



Pontificia Universidad Católica del Ecuador

Sede Ibarra

ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES

INFORME FINAL DEL PROYECTO

TEMA:

EVALUACIÓN IN VITRO DE LA BACTERIA *Bacillus subtilis* AISLADA DE LA RIZOSFERA DE PAPA (*Solanum tuberosum*) COMO POTENCIAL ANTAGONISTA EN EL CONTROL DE *Phytophthora infestans*

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

INGENIERO AGROPECUARIO

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN:

Línea 4. Gestión Sostenible y Aprovechamiento de los Recursos Naturales

Sublínea 4.1 Desarrollo y Sostenibilidad

AUTOR: ERICK REINALDO CHIZA ROMO

ASESOR: ING. SANTIAGO XAVIER MAFLA ANDRADE. M.CS.

IBARRA, NOVIEMBRE - 2019



Ibarra, 15 de noviembre de 2019

M.Cs. Santiago Xavier Mafla Andrade

ASESOR

CERTIFICA:

Haber revisado el presente informe final de investigación, el mismo que se ajusta a las normas vigentes en la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales (ECAA), de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCESI); en consecuencia, autorizo su presentación para los fines legales pertinentes.

(f):

M.Cs. Santiago Xavier Mafla Andrade

C.C.: 100265839-9



PÁGINA DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

El jurado examinador, aprueba el presente informe de investigación en nombre de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCESI):

(f): 

M.Cs. Santiago Xavier Mafla Andrade

C.C.: 100265839-9

(f): 

M.Sc. Diego Manuel León Tapia

C.C.: 171166889-5

(f): 

Mgs. Maritza de los Ángeles Mier Quiroz

C.C.: 100287828-6



ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS

Yo Erick Reinaldo Chiza Romo, declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 165 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, que manifiesta textualmente: “Se reconoce facultad de los autores y demás titulares de derechos de disponer de sus derechos o autorizar las utilidades de sus obras o prestaciones, a título gratuito u oneroso, según las condiciones que determinen. Esta facultad podrá ejercerse mediante licencias libres, abiertas y otros modelos alternativos de licenciamiento o la renuncia”.

Ibarra, 15 de noviembre de 2019

(f): 

Erick Reinaldo Chiza Romo

C.C.: 100327247-1



AUTORÍA

Yo, Erick Reinaldo Chiza Romo, portador de la cédula de ciudadanía N° 100327247-1, declaro que la presente investigación es de total responsabilidad del autor, y eximo expresamente a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra de posibles reclamos o acciones legales.

(f): .....

Erick Reinaldo Chiza Romo

C.C.: 100327247-1



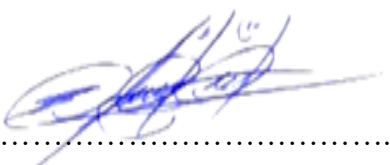
DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo: Erick Reinaldo Chiza Romo, con C.C.: 100327247-1, autor del trabajo de grado intitulado: “Evaluación in vitro de la bacteria *Bacillus subtilis* aislada de la rizosfera de papa (*Solanum tuberosum*) como potencial antagonista en el control de *Phytophthora infestans*”, previo a la obtención del título profesional de “Ingeniero Agropecuario”, en la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales.

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCESI el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de Universidad.

Ibarra, 15 de noviembre de 2019

(f): 

Erick Reinaldo Chiza Romo

C.C.: 100327247-1



**DECLARACIÓN DEL COMPORTAMIENTO ÉTICO DE LA ELABORACIÓN,
DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE TRABAJOS DE TITULACIÓN**

Por medio de la presente declaro conocer y aplicar en la elaboración, desarrollo y evaluación del Proyecto de Titulación: “Evaluación in vitro de la bacteria *Bacillus subtilis* aislada de la rizosfera de papa (*Solanum tuberosum*) como potencial antagonista en el control de *Phytophthora infestans*”, lo propuesto en el Código de ética de la Investigación y el Aprendizaje de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Aprobado por el Consejo Superior de la PUCE con fecha de 15 de enero del 2018.

(f): 

Erick Reinaldo Chiza Romo

C.C.: 100327247-1

Carrera: Ingeniería Agropecuaria

DEDICATORIA

Mi tesis la dedico con mucho amor y cariño.

A mi madre Carmita.

Por creer en mí y apoyarme en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.

A mi padre Pablo.

Por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi formación personal y académica, por los ejemplos de perseverancia y constancia que lo caracterizan y que me ha infundado siempre, por su apoyo incondicional mostrado para salir adelante y por su amor.

A mis hermanos.

Pablo, Jhoseet, Denisse y Mateo que desde niños hemos compartido momentos de mucha alegría. Gracias por siempre estar presentes en mi vida y ser la fuente de energía cuando más lo necesito.

A mis abuelitos.

Jorge Gustavo Chiza (QEPD) y Luz María Arias, por estar al pendiente de todo lo que me sucedía, por quererme, cuidarme y apoyarme durante toda mi formación personal, siempre serán un pilar necesario en vida, esto también se lo debo a ustedes.

¡Gracias, todo esto se los debo a ustedes!

Erick Reinaldo Chiza Romo

AGRADECIMIENTOS

A Dios.

Por darme la oportunidad de vivir y guiarme en cada paso de mi vida, por haberme dado salud para lograr mis objetivos, fortaleciendo mi corazón y mente en momentos decisivos en mi vida, y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo mi camino universitario.

A mi familia.

Por ser mí sustento y fortaleza, durante todos los pasos de mi vida, gracias por su apoyo incondicional en mis decisiones, siempre los necesitare.

A mis amigos.

Por compartir su amistad y compañerismo durante nuestra formación profesional y que hasta ahora seguimos siendo amigos: Jhonnatan Salazar, Lenin Sevillano, Paul Romero, César Revelo, Brayan Terán, Anita María Paspuel, Pamela Vilañez, Karen Andrade, entre otros.

A mi asesor.

M.Cs. Santiago Xavier Mafla Andrade por darme la confianza para afrontar este reto, y poder contar con su guía durante el desarrollo de mi tesis.

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra.

Gracias a todos mis maestros por compartir sus conocimientos y experiencia, fueron la base fundamental de mi formación profesional, gracias PUCESI por impulsar mi desarrollo académico.

¡Gracias a todos!

Erick Reinaldo Chiza Romo

*Para mi madre con todo mi cariño por su esfuerzo,
dedicación y apoyo incondicional.*

ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	viii
AGRADECIMIENTOS	ix
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
CAPÍTULO I	
INTRODUCCIÓN	3
CAPÍTULO II	
OBJETIVOS.....	6
2.1 Objetivo general	6
2.2 Objetivos específicos	6
2.3 Hipótesis	6
CAPÍTULO III	
ESTADO DEL ARTE.....	7
3.1 <i>Phytophthora infestans</i>	7
3.1.1 Generalidades	7
3.1.2 Antecedentes	7
3.1.3 Taxonomía	9
3.1.4 Reproducción.....	9
3.1.4.1 Reproducción asexual	9

3.1.4.2	Reproducción sexual	10
3.1.5	Ciclo de la enfermedad	10
3.1.6	Manejo de la enfermedad	11
3.1.6.1	Control cultural	12
3.1.6.2	Control químico.....	12
3.1.6.3	Control biológico	13
3.2	<i>Bacillus subtilis</i>	14
3.2.1	Generalidades	14
3.2.2	Antecedentes	15
3.2.3	Taxonomía	16
3.2.4	Ciclo biológico	16
3.2.5	<i>Bacillus subtilis</i> como controlador biológico	17
3.2.6	Mecanismo de acción: Antibiosis	19
3.2.7	Uso de <i>Bacillus subtilis</i> como antagonista	21

CAPÍTULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS	23	
4.1	Materiales, equipos e insumos utilizados	23
4.2	Métodos	25
4.2.1	Diseño experimental	25
4.2.2	Variables en estudio	25
4.2.2.1	Variable independiente	25

4.2.2.2	Variable dependiente	25
4.2.3	Esquema del análisis de ADEVA	26
4.3	Manejo de la investigación	26
4.3.1	Fase de campo	26
4.3.1.1	Muestreo de suelo	27
4.3.1.2	Recolección de material vegetal infectado con <i>Phytophthora infestans</i>	28
4.3.2	Fase de laboratorio	28
4.3.2.1	Aislamiento de cepas	28
4.3.2.1.1	Aislamiento de <i>Bacillus subtilis</i>	28
4.3.2.1.2	Aislamiento de <i>Phytophthora infestans</i>	30
4.3.2.2	Identificación de cepas.....	31
4.3.2.2.1	Identificación macroscópica de <i>Bacillus subtilis</i>	31
4.3.2.2.2	Identificación microscópica de <i>Bacillus subtilis</i>	31
4.3.2.2.2.1	Tinción de Gram	31
4.3.2.2.3	Identificación macroscópica de <i>Phytophthora infestans</i>	32
4.3.2.2.4	Identificación microscópica de <i>Phytophthora infestans</i>	32
4.3.2.2.4.1	Tinción de hongos	32
4.3.2.2.4.2	Tinción de hongos en montaje con cinta adhesiva.....	33
4.3.2.3	Purificación de cepas	33
4.3.2.3.1	Purificación de <i>Bacillus subtilis</i>	33
4.3.2.3.2	Purificación de <i>Phytophthora infestans</i>	34

4.3.2.4	Identificación molecular de los microorganismos	34
4.3.2.5	Secuenciación	38
4.3.3	Prueba de antagonismo	38
4.3.3.1	Cultivos duales	39
4.3.3.1.1	Preparación de las concentraciones.....	39
4.3.3.1.1.1	Conteo en cámara de Neubauer.....	39
4.3.3.1.2	Preparación de los tratamientos.....	40
4.3.3.1.3	Prueba de antagonismo por cultivos duales (disco - placa).....	41
4.3.3.2	Crecimiento celular	42
4.3.3.2.1	Espectrofotometría (450 nm).....	43
4.3.3.2.2	Recuento de bacterias (UFC.ml ⁻¹) y esporangios (esporangios.ml ⁻¹) en cámara de Neubauer a la hora 0-5-10-15-20 y 24.....	45
 CAPÍTULO V		
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		46
 CAPÍTULO VI		
CONCLUSIONES		74
 CAPÍTULO VII		
RECOMENDACIONES.....		77
 CAPÍTULO VIII		
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		78
 CAPÍTULO IX		

ANEXOS	90
--------------	----

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Phytophthora infestans</i>	9
Tabla 2. Clasificación taxonómica de <i>Bacillus subtilis</i>	16
Tabla 3. Esquema de ADEVA.....	26
Tabla 4. Dosis de <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Phytophthora infestans</i>	39
Tabla 5. Tratamientos implementados en la investigación para determinar el crecimiento celular de <i>Bacillus subtilis</i> vs <i>Phytophthora infestans</i>	43
Tabla 6. Variables y sus indicadores.....	46
Tabla 7. Secuencias relativamente más cercanas secuenciadas por BLAST	51
Tabla 8. Pruebas de normalidad Shapiro-Wilk y homogeneidad de la varianza.....	52
Tabla 9. Diámetro de halos inhibitorios (mm) de <i>Bacillus subtilis</i> vs <i>Phytophthora infestans</i>	54
Tabla 10. Análisis de varianza del diámetro de halos inhibitorios (mm) de <i>Bacillus subtilis</i> vs <i>Phytophthora infestans</i>	55
Tabla 11. Análisis de varianza de la absorbancia por espectrofotometría (450 nm).	58
Tabla 12. Recuento de bacterias (UFC.ml ⁻¹) y esporangios (esporangios.ml ⁻¹) en cámara de Neubauer.....	62
Tabla 13. Prueba t-student del recuento de bacterias (UFC.ml ⁻¹) y esporangios (esporangios.ml ⁻¹) en cámara de Neubauer	63
Tabla 14. Recuento de esporangios (esporangios.ml ⁻¹) de <i>Phytophthora infestans</i> , dosis 3x10 ³ esporangios.ml ⁻¹ en cámara de Neubauer	64

Tabla 15. Recuento de bacterias (UFC.ml ⁻¹) y esporangios (esporangios.ml ⁻¹) de <i>Bacillus subtilis</i> (dosis 1x10 ⁸ UFC.ml ⁻¹) vs <i>Phytophthora infestans</i> (dosis 3x10 ³ esporangios.ml ⁻¹) en cámara de Neubauer.....	65
Tabla 16. Recuento de bacterias (UFC.ml ⁻¹) y esporangios (esporangios.ml ⁻¹) de <i>Bacillus subtilis</i> (dosis 1x10 ⁶ UFC.ml ⁻¹) vs <i>Phytophthora infestans</i> (dosis 3x10 ³ esporangios.ml ⁻¹).....	66
Tabla 17. Recuento de bacterias (UFC.ml ⁻¹) y esporangios (esporangios.ml ⁻¹) de <i>Bacillus subtilis</i> (1x10 ⁴ UFC.ml ⁻¹) vs <i>Phytophthora infestans</i> (dosis 3x10 ³ esporangios.ml ⁻¹).....	67
Tabla 18. Recuento de bacterias (UFC.ml ⁻¹) de <i>Bacillus subtilis</i> , (dosis 1x10 ⁸ UFC.ml ⁻¹)	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de la enfermedad del tizón tardío inducido por <i>Phytophthora infestans</i>	11
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Bacillus subtilis</i> ; A) Crecimiento vegetativo, B) Esporulación.	17
Figura 3. Principales mecanismos de control biológico del género <i>Bacillus</i> ; Producción de: A) lipopéptidos, B) sideróforos, C) enzimas líticas, D) δ -endotoxinas, E) inducción a la respuesta sistémica (IRS).	18
Figura 4. Mecanismos de acción de <i>Bacillus subtilis</i>	18
Figura 5. Mecanismos que involucran lipopéptidos de <i>Bacillus subtilis</i>	19
Figura 6. Estructura representativa de lipopéptidos de las familias (a) surfactina (b) iturina y (c) fengicina.	20
Figura 7. Los lipopéptidos como metabolitos involucrados en el control biológico de fitopatógenos. A) Representantes de las familias de lipopéptidos, B) mecanismo de acción de los lipopéptidos.	21
Figura 8. Zonificación; Área de muestreo.	27
Figura 9. Agroquímico comercial; Propineb + Cimoxanil.	40
Figura 10. Diagrama del ensayo de antagonismo <i>in vitro</i> de <i>Bacillus subtilis</i> vs <i>Phytophthora infestans</i> . Adaptado de De la Cruz (2014).	42
Figura 11. Placa para espectrofotometría; Laboratorios PUCESI.	44
Figura 12. Cámara de Neubauer; Laboratorios PUCESI.	45
Figura 13. A: Colonias de <i>Bacillus subtilis</i> en medio de cultivo MRS-Agar (MERCK®) (El autor). B: Colonias de <i>Bacillus subtilis</i> en medio de cultivo TGE (Calvo y Zúñiga, 2010).....	47

Figura 14. A: Bacilos Gram positivos (El autor). B: Bacilos Gram positivos (Realpe <i>et al.</i> , 2014).....	48
Figura 15. A: Micelio de <i>Phytophthora infestans</i> aislado de material vegetal infectado en medio de cultivo PDA (El autor). B: Micelio de <i>Phytophthora infestans</i> aislado de material vegetal infectado en medio de cultivo PDA por Puño <i>et al.</i> , (2011).	49
Figura 16. A: <i>Phytophthora infestans</i> ; identificación de estructuras (El autor). B: <i>Phytophthora infestans</i> ; identificación de estructuras por Puño <i>et al.</i> , (2011). 50	50
Figura 17. Halos inhibitorios; Presencia de sensibilidad de <i>Phytophthora infestans</i> frente la bacteria <i>Bacillus subtilis</i> , placas incubadas a 37,5 °C durante 24 horas en medio de cultivo MUELLER HINTON AGAR (TM MEDIA®).	53
Figura 18. Prueba Tukey 5 % para el diámetro de halos inhibitorios (mm) de <i>Bacillus subtilis</i> vs <i>Phytophthora infestans</i>	56
Figura 19. Prueba Tukey 5 % de la absorbancia por espectrofotometría (450 nm) de <i>Bacillus subtilis</i> vs <i>Phytophthora infestans</i>	59
Figura 20. Determinación de la absorbancia por espectrofotometría (450 nm) de <i>Bacillus subtilis</i> vs <i>Phytophthora infestans</i>	60
Figura 21. Recuento de esporangios (esporangios.ml ⁻¹) en cámara de Neubauer de <i>Phytophthora infestans</i> , dosis 3x10 ³ esporangios.ml ⁻¹	64
Figura 22. Recuento de bacterias (UFC.ml ⁻¹) y esporangios (esporangios.ml ⁻¹) en cámara de Neubauer de <i>Bacillus subtilis</i> (dosis 1x10 ⁸ UFC.ml ⁻¹) vs <i>Phytophthora infestans</i> (dosis 3x10 ³ esporangios.ml ⁻¹).....	65
Figura 23. Recuento de bacterias (UFC.ml ⁻¹) y esporangios (esporangios.ml ⁻¹) en cámara de Neubauer de <i>Bacillus subtilis</i> (dosis 1x10 ⁶ UFC.ml ⁻¹) vs <i>Phytophthora infestans</i> (dosis 3x10 ³ esporangios.ml ⁻¹).....	66

