

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO**

**CARRERA:
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

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

**TEMA:
AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y PRUEBAS *in vitro* DE CEPAS
AUTÓCTONAS DE *Bacillus subtilis* COMO AGENTE DE BIOCONTROL DE
Alternaria spp EN *Brassica oleracea var.italica***

**AUTORAS:
CAROLINA ARACELY ÑACATO SUNTAXI
MARÍA FERNANDA VALENCIA GORDÓN**

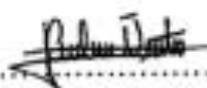
**TUTOR:
RAMIRO DANIEL ACURIO VÁSCONEZ**

Quito, marzo del 2016

Cesión de derechos de autor

Nosotras, Carolina Aracely Nacato Sntaxi con documento de identificación N° 1722640479 y María Fernanda Valencia Gordón con documento de identificación N° 1725914970 manifestamos nuestra voluntad y cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autoras del trabajo de titulación intitulado: "AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y PRUEBAS *in vitro* DE CEPAS AUTÓCTONAS DE *Bacillus subtilis* COMO AGENTE DE BIOCONTROL DE *Alternaria spp* EN *Brassica oleracea var.italica*.", mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniera 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 Propiedad Intelectual, en nuestra condición de autoras 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.

(f).....

Carolina Aracely Nacato Sntaxi

C.I.: 1722640479

(f).....

María Fernanda Valencia Gordón

C.I.: 1725914970

Quito, marzo del 2016

Declaratoria de coautoría del docente tutor

Yo declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación "AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y PRUEBAS *in vitro* DE CEPAS AUTÓCTONAS DE *Bacillus subtilis* COMO AGENTE DE BIOCONTROL DE *Alternaria spp* EN *Brassica oleracea var.italica*." realizado por Carolina Aracely Nacato Suntaxi y María Fernanda Valencia Gordón obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana, para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, marzo del 2016

(f).....

Ing. Ramiro Daniel Acurio Vásquez MSc.

C.I.: 1714819495

Índice

Introducción	1
Capítulo 1:Marco conceptual.....	3
1.1. Generalidades del cultivo de brócoli	3
1.1.1. Descripción botánica y clasificación taxonómica	3
1.1.2. Importancia del cultivo de brócoli.....	4
1.1.3. Cultivo en el Ecuador	5
1.2. Plagas del brócoli	5
1.2.1. Minador de hojas (<i>Liriomyza trifolii</i> Burg.)	5
1.2.2. Mosca de la col (<i>Chorthophilla brassicae</i>)	5
1.2.3. Oruga de la col (<i>Pieris brassicae</i>)	6
1.2.4. Pulgón de las coles (<i>Brevicoryne brassicae</i>)	6
1.2.5. Gorgojo de las coles o falsa potra (<i>Ceuthorrhynchus pleurostigma</i> <i>Marsch.</i>)	6
1.3. Enfermedades	7
1.3.1. Hernia o potra de la col (<i>Plasmodiophora brassicae</i> Wor.)	7
1.3.2. Mancha angular (<i>Mycosphaerella brassicicola</i> Gaumann.)	7
1.3.3. Mildiu (<i>Peronospora brassicae</i>)	7
1.3.4. Rizoctonia (<i>Rhizoctonia solani</i> Kühn).....	8
1.3.5. Roya (<i>Albugo candida</i> (Pers.) Kuntze.)	8
1.4. Mancha foliar del repollo (<i>Alternaria spp.</i>).....	8
1.4.1. Taxonomía y morfología.....	8
1.4.2. Importancia económica	9

1.4.3.	Epidemiología	10
1.4.4.	Síntomas.....	10
1.5.	El control biológico de enfermedades.....	10
1.5.1.	Importancia del control biológico.....	11
1.5.2.	Características de un Agente Microbiano de Control Biológico (AMCB)	11
1.5.3.	El control biológico microbiano en el brócoli	12
1.6.	Controlador biológico <i>Bacillus subtilis</i>	12
1.6.1.	Taxonomía y morfología de <i>Bacillus subtilis</i>	13
1.6.2.	Mecanismo de acción	13
1.6.3.	Uso de la bacteria como antagonista	14
1.6.4.	<i>Bacillus subtilis subsp. spizizenii</i> ATCC 6633.....	15
1.6.4.1.	Utilidad	15
1.7.	Antagonismo según la escala de bell y PIC (Porcentaje de Inhibición de crecimiento)	15
1.7.1.	Capacidad antagónica.....	16
1.7.2.	Patogenicidad	16
Capítulo 2:	Metodología	17
2.1.	Localización	17
2.2.	Fase de Campo	17
2.2.1.	Muestreo de suelo.....	17
2.2.2.	Recolección material vegetal infectado con <i>Alternaria spp</i>	17
2.3.	Fase de laboratorio (Obtención de <i>Bacillus subtilis</i>).....	18
2.3.1.	Diluciones.....	18

2.3.2.	Siembra de superficie en caja petri	18
2.3.3.	Aislamiento y purificación.....	18
2.3.4.	Caracterización de <i>Bacillus subtilis</i>	19
	2.3.4.1.Tinción azul de metileno	19
	2.3.4.2.Tinción de esporas.....	19
	2.3.4.3.Pruebas API	20
2.4.	Fase de laboratorio (Obtención de <i>Alternaria spp</i>).....	21
2.4.1.	Siembra en superficie en caja petri	21
2.4.2.	Aislamiento y Purificación	21
2.4.3.	Caracterización <i>Alternaria spp</i>	21
2.5.	Pruebas de Antagonismo	22
2.5.1.	Lectura del ensayo y Escala de Bell (Competencia por sustrato)	23
2.5.2.	Porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC).....	24
2.6.	Conservación de las cepas <i>Bacillus subtilis</i>	24
2.7.	Análisis estadístico	25
Capítulo 3:Resultados y discusión.....		26
3.1.	Caracterización morfológica de <i>Alternaria spp</i>	26
Morfología macroscópica <i>Alternaria spp</i>		26
3.2.	Caracterización microscópica de <i>Alternaria spp</i>	26
3.3.	Caracterización macroscópica de <i>Bacillus subtilis</i>	28
3.4.	Caracterización microscópica de <i>Bacillus subtilis</i>	29
3.5.	Pruebas API para <i>Bacillus subtilis</i>	31
3.6.	Pruebas de antagonismo.....	32

3.6.1. Antagonismo in vitro de <i>Bacillus subtilis</i> (competencia por sustrato)	35
3.6.2. Evaluación del efecto antibiótico	39
Conclusiones	41
Recomendaciones	42
Referencias.....	43

Índice de tablas

Tabla 1. Taxonomía del Brócoli.....	4
Tabla 2. Taxonomía de <i>Alternaria</i> spp.	9
Tabla 3. Taxonomía <i>Bacillus subtilis</i>	13
Tabla 4. Clases según la escala de Bell.	23
Tabla 5. Valores utilizados para la escala de Bell.	24
Tabla 6. Cepas aisladas.....	29
Tabla 7. Cepas aisladas caracterizas microscópicamente.	31
Tabla 8. Cepas pertenecientes al género <i>Bacillus subtilis</i>	31
Tabla 9. Análisis de varianza antagonista y patógeno (SC tipo III).	32
Tabla 10. Análisis de varianza Antagonista.	33
Tabla 11. Análisis de Varianza Patógeno.	34
Tabla 12. Valores crecimiento al séptimo día del antagonista para evaluación en la Escala de Bell.	35
Tabla 13. Antagonismo por competencia de sustrato.....	36
Tabla 14. Clasificación según escala de Bell.	37
Tabla 15. Porcentaje de inhibición del crecimiento.....	39

Índice de figuras

Figura 1. Morfología macroscópica <i>Alternaria spp.</i>	26
Figura 2. Morfología microscópica <i>Alternaria spp.</i>	27
Figura 3. Morfología macroscópica <i>Bacillus subtilis</i>	28
Figura 4. Morfología microscópica de <i>Bacillus subtilis</i>	30
Figura 5. Prueba de Tukey (5%) antagonista.....	33
Figura 6. Prueba de Tukey (5%) patógeno.....	34

Índice de anexos

Anexo 1. Ubicación zonas de muestreo.....	49
Anexo 2. Ficha uso del suelo provincia de Imbabura.....	51
Anexo 3. Ficha uso de suelo provincia de Tungurahua.....	52
Anexo 4. Ficha uso del suelo provincia de Cotopaxi.....	53
Anexo 5: Recolección de muestras.....	54
Anexo 6: Muestras vegetales en medio PDA.....	57
Anexo 7: Carta de colores Microgen Bacillus ID MID-66.....	58
Anexo 8: Tiras reactivas Microgen Bacillus ID MID-66.....	59
Anexo 9: Formulario de Informe Microgen Bacillus ID MID-66.....	60
Anexo 10: Plantilla para siembra de <i>Alternaria</i> spp.....	61
Anexo 11: Siembra patógeno vs antagonista para prueba in vitro.....	62

Resumen

Actualmente existe una demanda creciente desde los consumidores por alimentos de calidad, concepto que involucra principalmente la disponibilidad de productos libres de enfermedades y de residuos químicos nocivos para la salud humana, es por ello que surge la necesidad de encontrar nuevas opciones para el manejo sustentable del cultivo de brócoli frente al agente patógeno causal del daño en inflorescencia. La enfermedad causada por el hongo fitopatógeno *Alternaria spp*, es una de las principales causas de daño en cultivos de brócoli. Se realizaron muestreos en campo e investigaciones en laboratorio; en campo se tomaron muestras de suelo aleatoriamente en cultivos de brócoli, se recolectaron muestras vegetales que manifestaban indicios de estar infectadas con *Alternaria spp*. En la fase de laboratorio se procedió al aislamiento, identificación y pruebas *in vitro* de cepas de *Bacillus subtilis* para el control de *Alternaria spp*; la capacidad antagónica se midió utilizando la escala de Bell, los resultados indicaron que la cepa ATCC 6633 y la cepa AB-4 identificada y caracterizada como *Bacillus subtilis subsp. licheniformis*, presentaron actividad antagónica con un valor de 21,58% clase 2 según la escala de Bell, determinado así el potencial de *Bacillus subtilis* como buenos controladores biológicos contra *Alternaria spp*.

Palabras clave: *Alternaria spp*, inflorescencia, brócoli, *Bacillus*, controladores biológicos.

Abstract

There is an increasing consumer demand for quality food, a concept which mainly involves the availability of disease-free products and harmful to human health chemical waste, which is why the need for new options for sustainable management arises broccoli crop against the causative pathogen damage in inflorescence. The disease caused by the phytopathogenic fungus *Alternaria spp* is a major cause of damage to broccoli cultivars. Field sampling and laboratory investigations were conducted; field soil samples randomly taken broccoli cultivars, plant samples showed signs of being that infected with *Alternaria spp* collected. In the laboratory stage it proceeded to the isolation, identification and in vitro of *Bacillus subtilis* strains for the control of *Alternaria spp* tests; the antagonistic capacity was measured using the scale Bell, the results indicated that the strain ATCC 6633 and strain AB-4 identified and characterized as *Bacillus subtilis subsp. licheniformis*, they showed antagonistic activity with a value of 21.58% class 2 as measured Bell, thus determined the potential of *Bacillus subtilis* as biocontrol good against *Alternaria spp*.

Keywords: *Alternaria spp*, inflorescence, broccoli, *Bacillus*, biocontrol.

Introducción

El control biológico, mediante el uso de microorganismos antagonistas, se considera como una alternativa para el control de las enfermedades causadas por hongos fitopatógenos (Bettioli & Rivera, 2012).

Uno de los factores que afectan a la producción del cultivo de brócoli en el Ecuador, son las enfermedades causadas por hongos fitopatógenos, *Alternaria spp* es una de las principales enfermedades que afectan al brócoli, se caracteriza por producir un atizamiento y daño en la inflorescencia que se inicia como una decoloración café, que puede involucrar un florete o varios a la vez. La enfermedad se puede dispersar en las semillas infectadas, las herramientas de cultivo o de planta a planta por el viento y/o el agua. A menudo se puede apreciar en el envés de las hojas, manchas de color oscuro a manera de una mancha de aceite; cuando esto ocurre es casi seguro que la pella, en cualquier estado de formación, presentará una o varias inflorescencias con pudriciones, por ello la presencia de la enfermedad en el cultivo de brócoli impide que estas puedan ser comercializadas. Se ha estimado que esta enfermedad puede ocasionar hasta un 30% de pérdidas de pellas (Fraire & Nieto, 2010 & Cadena Yamchapaxi, 2011).

Las bacterias del tipo *Bacillus* son efectivas para inhibir el desarrollo de algunos hongos fitopatógenos. *Bacillus subtilis* provee un control efectivo de enfermedades causadas por hongos y bacterias.

El potencial de esta bacteria se basa en su capacidad para producir una amplia gama de moléculas bioactivas, que muestran fuertes propiedades antifúngicas, junto con una baja toxicidad y alta biodegradabilidad, adicionalmente, la capacidad de formar endosporas,

le proporcionan un alto nivel de resistencia a condiciones ambientales extremas (Yáñez Mendizábal, 2012, pág. 166).

Este trabajo se realizó con el fin de determinar la capacidad antagónica de cepas autóctonas de *Bacillus subtilis* aisladas y purificadas de las principales zonas productoras de brócoli en el Ecuador frente a *Alternaria spp* en pruebas *in vitro*; esto con el objetivo de tener un biocontrolador natural, que no afecte a la calidad del brócoli y esté libre de pesticidas y químicos que puedan causar daño al consumidor, así como buscar un mercado de alimentos orgánicos.

