet & otros (2012), Arencibia, Rosario & Gámez utilizaron glicerina para la conservación de *Bacillus subtilis* obteniendo buenos resultados, corroborando con la presente investigación.

Conclusiones

- Se determinó que el tratamiento IB6 aislado de la provincia de Imbabura es la mejor cepa con capacidad antagónica en brócoli bajo condiciones controladas debido a que presentó menor severidad a *Alternaria* spp. en cultivo y en postcosecha.
- La variedad Avenger presentó menor severidad de la enfermedad frente a la variedad Domador debido a una característica mayor resistencia varietal para *Alternaria* spp.
- El método de conservación que permitió obtener una buena reactivación de cepas bacterianas fue el Cryobank, al obtener un nulo porcentaje de contaminación y buena viabilidad de las cepas.

Recomendaciones

- Debido a resultados expresados del *Bacillus subtilis* como controlador biológico en pruebas bajo invernadero en condiciones controladas (temperatura y humedad), se recomienda realizar ensayos en campo abierto debido a sus variantes en las condiciones ambientales.
- Se recomienda seguir con los trabajos experimentales utilizando mayor concentración de *Bacillus* o también con la combinación con hongos endófitos para intensificar la eficacia antagónica en brócoli o en otro tipo de cultivos.
- Realizar productos comerciales a base de *Bacillus subtilis* como controladores biológicos de *Alternaria* en cultivo de brócoli, siendo éste un complemento al control químico.
- Se recomienda conservar bacterias mediante el método de Cryobank debido a que presenta una adecuada viabilidad en la activación de cepas.

BIBLIOGRAFÍA

Achicanoy, H. (2000). Descripción cuantitativa de las epidemias de las plantas. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, *53*(1), 941–968.

Alarcón, D.; Irney, Á. (2006). *Evaluación de técnicas de conservación para hongos filamentosos y levaduriformes en el cepario de la Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá*. *FACULTAD DE CIENCIAS*. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.

Alvarado, A.; Huiracocha, M. (2014). *Impacto en los costos de exportación de brócoli por la renuncia de Ecuador a la ley de promoción comercial andina y erradicación de drogas (atpdea) con los Estados Unidos de América*. Universidad de Cuenca.

Alves, P.; Pérez, E.; Oribe, B. (2014). *Guía para la identificación de patógenos de poscosecha en frutos de arándanos* (Instituto). Uruguay: Boletín de Divulgación, 107.

Arencibia, D.; Gámez, R.; Rosario, L. (2016). Métodos generales de conservación de microorganismos. *Vaccine Researc*, (October).

Arteaga, M. (2011). *Aclimatación de 12 Híbridos de Brócoli (Brassica oleracea L.* var *italica) en el cantón Riobamba, provincia de Chimborazo*. *Escuela Superior Politécnica de Chimborazo*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Barragán, D.; Lesmes, A. (2009). *Comparación de dos métodos de conservación, liofilización y microsecado sobre tres especies bacterianas: elección del mejor método.* Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.

Belmonte, A.; Nogueras, M.; Contigiani, M.; Gandini, V.; Sutich, E. (2008). Estudio de

métodos por congelación para la conservación y mantenimiento de cepas de Gardnerella vaginalis . *Revista Bioquimica Y Patologia Clinica Vol*. Recuperado de http://www.redalyc.org/pdf/651/65112134003.pdf

Blanco, D. (2012). Evaluación de bacilos aerobios formadores de endosporas (bafes) para el control biológico de Rhizoctonia solani Kuhn en el cultivo de papa criolla (solanum tuberosum Grupo Phureja), 89. Recuperado de http://www.bdigital.unal.edu.co/10703/

Bustos, J. (2016). *Manejo del Patosistema Streptomytces scabies Thaxter en Rabanito Raphanus sativus L. con Bacillus subtillis Conh Bajo Condiciones de Invernadero*. Universidad Autónoma Agraria Antonio Navarro, México.

Cadena, D. (2011). *Efecto de tres dosis en tres épocas de aplicación de pyraclostrobin (COMET®) en el control de la mancha foliar (Alternaria brassicae Berk) y validación del efecto agcelence en el rendimiento de un híbrido de brocoli (Brassica oleracea* var *italica)*. Universidad Técnica de Cotopaxi. Recuperado de http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/775/1/T-UTC-0598.pdf

Camacho, F.; Tello, J. (2012). *Organismos para el control de patógenos en los cultivos protegidos Prácticas culturales para una agricultura sostenible* (Fundación).