Figura 24. Recuento de bacterias (UFC.ml ⁻¹) y esporangios (esporangios.ml ⁻¹) en cámara de Neubauer de <i>Bacillus subtilis</i> (1x10 ⁴ UFC.ml ⁻¹) vs <i>Phytophthora infestans</i> (dosis 3x10 ³ esporangios.ml ⁻¹).....	67
Figura 25. Recuento de bacterias (UFC.ml ⁻¹) en cámara de Neubauer de <i>Bacillus subtilis</i> , (dosis 1x10 ⁸ UFC.ml ⁻¹)	68
Figura 26. Resultado de la pregunta 1	69
Figura 27. Resultado de la pregunta 2	70
Figura 28. Resultado de la pregunta 3	70
Figura 29. Resultado de la pregunta 4	71
Figura 30. Resultado de la pregunta 5	71
Figura 31. Resultado de la pregunta 6	72
Figura 32. Resultado de la pregunta 7	72
Figura 33. Resultado de la pregunta 8	73
Figura 34. Resultado de la pregunta 9	73

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Parcelas de producción de papa (<i>Solanum tuberosum</i>) de la propiedad ubicada en el sector Solferino, parroquia rural Mariscal Sucre, cantón San Pedro de Huaca, provincia del Carchi.....	90
Anexo 2. Toma de muestras de suelo de la rizosfera de papa (<i>Solanum tuberosum</i>) y material vegetal (hojas y tallos) infectados con <i>Phytophthora infestans</i>	90
Anexo 3. Disolución de muestra de suelo de la rizosfera de papa (<i>Solanum tuberosum</i>); Laboratorios PUCESI.	91
Anexo 4. Medios de Cultivo, MRS-Agar (MERCK®) y POTATO DEXTROSE AGAR (TM MEDIA®).	91
Anexo 5. Pesaje y preparación de medios de cultivo; Laboratorios PUCESI.	92
Anexo 6. Esterilización de materiales; Laboratorios PUCESI.	92
Anexo 7. Inóculos primarios de <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Phytophthora infestans</i> ; Laboratorios PUCESI.	93
Anexo 8. Inóculo primario de <i>Bacillus subtilis</i> aislada de la rizosfera de papa (<i>Solanum tuberosum</i>), incubadas a 37,5 °C durante 72 horas, en medio de cultivo MRS-Agar (MERCK®). Laboratorios PUCESI.	93
Anexo 9. Inóculo primario de <i>Phytophthora infestans</i> aislada de material vegetal infectado, incubadas a 25 °C durante 72 horas con exposición a la luz, en medio de cultivo POTATO DEXTROSE AGAR (TM MEDIA®). Laboratorios PUCESI.	94
Anexo 10. Siembra de cepas de <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Phytophthora infestans</i> ; Laboratorios PUCESI.	94
Anexo 11. Incubación en estufa a 37,5 °C por 24 horas; Laboratorios PUCESI.	95

Anexo 12. Purificación de cepas, Medio de cultivo líquido NUTRIENT BROTH(TM MEDIA®).	95
Anexo 13. Llenado de tubos de ensayo con caldo NUTRIENT BROTH(TM MEDIA®); Laboratorios PUCESI.....	96
Anexo 14. Purificación de la bacteria <i>Bacillus subtilis</i> ; Laboratorios PUCESI.	96
Anexo 15. Purificación de <i>Phytophthora infestans</i> ; Laboratorios PUCESI.	97
Anexo 16. Cepas puras; Tercera purificación de <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Phytophthora infestans</i> . Laboratorios PUCESI.....	97
Anexo 17. Identificación de cepas; Tinción de Gram para bacterias y Tinción de hongos; Laboratorios PUCESI.....	98
Anexo 18. Protocolo Wizard® Genomic DNA Purification Kit utilizado en la identificación molecular de los microorganismos.	98
Anexo 19. Protocolo utilizado en el aislamiento de ADN genómico de <i>Bacillus subtilis</i> . .	99
Anexo 20. Protocolo utilizado en el aislamiento de ADN genómico de <i>Phytophthora infestans</i>	100
Anexo 21. Identificación molecular de los microorganismos.	101
Anexo 22. ADN secuenciado de la cepa <i>Bacillus subtilis</i>	101
Anexo 23. ADN secuenciado de la cepa <i>Phytophthora infestans</i>	102
Anexo 24. Herramienta BLAST Online – secuencias significativas de <i>Bacillus subtilis</i> . 102	
Anexo 25. Herramienta BLAST Online – secuencias significativas de <i>Phytophthora infestans</i>	103
Anexo 26. Pruebas de antagonismo; Preparación de medio de cultivo MUELLER HINTON AGAR (TM MEDIA®).....	103

Anexo 27. Preparación de dosis de la bacteria <i>Bacillus subtilis</i> y testigo (Propineb + Cimoxanil); (absorción con discos de papel); Laboratorios PUCESI.	104
Anexo 28. Elaboración de los cultivos duales; Laboratorios PUCESI.	104
Anexo 29. Incubación de los tratamientos en estufa a 37,5 °C por 24 horas; Laboratorios PUCESI.	105
Anexo 30. Revisión y toma de medidas de los halos inhibitorios (mm); Laboratorios PUCESI.	105
Anexo 31. Crecimiento celular, Preparación de los tratamientos para espectrofotometría; Laboratorios PUCESI.	106
Anexo 32. Determinación de la absorbancia por espectrofotometría (450 nm), cada hora durante 24 horas consecutivas; Laboratorios PUCESI.	106
Anexo 33. Tabla de promedios de absorbancia por espectrofotometría (450 nm) de <i>Bacillus subtilis</i> vs <i>Phytophthora infestans</i>	107
Anexo 34. Invitación a la socialización de resultados.	108
Anexo 35. Socialización de resultados.	109
Anexo 36. Formato de encuesta.	110
Anexo 37. Lista de asistencia a la socialización de la investigación.	111
Anexo 38. Resultados de la socialización.	112

RESUMEN

La presente investigación está basada en el uso de la bacteria *Bacillus subtilis* como control biológico de *Phytophthora infestans*. El ensayo se realizó mediante muestreos en campo y análisis en laboratorio; en campo se tomaron muestras de suelo de la rizosfera de papa (*Solanum tuberosum*), y material vegetal (hojas y tallos), con síntomas de estar infectados con *Phytophthora infestans*; mientras que en la fase de laboratorio se procedió al aislamiento, identificación, secuenciación y pruebas de antagonismo *in vitro* de la bacteria *Bacillus subtilis*, para el control de *Phytophthora infestans*. La prueba de antagonismo por cultivos duales (disco - placa), demostró que el tratamiento 1 correspondiente a la dosis (1×10^8 UFC.ml⁻¹), obtuvo el mejor resultado con un halo inhibitorio de 16,86 mm de diámetro, mientras tanto el tratamiento 4 (Propineb + Cimoxanil), produjo un halo inhibitorio de 12,36 mm de diámetro, donde, se identifica que el control biológico fue mejor que el químico para esta investigación.

Palabras clave. - *Bacillus subtilis*, *Phytophthora infestans*, pruebas de antagonismo, cultivos duales, absorbancia, crecimiento celular.

ABSTRACT

The present investigation is based on the use of the bacterium *Bacillus subtilis* as a biological control of *Phytophthora infestans*. The test was performed by field sampling and laboratory analysis; In the field, soil samples were taken from the potato rhizosphere (*Solanum tuberosum*), and plant material (leaves and stems), with symptoms of being infected with *Phytophthora infestans*; while in the laboratory phase the isolation, identification, sequencing and *in vitro* antagonism tests of the *Bacillus subtilis* bacteria are performed, for the control of *Phytophthora infestans*. The test of antagonism by dual cultures (disc - plate), demonstration of treatment 1 corresponding to the dose (1×10^8 CFU.ml⁻¹) obtains the best result with an inhibitory halo of 16,86 mm in diameter, while the treatment 4 (Propineb + Cimoxanil), produced an inhibitory halo of 12,36 mm in diameter, which identifies the biological control that is better than the chemical for this investigation.

Keywords. - *Bacillus subtilis*, *Phytophthora infestans*, antagonism tests, dual crops, absorbance, cell growth.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum*) es uno de los rubros más importantes de los sistemas de producción de la sierra Ecuatoriana, siendo un componente fundamental en la canasta básica de los ecuatorianos (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2018). De igual manera, la producción de papa constituye una fuente importante de alimentación e ingresos económicos para las familias campesinas (Cuvi, 2010; Inca, 2015; Yupangui, 2016).

La provincia de Carchi conforma actualmente la zona de producción de papa más importante del país, con agricultores especializados que cultivan casi el 35 % de la producción nacional en solamente el 25 % de la superficie (Yanggen *et al.*, 2003). No obstante, las condiciones modernas empleadas en el manejo productivo de papa, han contribuido a que el cultivo enfrente muchos problemas que ponen en peligro el bienestar económico de los productores y la seguridad alimentaria del país (Pumisacho y Sherwood, 2002). De acuerdo al informe de rendimientos de papa en el Ecuador, el 54 % de los agricultores percibe a las plagas y enfermedades como su principal problema, declarando un 84 % correspondiente a daños por tizón tardío; siendo actualmente la enfermedad más seria que se registra en el cultivo de papa en la provincia de Carchi y a nivel mundial (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2018).

La enfermedad tizón tardío o “lancha” causada por *Phytophthora infestans*, es el patógeno más importante e incidente del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*), ya que, debido a su agresividad, la susceptibilidad de las variedades cultivadas y las condiciones climáticas favorables para su desarrollo, pueden causar pérdidas que varían entre el 30 a 100 % del rendimiento (Cuvi, 2010; Yanggen *et al.*, 2003; Yépez, 2016)

En las actuales condiciones de producción y mercado de papa en la provincia de Carchi, los agricultores no pueden producir sin la aplicación de productos químicos, especialmente para el control de tizón tardío (Pozo, 2015). La alta variabilidad genética y virulencia de *Phytophthora infestans* obliga al agricultor a realizar un control intensivo y en muchos casos indiscriminado, con mezclas y en número exagerado de fungicidas (Freire, 2017), llegando a ocupar hasta 23 aplicaciones por ciclo; el fungicida más utilizado en esta provincia es Propineb + Cimoxanil, el cual es aplicado en mezcla con una amplia gama de productos

comerciales, que incluso en algunos casos se duplica el ingrediente activo por control, sobre dosificando el uso de fungicidas (Yépez, 2016).

El uso excesivo de fungicidas por parte de los agricultores genera pérdidas no solamente en términos económicos, sino en términos de impacto ambiental ya que las prácticas agrícolas convencionales no han sido tan efectivas desde el punto de vista del desarrollo sostenible (Paulet, 1999).

Debido al ineficiente uso de fungicidas en el país, la presión para reducir el uso de productos químicos es cada vez mayor; en este sentido los retos pero también las oportunidades para racionalizar el manejo de la enfermedad, son grandes (Freire, 2017).

Por tanto, es necesario ampliar las investigaciones sobre la utilización de nuevas técnicas asociadas al control biológico, utilizando microorganismos benéficos para reducir la intensidad o actividades de microorganismos fitopatógenos productores de enfermedades (Guédez *et al.*, 2008; Robles, 2011; Robles, 2014). Ante esta relevancia, la búsqueda de alternativas especialmente naturales, económicas y viables en la prevención o control del tizón tardío son muy necesarias, ya que contribuyen al desarrollo de una agricultura sostenible y ecológica disminuyendo los efectos inherentes al uso de fungicidas y más productos químicos (Méndez-Úbeda *et al.*, 2017; Rodríguez *et al.*, 2010).

En la búsqueda y selección de microorganismos como agentes de control biológico, el género *Bacillus spp.* ha resultado de gran eficacia en el control de fitopatógenos debido a cualidades tanto morfológicas como fisiológicas que permiten su ubicuidad en la naturaleza (Barahona, 2012). *Bacillus spp.* representa un gran potencial antagonista principalmente por la gran cantidad de enzimas líticas, antibióticos y otras sustancias con actividad biocida, capaces de producir efectos de control sobre varias especies de organismos fitopatógenos (Méndez-Úbeda *et al.*, 2017); Además, ha tenido mucho éxito en la prevención de patologías vegetales causadas por hongos, por efecto de la producción de muchas clases de antibióticos como: bacilomicina, fengimicina, micosubtilina y zwittermicina que son efectivos en suprimir el crecimiento de patógenos *in vitro* y/o *in situ* (Carreras, 2011).

Según Cuervo (2010), su mayor representante es la especie *Bacillus subtilis*, el cual libera compuestos con propiedades antifúngicas, como la subtilina y otros antibióticos de la familia

de las iturinas. Permitiendo la inhibición de fitopatógenos y previniendo las enfermedades del suelo causadas por *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium spp.*, *Verticillium spp*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phytophthora capsici*, *Pythium spp.* y el nematodo nodulador de raíces (*Meloidogyne spp*) y *Rhizoctonia solani* (Cazorla *et al.*, 2007).

Por todo lo expuesto, la presente investigación busca determinar el efecto antagonista de la bacteria *Bacillus subtilis* frente a *Phytophthora infestans in vitro*, con el fin de introducir medios de control biológico; explorando alternativas que reduzcan el uso excesivo de productos químicos para el control de enfermedades, realizando un control oportuno y eficiente, además, sea amigable con el medio ambiente y minimice el daño a la salud de productores y consumidores.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

- Evaluar la capacidad antagonista de la bacteria *Bacillus subtilis* frente al fitopatógeno *Phytophthora infestans*.

2.2 Objetivos específicos

- Aislar la bacteria *Bacillus subtilis* mediante el medio de cultivo MRS para obtener cepas puras.
- Realizar pruebas antagonistas de *Bacillus subtilis* vs *Phytophthora infestans* mediante cultivos duales.
- Socializar los resultados de la investigación mediante un día de campo para la difusión de los resultados obtenidos en la investigación.

2.3 Hipótesis

- **Hipótesis alternativa (Ha)**
 - La bacteria *Bacillus subtilis*, tiene un efecto antagónico frente al fitopatógeno *Phytophthora infestans*.
- **Hipótesis nula (Ho)**
 - La bacteria *Bacillus subtilis*, no tiene un efecto antagónico frente al fitopatógeno *Phytophthora infestans*.

CAPÍTULO III

ESTADO DEL ARTE

3.1 *Phytophthora infestans*

3.1.1 Generalidades

Etiológicamente la palabra *Phytophthora* proviene de la unión de dos vocablos griegos *Phyto*= planta y *Phthora*= destructor (Pérez y Forbes, 2008). Su taxonomía corresponde al reino Chromista y phylum Oomycota, comprendiendo más de 700 especies, las cuales no tienen pigmentos fotosintéticos. Poseen dos flagelos en las zoosporas y presentan gametos masculinos con paredes formadas por celulosa o polímeros similares, hábitos acuáticos y terrestres, aunque siempre necesitan la presencia del agua (Alor, 2015; Freire, 2017).

Cevallos (2015), menciona que *Phytophthora infestans* también conocida como tizón tardío o “lancha” es una enfermedad policíclica, con varias fases de infección y de producción de inóculo durante la misma estación de cultivo, describiéndolo como un parásito obligado, el cual requiere de un hospedero vivo para sobrevivir por largos periodos de tiempo. De igual manera detalla que la cantidad de inóculo producido por el patógeno depende del hospedero, las condiciones de manejo y el ambiente. Su rápida diseminación le permite afectar hojas, tallos y tubérculos abarcando grandes superficies del cultivo, siempre y cuando sus condiciones climáticas sean favorables (Acuña, 2008; Huilcapi, 2012). De igual forma es capaz de sobrevivir en tejido vivo ya sea tubérculos, semilla, desechos de papas, plantas voluntarias y otros hospederos susceptibles, siendo éstos las principales fuentes de la enfermedad (Freire, 2017).

3.1.2 Antecedentes

El tizón tardío causado por *Phytophthora infestans* es una de las enfermedades más destructivas a nivel mundial. Siendo su centro de origen México, desde donde se han reportado varias migraciones del patógeno durante los últimos treinta años (Hidalgo, 2006).

Su primera migración se la registró durante la primera mitad del siglo XIX en Irlanda, ocasionando la destrucción total de los campos de cultivo de papa, generando efectos inmediatos de pobreza y hambruna que condujeron a profundos cambios sociales y

económicos en ese país. Provocó la muerte de un millón de personas de un total de ocho millones de habitantes, y otro millón y medio emigro del país (Realpe, 2010; Freire, 2017).

Su expansión fue por toda Europa entre los años 1845 y 1846 llegando a distribuirse por todos los continentes (Hidalgo, 2006). En la actualidad, se han descrito cuatro haplotipos mitocondriales designados como Ia, Ib, IIa y IIb, todos ellos fueron encontrados en aislamientos recolectados en la parte central de México durante el año 2003 (Jaramillo, 2015). De esta manera se confirmó que el centro de diversidad y origen de *Phytophthora infestans* está en las tierras altas México (Grünwald y Flier, 2005).