Capítulo 1:

Marco conceptual

1.1. Generalidades del cultivo de brócoli

El brócoli (*Brassica oleracea var. Italica*) es una hortaliza originaria del Mediterráneo y Asia Menor, existen referencias históricas de que el cultivo data desde antes de la Era Cristiana. Ha sido popular en Italia desde el Imperio Romano; en Francia se cultiva desde el siglo XVI. Se consume fresco en ensaladas, sopas, tortas, entre otras; industrialmente es utilizado en la elaboración de curtidos (Revelo, Ruíz, & Oña, 2009, pág. 03).

1.1.1. Descripción botánica y clasificación taxonómica

El brócoli es una planta herbácea que puede llegar a medir hasta 70cm de altura, posee un tallo suculento único, “sus hojas son estrechas y erguidas, con peciolo generalmente desnudos, limbos normalmente con los bordes más ondulados; así como nervaduras más marcadas y blancas, la raíz es pivotante con raíces secundarias y superficiales” (Romero Pinto, 2003, pág. 120). “Las flores del brócoli son pequeñas, en forma de cruz de color amarillo y el fruto es una silicua de valvas ligeramente convexas con un solo nervio longitudinal. Produce abundantes semillas redondas y de color rosáceo” (Romero Pinto, 2003, pág. 120).

La clasificación taxonómica del brócoli corresponde a la tabla que se muestra a continuación:

Tabla 1. Taxonomía del Brócoli.

Reino:	Plantae
División:	Fanerógama Magnoliophyta
Clase:	Dicotiledónea Magnoliopsida
Orden:	Brassicales
Familia:	Brassicaceae
Género:	<i>Brassica</i>
Especie:	<i>B. oleracea</i>
Variedad:	<i>Italica</i>
Nombre científico	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>Italica</i> .
Nombre común:	Brócoli, brécoles, bróculis

Nota: Evaluación de cuatro productos orgánicos en el combate de plagas y enfermedades para la producción de brócoli (*Brassica oleracea* Vr. *Italica*) en Yaruquí. Sangolquí, Pichincha, Ecuador: Escuela Politécnica del Ejército (Bonilla, 2005).

1.1.2. Importancia del cultivo de brócoli

El consumo de brócoli se ha incrementado principalmente por su gran cantidad de atributos nutritivos y anticancerígenos. La producción nacional del año 2014 aumentó de forma considerable en 59.59% con respecto al año 2013. Debido al aumento de la demanda de países como Rusia y Chile y a las ventajas climáticas que poseen las provincias productoras del cultivo. Las exportaciones de brócoli a nivel internacional aumentaron en 7.40% con respecto al año 2013, dicho incremento está directamente relacionado con el alza de la producción a nivel mundial, alcanzado el mayor volumen exportado en el año 2014 (1, 242,984 T). Dicho volumen representó el 5.58% de la producción total (Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca, 2014, pág. 03).

1.1.3. Cultivo en el Ecuador

La información del III Censo Agropecuario realizado en el 2000, muestra que la superficie cosechada de brócoli en el país fue de 3.359 hectáreas, alcanzando una producción total de 50 mil toneladas, aproximadamente, con un rendimiento promedio de 14,6 TM/ha. La región andina es ideal para este cultivo; Cotopaxi es la principal provincia productora del país con el 68%, Pichincha con el 16%, Imbabura con el 10%, Carchi con el 3%, Chimborazo con el 2% y el resto del país con el 1%. Estas zonas presentan condiciones favorables para la producción de esta hortaliza durante todo el año, siendo las principales variedades sembradas en el país: Legacy, Marathon, Shogum, Coronado y Domador (Revelo, Ruíz, & Oña, 2009, pág. 03).

1.2. Plagas del brócoli

Algunos autores mencionan los siguientes insectos como las principales plagas del cultivo de brócoli:

1.2.1. Minador de hojas (*Liriomyza trifolii* Burg.)

“Los daños los produce dípteros minadores, de color amarillo y negro. Se trata de una plaga muy polífaga y peligrosa. Labran galerías en las hojas, dentro de las cuales hacen la muda larvaria y la ninfosis” (Sánchez & Romero, 2005, pág. 1)

1.2.2. Mosca de la col (*Chorthophilla brassicae*)

Se trata de un díptero que daña a la planta cuando está en forma de larva, ya que desarrollan galerías desde la base de los tallos. Posteriormente cuando se hacen adultos ovoponen una nueva generación de larvas, se alimentan de las raíces, esto produce la podredumbre de la planta o su debilitamiento (Sánchez & Romero, 2005).

1.2.3. Oruga de la col (*Pieris brassicae*)

“Son lepidópteros, pueden tener tres generaciones al año. Las mariposas son blancas y con manchas negras, realizando la puesta en el envés de las hojas” (Sánchez & Romero, 2005, pág. 1).

“Las orugas son de color verde grisáceo con puntos negros y bandas amarillas, debido a su gran voracidad producen graves daños en las hojas, sobre las que se agrupan destruyéndolas en su totalidad, excepto los nervios” (Sánchez & Romero, 2005, pág. 1).

1.2.4. Pulgón de las coles (*Brevicoryne brassicae*)

“Se trata de un áfido, que afecta diferentes especies de la familia Cruciferae, donde también inverna en forma de huevo en los tallos de las mismas, son de color blanco azulado y muy ceroso” (Sánchez & Romero, 2005, pág. 1).

“Producen picaduras en las hojas de las plantas, además pueden ocasionar daños indirectos por ser transmisores de virosis. En veranos secos y cálidos producen graves daños, provocando pérdidas en la calidad de las cosechas” (Sánchez & Romero, 2005, pág. 1).

1.2.5. Gorgojo de las coles o falsa potra (*Ceuthorrhynchus pleurostigma* Marsch.)

“Son coleópteros, que ponen sus huevos en orificios en el cuello de la raíz de las plantas, dando lugar a unos abultamientos, en cuyo interior se alojan unas pequeñas larvas blancas de cabeza parda” (Sánchez & Romero, 2005, pág. 1).

“Los abultamientos se producen como consecuencia de la actividad masticadora de las larvas, que produce una reacción de las plantas que da lugar a las agallas. Los daños ocasionados por esta plaga influyen en la calidad del producto obtenido” (Sánchez & Romero, 2005, pág. 1).

1.3. Enfermedades

Algunos autores menciona los siguientes microorganismos bacterianos y fúngicos como las principales enfermedades del cultivo de brócoli:

1.3.1. Hernia o potra de la col (*Plasmodiophora brassicae* Wor.)

Esta enfermedad afecta a las raíces que presentan grandes abultamientos o protuberancias. Como consecuencia del atrofiamiento que sufren los vasos conductores, la parte aérea no se desarrolla bien y las hojas se marchitan en los momentos de mayor sequedad en el ambiente, para volver a recuperarse más tarde cuando aumenta la humedad.

Si se arranca las plantas afectadas por la enfermedad se observan malformaciones de las raíces (alargamiento de las zonas carnosas y formación de excrecencias) y raicillas que al principio son de color blanco en su interior, después se hacen grisáceas y al final sufren podredumbre blanda. Al cabo de cierto tiempo el hongo produce innumerables esporas, que son las que reproducen la enfermedad en la primavera siguiente (Santoyo & Martínez, 2011, pág. 22).

1.3.2. Mancha angular (*Mycosphaerella brassicicola* Gaumann.)

“En las hojas viejas se forman unas manchas circulares que pueden alcanzar 2 cm de diámetro, de color oscuro y aspecto acorchado” (Santoyo & Martínez, 2011, pág. 22).

1.3.3. Mildiu (*Peronospora brassicae*)

“Por el haz se forman pequeñas manchas de color amarillo y forma angulosa. En correspondencia con esas manchas, por el envés se forma una especie de pelusilla de color blanco grisáceo” (Santoyo & Martínez, 2011, pág. 22). “Puede atacar desde el

principio del nacimiento de la planta, haciéndolo con mayor virulencia en los cotiledones que llegan a desprenderse” (Santoyo & Martínez, 2011, pág. 22).

1.3.4. Rizoctonia (*Rhizoctonia solani* Kühn)

“Producen deformaciones que se originan en la parte superior de la raíz y cuello contiguo al tallo; la enfermedad puede producir la muerte de la planta, principalmente en siembras estivales” (Santoyo & Martínez, 2011, pág. 22).

1.3.5. Roya (*Albugo candida* (Pers.) Kuntze.)

“Produce deformaciones en distintos órganos de las plantas. En las hojas se forman unas pústulas de color blanco” (Santoyo & Martínez, 2011, pág. 22).

1.4. Mancha foliar del repollo (*Alternaria* spp.)

“El género *Alternaria* incluye alrededor de 50 especies de hongos ampliamente distribuidas en las regiones templadas de la Tierra” (Philippi, 2010, págs. 1,2). “Se trata de hongos, generalmente saprófitos o parásitos sobre muchos tipos de plantas hortícolas y sobre gran diversidad de sustratos (papel, cueros, tapicerías y otros.). Algunas especies pueden descomponer azúcares, pectina y lignina, así como contaminar alimentos con micotoxinas” (Philippi, 2010, págs. 1,2).

“*Alternaria*” es un hongo filamentoso, saprofito, perteneciente al filo Ascomycota y al grupo de los dematiáceos, caracterizados por presentar una coloración oscura (Arias & Jerez, 2008).

1.4.1. Taxonomía y morfología

La clasificación taxonómica del hongo fitopatógeno *Alternaria* spp se muestra a continuación:

Tabla 2. Taxonomía de *Alternaria* spp.

Reino:	Fungi
Filo:	Ascomycota
Subdivisión:	Pezizomycotina
Clase:	Dothideomycetes
Orden:	Pleosporales
Familia:	Pleosporaceae
Género:	<i>Alternaria</i>
Especie:	<i>Alternaria</i> spp.

Nota: *Producción Ecológica Certificada de hortalizas de clima frío*. Bogotá, Colombia: Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano (Romero Pinto, 2003).

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 (Philippi, 2010, págs. 1-2).

1.4.2. Importancia económica

La *Alternaria* spp es un agente patógeno, que presenta mayor incidencia en el mes de octubre, por el aumento en las precipitaciones en todo el callejón interandino. La presencia de la enfermedad en las inflorescencias del brócoli impide que estas puedan ser comercializadas, se ha estimado que esta enfermedad puede ocasionar un 30% de pérdidas de pellas (Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca, 2014, pág. 4).

1.4.3. Epidemiología

El hongo principalmente se encuentra en la semilla, residuos de cosecha y las malezas. Bajo condiciones favorables las esporas pueden producirse en una semana y comenzar un nuevo ciclo de la enfermedad (Serrato & French, 2011, pág. 1).

1.4.4. Síntomas

La *Alternaria spp.*: se caracteriza por producir un atizonamiento y daño en la inflorescencia, que se inicia como una decoloración café, que puede involucrar un florete o varios a la vez. Se dispersa con las semillas infectadas, con las herramientas de cultivo o de planta a planta por el viento y en el agua (Serrato & French, 2011, pág. 1).

A menudo se puede apreciar en el envés de las hojas, manchas de color oscuro a manera de una mancha de aceite; cuando esto ocurre es casi seguro que la pella, en cualquier estado de formación, presentará una o varias inflorescencias con pudriciones (Serrato & French, 2011, pág. 1).

1.5. El control biológico de enfermedades

Pérez (2005) menciona que el control biológico de enfermedades de plantas, constituye una práctica ampliamente difundida, que sigue siendo objeto de investigación y desarrollo. Un concepto amplio de control biológico incluye nociones como las de prácticas de cultivo y resistencia a las enfermedades.

El control biológico microbiano es “la utilización de microorganismos antagonistas o sus metabolitos para el control de enfermedades, entendiéndose por antagonistas, aquellos organismos que de forma natural interfieren en supervivencia o desarrollo de los patógenos” (Prieto, 2009, pág. 1).

Se entiende como Agente Microbiano de Control Biológico (AMCB) a aquellos agentes biológicos capaces de interferir en el proceso de la vida de los patógenos vegetales, pueden ser hongos, bacterias, nemátodos, y otros. Pueden impedir o disminuir la germinación de los propágulos de los patógenos y causar la degradación de los micelios, inhibir el crecimiento y desarrollo de la biomasa del patógeno, por la producción de antibióticos o el entrelazamiento de las hifas, competir por el alimento, por espacio u oxígeno (Prieto, 2009).

1.5.1. Importancia del control biológico

El control biológico es un componente vital de los sistemas sustentables, ya que constituye un medio económicamente atractivo y ecológicamente aceptable para reducir los insumos externos y mejorar la cantidad y calidad de los recursos internos, mediante la utilización de microorganismos debidamente seleccionados por su alta eficiencia e inocuidad, además pueden ser generados a partir de recursos locales y tener carácter endógeno (Guédez, Castillo, & Cañizales, 2009, pág. 58).

1.5.2. Características de un Agente Microbiano de Control Biológico (AMCB)

Para utilizar un microorganismo como Agente del Control Biológico debe poseer una alta patogenicidad, que es la habilidad de un patógeno a invadir y dañar los tejidos y órganos de su hospederos, alta eficiencia en la transmisión, habilidad de persistencia en el ambiente tales como esporas de bacterias, hongos y protozoarios y los cuerpos poliédricos de virus, poseen larga vida en almacenaje, y por último deben ser fáciles de reproducir y almacenar, mientras que los antagonistas deben tener una larga vida de almacenaje y retener su viabilidad y virulencia en el hospedero (Fuenmayor, 2000).