Cañedo, V.; Ames, T. (2004). *Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos*. *CIP, Centro Internacional de la Papa* (Centro Int). Lima-Perú: CIP, Centro Internacional de la Papa. Recuperado de https://doi.org/cip@cgiar.org, www.cipotato.org

Coello, G. (2005). Evaluacion de 4 productos organicos en el combate de plagas y enfermedades para la produccion de brocolí.

Copan/innovation. (2015). CRYOBANK™ Bacterial Cultures Freezing Systems. Recuperado de http://www.copanusa.com/products/lab-supplies/cryobank/

Cuervo, J. (2010). *Aislamiento y Caracterizacion de Bacillus spp como fijadores biologicos de nitrogeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales.* Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.

Díaz, M. (1995). *Manual de procedimientos banco de cepas y genes*. Santafé de Bogotá.

Fraire, M.; Nieto, D.; Cárdenas, E.; Gutiérrez, G.; Bujanos, R.; Vaquera, H. (2010). Hongos Causantes de la Pudrición del Florete de Brócoli Fungi Causes of the Rotting of the Floret of Broccoli. *Revista Mexicana de Fitopatología A.C.*, *28*(1), 25–33.

Fraire, M. (2007). *Calidad postcosecha del brócoli e histopatología de la respuesta varietal al mildiu hyaloperonospora parasitica*. *Control*. Colegio de Postgraduados.

Galeano, N. (2007). *Validación de la retención microbiana en los filtros de acetato y nitrato de celulosa empleados de la técnica de filtración por menbrana para la prueba de esterilidad*. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.

Gamazo, C.; Lopez, I.; Díaz, R. (2005). *Manual práctico de microbiología*. Barcelona: MASSON S.A.

Gamazo, C.; Sánchez, S.; Camacho, A. I. (2013). *Microbiología basada en experimentación*. (Elsevier, Ed.). Barcelona.

Guédez, C.; Castillo, C.; Cañizales, L.; Rafael, O. (2008). Control biológico: una herramienta para el desarrollo sutentable y sostenible. *Saber-ULA*, 52,54.

Guerino, J.; Dominguez, R. (2006). InfoBibos. Recuperado de http://www.infobibos.com/Artigos/2006_3/Alternariose/Index.htm

Hernández, D.; Loaiza, A. (2014). Selección De Un Método Para La Conservación Y Preservación De Actinomicetos Aislados Del Suelo Del Jardín Botánico De La Universidad Tecnológica De Pereira. *Universidad Tecnológica De Pereira*, (1), 1–5. Recuperado de https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2

Hernández, A. (2003). *Microbiología industrial*. Universidad Estatal a Distancia.

Hoyos, L. (2011). *Enfermedades de planta: control biológico*. Universidad Nacional de Colombia.

Jiménez, R. (2016). *Determinación de los requerimientos hídricos del cultivo de brócoli (Brassica oleracea. L.* var avenger*) bajo condiciones edafoclimáticas del cantón Riobamba provincia de Chimborazo*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Junges, E.; Toebe, M.; Ricardo, F.; Fínger, G.; Muniz, M. (2013). Efeito do condicionamento fisiológico e da peliculização associados à *Bacillus subtilis* em sementes de milho. *Revista Ciência Agronômica*, 520–526.

Layton, C.; Maldonado, E.; Monroy, L.; Corrales, L.; Sánchez, L. (2011). *Bacillus* spp.; perspectiva de su efecto biocontroladormediante antibiosis en cultivos afectadospor fitopatógenos. *NOVA - Publicación Científica En Ciencias Biomédicas*, *9*(16). Recuperado de http://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/nova/article/view/501

Llerena, L. (2013). *Evaluación de Fotosint, Bioplus y Biorregin en mezcla con Cistefol en diferentes dosis y épocas de aplicación para el Control de la Fisiopatia (Ojo de Gato) en el cultivo de Brócoli (Brassica oleracea l.* var *italica) en Macají, cantón Riobamba, provincia*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Márquez, F. (2007). Aislamiento Y Taxonomía De Bacterias Del Género Bacillus Recolectadas En Suelos De Un Bosque De Pinus Radiata Y Una Pradera Permanente En Distintas Épocas De Muestreo. *Licenciatura*, 66. Recuperado de http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2007/fcm357a/sources/fcm357a.pdf

MAST. (2004). Mastgroup. Retrieved October 4, 2016. Recuperado de http://www.mastgrp.com/IFUS/IFU132_SPA.pdf

MCPEC. (2011). Agendas para la transformación productiva territorial: provincia de Tungurahua. Tungurahua: Ministerio de coordinación de la producción, empleo y competitividad.