Durante los últimos diez años en Ecuador se ha observado la presencia de cambios en las poblaciones de *Phytophthora infestans*, cambios relacionados a la aparición de nuevos genotipos con un aumento drástico en los factores de virulencia (Hidalgo, 2006).

Delgado *et al.*, (2013), caracterizaron 66 aislamientos de la población de *Phytophthora infestans* en variedades locales de papa, los aislamientos fueron obtenidos de 16 zonas correspondientes a tres provincias del Ecuador (Carchi, Chimborazo y Loja). El estudio confirmó genotipos diferenciales resistentes a *Phytophthora infestans* con los genes R1 a R11, manteniendo un apareamiento del tipo A1; Ecuador ya reporta la presencia del tipo A2 en especies silvestres del grupo *Anarichomenum* (Ordoñez *et al.*, 2000).

De acuerdo a la investigación realizada por Oliva *et al.*, (2002) en Ecuador se han descrito cuatro linajes clonales: US-1, EC-1, EC3 (apareamiento A1) y EC-2 (apareamiento A2). Relacionando su alta diversidad genética a mutaciones provocadas por el aumento de la radiación UV (Forbes *et al.*, 1997; citado por Cevallos, 2015).

3.1.3 Taxonomía

Tabla 1.

Clasificación taxonómica de Phytophthora infestans

Reino: Protista
División: Heterokontophyta
Clase: Oomicetes
Phylum: Oomycota
Orden: Pythiales
Familia: Pythiaceae
Género: <i>Phytophthora</i>
Especie: <i>infestans</i>
Nombre científico: <i>Phytophthora infestans</i>
N. C.: <i>Phytophthora infestans</i> (Mont.) de Bary

Fuente: Agrios (2005)

3.1.4 Reproducción

La reproducción sucede tanto de manera asexual (vegetativa) como sexual (generativa) (Realpe, 2010).

3.1.4.1 Reproducción asexual

La reproducción asexual consiste en la producción de esporangios a partir de los esporangióforos que crecen en el tejido infectado. (Aylor *et al.*, 2001; citado por Cevallos, 2015). La diseminación se presenta de 3 a 10 días después de la infección de los órganos portadores de esporangios, emergiendo a través de los estomas a la superficie de la hoja (Jaramillo, 2015). Su germinación puede ser directa mediante zoosporangios maduros, cuyo comportamiento es de una simple espora que emite un tubo germinativo para entrar a la planta o indirecta mediante 3 a 8 zoosporas móviles que bajo ciertas condiciones pierden los flagelos, formando una pared celular y a continuación un tubo germinativo el cual puede penetrar directamente en la epidermis de las hojas y los tallos; en el caso de los tubérculos

el hongo ingresa a través de las lenticelas o de lesiones. Las zoosporas mueren si no encuentran un tejido hospedante apropiado (Agrios, 2004; citado por Realpe, 2010).

3.1.4.2 Reproducción sexual

Cevallos (2015), cita que *Phytophthora infestans* es un organismo heterotálico, bisexual y autoincompatible, de tal modo que para desarrollar sus estructuras sexuales y formar sus esporas necesita la coestimulación de dos tipos de apareamiento (A1 Y A2) (Oliva *et al.*, 2010).

Realpe (2010), menciona que la reproducción sexual empieza cuando el micelio de diferentes tipos de apareamiento A1 y A2, crecen juntos, uno de ellos pueden formar gametos masculinas (anteridios) y el otro forma gametos femeninas (oogonios).

El oogonio crece y es fertilizado en el anteridio convirtiéndose en una oospora dura “oospora de descanso” y de pared gruesa (Henfling, 1987). Las oosporas germinan por medio de un tubo germinal, el cual produce un esporangio y luego forma el micelio (Realpe, 2010).

Una de las ventajas de la reproducción sexual es la producción de oosporas con resistencia mecánica, esta cualidad le permite resistir a condiciones desfavorables como sequias y bajas temperaturas (Henfling, 1987; citado por Realpe, 2010). De igual manera (Andersson, 2007; citado por Jaramillo, 2015) resalta la capacidad del patógeno para inocular a largo plazo, ya que sus oosporas pueden sobrevivir por meses o años fuera de la planta huésped en ausencia de hospederos vivos (Cevallos, 2015).

3.1.5 Ciclo de la enfermedad

El ciclo de la enfermedad del tizón tardío o “lancha” inducido por *Phytophthora infestans* presenta el siguiente comportamiento:

El tubo germina, penetra la cutícula de la hoja o entra a través de un estoma y forma un micelio que crece profusamente entre las células y el cual envía largos haustorios enrollados hacia el interior de ellas. Las células de las que el micelio se nutren, tarde o temprano mueren y con forme empieza a degradarse, el micelio del hongo se propaga periféricamente en los tejidos carnosos de las hojas. Al cabo de unos cuantos días después de haberse

producido la infección, emergen nuevos esporangióforos que son diseminados por el viento e infecta a otras plantas. En un clima favorable, el período comprendido entre la aparición de la infección y la formación de los esporangios puede durar tan solo cuatro días y como consecuencia pueden producirse en una sola estación de crecimiento nuevas infecciones y numerosas generaciones asexuales del patógeno. (Realpe, 2010, pp.18)

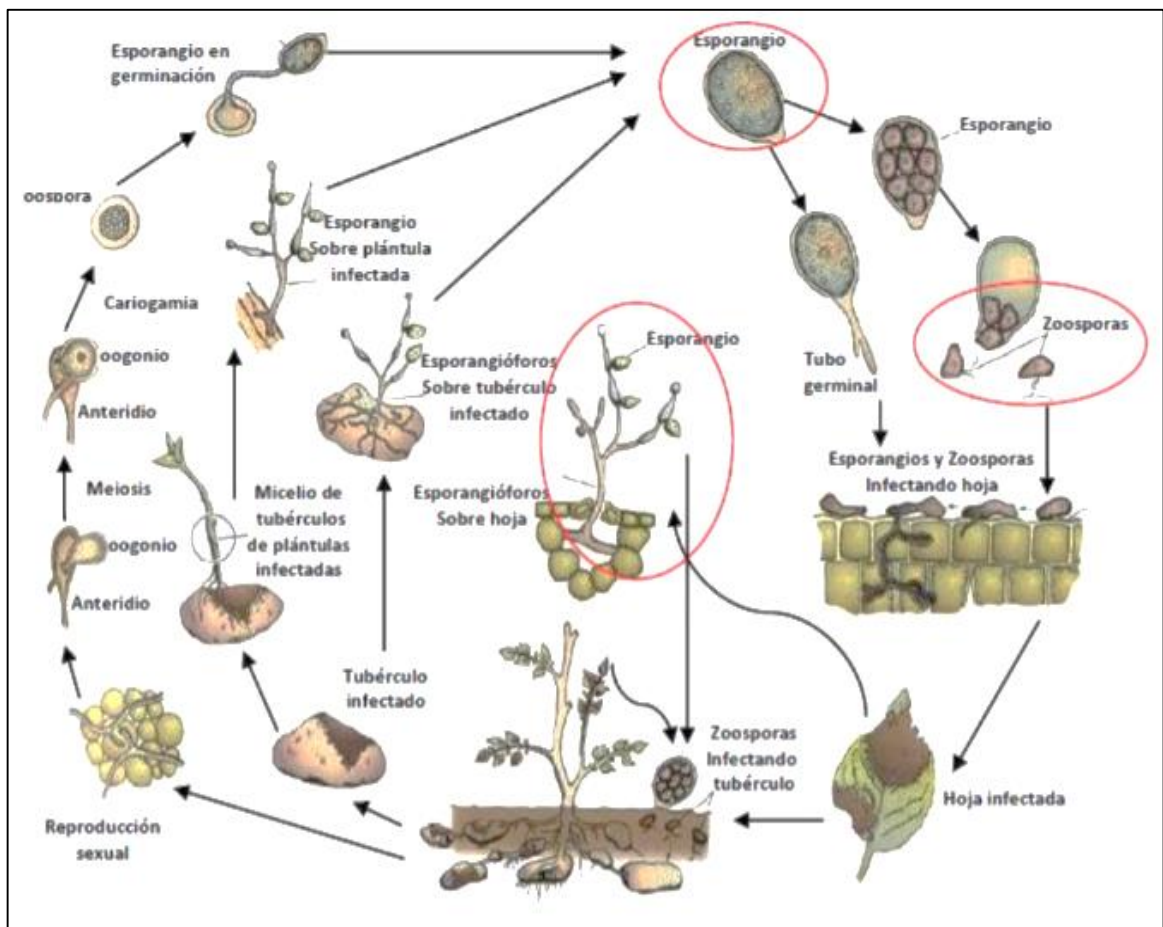


Figura 1. Ciclo de la enfermedad del tizón tardío inducido por *Phytophthora infestans*

Fuente: Agrios (2004)

3.1.6 Manejo de la enfermedad

El tizón tardío o lancha de la papa puede ser controlada con éxito mediante la combinación de prácticas culturales, medidas sanitarias y controles biológicos (Andre *et al.*, 2007; Comina, 2016).

3.1.6.1 Control cultural

El control cultural consiste en la utilización de todas las prácticas y actividades que se realizan durante el manejo agronómico del cultivo, modificando el ambiente para reducir la prevalencia y desarrollo del patógeno (Torres *et al*, 2011; citado por Bustamante, 2015).

Por lo general no se trata de tomar medidas de improviso, sino de realizar una planificación anticipada al proceso de producción, las actividades más relevantes por hacer son:

- Selección de los mejores campos de cultivo
- Saneamiento
- Aporques oportunos
- Control del riego
- Cosecha oportuna
- Eliminación de focos infecciosos
- Eliminación de malezas
- Eliminar papa voluntarias
- Eliminación de restos de papas
- Eliminar plantas enfermas

3.1.6.2 Control químico

El uso de productos químicos es una de las estrategias principales para el control de *Phytophthora infestans*, siendo capaz de matar o inhibir el crecimiento del hongo (Bustamante, 2015; Comina, 2016; Salas, 2015).

Los productos utilizados para controlar el Tizón tardío son clasificados en fungicidas de contacto y sistémicos (Comina, 2016; Pérez y Forbes, 2011).

Un fungicida de contacto actúa solamente en la parte superficial de la planta, destruyendo las estructuras del patógeno durante sus fases de germinación y penetración (Fernández-Northcote *et al.*, 1999). Para lograr un buen control con este tipo de fungicida se debe aplicar antes que el patógeno entre en la planta, logrando aplicaciones frecuentes y en intervalos cortos entre aplicaciones (Bustamante, 2015).

Un fungicida sistémico actúa de forma translaminar, penetrando y movilizándose del haz al envés o viceversa en la hoja y luego con un movimiento acropétalo se dirige a la parte superior de la planta (Bustamante, 2015). La ventaja de estos fungicidas radica en su intervalo de aplicación ya que no es lavado por las lluvias después de su aplicación (Fernández-Northcote *et al.*, 1999).

3.1.6.3 Control biológico

Un control biológico oportuno permite regular la población de un organismo que está afectando significativamente al cultivo (plaga y/o enfermedad), mediante la acción de otro que naturalmente ha sido diseñado para ejercer su control, resultando una alternativa eficiente y ecológica que contribuye al desarrollo de una agricultura sostenible, ya que disminuye los efectos inherentes al uso de fungicidas y productos químicos (Méndez *et al.*, 2017; Rodríguez *et al.*, 2010).

El control biológico de *Phytophthora infestans* se lo realiza por medio de la introducción de uno o más organismos vivos que permitan controlar, inhibir o destruir el patógeno. Entre los numerosos trabajos realizados se han reportado el efecto antagonista de varios microorganismos contra *Phytophthora infestans*, entre los que se mencionan: *Serratia spp.*, *Streptomyces spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Bacillus spp.*, *Trichoderma spp.*, *Fusarium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, *Myrothecium spp.*, entre otros. (Pérez y Forbes, 2008; citados por Bustamante, 2015)

Las bacterias del genero *Bacillus* son muy efectivas para inhibir el desarrollo de algunos hongos fitopatógenos, siendo *Bacillus subtilis* efectivo para el control de enfermedades causadas por hongos y bacterias (Ñacato y Valencia, 2016). El potencial de esta bacteria se basa en su capacidad para producir una amplia gama de moléculas bioactivas, que muestran grandes propiedades antifúngicas, junto con una baja toxicidad, alta biodegradabilidad y características amigables con el medio ambiente en comparación con los pesticidas químicos, adicionalmente, la formación de endosporas le proporciona un alto nivel de resistencia a condiciones ambientales (Yáñez, 2012).

3.2 *Bacillus subtilis*

3.2.1 Generalidades

Bacillus subtilis pertenece a la familia Bacillaceae y género *Bacillus*, presenta características de bacteria Gram (+), catalasa (+), son aerobias y anaerobias facultativas, poseen flagelos peritricos los mismos que permiten su movimiento, crece en un rango de pH entre 5,5 a 8,5 y además pueden ser psicrófilos o termófilos, su reproducción se da por fisión binaria formando colonias redondeadas o irregulares, de superficie opaca, color crema o café. (Sneath, 2005; citado por De la Cruz, 2014).

Una de las particularidades más importantes de *Bacillus subtilis* es la producción de endosporas resistentes a condiciones adversas, resistiendo temperaturas altas, cambios osmóticos fuertes y concentraciones bajas de humedad (Robalino, 2015).

La especie *Bacillus subtilis* es un microorganismos que se encuentran ampliamente distribuido en el ambiente, suele encontrarse en el suelo, agua dulce y salada, materia vegetal en descomposición, desiertos y la Antártida (Layton *et al.*, 2011; Salas, 2015).

Barahona (2012), describe a *Bacillus subtilis* como un organismo inicu, incapaz de causar enfermedad a los humanos, animales o plantas, por lo que es usado en la producción comercial de antimicrobianos como un agente de control biológico.

Bacillus subtilis produce más de dos docenas de antibióticos, donde la clase predominante son los de naturaleza peptídica, también produce diferentes tipos de enzimas hidrolíticas como quitinasas, celulasas, amilasas, proteasas y glucanasas (Robalino, 2015). De la misma manera existen estudios que aseguran que *Bacillos subtilis* destaca como productor de moléculas bioactivas con capacidad antifúngica (Stein, 2005).

Bacillus subtilis posee actividad antagónica contra una amplia variedad de microorganismos fitopatógenos, así como la diversidad de mecanismos de acción como: la competencia por espacio y nutrientes, inducción de resistencia, antibiosis y promueve el crecimiento de la planta (Tejera-Hernández *et al.*, 2011).

3.2.2 Antecedentes

Las bacterias del género *Bacillus* fueron descritas por primera vez por Cohn y comprende más de 100 especies distribuidas por todo el mundo. La primera clasificación se la realizó mediante sus características fundamentales, como es el crecimiento anaerobio, la respuesta positiva a la tinción Gram, la forma bacilar y la formación de endosporas (De la Cruz, 2014).

El estudio de *Bacillus subtilis* se lo ha realizado con fines industriales y agrícolas, de esta manera la utilización de la bacteria durante décadas ha permitido la elaboración de suplementos alimentarios (probióticos) necesarios en la alimentación animal (Olmos y Paniagua-Michel, 2014). Actualmente un gran número de cepas y sus metabolitos son usados a nivel comercial en la elaboración de alimentos, medicamentos y productos biológicos de uso agrícola.

El uso de *Bacillus subtilis* en la agricultura representa aproximadamente la mitad de los bioplaguicidas disponibles comercialmente en el mercado mundial siendo la alternativa ecológica más utilizada por los pequeños agricultores (Fravel, 2005). Algunos reportes mencionan que *Bacillus subtilis* puede inhibir el crecimiento de 17 géneros de hongos fitopatógenos que causan enfermedades a los cultivos (Castellanos *et al.*, 2008). De la misma manera, la utilización de *Bacillus subtilis* como biocontrolador incrementa el rendimiento y productividad de los cultivos, evitando la contaminación con sustancias químicas proporcionadas por los fungicidas (Albornoz y Salinas, 2011).

En las últimas décadas se han descrito muchos microorganismos aislados de la rizosfera, caracterizando y probando su efectividad como agente de control biológico ante los patógenos. Aprovechando las relaciones de competencia, la producción de antibióticos, enzimas y de otras sustancias los microorganismos ejercen su capacidad antagonista (Tejera-Hernández *et al.*, 2011).

3.2.3 Taxonomía

Tabla 2.

Clasificación taxonómica de Bacillus subtilis

Reino: Bacteria
Phylum: Firmicutes
Clase: Bacilli
Orden: Bacillales
Familia: Bacillaceae
Género: <i>Bacillus</i>
Especie: <i>subtilis</i>
Nombre científico: <i>Bacillus subtilis</i>

Fuente: Ñacato y Valencia (2016)

3.2.4 Ciclo biológico

Bacillus subtilis tiene dos ciclos de vida (Figura 2):

- A) Crecimiento vegetativo
- B) Esporulación

En el primer ciclo (A) la bacteria crece de forma exponencial siempre y cuando se encuentre en un medio con las condiciones favorables (Yáñez, 2012).

Mientras que la esporulación (B) ocurre cuando los nutrientes comienzan a escasear, causando que la bacteria forme una endospora, la cual puede permanecer viable en el ambiente por largos períodos de tiempo y volver a su ciclo de vida vegetativa (Yáñez, 2012).