1.5.3. El control biológico microbiano en el brócoli

Para Rubio (2005), el control biológico depende de un funcionamiento efectivo del antagonista apropiado para cada ecosistema particular planta-patógeno. La identificación de aislados antagonistas apropiados es siempre el primer paso en este proceso. La pauta a seguir para cada cultivo y cada área dependerá de un estudio a fondo de cada situación particular. Algunos preparados basados en alguno de los mecanismos ya están disponibles comercialmente, mientras que otros solo han sido probados de manera experimental.

“Se está utilizando *Bacillus thuringiensis*, como controlador biológico en los cultivos de brócoli; *B. thuringiensis* es una bacteria, que controla larvas de lepidópteros sin perturbar mayormente poblaciones de insectos benéficos, de esta manera protege los cultivos” (Cóndor, 2014, pág. 2).

1.6. Controlador biológico *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis provee un control efectivo de enfermedades causadas por hongos y bacterias, “se basa su capacidad para producir una amplia gama de moléculas bioactivas, que muestran fuertes propiedades antifúngicas, junto con una baja toxicidad y alta biodegradabilidad” (Acurio, 2007, pág. 46).

“Además produce antibióticos muy efectivos contra los hongos y cuando se instala en las raíces y hojas, induce a la planta a producir fitoalexinas, que confieren resistencia al ataque de hongos y nematodos patógenos” (Layton, Maldonado, Monroy, Corrales, & Sánchez, 2011, pág. 179). Esta es una característica, que tiene muchas ventajas en comparación con los fungicidas químicos, ya que no es tóxico para humanos, animales y plantas y no constituye un contaminante ambiental (Layton, Maldonado, Monroy, Corrales, & Sánchez, 2011, pág. 179).

1.6.1. Taxonomía y morfología de *Bacillus subtilis*

En la tabla siguiente, se muestra la clasificación taxonómica para esta bacteria.

Tabla 3. Taxonomía *Bacillus subtilis*

Reino:	Bacteria
Filo:	Firmicutes
Clase:	Bacilli
Orden:	Bacillales
Familia:	Bacillaceae
Género:	<i>Bacillus</i>
Especie:	<i>B. subtilis</i>

Nota: Tomado de *Taxonomía Bacillus subtilis* de

http://www.biocrawler.com/encyclopedia/Bacillus_subtilis (Bio06).

Bacillus subtilis tiene como característica principal ser una bacteria Gram positiva, mesófila, productora de esporas de pared delgada, de forma oval o cilíndrica, es fermentativa y usualmente hidroliza caseína y almidón. *B. subtilis* ha sido clasificada históricamente como un aerobio obligado, aunque recientes investigaciones han demostrado que esto no es estrictamente correcto (Biocrawler, 2006, pág. 1).

1.6.2. Mecanismo de acción

B. subtilis, se ha estudiado la liberación de compuestos con propiedades antifúngicas, como la subtilina y otros antibióticos de la familia de las Iturinas. Estas últimas son polipéptidos, que actúan sobre la pared celular de los hongos (Acurio, 2007, págs. 27-30).

Bacillus subtilis tiene la capacidad de controlar enfermedades en cultivos vegetales. Para esto se ha descubierto que produce compuestos de bajo peso molecular con mucha

afinidad por el hierro, evitando la germinación de las esporas de hongos patógenos (Layton, Maldonado, Monroy, Corrales, & Sánchez, 2011).

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 griseae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria oleracea*, *A. brassicae* y *Botrytis cinérea* (Layton, Maldonado, Monroy, Corrales, & Sánchez, 2011, pág. 180).

1.6.3. Uso de la bacteria como antagonista

Se ha determinado el efecto de *Bacillus subtilis* sobre la germinación y desarrollo de semillas de tomate infectadas con *Fusarium oxysporum*. También se han realizado pruebas “in vitro” con cepas de *Bacillus subtilis* aisladas de arroz; donde se demostró la capacidad de inhibir el crecimiento de los hongos fitopatógenos del suelo, tales como *Fusarium oxysporum*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Phytophthora nicotinae*, *Fusarium solani* (Rodríguez, 2003, pág. 20).

El mismo autor menciona, que uno de los usos de *B. subtilis*, como agente de control biológico es mediante el tratamiento de semillas. Su efecto benéfico cuando se aplica junto a las semillas o en forma individual, no se debe exclusivamente al antagonismo con los patógenos, sino que influye positivamente en la germinación, desarrollo y rendimiento del cultivo debido a la producción de sustancias promotoras del crecimiento y al mejoramiento de la nutrición de las plantas.

1.6.4. *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* ATCC 6633¹

Bacillus subtilis subsp. *spizizenii* ATCC 6633 produce subtilina un antibiótico péptido que contiene lantionina (lantibióticos). Los lantibióticos tienen una alta actividad antimicrobiana frente a varias bacterias Gram positivas, tales como *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Clostridium*. Contienen la inusual aminoácidos deshidroalanina y deshidrobutirina y se han denominado lantibióticos debido a sus puentes de sulfuro característicos consisten en meso-lantionina y 3-metil-lantion (Klein, 1994).

1.6.4.1. Utilidad

La cepa de *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* ATCC 6633 proviene de una colección certificada (cepa pura), la cual permite:

Evaluar la calidad de los medios de cultivo, asegurar la calidad de los resultados de ensayos de laboratorio (coloraciones y desempeño de reactivos) y validar métodos microbiológicos (Pruebas de sensibilidad) (Montoya Romero, 2012).

1.7. Antagonismo según la escala de bell y PIC (Porcentaje de Inhibición de crecimiento)

La evaluación de la capacidad antagónica “se determina la competencia por sustrato y el efecto antibiótico. Para evaluar la competencia por sustrato se utiliza la escala de Bell y en el caso del efecto antibiótico se calcula el porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC)” (Calvo Araya, Rivera Coto, Orozco Cayasso, & Orozco Rodríguez, 2012, pág. 1).

¹ American Type Culture Collection 6633

1.7.1. Capacidad antagónica

Es la capacidad basada en “la actividad inhibitoria directa, que ejerce un microorganismo sobre otro y que presenta acciones opuestas en un mismo sistema” (Pérez, Gonzalez, & Muñoz, 2014, pág. 54). La capacidad antagónica está dada por la inhibición, deterioro o muerte de alguna especie de microorganismo por la acción de otra; o una relación entre dos poblaciones en la cual una de ellas causa efectos deletéreos o negativos a la otra (Pérez, Gonzalez, & Muñoz, 2014, pág. 54).

1.7.2. Patogenicidad

La patogenicidad se define como “la capacidad de un agente infeccioso de producir una enfermedad en un huésped susceptible” (Salint, 2007, pág. 106).

“Un agente biológico patógeno es toda aquella entidad biológica capaz de producir enfermedad o daño en la biología de un huésped (humano, animal, vegetal) sensiblemente predispuesto” (Salint, 2007, pág. 106).

Capítulo 2:

Metodología

2.1. Localización

El proyecto se desarrolló en dos fases: en la fase de campo se obtuvieron las muestras de suelo y material vegetal (hojas) y la fase de laboratorio se realizó el aislamiento, la identificación y las pruebas *in vitro* de *Bacillus subtilis*.

Las muestras de suelo se obtuvieron de las provincias de Imbabura, Tungurahua y Cotopaxi (anexos del 1 al 4).

La fase de laboratorio se realizó en los laboratorios Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana.

2.2. Fase de Campo

En la fase de campo se realizó la recolección de muestras de suelo y material vegetal.

2.2.1. Muestreo de suelo

Las diferentes cepas de *Bacillus subtilis* fueron aisladas de muestras de suelo provenientes de fincas productoras de brócoli ubicadas en las provincias de Imbabura, Tungurahua y Cotopaxi.

Se seleccionaron 15 puntos al azar de muestreo de los suelos en las plantaciones de brócoli; las muestras se procedieron a tomar con una pala, sin superar los 5 cm de profundidad y colocadas en una funda plástica identificada; Se tomaron en total 45 muestras de 600 g de las fincas muestreadas como se muestra en los anexos 5a al 5c.

2.2.2. Recolección material vegetal infectado con *Alternaria spp.*

Las muestras de *Alternaria spp* se obtuvieron de la misma zona de la cual se tomaron las muestras de suelo, se procedió a recolectar hojas que presentaban características de

la enfermedad, colocándolas en recipientes con algodón humedecido (cámara húmeda) por 48h para favorecer el desarrollo del micelio, ver anexo 5d y anexo 5e.

2.3. Fase de laboratorio (Obtención de *Bacillus subtilis*)

En la fase de laboratorio para obtención de *Bacillus subtilis* se procesaron las 45 muestras de suelo recolectadas en campo.

2.3.1. Diluciones

Una vez tomada la muestra de suelo de cada zona, se le retiraron restos de raíces, piedras, entre otros, se pesó 10 g de cada muestra de suelo y se colocó en un frasco boeco, que contuvo 90 ml de suero fisiológico estéril; se agitó la disolución con el fin de homogenizar el contenido y facilitar el desprendimiento de microorganismos. Las muestras se colocaron en baño maría a 70 °C por veinte minutos; se prepararon 4 tubos de ensayo con 9 ml de suero fisiológico estéril; posteriormente se colocó 1 ml de la solución madre a un tubo de ensayo con 9 ml de suero fisiológico estéril obteniéndose la dilución 10^{-1} , de la dilución 10^{-1} se tomó 1 ml y se colocó en el siguiente tubo de ensayo, obteniéndose la dilución 10^{-2} ; el proceso se repitió hasta obtener la dilución 10^{-3} .

2.3.2. Siembra de superficie en caja petri

Con un asa microbiológica se sembraron dos repeticiones de la solución madre y las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} en cajas Petri con medio PCA (Plate Count agar) + púrpura de bromocresol y se procedió a incubar a 37°C por 48h.

2.3.3. Aislamiento y purificación

Se procedió a realizar la caracterización macroscópica de *Bacillus subtilis* de cada UFC (Unidades Formadoras de Colonias), que creció en el agar; de acuerdo a lo

siguiente: tamaño de 2 a 4 mm de diámetro, aspecto liso, mucoide o rugoso; los bordes ondulados o extendidos en el medio (Realpe , Hernández, & Agudelo, 2002, pág. 108).

Las colonias caracterizadas como candidatas de *Bacillus subtilis* fueron resembradas, con ayuda de un asa microbiológica estéril en agar nutritivo y se incubó a 37°C por 48h, luego del tiempo de incubación se volvieron a seleccionar las colonias con características macroscópicas de *Bacillus subtilis*.

De cada colonia identificada como *Bacillus subtilis*, se realizó una nueva siembra con en agar nutritivo a 37°C por 48h, el procedimiento se repitió por 3 ocasiones hasta obtener cepas puras.

2.3.4. Caracterización de *Bacillus subtilis*

Luego de una previa identificación macroscópica, se realizaron pruebas de identificación microscópica y bioquímica con las colonias aisladas.

2.3.4.1. Tinción azul de metileno

Las características microscópicas se identificaron, mediante tinción con azul de metileno, para la cual se procedió a tomar una muestra con el asa microbiológica de un cultivo de 24h extendiendo la muestra en un portaobjetos, que previamente contenía colocado una gota de agua, se fijó la muestra con ayuda de la llama de un mechero calentando el portaobjetos hasta que el agua se evapore, se añadió unas gotas azul de metileno y se calentó hasta que este se evaporó, posteriormente se procedió a observar en el microscopio confirmando la morfología típica de un bacilo caso contrario la colonia se descartó.

2.3.4.2. Tinción de esporas

Se tomó una muestra con ayuda del asa microbiológica y se extendió en un portaobjetos, en el cual previamente se colocó una gota de ácido acético al 0.03%, la

muestra se fijó tras haber pasado varias veces el portaobjetos por la llama del mechero, se procedió a colocar unas gotas de solución verde brillante sobre la muestra y se calentó, hasta que la muestra emitió vapores, sin dejar que se secase colocando más colorante, una vez que dejaba de emitir vapores. El procedimiento se lo realizó por ocho minutos, una vez terminado este tiempo se lavó el exceso de colorante con agua destilada y finalmente se colocó una gota de safranina por 1 min, lavando con agua destilada para retirar el exceso de colorante se procedió a la observación al microscopio.

2.3.4.3. Pruebas API

Se realizó mediante el kit Microgen BACILLUS-ID MID-66, a partir de un cultivo de 24h se procedió a preparar una dilución 10^{-1} en 5ml de suero fisiológico estéril, mediante una micropipeta con puntas previamente esterilizadas, se transfirieron aproximadamente 100 μ l de la suspensión a cada pocillo de las tiras reactivas BAC I Y BAC 2, se procedió a incubar a 37°C durante 24 y 48h.

La lectura de las pruebas se realizó 24h y 48h después haber realizado la inoculación en cada pocillo, registrando los cambios de color como se observa en el anexo 7 y 8; verificando así la lectura positiva o negativa. Para realizar la lectura de 48h se añadió los reactivos correspondientes en cada pocillo indicado, se agregó en el pocillo 19 reactivo de kovacs, en el pocillo 20 una gota de nitrato A y una gota de nitrato B, la lectura se realizó después de 60seg, en el pocillo 23 se colocó una gota de reactivo VPI seguido de una gota de reactivo VPII, leyéndose la prueba después de 15min.

Los valores positivos o negativos fueron registrados en el formulario de informes adjunto en el kit anexo 9, se procedió a calcular la codificación y se interpretó utilizando el software MID.