Montalvo, F. (2014). *Evaluación de cuatro distanciamientos de siembra en el desarrollo y producción de dos variedades del brócoli (Brassica oleracea l.) En el cantón Ibarra provincia de Imbabura*. Universidad Técnica de Babahoyo.

Niño, L. (2009). Implementación de diferentes técnicas analíticas para la determinación de biomasa bacteriana de cepas pseudomonas putida biodegradadoras de fenol. *Revista ION*, *23*(1), 65.

Ñacato, C.; Valencia, M. (2016). *Aislamiento, identificación y pruebas in vitro de cepas autóctonas de Bacillus subtilis como agente de biocontrol de Alternaria* spp. *en*

Brassica oleracea var *italica*. Universidad Politécnica Salesiana, Ecuador. Recuperado de http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/12144

Obiageli, E.; Laing, M. (2007). Rhizotron studies on Zea mays L. to evaluate biocontrol activity of *Bacillus subtilis*. *Orld J Microbiol Biotechnol*, 269–274.

Orellana, H.; Solórzano, H.; Boniolla, A.; Salazar, G; Falconí, C.; Velasteguí, R. (2008). *Manejo orgánico ecológico del cultivo de brócoli*. *Vademécum Agrícola* (QuickMed A).

Parra, S.; Pérez, M.; Bernal, M.; Suárez, Z.; Montoya, D. (2006). Implementación y evaluación de dos métodos de conservación y generación de la base de datos del banco de cepas y genes del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN). *Nova - Publicación Científica*, *4*(5), 39–49.

Parra, M. (2014). *Interacciones entre "Pythium ultimum" y bacterias de la rizosfera en la patogénesis de la podredumbre del tallo del brócoli.* Universidad Politécnica de Cartagena.

Pavón, M. (2013). *Detección de Alternaria spp mediante técnicas genéticas como índice de calidad de materias primas y marcador de bioseguridad en productos hortofrutícolas frescos y procesados.* Universidad Complutense de Madrid.

Pérez, N. (2012). *Manejo Ecológico de Plagas*. (A. García Marrero, Ed.) (CEDAR). San José de las Lajas: MINREX.

Posada, J.; Cardona, C. (2010). Análisis de la refinación de glicerina obtenida como coproducto en la producción de biodiesel. *Ingenieria Y Universidad*, *14*(1), 9–28.

https://doi.org/0123-2126

Ramírez, J.; Arias, T.; Jerez, A. (2008). *Elaboración de un atlas para la descripción macroscópica y microscópica de hongos fitopatógenos de interés en especies de flores de corte cultivadas en la sabana de Bogotá*. Pontificia universidad Javeriana. Recuperado de http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis223.pdf

Robles, A. (2014). Uso de microorganismos antagonistas y sustancias naturales como un aalternativa ecológica en el control de enfermedades en cultivos. *Centro de Biotecnologia*, 34–43.

Rojas, A. (2012). Evaluación de producto DPX-QGU42 en el control de tizón temprano (Alternaria solani) en el cultivo de papa (Solanum tuberosum). Recuperado de http://dspace.utalca.cl/handle/1950/9211

Salazar, J. C. (2013). *Diferentes dosis de bioregulador orgánico en la germinación y producción de plantas de brocoli (Brassica oleraceae L.) en el cantón Salcedo*. Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Recuperado de http://repositorio.uteq.edu.ec/handle/43000/543

Sánchez, D.; Bautista, S.; Castillo, P. (2007). Efecto del quitosano en el desarrollo y morfología de Alternaria alternata (Fr .) Keissl . *Anales de Biología*, *29*, 23–32.