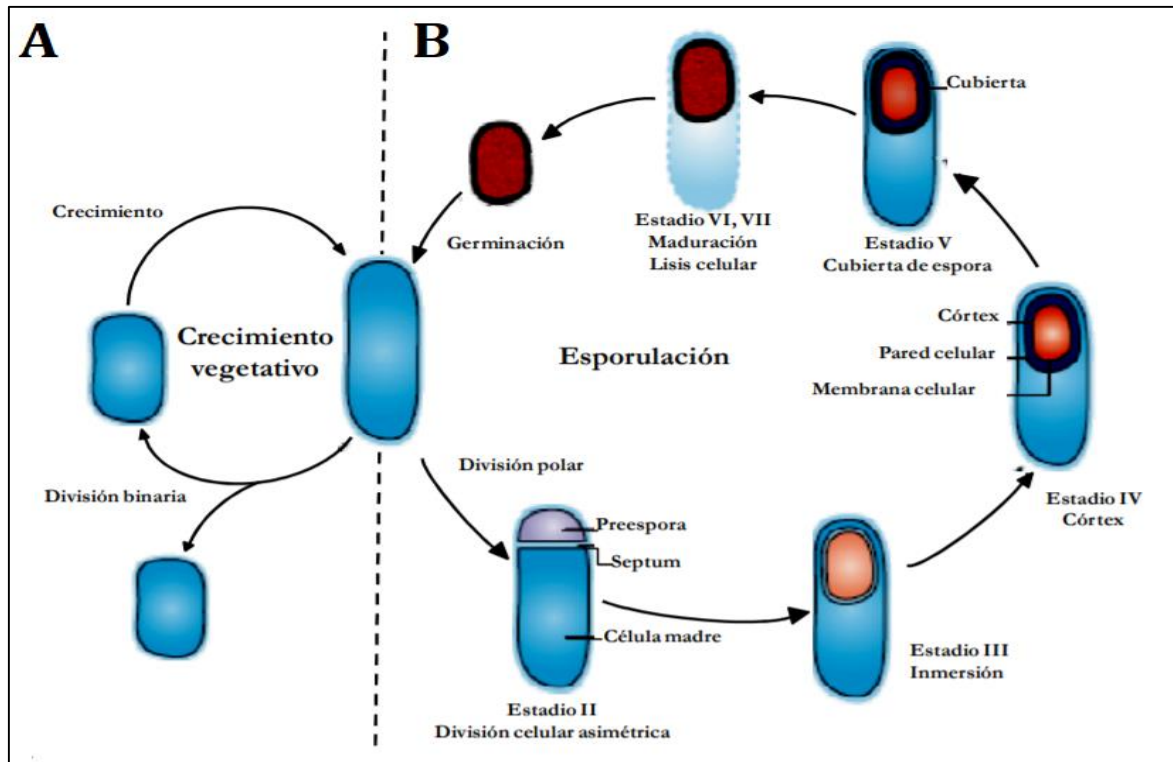


Figura 2. Ciclo de vida de *Bacillus subtilis*; A) Crecimiento vegetativo, B) Esporulación.

Fuente: Yáñez (2012)

3.2.5 *Bacillus subtilis* como controlador biológico

El género *Bacillus* se caracteriza por poseer una gran diversidad de especies que demuestran actividad antagónica como controladores biológicos contra diversos microorganismos fitopatógenos presentes en los cultivos agrícolas (Villarreal-Delgado *et al.*, 2018). Siendo capaces de evitar el establecimiento y desarrollo de estos organismos a través de diferentes mecanismos de acción, entre las principales vías se incluyen A) la excreción de antibióticos, B) sideróforos, C) enzimas líticas, D) toxinas y E) induciendo la resistencia sistémica de la planta (IRS), (Figura 3) (Layton *et al.*, 2011; Tejera-Hernández *et al.*, 2011; Villarreal-Delgado *et al.*, 2018).

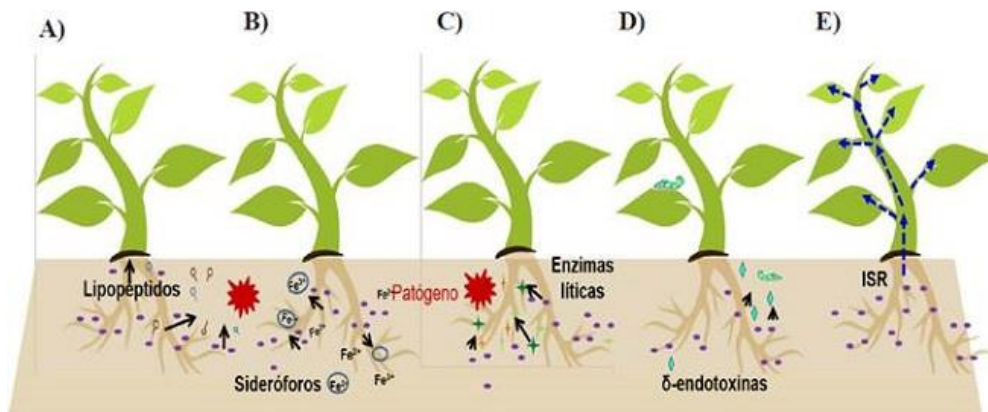


Figura 3. Principales mecanismos de control biológico del género *Bacillus*; Producción de: A) lipopeptidos, B) sideróforos, C) enzimas líticas, D) δ -endotoxinas, E) inducción a la respuesta sistémica (IRS).

Fuente: Villarreal-Delgado *et al.*, (2018)

Ruiz-Sánchez *et al.*, (2016); Kloepper *et al.*, (2007), mencionan que la acción biocontroladora de *Bacillus subtilis* se relaciona con al menos 7 mecanismos de acción, como: 1) parasitismo directo, donde las bacterias se mueven hacia las esporas en germinación y se adhieren a la superficie por medio de la polaridad, 2) producción de antibióticos extracelulares (antibiosis), 3) competencia por nutrientes en el hospedante, 4) sitios de exclusión, 5) sitios de infección, 6) promotor de crecimiento, 7) parasitismo y/o inducción de resistencia. Además, Salas (2015); Tejera-Hernández *et al.*, (2011) describen que *Bacillus subtilis* en contacto con la planta producen fitohormonas, solubilizan fosfatos y fijan nitrógeno, (Figura 4).

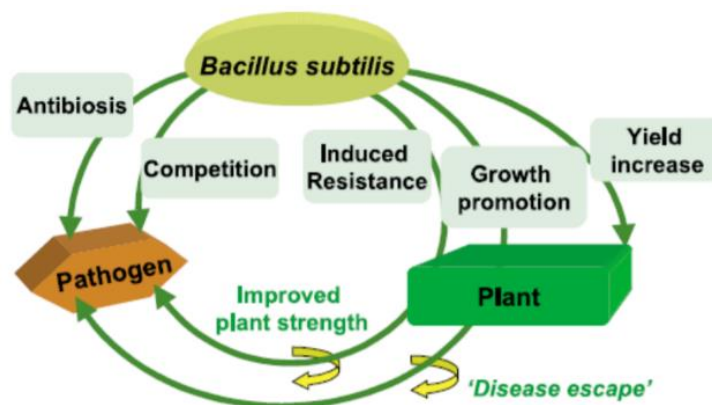


Figura 4. Mecanismos de acción de *Bacillus subtilis*

Fuente: López (2015)

Bacillus subtilis destaca por su potencial para producir una amplia gama de metabolitos antibióticos (antibiosis) con fuertes propiedades antifúngicas que le permite actuar sobre microorganismos de diversa etiología (Cobo, 2017). Adicionalmente, la capacidad para formar endosporas le proporciona un alto nivel de resistencia a condiciones ambientales extremas, demostrando que estas bacterias son excelentes candidatas para el desarrollo de bioproductos por su competencia rizosférica, inhibición directa de fitopatógenos e inmunización de la planta huésped, (Figura 5) (Errington, 2003).

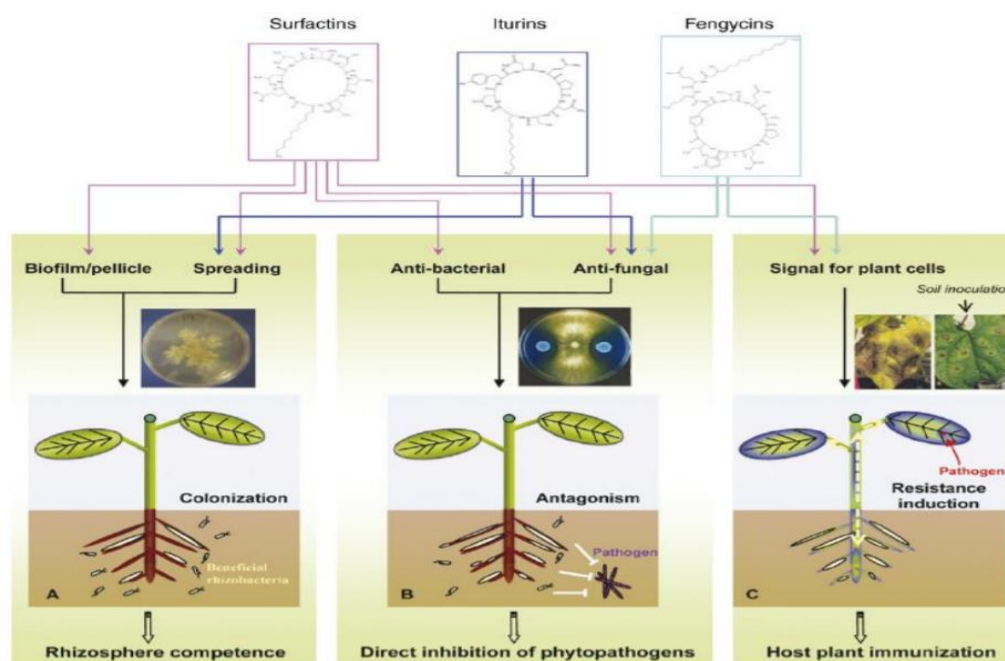


Figura 5. Mecanismos que involucran lipopéptidos de *Bacillus subtilis*

Fuente: López (2015)

3.2.6 Mecanismo de acción: Antibiosis

El mecanismo de acción por antibiosis de un biocontrolador se fundamenta en el conjunto de interacciones entre organismos, en el cual uno o más procesos metabólicos, bioquímicos, mecánicos y físicos inhiben la expresión del patógeno en un hábitat determinado, sea disminuyendo el crecimiento o eliminando al microorganismo patógeno (Layton *et al.*, 2011; Robles, 2011; Salas, 2015).

El género *Bacillus* ha sido estudiado ampliamente respecto a la producción de antibióticos. Determinado que “los grupos principales de moléculas bioactivas antifúngicas están constituidos por antibióticos como zwittermicin–A, kanosamina y lipopéptidos, siendo los

lipopéptidos los compuestos más estudiados por su alta actividad biocida, el potencial biotecnológico y las posibles aplicaciones en biocontrol” (Yáñez, 2012, pp.9).

En este sentido, se ha informado que *Bacillus subtilis* libera compuestos polipéptidos con propiedades antifúngicas, como la subtilina y otros antibióticos de la familia de las Iturinas actuando sobre la pared celular de los hongos, generando fuerte actividad biocida contra un amplio rango de patógenos del suelo, foliares y de postcosecha (Ñacato y Valencia, 2016; Yáñez, 2012). De igual manera, la producción de fengimicinas (lipopéptidos) ha demostrado tener actividad contra los hongos filamentosos, especialmente las del tipo A y B demostrado tener una fuerte actividad antifúngica como las iturinas, pero más específica en el control de hongos filamentosos (Ongena *et al.*, 2005). A pesar de que los mecanismos de acción de las fengimicinas son menos conocidos en comparación con otros lipopéptidos, estudios demuestran que las fengimicinas actúan de manera sinérgica con las iturinas, igual que las surfactinas actúan en sinergismo con las iturinas, al no tener actividad antifúngica por si sola (Yáñez 2012).

Yáñez (2012), menciona que “Los lipopéptidos son proteínas cíclicas sintetizadas a partir de complejos multienzimáticos largos. Su estructura química comprende una parte cíclica constituida por un único ácido graso que tiene ligados de 7 a 10 α -aminoácidos. Están agrupados en tres familias: surfactinas, iturinas y fengimicinas” (pp.9), (Figura 6).

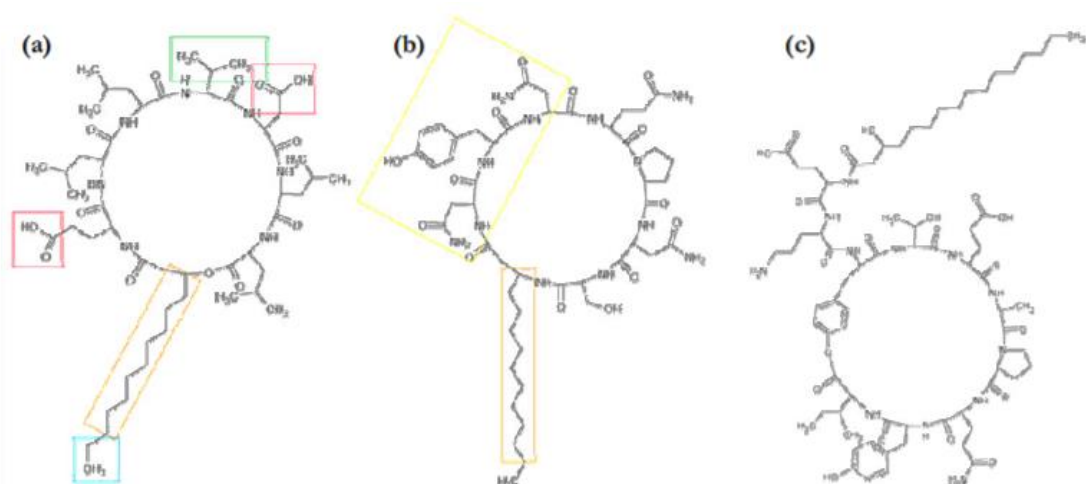


Figura 6. Estructura representativa de lipopéptidos de las familias (a) surfactina (b) iturina y (c) fengicina.

Fuente: Yáñez (2012)

3.2.7 Uso de *Bacillus subtilis* como antagonista

Pérez (2004), define la capacidad antagonica como la interacción entre microorganismos, donde uno infiere con el otro, es decir, causa la inhibición, deterioro o muerte directa del microorganismo patógeno.

En este contexto, la capacidad antibiótica y antifúngica de *Bacillus subtilis*, al producir moléculas bioactivas de naturaleza química compleja como los lipopéptidos (surfactina, iturina y fengicina) desencadenan la inhibición de la expresión de un microorganismo patógeno, afectando la membrana citoplasmática de las células bacterianas o fúngicas, provocando la formación de poros y un desbalance osmótico (Villarreal-Delgado *et al.*, 2018). Además de modificar la permeabilidad y la composición de los lípidos de la membrana formando pequeñas vesículas, desencadenando la muerte celular de los microorganismos fitopatógenos (Layton *et al.*, 2011) (Figura 7).

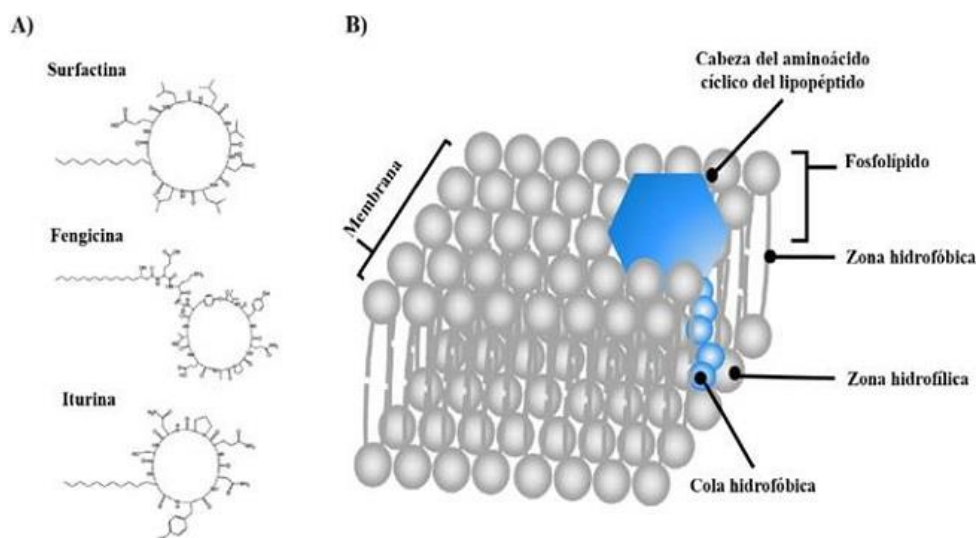


Figura 7. Los lipopéptidos como metabolitos involucrados en el control biológico de fitopatógenos. A) Representantes de las familias de lipopéptidos, B) mecanismo de acción de los lipopéptidos.