2.4. Fase de laboratorio (Obtención de *Alternaria spp*)

Para la obtención de *Alternaria spp*; en la fase de laboratorio se procesaron las muestras de material vegetal recolectados en campo.

2.4.1. Siembra en superficie en caja petri

Se procede a recortar cuadrados de la zona en la cual se desarrolló el micelio del hongo y se realizó protocolo de desinfección colocando la muestra vegetal en solución de cloro al 0.5% por 2 min y enjuagándola con agua destilada, finalmente con una pinza estéril se coloca en medio PDA (Papa dextrosa agar) y se dejó en incubación entre 24 y 27°C con exposición a la luz (ver anexo 6).

2.4.2. Aislamiento y Purificación

Mediante un sacabocados estéril se selecciona una muestra de cada hongo, que se desarrolló en el agar, se sembró cada una de las muestras en medio PDA (Papa dextrosa agar), se incubo a 27 °C por 5 días con exposición a la luz, pasado el tiempo de incubación se procedió a seleccionar los hongos, que presentaban coloración verde oscuro, borde irregular, superficie plana polvosa- algodonosa características macroscópicas del género *Alternaria* (Arias Tauta & Jerez Ramirez, 2008).

De las colonias identificadas como *Alternaria*, se tomó una muestra y se sembró en medio PDA, repitiéndose este proceso 4 veces cada 5 días hasta la verificación de la pureza del microorganismo fúngico.

2.4.3. Caracterización *Alternaria spp*.

La caracterización morfológica macroscópica se realizó basándose en la descripción según Arias Tauta & Jerez Ramirez,(2008).

Para la caracterización morfológica microscópica se realizó una impronta con azul de lactofenol y se observó en el microscopio identificando las estructuras características

de *Alternaria spp*, se utilizó una clave de identificación de hongos y pseudohongos fitopatógenos comunes, mencionada por Vivienne Gepp (2009).

2.5. Pruebas de antagonismo

Las pruebas de antagonismo se realizaron utilizando la técnica de cultivos duales.

Se procedió a sembrar discos de *Alternaria spp* de 5mm de diámetro de manera equidistante con ayuda de una plantilla como se observa en el anexo 10, se incubó a 24°C durante 24h con exposición a horas luz y oscuridad; en cajas Petri con medio PDA artesanal, en total se sembraron 126 cajas.

También se realizó un cultivo de 24h con las cepas de *B. subtilis* (antagonista) en 10ml de caldo TSB (Trypticasa Soya Broth) el que se incubó a 37°C.

Una vez que se obtuvieron los cultivos de las diferentes cepas de *B. subtilis* (antagonista)

Para inocular *B. subtilis* (antagonista) en cajas de Petri con *Alternaria spp* previamente sembrado, como se observa en el anexo 11. Se procedió a verter el cultivo de caldo TSB en cajas Petri vacías y estériles, con la ayuda de una pinza estéril se sujetó un porta objetos estéril y se sumergió el filo de éste en la caja petri con el inóculo de *B. subtilis*, luego se inocula en la caja con *Alternaria spp* hundiendo suavemente el porta objetos en medio de la caja petri y se incubó a 24°C.

En total se realizaron 14 repeticiones de cada cepa de *B. subtilis* aislada e identificada, del control positivo (cepa ATCC 6633 *Bacillus subtilis subsp. spezzizenii*) y los testigos (*Alternaria spp*).

2.5.1. Lectura del ensayo y Escala de Bell (Competencia por sustrato)

Para la evaluación de la capacidad antagónica se midió: el tiempo de contacto entre el antagonista y el patógeno, durante 7 días, cada 24h a partir de la inoculación del antagonista, de la misma manera se midió crecimiento radial del antagonista y el patógeno (crecimiento expresado en mm) y la ubicación en la escala de Bell *et al.* (1982) citada por Calvo Araya *et al.*, (2012, pág 227), la cual se describe a continuación:

Tabla 4. Clases según la escala de Bell.

Clase	Descripción
1	El antagonista ocupa completamente la superficie del medio de cultivo cubriendo totalmente al patógeno
2	El antagonista llega a sobrepasar las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo
3	El antagonista y el patógeno colonizan cada uno aproximadamente la mitad de la superficie del medio y ninguno parece dominar al otro
4	El patógeno sobrepasa al crecimiento del antagonista colonizando tres cuartas partes de la caja Petri
5	El agente fitopatógeno llega a cubrir totalmente el plato Petri.

Nota: Tomado de *Agronomía Mesoamericana* (Calvo Araya, Rivera Coto, Orozco Cayasso, & Orozco Rodríguez, 2012, pág. 225).

Para obtener los valores en la siguiente tabla se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{C \times 100}{60} = \text{valor Escala de Bell}$$

C= Crecimiento del antagonista en el séptimo día.

Fuente: (Calvo Araya, Rivera Coto, Orozco Cayasso, & Orozco Rodríguez, 2012, pág. 225).

Tabla 5. Valores utilizados para la escala de Bell.

Clase		Rango
1	Muy bueno	≥ 60 mm
2	Bueno	< 60 mm y ≥ 40 mm
3	Deficiente	< 40 mm y ≥ 30 mm
4	Malo	< 30 mm y > 0
5	Muy malo	Igual a cero

Nota: Elaborado por: Ñacato. C & Valencia. M, 2015.

2.5.2. Porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC)

Porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC), se evaluó a los siete días utilizando la fórmula 2 propuesta por Skidmore y Dickinson (1976).

$$PIC = \frac{[C_1 - C_2]}{C_1} \times 100$$

C1= Crecimiento radial del testigo

C2= crecimiento radial del fitopatógeno en los tratamientos de cultivo dual.

Fuente: (Calvo Araya, Rivera Coto, Orozco Cayasso, & Orozco Rodríguez, 2012, pág. 225).

2.6. Conservación de las cepas *Bacillus subtilis*

Las cepas de *B. subtilis* una vez aisladas y caracterizadas se conservaron en tubos de agar inclinado y se incubaron a 37°C hasta observar crecimiento, una vez que se verificó crecimiento se procedió a colocar aceite de vaselina estéril en los tubos pasándolos finalmente a refrigeración para su conservación a 4 °C.

2.7. Análisis estadístico

Para el análisis de varianza se realizó una ANOVA de una vía, en la que se determinó diferencias estadísticas significativas entre tratamientos para la distribución,

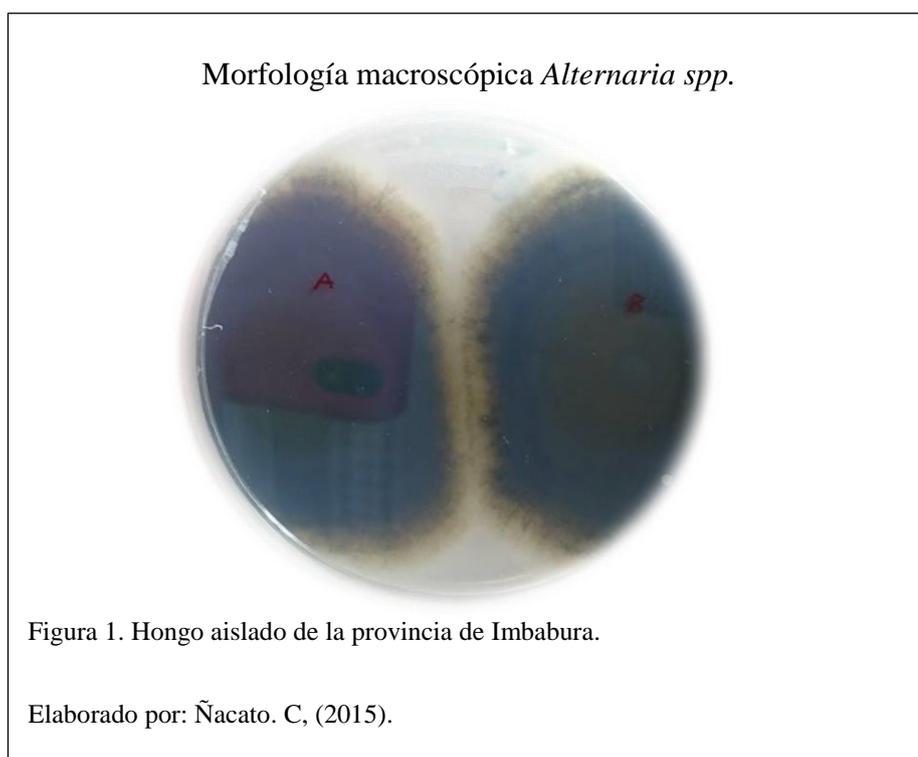
Seguido se realizó una *prueba a posteriori*, Tukey 5%, en el programa Infostat versión 2013.

Capítulo 3:

Resultados y discusión

3.1. Caracterización morfológica de *Alternaria spp.*

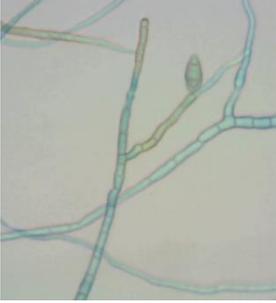
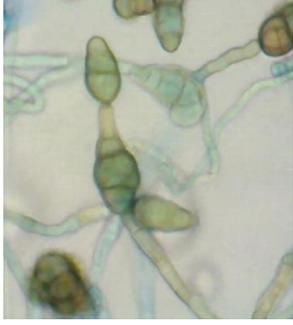
Como se muestra en la figura a continuación, las características morfológicas macroscópicas del hongo aislado de las muestras vegetales de la provincia de Imbabura, presenta color oscuro negro u oliváceo, plano de borde irregular, la superficie se presenta visiblemente plana polvosa-algodonosa; características que son similares a las descritas por Arias Tauta & Jerez Ramirez (2008) para el género *Alternaria spp.*



3.2. Caracterización microscópica de *Alternaria spp.*

A continuación se muestran las características microscópicas del hongo perteneciente a la provincia de Imbabura. Las estructuras identificadas del hongo aislado presentaron: conidióforos ramificados de coloración oscura, septado de manera

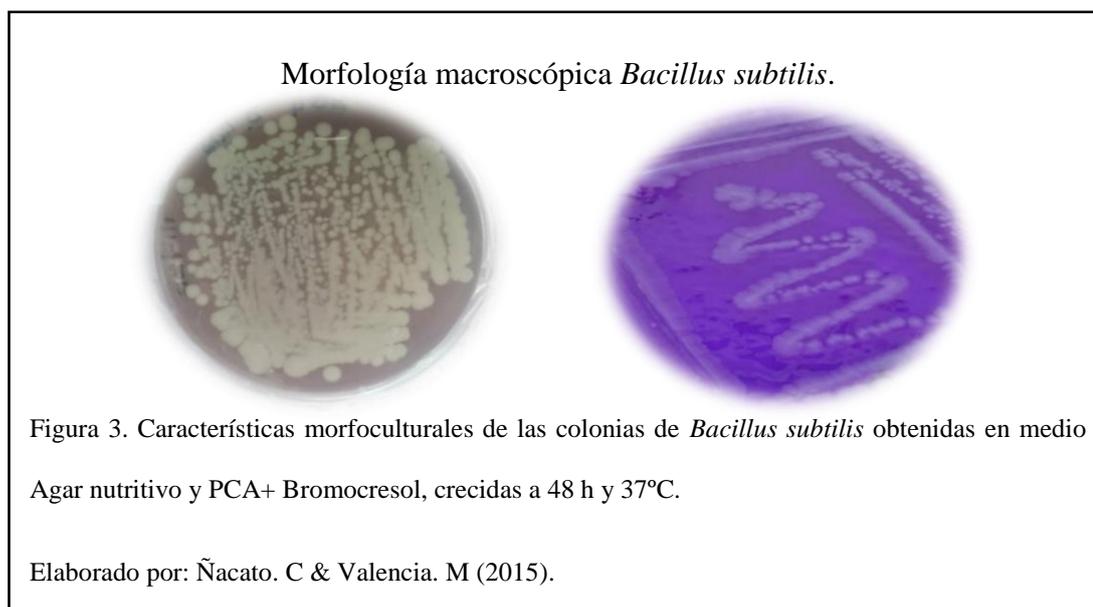
transversal o longitudinal; los conidios mostraron septos transversales o longitudinales, de coloración café o verde, pared lisa, dispuestos en cadena, de forma ovoide por lo que el hongo aislado mostro semejanza con las estructuras identificadas por Barnett & Hunter, (1998).

Morfología microscópica <i>Alternaria spp.</i>	
Identificación Barnett (1998)	Identificación Impronta
 <p>Alternaria</p>	
 <p>Conidióforos</p>	
 <p>Conidios</p>	
<p>Figura 2. Hongo aislado de la provincia de Imbabura vista microscópica lente 40X.</p> <p>Elaborado por: Ñacato. C, (2015).</p>	

De las caracterizaciones anteriores, se confirmó la identidad del hongo como *Alternaria spp*, mediante la clave de identificación para hongos y pseudohongos fitopatógenos de Vivienne Gepp, (2009), ya que en el hongo se observó únicamente estructuras reproductivas y/o micelio, que le daban una apariencia algodonosa, conidios formados sobre conidióforos largos o cortos de manera libre no dentro de estructuras fructíferas, conidios pluricelulares, con varios tabiques de coloración oscura, forma clava alargada, con varios tabiques transversales y algunas longitudinales; se determinó el siguiente resultado en la clave de la siguiente manera Clave IV: CC-Q-RR-UUU que corresponde *Alternaria spp*.