Sánchez, L.; Corrales, L. (2005). Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas. *Nova - Publicación Científica*, *3*(4). Recuperado de http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA_12/ARTORIG2_4.pdf

Sánchez, B. (2013a). *Respuesta del brócoli (Brassica oleracea* var *italica) híbrido*

fantástico a la fertilización con cinco fuentes de azufre aplicadas a dos dosis. Mulaló, Cotopaxi. Universidad Central del Ecuador. Recuperado de http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/2042

SENPLADES. (2013). *Objetivos nacionales para el Buen Vivir*. (SENPLADES, Ed.). Quito: Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo. Recuperado de www.buenvivir.gob.ec/versiones-plan-nacional%0A

Serrato, L.; French, R. (2011). Mancha foliar del Repollo por Alternaria. *AgriLIFE*. Recuperado de http://amarillo.tamu.edu/files/2010/11/Alternaria-en-RepolloRF.pdf

SIPSA. (2014). *Principales enfermedades causadas por hongos en hortalizas , durante la temporada de lluvia*. Quito.

Subsecretaria de Fomentos a los Agronegocios. (2011). Monografia de cultivos. *Sagarpa*, *1*, 1–11.

Tejera, B.; Heydrich, M.; Rojas, M. (2011). Potencialidades del género Bacillus en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC Ciencias Biologicas*, *42*(3), 131–138.

Telenchana, N. (2015). *Aplicación de productos sello verde en el manejo de la hernia de las crucíferas (Plasmodiophora brassicae) en el cultivo de brócoli (Brassica olerácea* var avenger*), en las condiciones agroecológicas de Izamba*. Universidad Técnica de Ambato.

Tenorio, R.; Portugal, V.; Violante, H. (2012). Antagonismo in vitro de aislados bacterianos de fresa comercial y silvestre vs. Botrytis cinerea y Rhizopus stolonifer.

Revista de Sociedad, Cultura Y Desarrollo Sustentable.

Vallejo, Z. (2013). *Evaluación de siete variedades de brócoli (Brassica oleracea* var *italica) en dos localidades de Pichincha.* Universidad Central del Ecuador.

Vélez, D. (2015). *Estudio de factibilidad para la producción y comercialización de brócoli (Brassica oleracea* var *italica) híbrido Avenger para mercado de exportación en Cunchibamba, provincia de Tungurahua. Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015*. Universidad San Francisco de Quito. https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004

Wong. (2010). ¿Después De Un Análisis De Variancia…Qué? Ejemplos En Ciencia De Alimentos 1. *Agronomía Mesoamericana*, *21*(1), 1–8.

Anexos

Anexo 1. Preparación de medios y soluciones

- Medio PDA (Potato Dextrose Agar)

Se suspendió 39 g del medio en un litro de agua destilada. En una plancha térmica se calentó y por 2 minutos se dejó hervir con agitación constante. Se esterilizó en autoclave a 121ºC y 15 psi durante 15 minutos. Se dejó enfriar hasta una temperatura de 45-50ºC. Se colocó aproximadamente 25 mL de medio en las cajas petri. Medio TSB (Tryptic Soy Broth)

Se suspendió 40 g del medio en un litro de agua destilada. En una plancha térmica se calentó y por 2 minutos se dejó hervir con agitación constante. Se esterilizó en autoclave a 121ºC y 15 psi durante 15 minutos. Se dejó enfriar hasta una temperatura de 45-50ºC. Se colocó aproximadamente 45 mL de medio en tubos falcon.

- AN (Agar Nutritivo)

Se suspendió 31 g del medio en un litro de agua destilada. En una plancha térmica se calentó y por 2 minutos se dejó hervir con agitación constante. Se esterilizó en autoclave a 121ºC y 15 psi durante 15 minutos. Se dejó enfriar hasta una temperatura de 45-50ºC. Se colocó aproximadamente 25 mL de medio en las cajas petri.

Anexo 2. Preparación del estándar de McFarland

Se prepar**ó** el estándar Nro. 4 y 10 de la tabla de McFarland. según el manual de Herrera Cabeza (2013, págs. 8,9). El estándar Nro. 4 se preparó adicionando 0,5 mL de $BaCl_2*2H_2O$ al 1,175% en 9,6 mL H_2SO_4 al 1% en un tubo. Se obtuvo una turbidez, con una concentración de 12 x 10^8 U.F.C/mL.