Fuente: Villarreal-Delgado *et al.*, (2018)

Varios estudios han reportado que *Bacillus subtilis* puede inhibir el crecimiento de 17 géneros de hongos fitopatógenos causantes de enfermedades en cultivos de interés comercial. Del mismo modo, la relación costo beneficio al emplear este biocontrol es favorable, ya que el efecto controlador es permanente mientras las condiciones ambientales sean las adecuadas para el desarrollo normal de la bacteria, incrementando los rendimientos y evitando la presencia de sustancias tóxicas por utilización de fitosanitarios (Salas, 2015).

De igual manera, investigaciones realizadas por Ñacato y Valencia (2016); Yáñez (2012) determinan el efecto antagonista de *Bacillus subtilis* sobre la germinación y desarrollo de semillas de tomate infectados con *Fusarium oxysporum*. También se han realizado pruebas *in vitro* con aislados de *Bacillus subtilis* de parcelas con producción de arroz, donde se constató y demostró la capacidad de inhibición en el crecimiento de algunos hongos fitopatógenos del suelo, como: *Fusarium oxysporum*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Phytophthora nicotinae*, *Fusarium solani*. Mientras que en condiciones de postcosecha la podredumbre marrón del melocotón causada por *Monilinia fructicola* fue controlada satisfactoriamente (Yáñez, 2012)

CAPÍTULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales, equipos e insumos utilizados

Materiales

- Barreno
- Palin
- Fundas plásticas (ziploc)
- Cooler
- Frascos Boeco de varios volúmenes
- Cajas de Petri
- Tubos de ensayo
- Papel aluminio
- Algodón
- Pipeta
- Pera de succión
- Guantes de nitrilo
- Mechero
- Encendedor
- Gradillas
- Micropipetas de (10 - 100 μ l; 100 - 1000 μ l)
- Puntas para micro pipeta
- Cinta parafilm
- Pinzas
- Vasos de precipitación de varios volúmenes
- Probetas de varios volúmenes
- Asa microbiológica
- Porta objetos
- Cubre objetos
- Lámparas de alcohol
- Goteros

- Piseta
- Cámara de Neubauer
- Hisopos Quick Swab (3M)
- Círculos de papel filtro
- Microtubos eppendorf de 0,6 ml
- Pie de rey

Equipos de laboratorio

- Autoclave (icam CLAVE)
- Balanza analítica (ADAM®)
- Cámara de flujo laminar (N-BIOTECK®)
- Estufa (memmert®)
- Microscopio óptico (Instru LabQ®)
- Contador de colonias (Stuart®)
- Espectrofotómetro (Epoch®)

Reactivos

- Alcohol
- Agua estéril
- MRS-Agar (MERCK®)
- POTATO DEXTROSE AGAR (TM MEDIA®)
- NUTRIENT BROTH (TM MEDIA®)
- MUELLER HINTON AGAR (TM MEDIA®)
- Cristal Violeta
- Lugol
- Safranina
- Azul de metileno
- Propineb + Cymoxanil

4.2 Métodos

4.2.1 Diseño experimental

Para la investigación se utilizó un diseño completamente al azar (DCA), con 4 tratamientos y 3 repeticiones, dando como resultado 12 unidades experimentales.

4.2.2 Variables en estudio

4.2.2.1 Variable independiente

La presente investigación determinó el efecto antagonista de la bacteria *Bacillus subtilis* frente a *Phytophthora infestans*, evaluando 3 dosis a diferentes concentraciones, además se incluyó un producto comercial como testigo para el control de *Phytophthora infestans*:

- D1: *Bacillus subtilis*, concentración 1×10^8 UFC.ml⁻¹
- D2: *Bacillus subtilis*, concentración 1×10^6 UFC.ml⁻¹
- D3: *Bacillus subtilis*, concentración 1×10^4 UFC.ml⁻¹
- TESTIGO: Propineb + Cimoxanil

4.2.2.2 Variable dependiente

Para la evaluación de la actividad antagónica de la bacteria *Bacillus subtilis* frente a *Phytophthora infestans* se determinó:

- Diámetro del halo inhibitorio (mm)

4.2.3 Esquema del análisis de ADEVA

Para el análisis de varianza se utilizó el siguiente esquema.

Tabla 3.

Esquema de ADEVA

Fuentes de variación	Grados de libertad
Total	11
Tratamientos	3
Error experimental	8

4.3 Manejo de la investigación

La investigación se la desarrolló en dos fases: en la fase de campo se recolecto muestras de suelo de la rizosfera de papa (*Solanum tuberosum*) y material vegetal (hojas y tallos) infectado con *Phytophthora infestans*, mientras que en la fase de laboratorio se realizó el aislamiento, identificación, secuenciación y pruebas de antagonismo *in vitro* de la bacteria *Bacillus subtilis* frente a *Phytophthora infestans*.

4.3.1 Fase de campo

En base a la zonificación establecida en la investigación de Vilañez (2019) “Evaluación de *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus subtilis* aisladas de la rizosfera de papa (*Solanum tuberosum*) para el control de *Phytophthora infestans*” se realizó el muestreo de suelo de la rizosfera de papa (*Solanum tuberosum*) conforme a lo mencionado por Tejera-Hernández *et al.*, (2011); Orberá *et al.*, (2005), los mismos que manifiestan que *Bacillus subtilis* destaca por ser bacterias de vida libre presentes en las capas más superficiales hasta las más profundas del suelo colonizando la rizosfera de las plantas.

Mientras que la investigación de Calvo y Zúñiga (2010), concluye que la especie *Bacillus subtilis* es un habitante muy común en la rizosfera del cultivo de papa, ya que:

La concentración de bacterias por gramo de suelo que se haya alrededor de las raíces de las plantas en la llamada rizósfera es mucho mayor que en el resto del suelo, esto se puede deber a los altos niveles de nutrientes que se encuentran en la zona que rodea a las raíces que permiten el desarrollo de poblaciones microbianas. (Yáñez, 2012, pp.7).

Adicionalmente menciona que debido a su capacidad de formación de endosporas *Bacillus subtilis* tiene la ventaja de supervivencia en la rizosfera vegetal.

4.3.1.1 Muestreo de suelo

La toma de muestras tuvo lugar en parcelas de producción de papa (*Solanun tuberosum*) de la propiedad ubicada en el sector Solferino, parroquia rural Mariscal Sucre, cantón San Pedro de Huaca, provincia del Carchi (Figura 8).

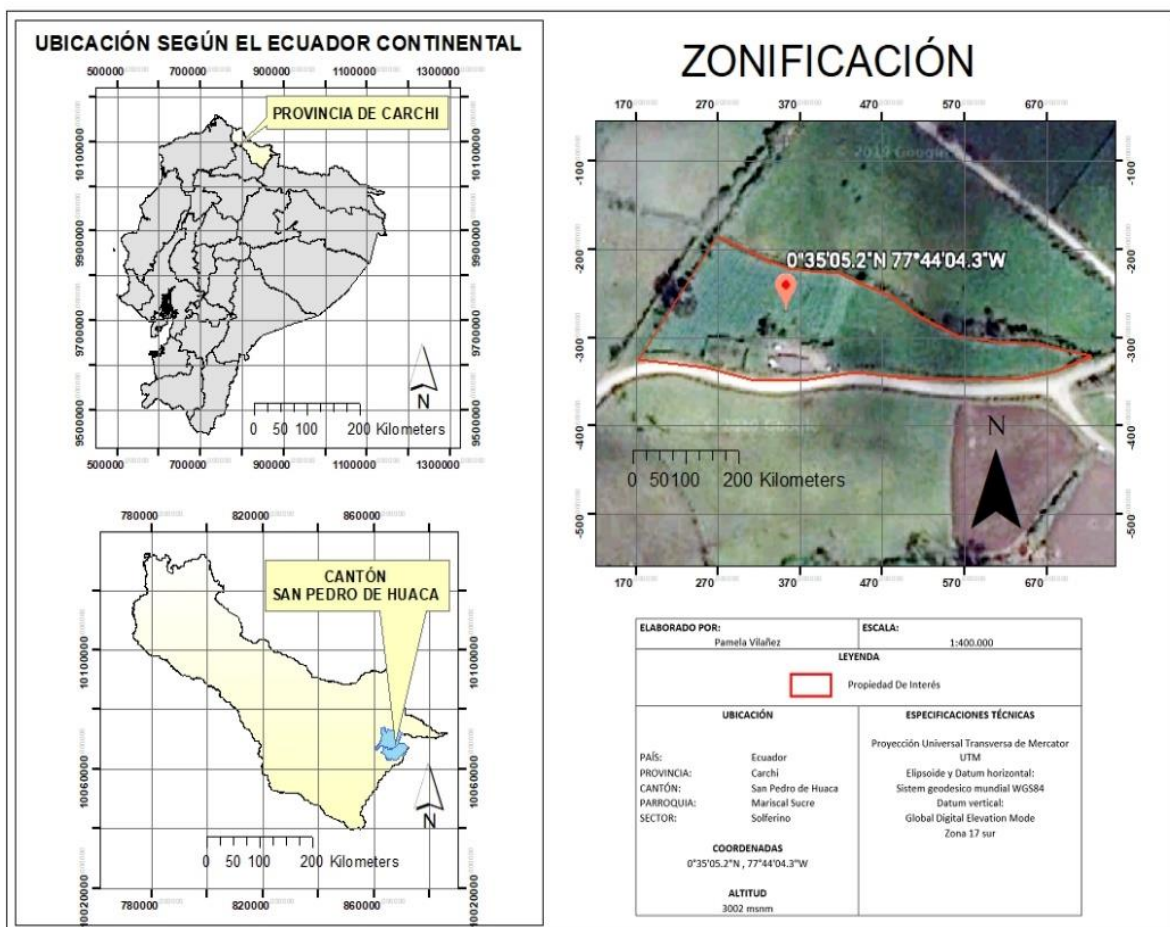


Figura 8. Zonificación; Área de muestreo.

Fuente: Vilañez (2019)

Conforme a lo mencionado por Schweizer (2011); Mendoza y Espinoza (2017), se recolecto 10 muestras de suelo de la rizosfera de papa (*Solanun tuberosum*) compuestas de 6 submuestras cada una, de un terreno de 458,61 m². Se recorrió el lote tomando muestras en forma de zig-zag con la ayuda de un barreno; la herramienta se introdujo a una profundidad de 20 a 30 cm a nivel de la rizosfera, obteniendo muestras homogéneas, las mismas que fueron mezcladas en un recipiente plástico desinfectado, para posteriormente ser guardadas en fundas plásticas de 500 gramos para su transporte.

4.3.1.2 Recolección de material vegetal infectado con *Phytophthora infestans*

El material vegetal infectado con *Phytophthora infestans* se lo recolecto de la misma zona del muestreo de suelo (Figura 8). Procediendo a tomar material vegetal (hojas y tallos) contaminado que presentaban características de la enfermedad; manchas oscuras de color negro en hojas y tallos de plantas y polvo blanco debajo de las hojas. Las muestras vegetales fueron colocadas en fundas plásticas para mantener una cámara húmeda y favorecer el desarrollo del micelio para su aislamiento (Ñacato y Valencia, 2016).

4.3.2 Fase de laboratorio

La investigación se realizó en los laboratorios de Biología, Microbiología y Biotecnología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra, ubicada en la parroquia San Francisco, ciudad de Ibarra, provincia de Imbabura.

4.3.2.1 Aislamiento de cepas

La metodología empleada para el aislamiento de la bacteria *Bacillus subtilis* y *Phytophthora infestans* se fundamenta en los procesos descritos por (Reynoso *et al.*, 2015; Garibaldi *et al.*, 2009).

4.3.2.1.1 Aislamiento de *Bacillus subtilis*

Previo al proceso de aislamiento de la bacteria *Bacillus subtilis*, todos los materiales utilizados en laboratorio fueron esterilizados con ayuda de una autoclave a 120 °C durante 30 minutos, garantizando asepsia en todos los procesos establecidos.

Para el inóculo primario se preparó una solución madre con muestra de suelo de la rizosfera de papa (*Solanum tuberosum*); se pulverizó la muestra de suelo con la ayuda de un mortero y pistilo, continuamente se pesó 1 gr de suelo pulverizado en una balanza analítica, esta muestra se la coloco a baño maría a 70 °C por 20 minutos para facilitar el encapsulamiento de *Bacillus* (Ñacato y Valencia, 2016). Posteriormente se depositó la muestra de suelo en un tubo de ensayo con 9 ml de agua esterilizada, luego se agito la disolución con el fin de homogenizar el contenido y facilitar el desprendimiento del microorganismo, a partir de esta solución madre se realizó disoluciones hasta obtener una disolución 10^{-4} , de esta última disolución se tomó 1 ml con la ayuda de una micropipeta y se sembró por dispersión con un aza esterilizada en cajas de Petri con medio de cultivo MRS-Agar (MERCK®), las placas se las coloco en una estufa para ser incubadas a 37,5 °C durante 72 horas.

Mediante los resultados del inóculo primario se realizó la caracterización macroscópica de *Bacillus subtilis* de cada UFC (Unidades Formadoras de Colonias) que crecieron en el agar (Anexo 8). Las colonias caracterizadas como candidatas de *Bacillus subtilis* fueron colocadas mediante un inóculo con aza esterilizada, en tubos de ensayo con 9 ml de caldo NUTRIENT BROTH (TM MEDIA®) los mismos que fueron incubados en una estufa a 37,5 °C durante 72 horas.

El inóculo secundario con *Bacillus subtilis* se lo realizó preparando 100 ml del medio de cultivo MRS-Agar (MERCK®), el cual se vertió a razón de 20 ml por caja de Petri utilizada; el proceso de preparación y siembra fue realizado dentro de la cámara de flujo laminar, asegurando una zona libre de patógenos y/o contaminantes. Con la ayuda de un mechero de Bunsen y un asa microbiológica esterilizada, se realizó una siembra por estría; la cual consiste en empapar o cargar el asa de caldo nutritivo con bacterias. A continuación, se realizó 4 estrías paralelas sobre la superficie de la placa, de tal manera que el inóculo ocupe toda su área. Concluyendo el proceso las cajas de Petri son selladas con cinta parafilm, y los cultivos en caldo nutritivo regresan a ser preservados dentro de una cámara de frío.

La inoculación fue desarrollada en 5 cajas de Petri, las cuales fueron ubicadas dentro de la estufa a 37,5 °C durante 72 horas para su incubación.

4.3.2.1.2 Aislamiento de *Phytophthora infestans*

Previo al proceso de aislamiento de *Phytophthora infestans*, todos los materiales utilizados en laboratorio fueron esterilizados con ayuda de una autoclave a 120 °C durante 30 minutos, garantizando asepsia en todos los procesos establecidos.

En el aislamiento primario de *Phytophthora infestans* se colocó porciones de residuos vegetales (hojas infectadas) que presentaban un desarrollo micelial del oomiceto, los cuales se desinfectaron por dos minutos en hipoclorito de sodio al 1 %, enseguida se enjuagaron tres veces con agua destilada esterilizada y se colocaron en papel secante, posteriormente, con la ayuda de una pinza esterilizada se sembraron cinco trozos en cajas de Petri con medio de cultivo POTATO DEXTROSE AGAR (TM MEDIA®), las placas fueron incubadas a 25°C durante 72 horas con exposición a la luz (Anexo 7) (Guillén-Cruz *et al.*, 2006).

Pasado el tiempo de incubación se realizó la caracterización macroscópica de *Phytophthora infestans* (Anexo 9), obteniendo colonias que presentaban características fenotípicas del oomiceto, posteriormente las muestras candidatas fueron colocadas mediante un inóculo con un aza esterilizada, en tubos de ensayo con 9 ml de caldo NUTRIENT BROTH (TM MEDIA®) las mismas que fueron incubadas a 25 °C durante 72 horas con exposición a la luz.

El inóculo secundario con *Phytophthora infestans* se lo realizó preparando 100 ml del medio de cultivo POTATO DEXTROSE AGAR (TM MEDIA®), el cual se vertió a razón de 20 ml por caja de Petri utilizada; el proceso de preparación y siembra fue realizado dentro de la cámara de flujo laminar, asegurando una zona libre de patógenos y/o contaminantes.

Con la ayuda de un mechero de Bunsen y un asa microbiológica esterilizada, se realizó una siembra por estría; la cual consiste en empapar o cargar el asa de caldo nutritivo con esporas. A continuación, se realizó 4 estrías paralelas sobre la superficie de la placa, de tal manera que el inóculo ocupe toda su área. Concluyendo el proceso las cajas de Petri son selladas con cinta parafilm, y los cultivos en caldo nutritivo regresan a ser preservados dentro de una cámara de frío.

La inoculación fue desarrollada en 5 cajas de Petri, las cuales fueron incubadas a 25 °C durante 72 horas con exposición a la luz.

4.3.2.2 Identificación de cepas

Para la identificación de la bacteria *Bacillus subtilis* y *Phytophthora infestans* se realizaron pruebas de identificación fenotípica (macroscópica y microscópica) a las muestras resultantes del inóculo secundario en el proceso de aislamiento de cepas, con el fin de determinar las características morfológicas de los microorganismos.

4.3.2.2.1 Identificación macroscópica de *Bacillus subtilis*

Mediante una observación directa se verificó el tamaño, color y formación de colonias, en base a los criterios de descripción morfológica propuestos por Calvo y Zúñiga (2010); Realpe *et al.*, (2014); Salas, (2015) identificando colonias medianas y grandes con bordes ondulados irregulares, elevación planoconvexa y color blanquecino.