3.3. Caracterización macroscópica de *Bacillus subtilis*.

Se identificaron macroscópicamente las colonias que crecieron en el medio de cultivo PCA (Plate Count Agar) + Bromocresol, se seleccionaron como cepas candidatas de *Bacillus subtilis* a aquellas que presentaron color blanco o crema, tamaño aproximado de 2 a 4 mm de diámetro, aspecto liso, mucoso o rugoso, bordes ondulados o extendidos en el medio como se aprecia en la figura 3; estas características de la bacteria *Bacillus subtilis* concuerdan con las descritas por Realpe , Hernández y Agudelo (2002).



Se obtuvieron un total de 28 cepas aisladas candidatas de *Bacillus subtilis*, de las cuales 6 fueron aisladas de la provincia de Imbabura, 7 de la provincia de Tungurahua y 15 de la provincia de Cotopaxi, para el manejo de cada colonia se procedió a identificarlas mediante códigos como se puede observar en la tabla a continuación.

Tabla 6. Cepas aisladas.

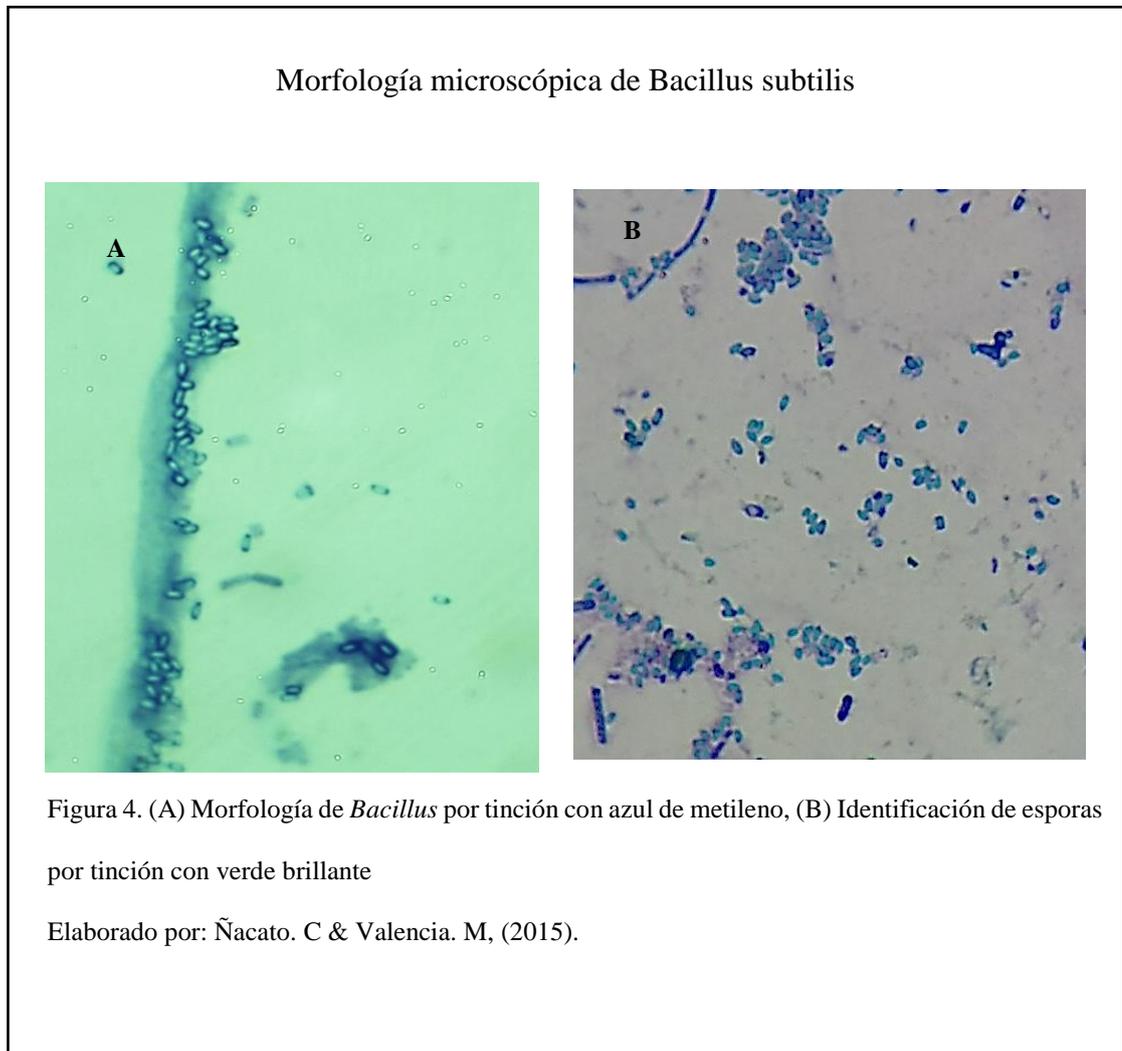
Código	Provincia	Código	Provincia
IB-6	Imbabura	CT-14	Cotopaxi
IB-13 A	Imbabura	CT-24	Cotopaxi
IB-13 B	Imbabura	CT-7 A	Cotopaxi
IB 11	Imbabura	CT-2 A	Cotopaxi
IB-1	Imbabura	CT-1	Cotopaxi
IB-3	Imbabura	CT-12	Cotopaxi
AB-15	Tungurahua	CT-8	Cotopaxi
AB-4 B	Tungurahua	CT-10	Cotopaxi
AB-8	Tungurahua	CT-9	Cotopaxi
AB-4 A	Tungurahua	CT-4	Cotopaxi
AB-2	Tungurahua	CT-6	Cotopaxi
AB-3	Tungurahua	CT-5	Cotopaxi
AB-10	Tungurahua	CT-15	Cotopaxi
CT-3	Cotopaxi	CT-11	Cotopaxi

Nota: Elaborado por: Ñacato.C& Valencia. M, 2015

3.4. Caracterización microscópica de *Bacillus subtilis*

La caracterización microscópica de los 28 microorganismos aislados se basó en las siguientes características: Bacilos gram positivos de aproximadamente 0,8 mm

dediámetro por 2 a 3 mm de largo con bordes redondeados, *Bacillus subtilis* presentan esporas esféricas y centrales que no deforman el bacilo como se aprecia en la figura 4 se obtuvo 14 microorganismos aislados, cuyas características que coincidieron con las definidas por Realpe , Hernández y Agudelo, (2002)



En la siguiente tabla se muestran las 14 cepas candidatas, cuya morfología microscópica es semejante a la mencionada por Realpe , Hernández y Agudelo, (2002)

Tabla 7. Cepas aisladas caracterizadas microscópicamente.

Códigos	Procedencia	Códigos	Procedencia
IB-6	Imbabura	CT-8	Cotopaxi
AB-3	Tungurahua	CT-11	Cotopaxi
AB-4	Tungurahua	CT-6	Cotopaxi
AB-10	Tungurahua	CT-7	Cotopaxi
AB-15	Tungurahua	CT-15	Cotopaxi
AB-2	Tungurahua	CT-1	Cotopaxi
CT-5	Cotopaxi	CT-12	Cotopaxi

Nota: Elaborado por: Ñacato. C & Valencia. M, (2015).

3.5. Pruebas API para *Bacillus subtilis*

Se confirmó la identidad mediante pruebas API de 7 cepas como *Bacillus subtilis* descritas en la tabla a continuación.

Tabla 8. Cepas pertenecientes al género *Bacillus subtilis*.

Códigos	Procedencia	Identificación
IB-6	Imbabura	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>licheniformis</i>
AB-3	Tungurahua	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>licheniformis</i>
AB-4	Tungurahua	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>licheniformis</i>
AB-10	Tungurahua	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>licheniformis</i>
CT-5	Cotopaxi	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>licheniformis</i>
CT-8	Cotopaxi	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>pumilis</i>
CT-11	Cotopaxi	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>

Nota: Elaborado por: Ñacato. C & Valencia. M, (2015).

3.6. Pruebas de antagonismo

En el análisis de varianza, como se muestra en la siguiente tabla, se detectaron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos para la distribución, es decir que existe una diferencia en al menos uno de los tratamientos de *Bacillus subtilis* frente al patógeno *Alternaria spp* en comparación al resto ($p < 0,0001$), por lo cual se acepta la hipótesis alternativa determinado que el microorganismo *Bacillus subtilis*, presenta actividad biocontroladora del hongo fitopatógeno *Alternaria spp*.

Tabla 9. Análisis de varianza antagonista y patógeno (SC tipo III).

Análisis de varianza antagonista (SC tipo III).					
F.V	S.C	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2537,43	7	362,49	20,67	<0,0001
Cepa	2537,43	7	362,49	20,67	<0,0001
Error	1824,04	104	17,54		
Total	4361,47	111			

Análisis de varianza patógeno (SC tipo III).					
F.V	S.C	gl	CM	F	p-valor
Modelo	15980,67	8	1997,58	55,87	<0,0001
Alternaria	15980,67	8	1997,58	55,87	<0,0001
Error	4183,39	117	35,76		
Total	20164,06	125			

Nota: Elaborado por: Nacato. C & Valencia. M, (2015).

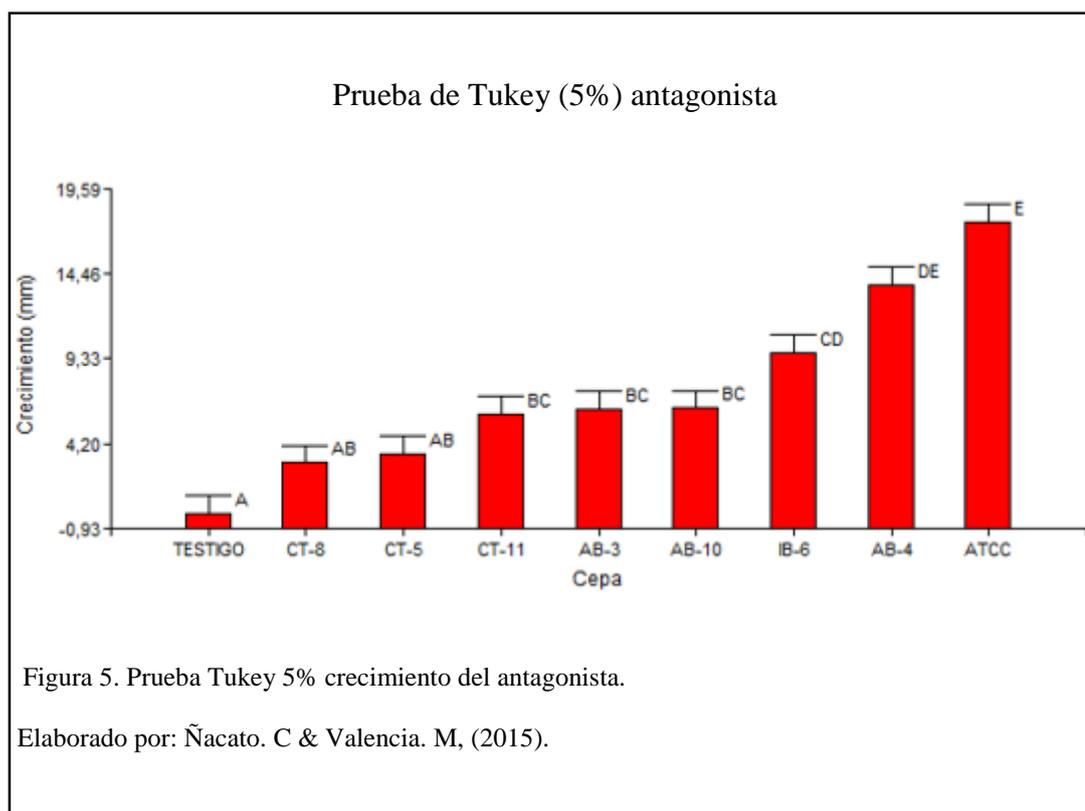
En el crecimiento del antagonista se obtuvo un coeficiente de variación de 50,48% como se muestra en el análisis de varianza en la tabla a continuación.

Tabla 10. Análisis de varianza Antagonista.

Variable	N	R1	R1 Aj	CV
Crecimiento (mm)	112	0,58	0,55	50,48

Nota: Elaborado por: Ñacato. C & Valencia. M, (2015).

Se diferenciaron cinco rangos de significación (A), (AB), (C), (CD) y (D) como se observa en la figura 5. En el rango D se ubica la cepa ATCC 6633 con un crecimiento promedio de 17,60; seguido de la cepa AB-4 la cual se ubica en el rango CD con un crecimiento promedio de 13,78; valores de crecimiento altos en comparación con el resto de cepas, queriendo decir que las cepas AB-4 y ATCC 6633 lograron un desarrollo significativo sobre el patógeno, lo que demuestra la existencia de actividad.



En cuanto al crecimiento del patógeno se obtuvo que el coeficiente de variación obtenido fue de 12,91% como se observa en la tabla 11 ; se establecieron diferencias

significativas en el crecimiento de *Alternaria spp*, puesto que se diferenciaron seis rangos de significación (A), (B), (BC), (BCD), (CD) y (D) mostrados en la figura 6.

Tabla 11. Análisis de Varianza Patógeno.

Variable	N	R1	R1 Aj	CV
crecimiento (mm)	126	0,79	0,78	12.91

Nota: Elaborado por: Ñacato. C & Valencia. M, (2015).