Se preparó el segundo estándar Nro. 10 de la tabla de McFarland, adicionando 1,0mL de $BaCl_2*2H_2O$ al 1,175% en 9,0mL H_2SO_4 al 1%. Se obtuvo una turbidez, a una concentración de 30 x 10^8 U.F.C/mL.

Escala de McFarland

TUBO	**Cl_2Ba 1%**	**SO_4H_2 1%**	**U.F.C/mL**
1	0,1	9,9	$3,0x10^8$
2	0,2	9,8	$6,0x10^8$
3	0,3	9,7	$9,0x10^8$
4	0,4	9,6	$1,2x10^8$
5	0,5	9,5	$1,5x10^8$
6	0,6	9,4	$1,8x10^8$
7	0,7	9,3	$2,1x10^8$
8	0,8	9,2	$2,4x10^8$
9	0,9	9,1	$2,7x10^8$
10	1,0	9,0	$3,0x10^8$

Nota: Tomado de Escala de McFarland de Herrera Cabeza, 2013

Anexo 3. Medición de halo de crecimiento del hongo *Alternaria* spp. en la primera resiembra.

Cajas	Día 2		Día 3		Día 4	
	h1	**h2**	**h1**	**h2**	**h1**	**h2**
A	7,8	7,4	0	0	0	0
B	7	8,4	0	0	0	0
C	8,7	8,9	10,1	9,8	11	11,2
D	0	0	0	0	0	0
E	11,2	9,4	13,4	12,5	14	13,9
F	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**
G	8,5	8,5	11,6	12	11,9	12,8
H	10,4	8,4	10,9	9	12,5	12,4
I	9,9	9,1	11	11	0	0

Nota: h1=halo.
Realizado por las Autoras, 2016.

Anexo 4. Medición de halo de crecimiento del hongo *Alternaria* spp. en la tercera resiembra.

Cajas	Día 1		Día 2		Día 3	
	h1	**h2**	**h1**	**h2**	**h1**	**h2**
A	10,5	10,7	18,5	18,9	29,2	30
B	10,9	9,8	18,9	17,6	28,9	28,5
C	10,3	10,5	16,7	17	25,8	26,3
D	9,6	9,4	16,5	16	25,5	25,1
E	9,8	10,8	17,8	19	28,7	29,5
F	9,5	11,3	17,3	19	28,9	30,1
G	9,3	12,3	15,8	18	25	27,9
H	**12,3**	**10,1**	**21,1**	**20,3**	**33,7**	**33**
I	10,1	11,9	19	19	32,2	32,7

Nota: h1=halo.
Realizado por las Autoras, 2016.

Anexo 5. Ficha uso de suelo provincia de Tungurahua.

Clima	**Precipitaciones**	**Media Anual**	**Total Anual**
		41,9 mm	503,6 mm
	Temperatura Media	14,6 °C	
	Humedad Media	68,57 %	
Geomórfica	**MO %**	**Textura**	**Profundidad**
	1,8	Franco Arenosa	> 1m
Georreferenciación	**Coordenadas**	**Altitud**	**Provincia/Parroquia/Barrio**
	X 770034.76815062 Y 9864922.60691711	2590 msnm	Tungurahua/Izamba/San Francisco
	Uso de la tierra	Cultivo de Hortalizas	
	Cultivo	Brócoli	
	Sistemas de siembra	Canteros	
	Rotación de cultivos	Entre las diferentes familias	

Tomado de: Ñacato & Valencia, 2015

Anexo 6. Fase de Laboratorio – *Alternaria spp.*

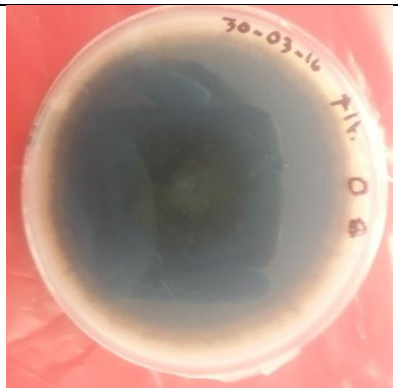


Figura 11. Selección de placas de *Alternaria* spp. en medio PDA.

Figura 12. Siembra del hongo, utilización de sacabocados.