4.3.2.2.2 Identificación microscópica de *Bacillus subtilis*

La identificación microscópica de la bacteria *Bacillus subtilis* se la realizó mediante la técnica de coloración Gram, basándose en el protocolo establecido por (Benavides, 2007; Reynoso *et al.*, 2015).

4.3.2.2.2.1 Tinción de Gram

- a) Se preparó un frotis bacteriano a partir de un medio de cultivo sólido a las 72 horas de incubación.
- b) Se fijó el frotis bacteriano con ayuda de un mechero de Bunsen.
- c) Se agregó 2 gotas de Cristal Violeta en el frotis durante 30 segundos.
- d) A continuación, se lavó cuidadosamente el frotis con agua destilada para eliminar el exceso de colorante.
- e) Se agregó 2 gotas de Lugol en el frotis durante 30 segundos.
- f) A continuación, se lavó cuidadosamente el frotis con agua destilada para eliminar el exceso de colorante.
- g) Se inclinó la porta objetos para aplicar gota a gota el decolorante (alcohol), dejando que escurra hasta que no fluya más colorante.
- h) Se lavó con agua inmediatamente para eliminar el exceso del decolorante.
- i) Se agregó 2 gotas de Safranina durante 30 segundos.

- j) Se lavó con agua inmediatamente para eliminar el exceso del colorante de contraste.
- k) Se dejó secar el frotis a temperatura ambiente.
- l) Se agregó una gota de aceite de inmersión sobre la placa.
- m) Se observó el frotis teñido al microscopio con los objetivos 10X y 40X y 100X.

El resultado obtenido de la coloración Gram, permitió observar estructuras de color azul, propio de las bacterias Gram (+), de igual forma se distinguió estructuras de Bacilos con bordes redondeados.

Después de verificar los resultados se tomó la decisión de purificar y seguir repicando las muestras, con la finalidad de obtener cepas puras.

4.3.2.2.3 Identificación macroscópica de *Phytophthora infestans*

Mediante una observación directa se verifico el tamaño, color y formación de micelio, en base a los criterios de descripción morfológica propuestos por Pérez y Forbes (2011); Puño (2011), identificando un micelio color blanco con consistencia algodonosa.

4.3.2.2.4 Identificación microscópica de *Phytophthora infestans*

La identificación microscópica de *Phytophthora infestans* se la realizó a través de las técnicas de tinción de hongos y tinción de hongos en montaje con cinta adhesiva, siguiendo el protocolo establecido por (Benavides, 2007; Reynoso *et al.*, 2015). Los mismos que permitieron observar estructuras especiales como esporangios, siendo estos de especial importancia para la identificación de *Phytophthora infestans*.

4.3.2.2.4.1 Tinción de hongos

Para la tinción de hongos, se realizó el siguiente proceso:

- a) Se preparó un frotis del micelio de *Phytophthora infestans* a partir de un medio de cultivo sólido a las 72 horas de incubación.
- b) Se fijó el frotis del micelio con ayuda de un mechero de Bunsen.
- c) El frotis se cubrió con dos gotas de azul de metileno durante 30 segundos a 1 minuto.
- d) El exceso de colorante se eliminó con un lavado suave, con la ayuda de una piseta.
- e) Dejar secar a temperatura ambiente.

f) Se observó en el microscopio con los objetivos 10X y 40X.

4.3.2.4.2 Tinción de hongos en montaje con cinta adhesiva

Para la tinción de hongos en montaje con cinta adhesiva, se realizó el siguiente proceso:

- a) Tomar una tira de 4 a 5 cm de cinta adhesiva transparente, tomándola únicamente por los extremos.
- b) Cerca del mechero abrir la caja de Petri conteniendo la muestra de micelio de *Phytophthora infestans* y presionar ligeramente la cinta transparente sobre la periferia de la colonia.
- c) Ubicar la cinta con la muestra adherida sobre una gota de azul de lactofenol, previamente colocada en el centro del portaobjetos.
- d) La cinta funciona como cubre objetos por lo que se debe aplanar lo mejor posible, evitando la formación de burbujas y sin alterar demasiado las estructuras.
- e) A continuación, se dejó reposar durante 3 a 5 minutos.
- f) Se observó en el microscopio con los objetivos 10X y 40X.

Después de verificar los resultados se tomó la decisión de purificar y seguir repicando las muestras, con la finalidad de obtener cepas puras.

4.3.2.3 Purificación de cepas

La purificación de cepas de la bacteria *Bacillus subtilis* y *Phytophthora infestans* se la realizó en base a la metodología descrita por Reynoso *et al.*, (2015) a las mismas muestras resultantes del proceso de identificación fenotípica (macroscópica y microscópica), con el fin de obtener cepas totalmente puras.

4.3.2.3.1 Purificación de *Bacillus subtilis*

Previo al proceso de purificación de la bacteria *Bacillus subtilis* y *Phytophthora infestans*, todos los materiales utilizados en laboratorio fueron esterilizados con ayuda de una autoclave a 120 °C durante 30 minutos, garantizando asepsia en todos los procesos establecidos.

Finalmente, después del proceso de aislamiento de cepas e identificación macroscópica y microscópica las colonias caracterizadas como candidatas de *Bacillus subtilis* fueron

resembradas con ayuda de un asa esterilizada inoculando 6 tubos de ensayo con 9 ml de caldo NUTRIENT BROTH (TM MEDIA®). Para su posterior incubación los tubos inoculados fueron colocados dentro de la estufa a 37,5 °C por 72 horas; luego del tiempo de incubación se volvió a repicar las muestras en cajas de Petri para continuar seleccionando las colonias con características macroscópicas y microscópicas propias de *Bacillus subtilis*, realizando 3 repeticiones hasta obtener cepas puras.

4.3.2.3.2 Purificación de *Phytophthora infestans*

Finalmente, después del proceso de aislamiento de cepas e identificación macroscópica y microscópica las colonias caracterizadas como candidatas de *Phytophthora infestans* fueron resembradas con ayuda de un asa esterilizada inoculando 7 tubos de ensayo con 9 ml de caldo NUTRIENT BROTH (TM MEDIA®). Para su posterior incubación los tubos inoculados fueron colocados dentro de la estufa a 25 °C por 72 horas; luego del tiempo de incubación se volvió a repicar las muestras en cajas de Petri para continuar seleccionando las colonias con características macroscópicas y microscópicas propias de *Phytophthora infestans*, realizando 3 repeticiones hasta obtener cepas puras.

4.3.2.4 Identificación molecular de los microorganismos

De acuerdo con el personal del laboratorio de Fitopatología y Control Biológico de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador-Quito, la extracción de ADN genómico y el análisis de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se los realizó siguiendo el protocolo sugerido por el kit Wizard® Genomic DNA Purification.

Estableciendo que para el aislamiento de ADN genómico y análisis de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la bacteria *Bacillus subtilis* el protocolo a seguir es; Aislamiento de ADN genómico de bacterias Gram positivas y Gram negativas. Mientras que, la extracción de ADN genómico y el análisis de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de *Phytophthora infestans* se lo realizó mediante el protocolo; Aislamiento de ADN genómico a partir de tejido vegetal (MacroGen Inc, 2019).

Los protocolos aplicados fueron los siguientes:

Aislamiento de ADN genómico de bacterias Gram positivas y Gram negativas

Materiales a ser suministrados por el usuario:

- Tubos de 1,5 ml de micro centrífuga
- Baño de agua, 80 °C
- Baño de agua, 37 °C
- Isopropanol, a temperatura ambiente
- Etanol al 70 %, a temperatura ambiente
- Baño de agua, 65 °C (opcional; para la rápida rehidratación de ADN)
- EDTA 50 mM (pH 8,0) (para las bacterias Gram positivas)
- 10 mg / ml de lisozima (Sigma Cat. # L4919) (para las bacterias Gram positivas)
- 10 mg / ml de lisostafina (Sigma Cat. # L7386) (para las bacterias Gram positivas)

Procedimiento:

1. Añadir 1 ml de cultivo de una noche a un tubo de 1,5 ml.
2. Centrifugar a 13 000-16 000 * revoluciones durante 2 minutos para sedimentar las células. Eliminar el sobrenadante.
3. Suspender las células en 480 µl de EDTA 50 mM.
4. Añadir la (s) enzima (s) lítica apropiada (s) al sedimento celular en un volumen total de 120 µl, y pipetear suavemente para mezcla. El propósito de este pre-tratamiento es debilitar la pared celular de manera que la lisis celular pueda ser eficiente.
5. Incubar la muestra a 37 °C durante 30-60 minutos. Centrifugar durante 2 minutos a 13 000-16 000 * revoluciones y eliminar el sobrenadante.
6. Añadir 600 µl de núcleos de Solución de Lisis. Pipetear suavemente hasta que se vuelven a suspender las células.
7. Incubar a 80 °C durante 5 minutos para lisar las células; a continuación, enfriar a temperatura ambiente.
8. Añadir 3 µl de la solución de ARNasa al lisado celular. Invertir el tubo 2-5 veces para mezclar.
9. Incubar a 37 °C durante 15-60 minutos. Enfriar la muestra a temperatura ambiente.

10. Añadir 200 µl de la solución de precipitación de proteínas al lisado celular tratado con ARNasa. Utilizar un Vortex vigorosamente a alta velocidad durante 20 segundos para mezclar la solución de precipitación de proteínas con el lisado celular.
 11. Incubar la muestra en hielo durante 5 minutos.
 12. Centrifugar a 13 000-16 000 * revoluciones durante 3 minutos.
 13. Transferir el sobrenadante que contiene el ADN a un tubo limpio de 1,5 ml que contenga 600 µl de isopropanol, mezclar en una centrifuga.
- Nota: Algunos sobrenadantes pueden permanecer en el tubo original que contiene el sedimento de proteína. Deja este líquido residual en el tubo para evitar la contaminación de la solución de ADN con la proteína precipitada.
14. Mezclar suavemente por inversión hasta que las hebras de hilo de ADN forman una masa visible.
 15. Centrifugar a 13 000-16 000 * revoluciones durante 2 minutos.
 16. Verter cuidadosamente el sobrenadante y drenar el tubo sobre papel absorbente limpio. Añadir 600 µl de etanol al 70 % a temperatura ambiente y se invierte suavemente el tubo varias veces para lavar el sedimento de ADN.
 17. Centrifugar a 13 000-16 000 * revoluciones durante 2 minutos. aspirar cuidadosamente el etanol.
 18. Drenar el tubo sobre papel absorbente limpio y permitir que el pellet se seque al aire durante 10-15 minutos.
 19. Añadir 100 µl de solución de rehidratación de ADN para el tubo y rehidratar el ADN mediante incubación a 65 °C durante 1 hora. Periódicamente mezclar la solución golpeando suavemente el tubo. Alternativamente, rehidratar el ADN incubando la solución durante la noche a temperatura ambiente o a 4 °C.
 20. Mantenga el ADN a 2-8 ° C.

Fuente: MacroGen, Inc. (2019)

Aislamiento de ADN genómico a partir de tejido vegetal

Materiales a ser suministrados por el usuario:

- Tubos de 1,5 ml de micro centrífuga
- Nitrógeno líquido
- Mortero y pistilo
- Baño de agua, 65 °C
- Baño de agua, 37 °C
- Isopropanol, temperatura ambiente
- Etanol al 70 %, temperatura ambiente

Procedimiento:

1. Procese el tejido de la hoja congelándolo con nitrógeno líquido y moliéndolo en un polvo fino usando un mortero y pistilo. Agregue 40 mg de esta hoja en polvo a un tubo de micro centrífuga de 1,5 ml.
2. Añadir 600 µl de núcleos de Solución de Lisis, y agitar 1-3 segundos para humedecer el tejido.
3. Incubar a 65 °C durante 15 minutos.
4. Añadir 3 µl de la solución de ARNasa al lisado celular, y mezclar la muestra invirtiendo el tubo 2-5 veces. Incubar la mezcla a 37 °C durante 15 minutos. Permitir que la muestra se enfríe a temperatura ambiente durante 5 minutos antes de proceder.
5. Añadir 200 µl de la solución de precipitación de proteínas, y agitar vigorosamente a alta velocidad durante 20 segundos.
6. Centrifugar durante 3 minutos a 13 000-16 000 * revoluciones. Las proteínas precipitadas formarán un sedimento compacto.
7. Retirar con cuidado el sobrenadante que contiene el ADN (dejando el sedimento de proteína detrás) y transferirlo a un tubo limpio de 1,5 ml que contenga 600 µl de isopropanol.

Nota: Algunos sobrenadantes puede permanecer en el tubo original que contiene el sedimento de proteína. Deja este líquido residual en el tubo para evitar la contaminación de la solución de ADN con la proteína precipitada.

8. Mezclar suavemente la solución por inversión hasta hebras de hilo de ADN forman una masa visible.
9. Centrifugar a 13 000-16 000 * revoluciones durante 1 minuto a temperatura ambiente.
10. Decantar cuidadosamente el sobrenadante. Añadir 600 µl de etanol al 70 % a temperatura ambiente y se invierte suavemente el tubo varias veces para lavar el ADN. Centrifugar a 13 000-16 000 * revoluciones durante 1 minuto a temperatura ambiente.
11. Aspire cuidadosamente el etanol utilizando una pipeta. El sedimento de ADN está muy suelto en este punto y se debe tener cuidado para evitar aspirar el pellet en la pipeta.
12. Invertir el tubo sobre papel absorbente limpio y permitir que el sedimento seque al aire durante 15 minutos.
13. Añadir 100 µl de solución de rehidratación del ADN y rehidratar el ADN mediante incubación a 65 °C durante 1 hora. Periódicamente mezclar la solución golpeando suavemente el tubo. Alternativamente, rehidratar el ADN incubando la solución durante la noche a temperatura ambiente o a 4 °C.
14. Mantenga el ADN a 2-8 ° C.

Fuente: Macrogen, Inc. (2019)

4.3.2.5 Secuenciación

Las muestras de ADN genómico de la bacteria *Bacillus subtilis* y *Phytophthora infestans* obtenidas por el personal del laboratorio de Fitopatología y Control Biológico de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador-Quito, fueron enviadas a la empresa Sur-Koreana Macrogen para su respectiva secuenciación.¹

4.3.3 Prueba de antagonismo

Para determinar el efecto antagonista de la bacteria *Bacillus subtilis* frente a *Phytophthora infestans* se realizó ensayos microbiológicos, mediante la utilización de cultivos duales (disco-placa), los mismos que permitieron determinar la sensibilidad que presento el patógeno frente el agente antagonista. De igual manera, para contrastar y corroborar los datos obtenidos en la prueba de antagonismo se determinó el crecimiento celular de *Bacillus*

¹ Jeniffer Yáñez, A. Mtr. Docente Investigadora, Fitopatología y Control Biológico PUCE; Ana Almeida, Becaria de Microbiología y Laboratorio de Fitopatología y Control Biológico.

subtilis vs *Phytophthora infestans* mediante la obtención de la absorbancia por espectrofotometría (450 nm) y recuento de bacterias (UFC.ml⁻¹) y esporangios (esporangios.ml⁻¹) en cámara de Neubauer durante 24 horas.

4.3.3.1 Cultivos duales

La evaluación de la bacteria *Bacillus subtilis* frente a *Phytophthora infestans* se la realizó mediante un inóculo de cultivos duales (disco-placa) siguiendo los procesos propuestos por Condor (2018); De la Cruz (2014); Picazo (2000).

4.3.3.1.1 Preparación de las concentraciones

Con la finalidad de establecer las concentraciones necesarias para el ensayo (Tabla 4), se realizó un recuento de bacterias (UFC.ml⁻¹) y esporangios (esporangios.ml⁻¹) con la ayuda de una cámara de Neubauer, a muestras de la bacteria *Bacillus subtilis* incubada a 37,5 °C por 24 horas y de *Phytophthora infestans* incubada a 25 °C por 72 horas con exposición a la luz.

Tabla 4.

Dosis de Bacillus subtilis y Phytophthora infestans

Dosis de <i>Bacillus subtilis</i>	Dosis de <i>Phytophthora infestans</i>
D1: 1x10 ⁸ UFC.ml ⁻¹	3x10 ³ esporangios.ml ⁻¹
D2: 1x10 ⁶ UFC.ml ⁻¹	
D3: 1x10 ⁴ UFC.ml ⁻¹	
Testigo: Propineb + Cimoxanil	

4.3.3.1.1.1 Conteo en cámara de Neubauer

Se determinó el número de bacterias (UFC.ml⁻¹) y esporangios (esporangios.ml⁻¹) por unidad de volumen del líquido, basándose en los procesos mencionados por (Caicedo y Chacón, 2017; Gavilánez y Salazar, 2016; Rodríguez, 2012).