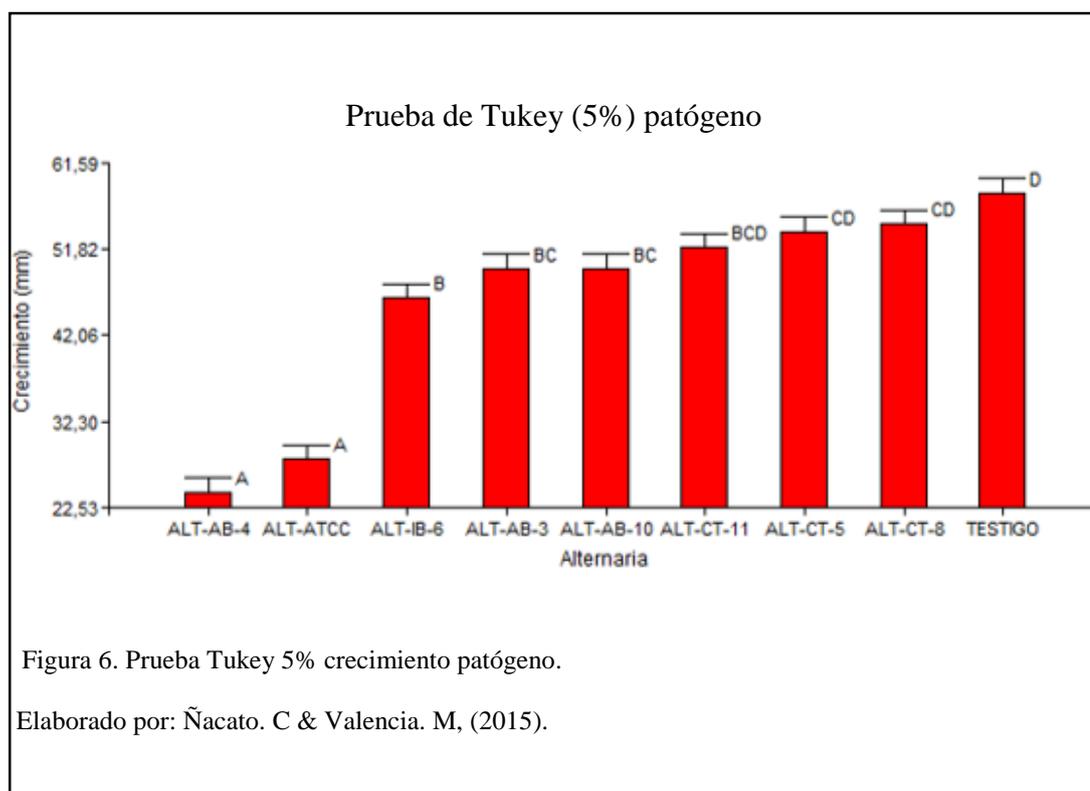


Figura 6. Prueba Tukey 5% crecimiento patógeno.

Elaborado por: Ñacato. C & Valencia. M, (2015).

En el rango A se ubicaron las cepas ALT- AB-4 y ALT-ATCC 6633 con valores promedio de crecimiento bajos en comparación al resto de cepas, lo que nos dice que existió actividad antagónica de las *Bacillus subtilis* razón por la cual se ve afectado el crecimiento de *Alternaria spp*.

3.6.1. Antagonismo in vitro de *Bacillus subtilis* (competencia por sustrato)

Empleando la fórmula 2 se obtuvieron los siguientes valores mostrados en la tabla a continuación para la Escala de Bell:

Tabla 12. Valores crecimiento al séptimo día del antagonista para evaluación en la Escala de Bell.

IB-6	ATCC	CT-11	CT-8	AB-3	AB-4	AB-10	CT-5
34	57	-	19	17	67	23	-
32	60	30	-	71	32	44	-
36	56	-	-	51	47	30	36
34	49	37	13	-	43	42	8
35	66	33	-	31	53	34	32
30	60	-	28	-	35	17	7
38	83	18	-	31	44	26	-
32	49	-	19	20	32	29	-
35	53	-	29	20	45	11	28
31	74	23	-	33	47	27	17
31	73	32	18	-	46	-	-
24	45	30	-	-	54	13	-
21	39	20	-	-	47	-	23
37	57	57	17	20	51	-	17

Nota: Elaborado por: Ñacato. C & Valencia. M, (2015).

De acuerdo a los valores obtenidos para sacar la escala de Bell se obtuvieron los siguientes porcentajes de capacidad antagónica por competencia

Tabla 13. Antagonismo por competencia de sustrato.

Cepa	Clase 1	Clase 2	Clase 3	Clase 4	Clase 5
IB-6	0%	0%	86%	14%	0%
AB-3	7%	7%	21%	29%	36%
AB-4	7%	72%	21%	0%	0%
AB-10	0%	24%	21%	43%	12%
CT-5	0%	0%	14%	43%	43%
CT-8	0%	0%	7%	43%	50%
CT-11	0%	7%	37%	21%	34%
ATCC 6633	43%	57%	0%	0%	0%
ANTAGONISMO	7.13%	21.86%	25.75%	24.13%	21.13%
TOTAL					

Nota: 1 Muy bueno, 2 Bueno, 3 Deficiente, 4 Malo, 5 Muy malo;

Elaborado por: Ñacato. C & Valencia. M, (2015).

Con los porcentajes de antagonismo obtenidos se ubicó a las distintas cepas aisladas conforme a la capacidad antagónica mostrada de acuerdo a las 5 clases de la Escala de Bell, quedando como se muestra en la tabla a continuación.

Tabla 14. Clasificación según escala de Bell.

Cepa	Clase
IB-6	3
AB-3	5
AB-4	2
AB-10	4
CT-5	5
CT-8	5
CT-11	3
ATCC 6633	2

Nota: Elaborado por: Ñacato. C & Valencia. M, (2015).

Conforme a los datos presentados en las tablas 12 a la 14, según la escala de Bell y otros (1982) el antagonismo entre *Bacillus subtilis* y *Alternaria spp* se dio de la siguiente manera: la cepa AB-4 con un valor de 72% y la cepa ATCC 6633 con el 57%, se ubicaron en la clase 2 al evaluarse como antagonista de *Alternaria spp*.

En el ensayo se obtuvo un 21,86% de antagonismo de los tratamientos en la clase 2, y un valor de 25,75% en la clase 3, valores evaluados según la escala de Bell, lo que nos dice que solo el 21,86% de los tratamientos sobrepasaron las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo y el 25,75% mostró crecimiento sin dominarse el uno sobre el otro.

Sin embargo el porcentaje de antagonismo *in vitro* es muy similar a los porcentajes obtenidos con un 24,13% en clase 4 y 21,13% en clase 5, lo que nos indica que el hongo presentó mayor agresividad o resistencia al ataque de las cepas de *Bacillus*

subtilis, puesto que en esta clase el patógeno presentó mayor crecimiento en el medio que el antagonista, lo que se pudo deber a causa de algunos factores mencionados por Caiza Chamorro (2013), como son: la adaptabilidad de cepa al medio de cultivo, la disponibilidad de nutrientes, las distintas condiciones ambientales de los sitios de colecta de los cuales se aislaron las diferentes cepas, la diferencia entre especies y genética pese a haber sido identificadas como semejantes.

Por tanto las mejores cepas con los valores más altos fueron: la cepa AB-4 (*B. subtilis subsp. licheniformis*) y ATCC 6633 (*B. subtilis subsp. spizizenii*).

Se demuestra así, que las cepas *Bacillus subtilis* presentan actividad antagónica, por competencia, puesto que este género de bacterias al ser también promotoras de crecimiento vegetal compiten por la adquisición de nutrientes, Tejera, Rojas y Heydrich (2011), mencionan en su artículo el mecanismo mediante el cual actúa *Bacillus subtilis*, para competir por uno de los nutrientes esenciales en desarrollo de cualquier organismo como lo es el hierro (Fe^{3+}).

Las bacterias producen y excretan los sideróforos, una vez que es secuestrado el hierro del medio, el complejo sideróforo-hierro es reconocido por receptores específicos de membrana y una vez dentro de la célula, se deposita en un sitio específico por un proceso que involucra un intercambio de ligandos que puede estar precedido o no por la reducción del hierro o por la hidrólisis del sideróforo (Osorio, 2007, pág. 3621).

Cabe recalcar que los sideróforos, producidos por *Bacillus subtilis*, tienen mayor afinidad por los compuestos de hierro (Robles Carrión, 2011, págs. 20-21).

Por lo tanto, el agente patógeno, que compite con *Bacillus subtilis* por el hierro de manera ineficiente, es un patógeno cuyo desarrollo se ve afectado como es el caso de *Alternaria spp*, además de que la deficiencia de este elemento afecta a su sistema enzimático, como menciona Benavides Mendoza (2008); impidiéndole sintetizar micotoxinas necesaria para ejercer su acción patogénica.

3.6.2. Evaluación del efecto antibiótico

La cepa AB-4 presento el valor más alto de inhibición de crecimiento con un PIC de 58%, seguido por la cepa ATCC 6633 que presento un PIC de 52%, valores superiores al resto de cepas las cuales presentaron valores de PIC menores al 50% como se aprecia en la tabla a continuación, se observan diferencias significativas entre las diferentes cepas.

Tabla 15. Porcentaje de inhibición del crecimiento.

TRATAMIENTO	PIC
AB-4	58%
ATCC 6633	52%
IB-6	20%
AB-3	15%
AB-10	15%
CT-11	10%
CT-5	8%
CT-8	6%

Nota: Elaborado por: Ñacato. C & Valencia. M, (2015).

De lo anterior mencionado se obtuvo que la cepa AB-4 es la más efectiva, debido a que presentó la mayor concentración de metabolitos inhibitorios, ya que la capacidad

antagónica de *Bacillus subtilis* radica principalmente en su capacidad de producir distintos metabolitos con capacidad antifúngica y antibacteriana, dentro del grupo de metabolitos antifúngicos se encuentran las surfactinas, fengicinas e iturinas; además de una gran variedad de enzimas líticas entre las cuales se destacan lipasas, proteasas y β glucanasas (Tejera, Rojas, & Heydrich, 2011; Layton *et al.* 2011, Yesid & Sánchez, 2012).

Sin embargo, el mecanismo de antibiosis utilizado por *Bacillus subtilis* involucra la interacción de más de uno de estos metabolitos, para ejercer su actividad fungicida biocontroladora, además de la especificidad que posea contra el patógeno, Yesid & Sánchez (2012) y Yáñez Mendizábal (2012), mencionan que la familia de las surfactinas no son sustancias con actividad fungicida, estas muestran actividad antifúngica en sinergismo con iturina A; a diferencia de las iturinas, ya que estas muestran actividad antifúngica e inhibitoria contra una gran variedad de patógenos, las fengicinas presentan actividad fungitóxica fuerte, especialmente contra hongos filamentosos, hecho que explica el bajo valor de PIC, que obtuvieron el resto de cepas, es por ello que resulta razonable pensar que la cepa AB-4 y ATCC 6633 presentan mayor concentración, mejor interacción y especificidad de los metabolitos secretados contra el patógeno a diferencia del resto de cepas que a pesar de haber secretado estos metabolitos no hubo interacción entre estos o no tuvieron afinidad contra el patógeno.

La variabilidad de la acción antagonista entre las diferentes cepas se debe a que esta actividad es muy cambiante entre microorganismos, ya que estos se expresan dependiendo de las condiciones ambientales en las que se encuentre, entre otros factores (Calvo *et al.*, 2012, pág. 230).

Conclusiones

Se logró aislar y purificar 28 cepas nativas provenientes de cultivos de brócoli pertenecientes a las provincias de Imbabura, Tungurahua y Cotopaxi; las cuales fueron sometidas a pruebas morfológicas macro y microscópicas, y bioquímicas llegando a obtener solo 7 cepas que se confirmaron como *Bacillus subtilis*.

Las cepas aisladas de *Bacillus subtilis* mostraron capacidad antagónica en las pruebas *in vitro* realizadas contra el hongo fitopatógeno *Alternaria spp*, ya que se evidenció que el crecimiento del patógeno *Alternaria spp*, se vio afectado significativamente por dos cepas con valores de PIC de 58% y 52%, demostrando que las cepas antagonistas aisladas de *Bacillus subtilis* poseen potencial como controladores biológico contra el hongo fitopatógeno *Alternaria spp*.

Se determinó que el tratamiento AB-4 (cepa nativa) es la mejor cepa con capacidad antagónica de entre las 7 que se logró aislar porque obtuvo los mejores resultados, ubicándose en Clase 2 según la escala de Bell y en el rango A de la prueba de Tukey al 5%, incluso llegando a superar al control positivo que fue la cepa ATCC 6633.

Recomendaciones

De los resultados obtenidos en esta investigación la cepa AB-4 debe ser considerada para posteriores estudios en campo debido al potencial antagónico mostrado frente a *Alternaria spp.*

Para futuras investigaciones es recomendable evaluar la actividad antagónica de la cepa AB-4 en diferentes condiciones ambientales.

Se recomienda además probar inóculos combinados con otros hongos endófitos antagonistas.