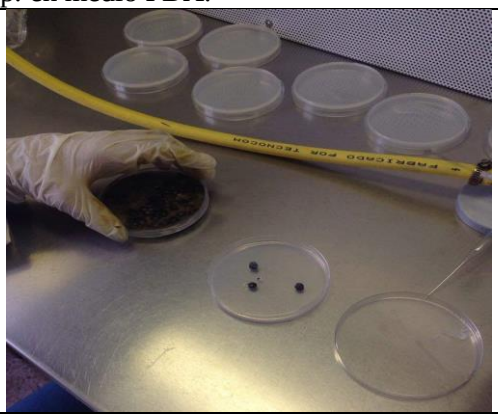


Figura 13. Siembra de *Alternaria* spp. en placas de PDA.

Figura 14. Medición de halos de crecimiento de *Alternaria* spp.

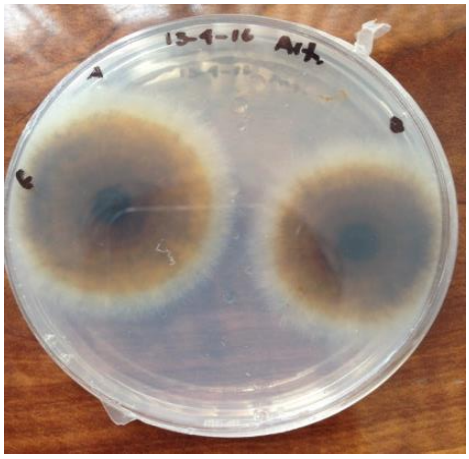


Figura 15. Crecimiento en placa de *Alternaria* spp.

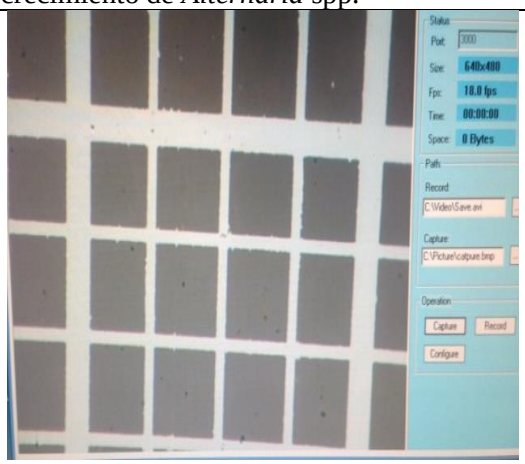


Figura 16. Conteo de esporas del hongo *Alternaria* spp.

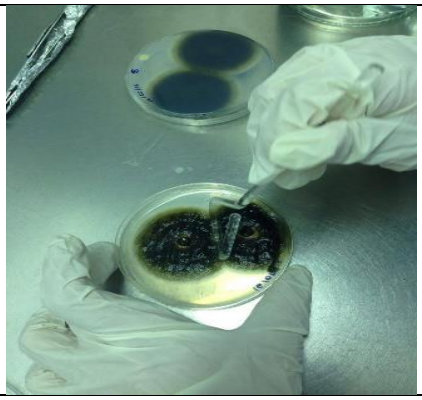


Figura 17. Preparación del inóculo de *Alternaria* spp.	Figura 18. Preparación del inóculo en dilución para aplicación en campo.

Anexo 7. Fase de laboratorio- *Bacillus subtilis*

Figura 19. Selección de placas de *Bacillus subtilis* AB4.	Figura 20. Selección de placas de *Bacillus subtilis* IB6.

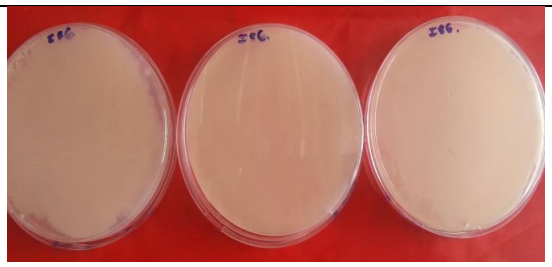
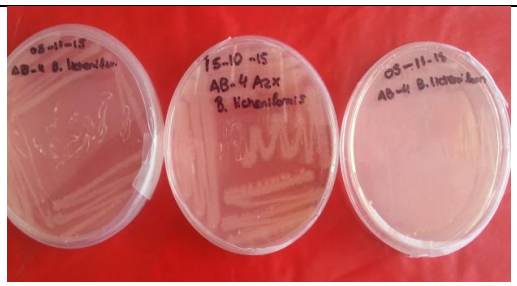

	

Figura 21. Siembra de *Bacillus subtilis* IB6 y AB4.	Figura 22. Masificacion de *Bacillus subtilis* IB6 y AB4.