Para el conteo en cámara de Neubauer de *Bacillus subtilis* y *Phytophthora infestans*, se realizó el siguiente proceso:

4.3.3.1.3 Prueba de antagonismo por cultivos duales (disco - placa)

El proceso aplicado fue el siguiente:

- a) Se usó 4 vasos de precipitación; en 3 vasos se colocó 3 ml de caldo nutritivo de cada uno de los tratamientos a evaluar; D1 (*Bacillus subtilis*, dosis: 1×10^8 UFC.ml⁻¹); D2 (*Bacillus subtilis*, dosis: 1×10^6 UFC.ml⁻¹); D3 (*Bacillus subtilis*, dosis: 1×10^4 UFC.ml⁻¹) y 1 vaso con 3 ml de la preparación del Testigo (Propineb + Cimoxanil, dosis: 0,025 g.ml⁻¹). Continuamente se depositó círculos de papel filtro en los vasos de precipitación, con el objetivo de saturar la absorción del círculo de papel, de tal manera, que se evita el escurrimiento del líquido en el momento de su ubicación.
- b) Se preparó 240 ml del medio de cultivo MUELLER HINTON AGAR (TM MEDIA®); el cual se vertió a razón de 20 ml por caja de Petri utilizada. De acuerdo al diseño experimental planteado, se necesitó un total de 12 cajas de Petri, cada una de ellas inoculada con *Phytophthora infestans* (dosis: 3×10^3 esporangios.ml⁻¹), las mismas que fueron incubadas a 25° C durante 72 horas con exposición a la luz; El proceso de inoculación del patógeno se lo realizó con ayuda de un Hisopos Quick Swab (3M), se introduce el hisopo en la muestra del patógeno, esperando que absorba durante 3 a 4 segundos, luego se regresa el hisopo a su contenedor, en la parte superior del hisopo se encuentra caldo nutritivo, el cual, se debe depositar en el contenedor del hisopo, asegurando que el líquido se mezcle con la muestra tomada. Con las cajas de Petri cerca de un mechero de Bunsen procedemos a destaparlas; con la ayuda del Hisopos Quick Swab (3M) + la muestra, se procede a inocular toda la superficie del agar, realizando movimientos ascendentes y descendentes; incluir rotaciones de la caja de Petri garantiza un cubrimiento total de su área.
- c) Previo a la ubicación de los círculos de papel filtro, se traza un cuadrante imaginario en la placa, tratando de dividir en cuadrantes homogéneos.
- d) Acercamos las cajas de Petri a un mechero de Bunsen y procedemos a la ubicación de los círculos; considerando una distancia de 3,5 cm entre círculos, respectivamente se ubica 4 círculos de papel en los cuatro puntos cardinales (Figura 10); Se repite el proceso con todos los tratamientos y repeticiones.
- e) Finalmente se ubican las cajas de Petri en la estufa a 37,5 °C durante 24 horas.

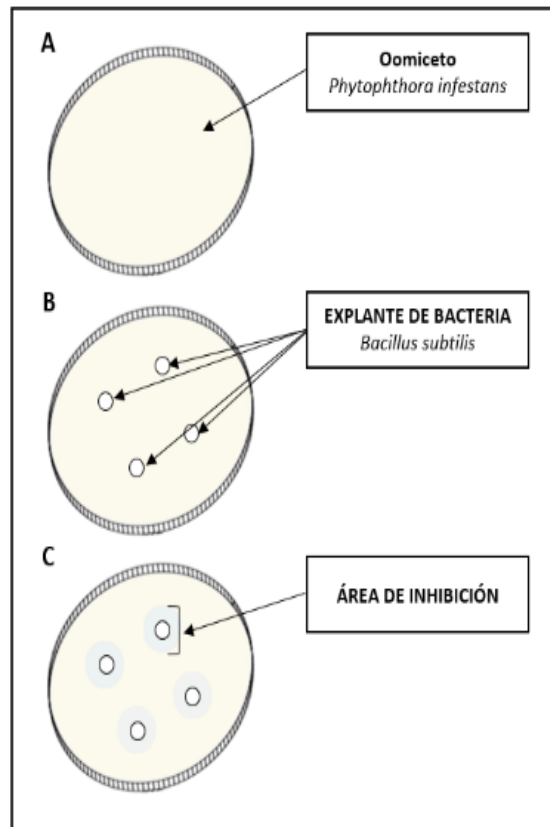


Figura 10. Diagrama del ensayo de antagonismo *in vitro* de *Bacillus subtilis* vs *Phytophthora infestans*.

Adaptado de De la Cruz (2014).²

La lectura de los antibiogramas se la realizó a las 24 horas de incubación de los microorganismos, dando como resultado la presencia de halos inhibitorios (Figura 17), posteriormente se determinó el diámetro de inhibición (mm) con la ayuda de un pie de rey o calibrador.

4.3.3.2 Crecimiento celular

Mediante la determinación de absorbancia por espectrofotometría (450 nm) y un recuento de bacterias (UFC.ml⁻¹) y esporangios (esporangios.ml⁻¹) en cámara de Neubauer, se estableció el crecimiento celular durante 24 horas, corroborando a los resultados obtenidos en la prueba de antagonismo. Reflejando que los valores obtenidos por medio de estos procesos, permiten apreciar con mayor lucidez el comportamiento antagonista de la bacteria *Bacillus subtilis* frente a *Phytophthora infestans*.

² Nota: A= Siembra del oomiceto, B= Explante de la bacteria, C= Área de inhibición.

4.3.3.2.1 Espectrofotometría (450 nm)

Para el proceso de espectrofotometría (450 nm) se evaluó 5 tratamientos con 3 repeticiones (Tabla 5), de tal manera, que intervinieron las mismas dosis empleadas en las pruebas de antagonismo.

Tabla 5.

Tratamientos implementados en la investigación para determinar el crecimiento celular de Bacillus subtilis vs Phytophthora infestans

	Caldo nutritivo (NUTRIENT BROTH)	(Phytophthora infestans)	(Bacillus subtilis)	Dosis
	ml	ml	ml	
T1	9,00	1,00	---	3x10 ³ esporangios.ml ⁻¹ 1x10 ⁸ UFC.ml ⁻¹
T2	8,00	1,00	1,00	vs 3x10 ³ esporangios.ml ⁻¹ 1x10 ⁶ UFC.ml ⁻¹
T3	8,25	1,00	0,75	vs 3x10 ³ esporangios.ml ⁻¹ 1x10 ⁴ UFC.ml ⁻¹
T4	8,50	1,00	0,50	vs 3x10 ³ esporangios.ml ⁻¹
T5	9,00	---	1,00	1x10 ⁸ UFC.ml ⁻¹

Nota: T= Tratamiento, UFC= Unidades Formadoras de Colonias.

Para evaluar la interacción y comportamiento de la bacteria *Bacillus subtilis* vs *Phytophthora infestans* se realizó lo siguiente:

- Todos los materiales utilizados en laboratorio fueron esterilizados con ayuda de una autoclave a 120 °C durante 30 min, garantizando asepsia en todos los procesos establecidos.
- Previo al tratamiento se inóculo muestras de *Bacillus subtilis* incubada a 37,5 °C por 24 horas y *Phytophthora infestans* incubada a 25 °C por 72 horas en tubos de ensayo con caldo NUTRIENT BROTH (TM MEDIA).

- c) Utilizando la cámara de Neubauer se realizó un recuento de bacterias (UFC.ml^{-1}) y esporangios ($\text{esporangios.ml}^{-1}$) a las muestras de *Bacillus subtilis* y *Phytophthora infestans*, para determinar las dosis necesarias para el ensayo (Tabla 5).
- d) Se dispuso de una gradilla y 15 tubos de ensayo, en los cuales se preparó los distintos tratamientos. Con los tratamientos listos se procede a usar una micropipeta tomando 100 μl de cada tratamiento y repetición.
- e) La muestra tomada se depositó dentro de los pasillos de la placa para espectrofotometría, considerando el orden del tratamiento y repetición; la placa consta de 86 pasillos, los que están numerados de (A-H) y (1-12)
- f) Después de tomar la muestra de cada tratamiento y repetición, la gradilla con las muestras son devueltas a la incubadora, permitiendo el crecimiento normal de los microorganismos.
- g) Continuamente se introdujo la placa en el espectrofotómetro, y al cabo de 40 segundos se obtuvo resultados.
- h) Este proceso se lo realizó a todos los tratamientos y repeticiones, tomando datos cada hora durante 24 horas consecutivas.



Figura 11. Placa para espectrofotometría; Laboratorios PUCESI.

Fuente: El autor

4.3.3.2.2 Recuento de bacterias (UFC.ml⁻¹) y esporangios (esporangios.ml⁻¹) en cámara de Neubauer a la hora 0-5-10-15-20 y 24

Continuamente al proceso de espectrofotometría (450 nm), se realizó un recuento de bacterias (UFC.ml⁻¹) y esporangios (esporangios.ml⁻¹), el cual, servirá para contrastar los resultados obtenidos de la absorbancia por espectrofotometría (450 nm).

El recuento se lo realizó en las horas 0-5-10-15-20 y 24, considerando los picos de mayor relevancia en el análisis de absorbancia por espectrofotometría (450 nm) (Figura 20); siguiendo los procesos mencionado por (Caicedo y Chacón, 2017; Gavilánez y Salazar, 2016; Rodríguez, 2012).

- Se agregó una gota de muestra líquida (caldo nutritivo) de cada uno de los tratamientos (Tabla 5), sobre todo el recuadro de conteo, manteniendo un conteo a la hora correspondiente.
- Se colocó el cubre objetos, evitando formar burbujas de aire.
- Se observó con un microscopio óptico, usando el objetivo 40X.
- Para una mayor homogenización del recuento, se contó los 4 cuadrantes (64 cuadros), continuo al proceso, se calculó un promedio de los valores obtenidos en los 4 cuadrantes.
- Siguiendo la siguiente formula: # de esporas contadas x factor de dilución, se obtiene el número de partículas por unidad de volumen del líquido.



Figura 12. Cámara de Neubauer; Laboratorios PUCESI.

Fuente: El autor

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Análisis estadístico

Los resultados de la investigación se los obtuvo a través de procesos específicos, como: aislamiento e identificación fenotípica (macroscópica y microscópica) de cepas puras, secuenciación molecular de los microorganismos y pruebas de antagonismo. Adicionalmente para corroborar los resultados obtenidos en la prueba de antagonismo se determinó el crecimiento celular mediante la obtención de la absorbancia por espectrofotometría (450 nm) y recuento de bacterias (UFC.ml⁻¹) y esporangios (esporangios.ml⁻¹) en cámara de Neubauer a la hora 0-5-10-15-20 y 24.

Los datos obtenidos en la investigación fueron tabulados y procesados, mediante el programa Microsoft Excel, Además, para el análisis de los datos se empleó la herramienta estadística InfoStat. Mientras que los datos pertenecientes a las variables evaluadas (Tabla 6) fueron examinados estadísticamente mediante un análisis de varianza (ADEVA), bajo el nivel de significancia de la prueba TUKEY 5 %.

5.1.1 Variables evaluadas

Por medio de la investigación realizada se determinó el efecto antagonista de la bacteria *Bacillus subtilis* frente a *Phytophthora infestans*, la misma que evaluó las siguientes variables: Tabla 6.

Tabla 6.

Variables y sus indicadores

VARIABLES	INDICADORES
Diámetro de halos inhibitorios	mm (milímetros)
Crecimiento celular	Curva de crecimiento (Absorbancia por espectrofotometría 450 nm/ comprobado por cámara de Neubauer)

5.2 Identificación macroscópica de *Bacillus subtilis*

Como se muestra en la figura 13, en el cuadro (A) se identificaron las colonias de *Bacillus subtilis* aisladas de la rizosfera de papa (*Solanum tuberosum*), incubadas a 37,5 °C durante 24 horas, en medio de cultivo MRS-Agar (MERCK®). Se determinó las características morfológicas macroscópicas de la bacteria, seleccionando las colonias que presentaron forma irregular con borde ondulado, elevación planoconvexa con superficie opaca, color crema con consistencia seca, tamaño aproximado de 2 a 4 mm de diámetro. Características que son similares a las descritas por Calvo y Zúñiga (2010), colonias con un tamaño de 2 a 4 mm con consistencia seca, bordes irregulares ondulados, color blanco o crema, cuadro (B).

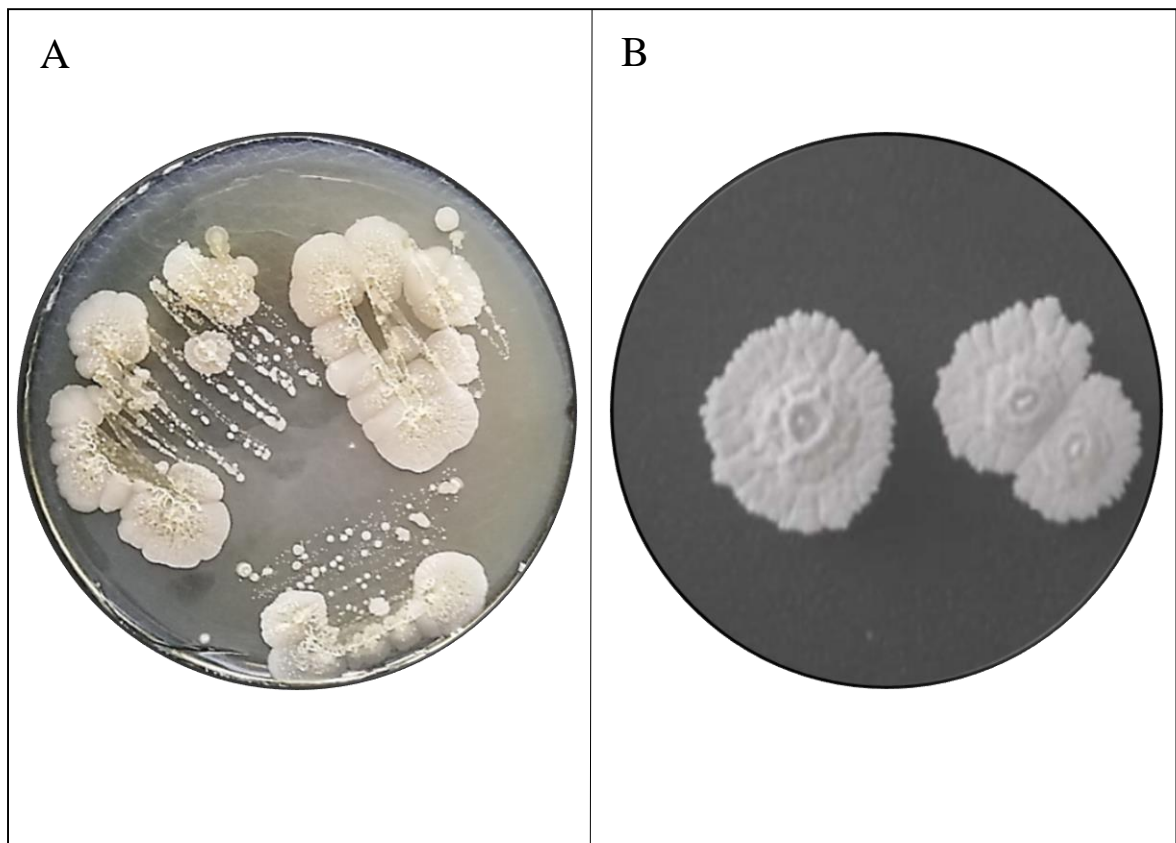


Figura 13. A: Colonias de *Bacillus subtilis* en medio de cultivo MRS-Agar (MERCK®) (El autor). B: Colonias de *Bacillus subtilis* en medio de cultivo TGE (Calvo y Zúñiga, 2010).

5.3 Identificación microscópica de *Bacillus subtilis*

En la figura 14 se demuestra la caracterización microscópica de la bacteria *Bacillus subtilis* demostró bacilos Gram positivos de color azul y bordes redondeados, cuadro (A); siendo características similares con las mencionadas por Realpe *et al.*, (2014); bacilos gran positivos con presencia de esporas esféricas y centrales, cuadro (B).