Referencias

- Acurio, D. V. (2007). *Aislamiento, caracterización y pruebas de eficiencia in vitro y bajo invernadero de cepas de Bacillus subtilis para control de Phytophthora infestans, con el fin de establecer un banco de microorganismos*. (Tesis). Obtenido de <http://repositorio.espe.edu.ec/>
- Arias Tauta, J. K., & Jerez Ramirez, 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*. Quito: (Tesis, Pontificia Universidad Javeriana). Obtenido de <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis223>
- Barnett. (1960). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. Virginia: Burgess Publishing Company.
- Barnett, & Hunter. (1998). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. Virginia: APS Press St Paul.
- Benavides mendoza, A. (27 de febrero de 2008). *Fisiología, Absorción y Asimilación de Hierro en las Plantas*. Argentina: Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
- Bettioli, W., & Rivera, M. (16 de junio de 2012). *Control Biológico de Enfermedades de Plantas en América Latina y el Caribe*. 09-10. Obtenido de http://ugi.espe.edu.ec/ugi/wp-content/uploads/2014/05/Control_biologico_de_enfermedades_de_plantas_en_America_Latina_y_el_Caribe_2014
- Biocrawler*. (2006). Recuperado el 29 de mayo de 2015, de http://www.biocrawler.com/encyclopedia/Bacillus_subtilis

- Bonilla, C. G. (2005). *Evaluación de cuatro productos orgánicos en el combate de plagas y enfermedades para la producción de brócoli (Brassica oleracea Vr. Itálica) en Yaruqui*. (Tesis, Escuela Politécnica del Ejército). Obtenido de <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/5038/1/T-ESPE-IASA%20I-002882>
- C., K. (1994). Genes Involved in Self-Protection against the Lantibiotic Subtilin Produced by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. *Applied and environmental microbiology*, 2793.
- Cadena Yamchapaxi, D. R. (2011). *Efecto de tres dosis en tres épocas de aplicación de pyraclostrobin (COMET®) en el control de la mancha*. (Tesis, Universidad Técnica de Cotopaxi). Obtenido de <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/775/1/T-UTC-0598>
- Caiza Chamorro, V. E. (2013). *Colección, identificación y pruebas de eficacia in vitro de (Trichoderma sp) en el control biológico de (Botrytis cinerea) en la finca florícola picasso roses*. (Tesis, Universidad Politécnica Salesiana). Obtenido de <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5073/1/UPS-CYT00104>
- Calva, J. A., & Rivera, G. (2012). Aislamiento y Evaluación in vitro de Antagomnistas de Botritis cinerea en Mora. *Agronomía Mesoamericana*, 227.
- Calvo Araya, J., Rivera Coto, G., Orozco Cayasso, S., & Orozco Rodríguez, R. (2012). *Agronomía Mesoamericana*. 225-231. doi:<http://dx.doi.org/10.15517/am.v23i2.6481>
- Cóndor, P. (2014). *Instituto de Desarrollo y Medio Ambiente*. Obtenido de <http://idmaperu.org/idma/portfolio/control-biologico-de-polilla-en-brocoli-con-bacillus-thuringiensis/>

- Fraire, M., & Nieto, D. (04 de mayo de 2010). *Alternaria tenuissima*, *A. alternata* y *Fusarium oxysporum* Hongos Causantes de la Pudrición del Florete de Brócoli. 25-33. México: Revista mexicana de Fitopatología.
- Fuenmayor, M. (2000). *Plaguicidas microbianos: una alternativa de control biológico*. Obtenido de <http://www.ceniap.gov.ve/publica/divulga/fd52/plaguicidas.htm>
- Gepp, V. (agosto de 2009). Clave para identificar hongos y pseudohongos fitopatógenos comunes .
- Guédez, C., Castillo, C., & Cañizales, L. (2009). Control biológico: Una herramienta para el desarrollo sustentable y sostenible. *Academia*, 58.
- Klein, C. (1994). Genes Involved in Self-Protection against the Lantibiotic Subtilin Produced by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. *Applied and environmental microbiology*, 2793.
- Layton, C., & Maldonado, E. (2011). *Bacillus* spp.; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. *NOVA*, 179.
- Layton, C., Maldonado, E., Monroy, L., Corrales, L., & Sánchez, L. (noviembre de 2011). *Bacillus* spp.; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. 177-187. Bogotá, Colombia: Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.
- MICROGEN BIOPRODUCTS. (2015). Microgen BACILLUS-ID. *Sistema de identificación para la especie y los géneros del bacilo mésofilo procedentes de fuentes alimenticias y clínicas*.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca. (2013). Brócoli. Quito, Ecuador: Coordinación General del sistema de Información General.

- Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca. (2014). Boletín Situacional Brocolí. Quito, Ecuador: Coordinación General del Sistema de Información Nacional.
- Montoya Romero, M. I. (2012). *Las Cepas ATCC - Herramienta indispensable en el Control de Calidad Interno en Microbiología*. Colombia: ICMT.
- Osorio, N. (2007). A review on beneficial effects of rhizosphere bacteria on soil nutrient availability and plant nutrient uptake. *Rev Fac Nal Agr Medellín*, 3621-3643.
- Perez, L. (2005). *Bases moleculares del control biológico de fitopatógenos. Experiencia Chilena*. Obtenido de http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_agronomicas/montealegre_j/2.html
- Pérez, R., Gonzalez, T., & Muñoz, J. (2014). An antagonismo microbiano asociado a cepas bacterianas provenientes de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) y Maíz (*Zea mays*). *Revista Iberoamericana de Ciencias*.
- Philippi, L. (09 de noviembre de 2010). Aspectos gerais e morfológicos de *Alternaria* spp. *Estudos em Doenças de Plantas*, 01-02. Recuperado el 29 de mayo de 2015
- Prieto, V. (2009). *Control Biológico*. Obtenido de <http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/cursos/fitopato/praticas/cbiologico.html>
- Realpe, M. E., Hernández, C. A., & Agudelo, C. I. (enero de 2002). *Revista biomedica*. Obtenido de Especies del género *Bacillus*: Especies del género *Bacillus*: morfología macroscópica y microscópica: <http://www.revistabiomedica.org>
- Revelo, R., Ruíz, M., & Oña, J. (2009). *Perfil de Brócoli*. CICO. Recuperado el 29 de mayo de 2015

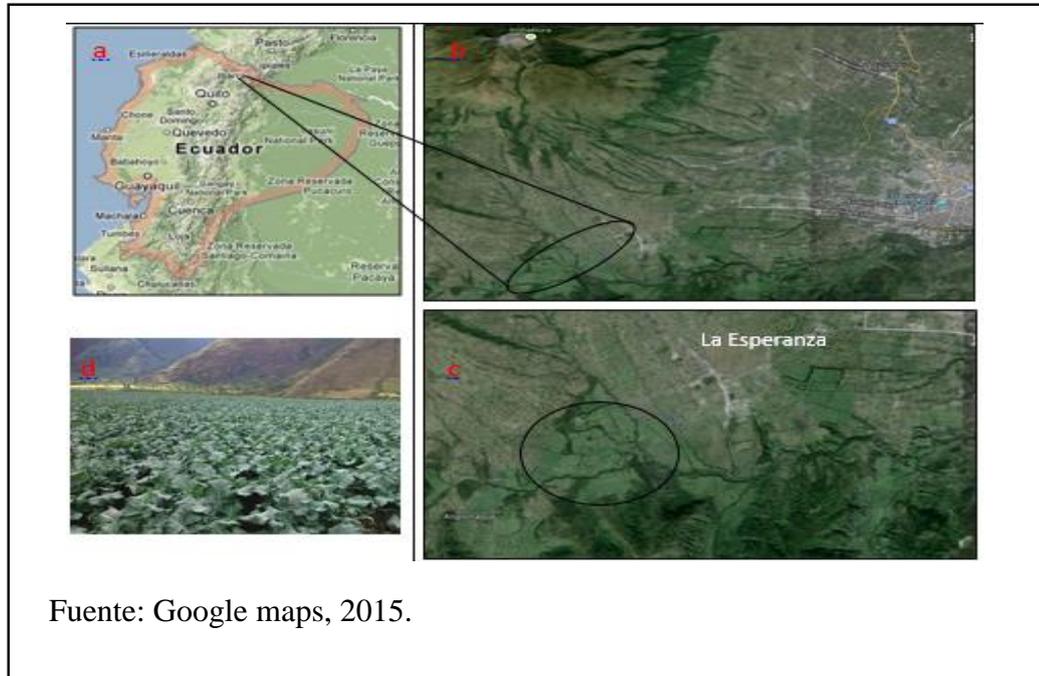
- Robles Carrión, A. R. (2011). *Evaluación de microorganismos antagonistas y sustancias naturales en el control de enfermedades foliares en tomate*. (Tesis de maestría, Universidad Central Marta Abreu de las Villas). Obtenido de <http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/bitstream/28000/335/1/T-SENESCYT-0105>
- Rodríguez, B. (2003). Evaluación de materiales de soporte para la formulación de la bacteria antagonista *B. subtilis* para el control de *Moniliophthora roreri* en *Theobroma cacao*. (Tesis). Obtenido de <http://repositorio.espe.edu.ec>
- Romero Pinto, M. (2003). *Producción Ecológica Certificada de hortalizas de clima frío*. Bogotá, Colombia: Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Recuperado el 29 de mayo de 2015
- Rubio, V. (2005). Control biológico de plagas y enfermedades de los cultivos. Madrid: CCMA-CSIC.
- Salint. (2007). *UNAVARRA.ES*. Obtenido de <http://www.unavarra.es/genmic/salint/microbiologia.pdf>
- Sánchez, M., & Romero, R. (2005). Manejo de las principales plagas del repollo, brócoli, coliflor. *Divulgativo CENIAP*.
- Santoyo, J. A., & Martínez, C. O. (2011). *Tecnología de producción de brócoli*. Sinaloa: Rp.
- Serrato, L., & French, R. (19 de septiembre de 2011). Mancha foliar del Repollo por *Alternaria*. *AgriLIFE EXTENSION*, 1. Recuperado el 29 de mayo de 2015
- Skidmore, A., & Dickinson, C. (s.f.). Colony interactions and hyphal interference between *Septoria nodorum* and phylloplane fungi. *Transactions of British Mycological Society*.

- Tejera, B., Rojas, M., & Heydrich, M. (diciembre de 2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *CENIC Ciencias Biológicas*, 131-138.
- Vivienne Gepp. (septiembre de 2009). *Curso de Fitopatología*. Obtenido de <http://www.pv.fagro.edu.uy>
- Yáñez Mendizábal, V. d. (2012). *Potencial de la cepa CPA-8 de Bacillus subtilis como agente de biocontrol de enfermedades de postcosecha de fruta*. Lleida: (Tesis, Universitat de Lleida). Obtenido de <http://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/80456/Tvrym1de1.pdf?sequence=1>
- Yesid, A., & Sánchez, L. (septiembre de 2012). *Determinación de metabolitos secundarios a partir de Bacillus subtilis efecto biocontrolador sobre Fusarium sp.* Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702012000200002

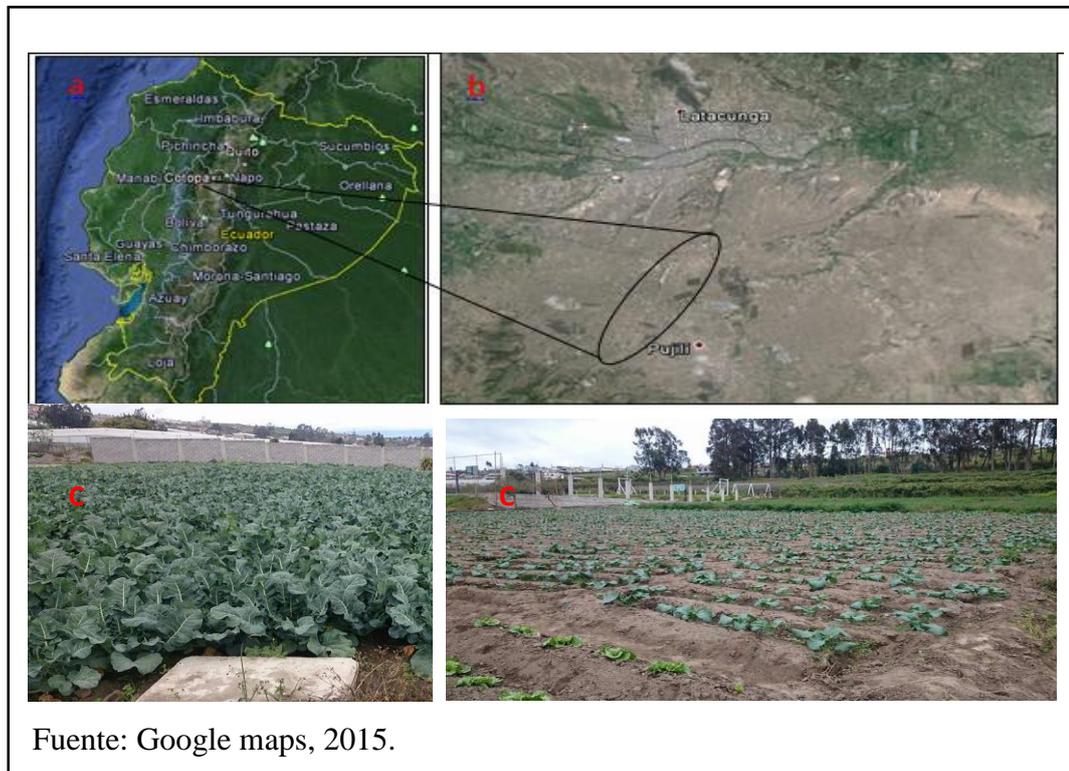
Anexos

Anexo 1. Ubicación zonas de muestreo.