Figura 23. Siembra en tubos falcon de *Bacillus subtilis* IB6 y AB4.

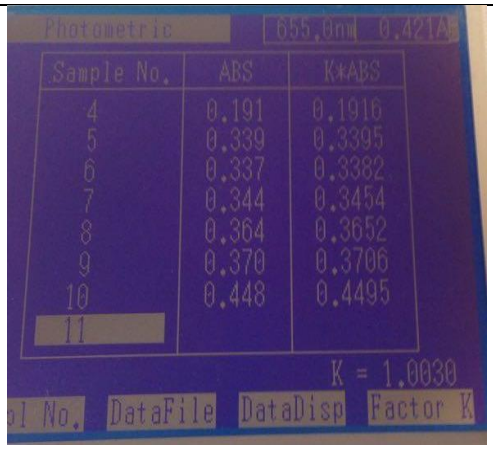


Figura 24. Determinación de concentración de *Bacillus subtilis* IB6 y AB4.

Anexo 8. Fase de laboratorio- Conservación *Bacillus subtilis* IB6 y AB4.

- Distribución de tratamientos para la conservación

TRATAMIENTOS	
CÓDIGO	TIPO DE TRATAMIENTO
C1	*Bacillus subtilis* AB4
1	CRIOBANK
2	MEDIO TSB
3	MEDIO TSB-GLICERINA
4	MEDIO INCLINADO (gar nutritivo)
5	MEDIO INCLINADO-GLICERINA
C2	*Bacillus subtilis* IB6
6	CRIOBANK
7	MEDIO TSB
8	MEDIO TSB-GLICERINA
9	MEDIO INCLINADO (gar nutritivo)
10	MEDIO INCLINADO-GLICERINA

Realizado por las Autoras, 2016.

Figura 25. Conservación de *Bacillus subtilis* IB6 y AB4 por 5 métodos diferentes.

Figura 26. Conservación de *Bacillus subtilis* IB6 en Agar Nutritivo inclinado con vaselina.

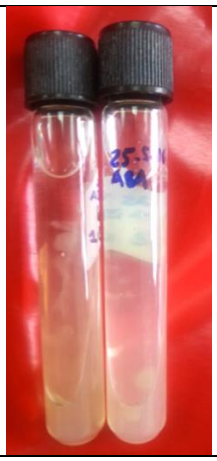


Figura 27. Conservación de *Bacillus subtilis* AB4 en Agar Nutritivo inclinado con vaselina.

Figura 28. Conservación de *Bacillus subtilis* AB4 en Agar Nutritivo inclinado.

Figura 29. *Bacillus subtilis* IB6 en Agar Nutritivo inclinado

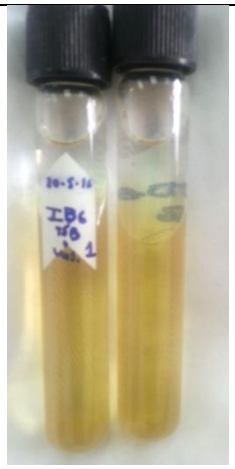
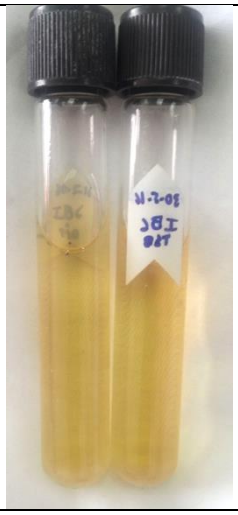


Figura 30. Conservación de *Bacillus subtilis* IB6 en TSB (Tripteina Soya Agar) con vaselina

	
Figura 31. Conservación de *Bacillus subtilis* AB4 en TSB (Tripteina Soya Agar) inclinado con vaselina	Figura 32. Conservación de *Bacillus subtilis* IB6 en TSB (Tripteina Soya Agar)

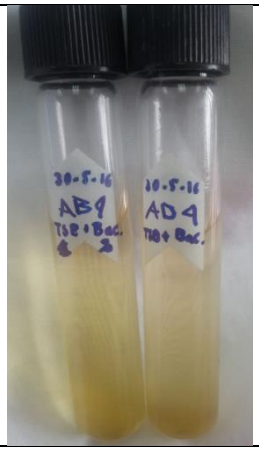



Figura 33. Conservación de *Bacillus subtilis* AB4 en TSB (Tripteina Soya Agar)	Figura 34. Conservación de *Bacillus subtilis* IB6 Y AB4 en Cryobank.

Anexo 9. Diseño experimental

Fase de campo	
Figura 35. Cultivo de brócoli en Izamba-Ecuador.	Figura 36. Diseño del testigo químico
Figura 37. Diseño del tratamiento AB4	Figura 38. Verificación de temperatura y humedad relativa dentro del invernadero.

Figura 39. Aplicación del tratamiento de *Bacillus Subtilis* AB4.	Figura 40. Manejo de regadío por goteo

Anexo 10. Evaluación de la enfermedad

Escala de severidad	
Figura 41,42. Escala 1: 1-3 manchas circulares necróticas en las hojas de la planta	Figura 43,44. Escala 2: 4-6 manchas circulares necróticas en las hojas de la planta
Figura 45,46. Escala 3: 7-9 manchas circulares necróticas en las hojas de la planta	Figura 47,48. Escala 4: 10-12 manchas circulares necróticas en las hojas de la planta

Figura 49,50. Escala 5: 13-16 manchas circulares necróticas en las hojas de la planta

Figura 50,51. Escala 6: 17-21 manchas circulares necróticas en las hojas de la planta

Figura 52,53,54. Escala 7: manchas circulares necróticas en la hojas mayores a 21, 1-3 manchas en tallo

Figura 55, 56, 57. Escala 8: manchas circulares necróticas en la hojas mayores a 21, manchas en tallo mayores a 3, 1 mancha en pella

Figura 35. Plantas de Brócoli antes de la cosecha

Anexo 11. Cosecha de brócoli

Cosecha	
Figura 58. Corte Pella de Brócoli	Figura 59. Materiales para cámara húmeda y pesaje de pellas

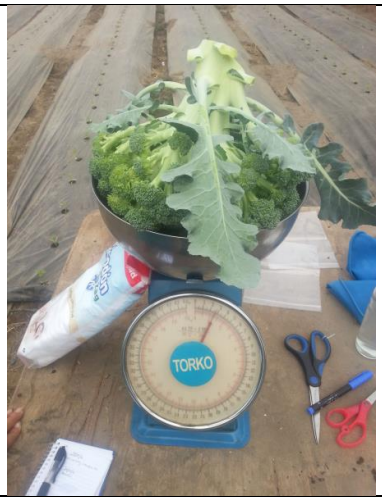



Figura 60. Pesaje de pellas de brócoli.	Figura 61. Selección de brotes de brócoli para cámara húmeda.

Figura 62. Brotes de brócoli en cámara húmeda para cada uno de los tratamientos.

Figura 63. Observación de la extensión del hongo en la pella

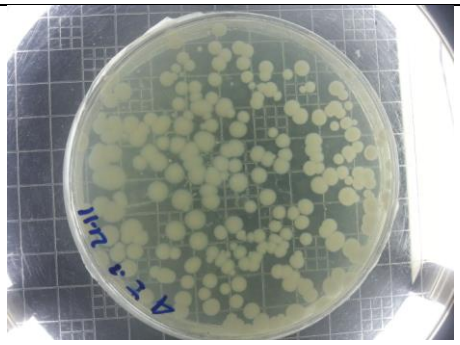
Figura 64,65. Daños del hongo en la pella

Figura 66,67. Cámara húmeda después de 48 horas presencia del Hongo *Alternaria* spp

.

Figura 68,69. Cámara húmeda después de 48 h, presencia del Hongo *Alternaria* spp. en tallos de los brotes de brócoli.

Anexo 12. Activación de cepas conservadas

Figura 70. Determinación de las concentraciones con la escala de Marcfarlan 4 para los tratamientos de conservación *Bacillus subtilis* AB4	Figura 71. Diluciones de los tratamientos de conservación *Bacillus subtilis* IB6 y AB4
	
Figura 72. Diluciones de los tratamientos de conservación *Bacillus subtilis* IB6 y AB4	Figura 73. Cuantificación de colonias de *Bacillus subtilis* IB6 y AB4.