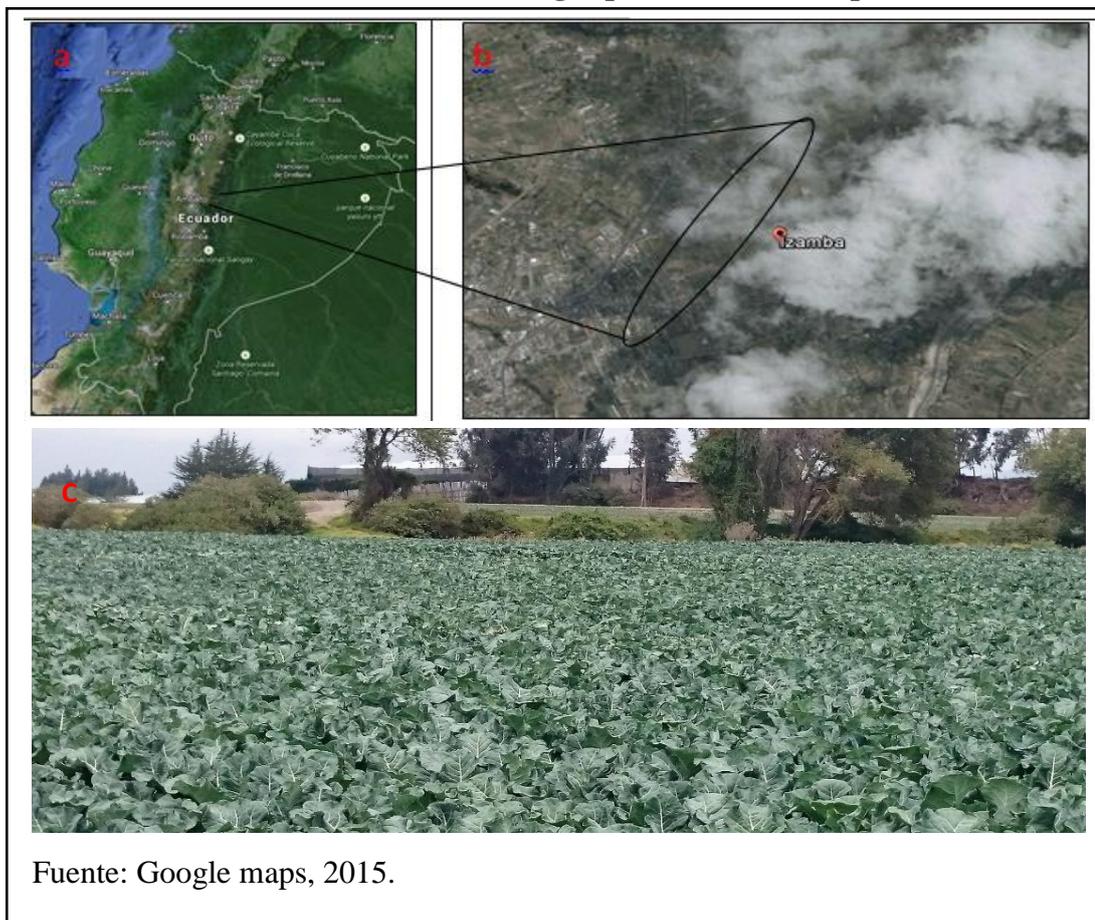
a) Ubicación hacienda la Verbena provincia de Imbabura.



b) Ubicación parroquia Izamba provincia de Tungurahua.



c) Ubicación hacienda la Selva Alegre provincia de Cotopaxi.



Fuente: Google maps, 2015.

Anexo 2. Ficha uso del suelo provincia de Imbabura.

		Total Anual	
Clima	Precipitaciones	800 mm	
	Temperatura	17°C	
	Media		
	Humedad	80%	
	Media		
Geomórfica	MO %	Textura	Profundidad
	6	Franco arcilloso	1m
Georreferenciación	Coordenadas	Altitud	Provincia/Parroquia/Barrio
	X:0.266667 Y: -78.1	2550	Imbabura, La Esperanza, La Verbena
Historia Agronómica	Uso de la tierra	Agrícola	
	Cultivo	Brócoli	
	Rotación de cultivos	Quinua, vicia, cebada	
	Frecuencia de cultivo	Permanente	
	Fertilización	Orgánica	
	Manejo de residuos	Frascos, canecas, sacos de insumos son enviados a planta central para entrega al gestor ambiental	
	Rendimiento del cultivo	16 ton/ha	

Nota: Elaborado por: Ñacato. C & Valencia. M, (2015).

Anexo 3. Ficha uso de suelo provincia de Tungurahua.

	Precipitaciones	Media Anual	Total Anual
		41,9 mm	503,6 mm
Clima	Temperatura Media	14,6 °C	
	Humedad	68,57 %	
	Media		
	MO %	Textura	Profundidad
Geomórfica	1,8	Franco	> 1m
		Arenosa	
	Coordenadas	Altitud	Provincia/Parroquia/Barrio
Georreferenciación	X 770034.76815062	2590 msnm	Tungurahua/Izamba/San
	Y 9864922.60691711		Francisco
	Uso de la tierra	Cultivo de Hortalizas	
	Cultivo	Brócoli	
	Sistemas de siembra	Canteros	
	Rotación de cultivos	Entre las diferentes familias	
	Frecuencia de cultivo	Cultivo permanente	
Historia Agronómica	Fertilización	Química: (Urea/10-30-10 /Fertilizantes foliares)	
		Orgánica: Majada de Ganado vacuno	
	Manejo de residuos	Incorporación en suelos	
	Rendimiento del cultivo	12-14 Tm/Ha	
	Practicas Convencionales	Rascadillo/ Fertilización/ Aporques	

Nota: Elaborado por: Ñacato. C & Valencia. M, (2015).

Anexo 4. Ficha uso del suelo provincia de Cotopaxi.

	Precipitaciones	Total Anual	
		679 mm	
Clima	Temperatura	12 °C	
	Media		
	Humedad		
	Media	60%	
	MO %	Textura	
Geomórfica	5	limosa, franco limoso, franco arcilloso limoso	
	Coordenadas	Altitud	Provincia/Parroquia/Barrio
Georreferenciación		3.000 msnm	Cotopaxi/José Guango bajo/ Mulalo/ Quisinche bajo
	Uso de la tierra	Agrícola	
	Cultivo	Brócoli	
	Sistemas de siembra	Semi- convencional	
	Rotación de cultivos	No	
Historia Agronómica	Frecuencia de cultivo	3 meses/ permanente	
	Fertilización	Química: Sólido Nitrato de Amonio Nitrogram, Rendidor, Muriato de Potasio	
	Manejo de residuos	Incorporación en suelo/ Triple lavado	
	Rendimiento del cultivo	18 Tm/Ha	
	Prácticas Convencionales	Fertilización, fumigación (cada 15 días), herbicidas, arado, rastra.	

Nota: Elaborado por: Ñacato. C & Valencia. M, (2015).

Anexo 5: Recolección de muestras.

a) Recolección muestras de suelo



Elaborado por: Ñacato. C & Valencia. M, (2015).

b) Recolección de muestras de suelo.



Elaborado por: Ñacato. C & Valencia. M, (2015).

c) Muestras de suelo recolectadas y etiquetadas.



Elaborado por: Ñacato. C & Valencia. M, (2015).

d) Recolección material vegetal.



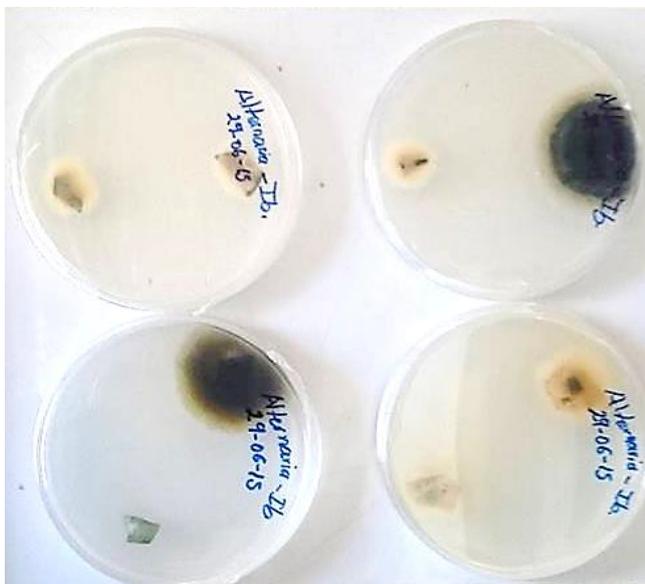
Elaborado por: Ñacato. C & Valencia. M, (2015).

e) Cámara húmeda con material vegetal infectado.



Elaborado por: Ñacato. C & Valencia. M, (2015).

Anexo 6: Muestras vegetales en medio PDA.



Elaborado por: Ñacato. C & Valencia. M, (2015).

Anexo 7: Carta de colores Microgen Bacillus ID MID-66.

Carta de colores/Farbtafel/Tableau de couleurs Microgen™ Bacillus ID MID-66
Lea las tiras a las 24 y 48 horas

POCILLO/ NAPFCHEN /GODET	24	1 a 18	1 a 18	19	20	21	22	23	(20) + Reactivos
Reacción	Control negativo de carbohidrato 24/48 horas	Fermentación de carbohidrato 24 horas	Fermentación de carbohidrato 48 horas (*)	Indol 48 horas	O.N.P.G 24/48 horas	Arginina 24/48 horas	Citrato 24/48 horas	VP 48 horas	Nitrato 48 horas
Negativo (Pocillo 24 (*))									
Positivo									

Estos colores se incluyen como guía general de la gama de colores de prueba.
PRECAUCIÓN: Mantener alejado de la luz solar directa. Los colores de esta carta cambiarán debido al envejecimiento del papel y a la decoloración.
 Leyenda: Reactivos Cubierto con aceite de vaselina estéril.
 s adecuados para añadir a las 48 horas, antes de la lectura. (*) Con algunos bacilos, el color negativo puede cambiar de rojo a naranja con el tiempo. Al clasificar un resultado deberá consultar el control negativo

Fuente: Sistema de identificación para la especie y los géneros del bacilo mésofilo procedentes de fuentes alimenticias y clínicas MICROGEN BIOPRODUCTS, (2015).

Anexo 8: Tiras reactivas Microgen Bacillus ID MID-66



Elaborado por: Ñacato. C & Valencia. M, (2015).

Anexo 9: Formulario de Informe Microgen Bacillus ID MID-66

MICROGEN BACILLUS-ID 24 TEST REPORT FORM

Lab. No. CT-11 Specimen Type: _____ Date: 01-10-15


MICROGEN BIOPRODUCTS

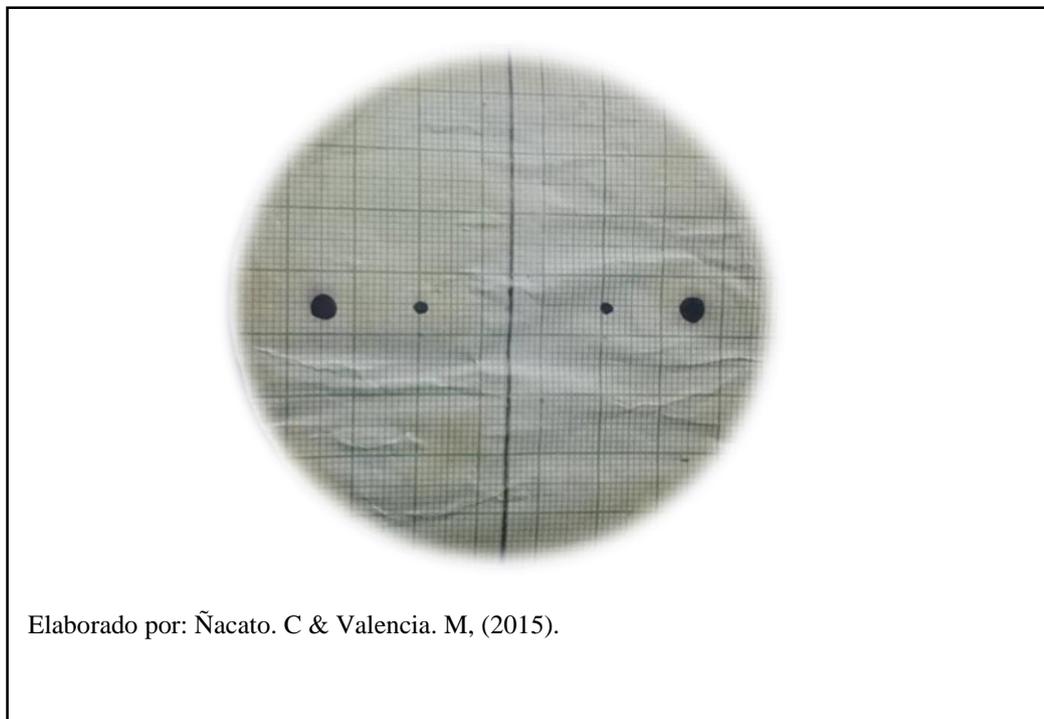
Well Number	Bacillus Strip 1 (BAC 1)												Bacillus Strip 2 (BAC 2)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
	ARA	CEL	INO	MAN	MNS	RAF	RHA	SAL	SOR	SUC	TRE	XYL	ADO	GAL	MDM	MDG	INU	MLZ	IND	ONPG	ARG	CIT	VP	NIT	NEG
Reaction 24 hours	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
Reaction 48 hours	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
Reaction Index	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	
Sum of Positive Reactions	7			0			7			7			4			7			0			4			

Profile No: _____ Final Identification: B. subtilis

WN6675/2005/02

Elaborado por: Ñacato. C & Valencia. M, (2015).

Anexo 10: Plantilla para siembra de *Alternaria* spp.



Anexo 11: Siembra patógeno vs antagonista para prueba in vitro.