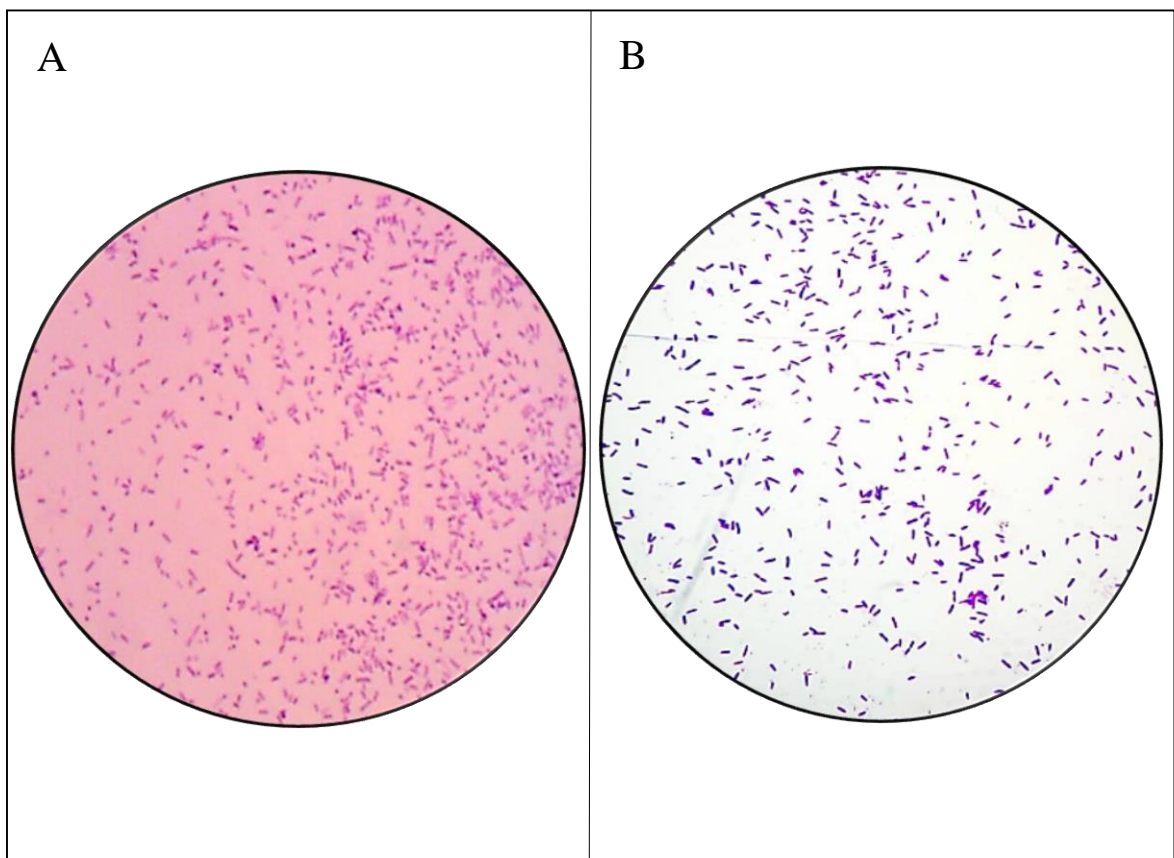


Figura 14. A: Bacilos Gram positivos (El autor). B: Bacilos Gram positivos (Realpe *et al.*, 2014).

5.4 Identificación macroscópica de *Phytophthora infestans*

Como se muestra en la figura 15, las características morfológicas macroscópicas de *Phytophthora infestans* aislado de material vegetal (hojas y tallos) infectado en cultivo de papa (*Solanum tuberosum*), incubado a 25 °C durante 72 horas con exposición a la luz, en medio de cultivo POTATO DEXTROSE AGAR (TM MEDIA®). Presenta micelio de color blanco en forma algodonosa, cuadro (A); características que son similares a las descritas por Puño *et al.*, (2011), micelio de color blanco con consistencia algodonosa, cuadro (B).

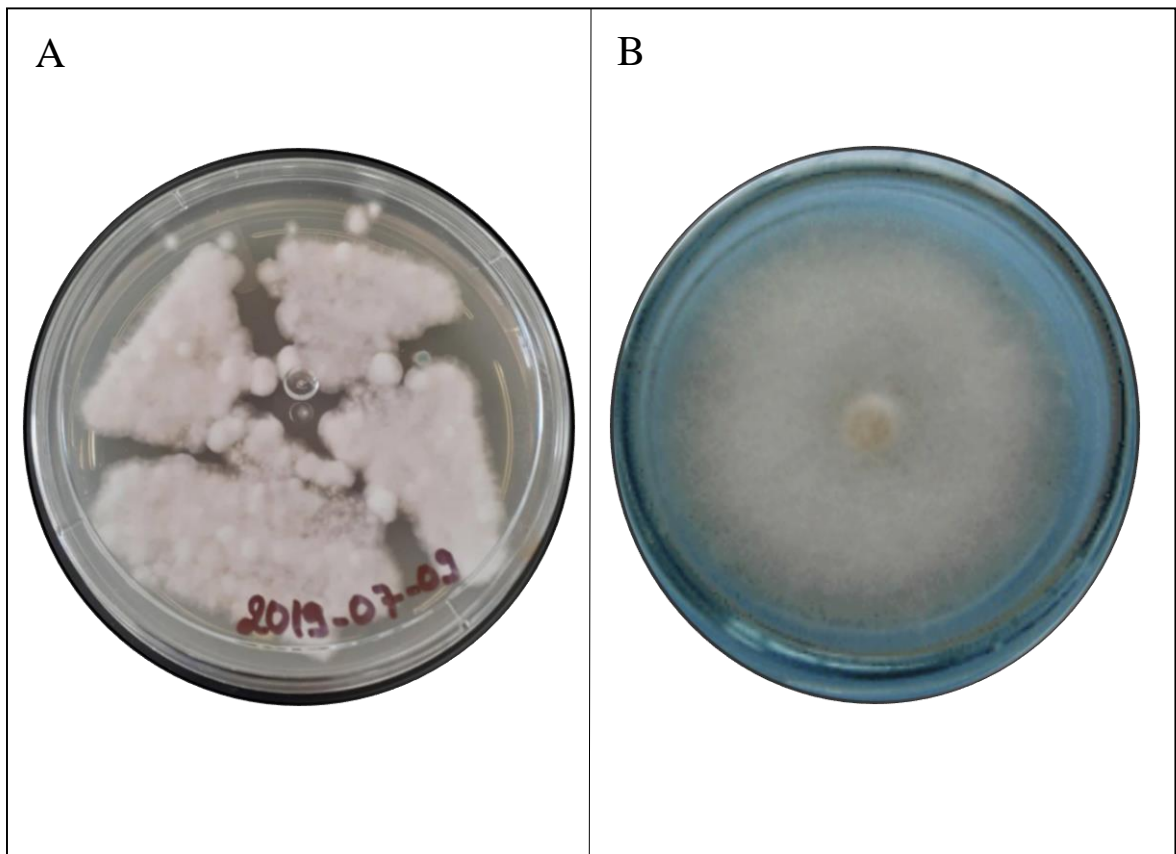


Figura 15. A: Micelio de *Phytophthora infestans* aislado de material vegetal infectado en medio de cultivo PDA (El autor). B: Micelio de *Phytophthora infestans* aislado de material vegetal infectado en medio de cultivo PDA por Puño *et al.*, (2011).

5.5 Identificación microscópica de *Phytophthora infestans*

En la figura 16 se demuestra la caracterización microscópica de *Phytophthora infestans* permitió observar esporangios a limoniformes, cuadro (A); por lo que el aislado mostro semejanza con las estructuras identificadas por Puño *et al.*, (2011); los esporangios son ovoides, elipsoidales a limoniformes, cuadro (B).

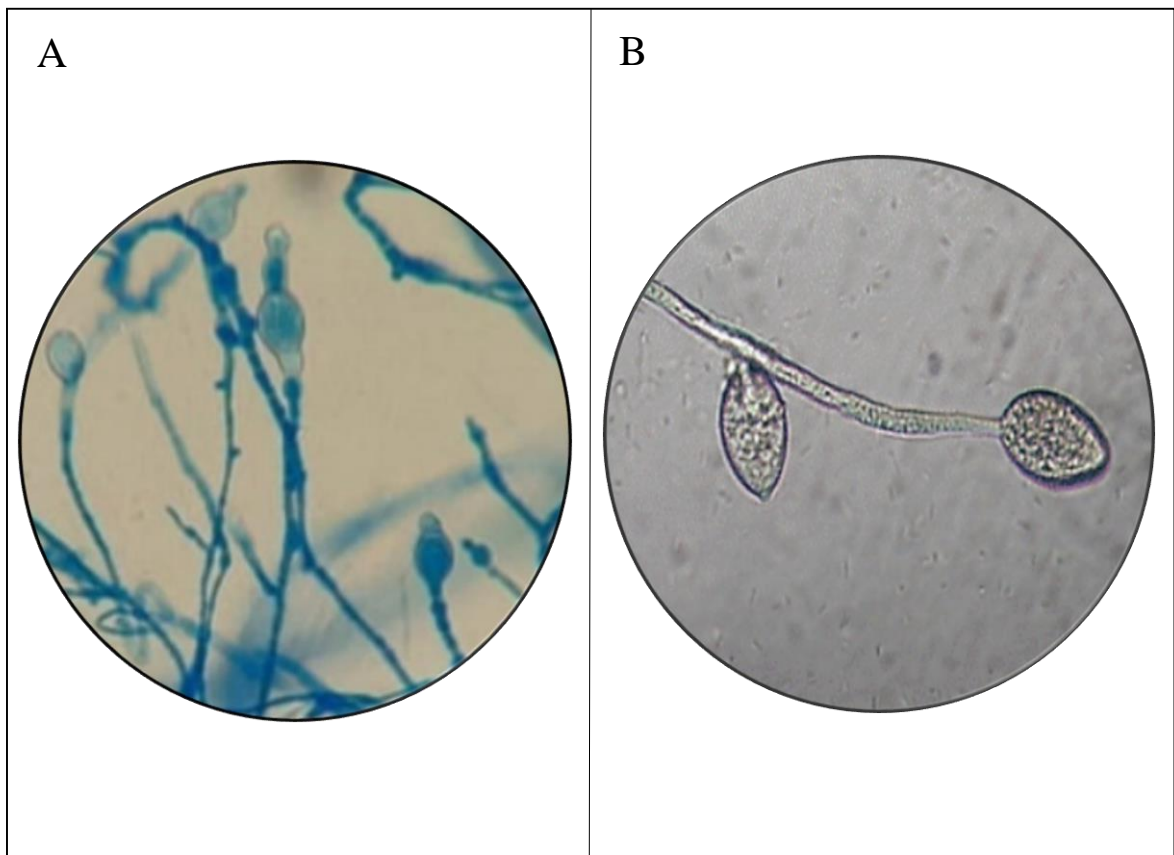


Figura 16. A: *Phytophthora infestans*; identificación de estructuras (El autor). B: *Phytophthora infestans*; identificación de estructuras por Puño *et al.*, (2011).

5.6 Identificación molecular de los microorganismos

Todo el proceso destinado a la identificación molecular de la bacteria *Bacillus subtilis* y *Phytophthora infestans*, fue realizado en el Laboratorio de Fitopatología y Control Biológico de la Pontificia Universidad Católica-Quito, obteniendo material genético puro de los microorganismos en estudio, posteriormente el servicio de secuenciación de ADN lo realizó la empresa Sur-Koreana Macrogen.³

5.7 Secuenciación

Los productos de la secuenciación (electroferograma) proporcionados por la empresa Sur-Koreana Macrogen, fueron analizados, codificados y alineados mediante la utilización de la herramienta bioinformática MEGA (Análisis Molecular Genético Evolutivo), continuamente fueron sometidas al lector BLAST-Online (Herramienta Básica Local para la Búsqueda de Alineamiento) que compara la secuencias de estudio con la secuencia que se encuentra en la bases de datos GenBank-NCBI (Centro Nacional para Información Biotecnológica), exponiendo los siguientes resultados (Salas, 2015).

Tabla 7.

Secuencias relativamente más cercanas secuenciadas por BLAST

CEPA	Secuencia relativa más cercana	Porcentaje de identificación	Identificación de la secuencia GenBank	Grupo
1	<i>Bacillus subtilis</i>	99,93 %	KJ870198,1	Bacilos
2	<i>Phytophthora infestans</i>	100 %	MH401206,1	Oomicetos

³ Jeniffer Yáñez, A. Mtr. Docente Investigadora, Fitopatología y Control Biológico PUCE; Ana Almeida, Becaria de Microbiología y Laboratorio de Fitopatología y Control Biológico.

5.8 Pruebas de normalidad y homogeneidad de la varianza

Luego de obtener los resultados del diámetro de halos inhibitorios (mm) y absorbancia por espectrofotometría (450 nm) se realizó pruebas de normalidad de Shapiro–Wilk, obteniendo valores estadísticos mayores a ($p\text{-value} > 0,05$) demostrando que los datos se distribuyen de forma normal. Conjuntamente se realizó evaluaciones de la homogeneidad de la varianza mediante la prueba de Leven, obteniendo valores estadísticos F calculado, mayores a 0,05, que demuestran homogeneidad entre los valores, (Tabla 8).

Tabla 8.

Pruebas de normalidad Shapiro-Wilk y homogeneidad de la varianza

Variable	n	Media	Desviación Estándar	W*	p-value	Homogeneidad de la var. Valor F
Diámetro de halos inhibitorios (mm)	12	14,27	2,25	0,92	0,4665	0,8010
Absorbancia por espectrofotometría (450 nm)	125	0,27	0,05	0,97	0,1443	0,0695

5.9 Diámetro de halos inhibitorios (mm)

5.9.1 Resultados del diámetro de halos inhibitorios (mm) de *Bacillus subtilis* vs *Phytophthora infestans*

De acuerdo a los resultados del efecto antagonista de la bacteria *Bacillus subtilis* frente a *Phytophthora infestans*, el ensayo de los cultivos duales (disco-placa) en placas incubadas a 37,5 °C durante 24 horas, permitió visualizar diferentes lecturas del diámetro de halos inhibitorios (mm) obtenidas en el laboratorio de Microbiología de la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales perteneciente a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra, (Figura 17).

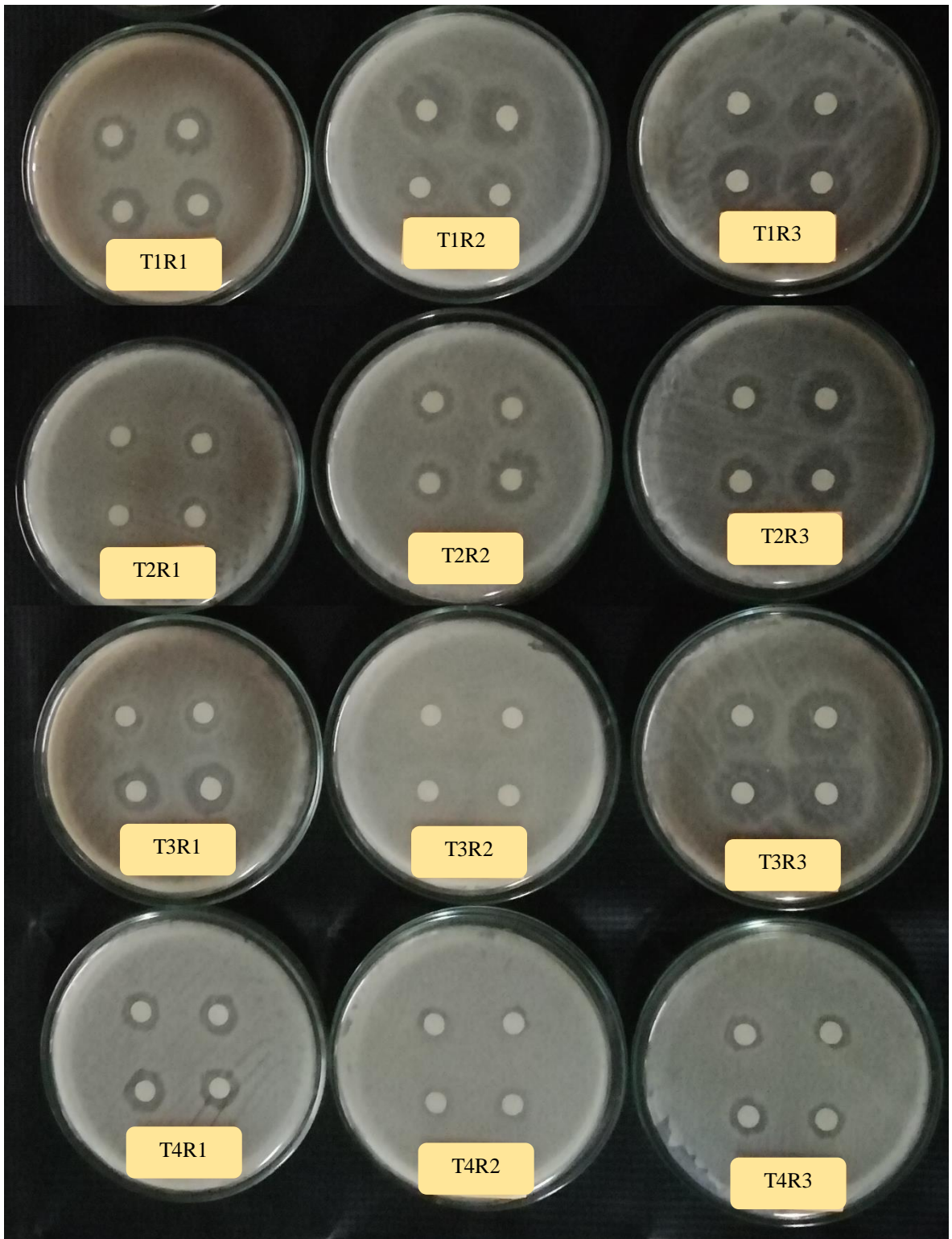


Figura 17. Halos inhibitorios; Presencia de sensibilidad de *Phytophthora infestans* frente la bacteria *Bacillus subtilis*, placas incubadas a 37,5 °C durante 24 horas en medio de cultivo MUELLER HINTON AGAR (TM MEDIA®).

Fuente: El autor

En la tabla 9, se puede apreciar los valores correspondientes al diámetro de halos inhibitorios (mm) de *Bacillus subtilis* vs *Phytophthora infestans*, los mismos que presentan diferencias entre tratamientos, siendo el T1 (*Bacillus subtilis*, dosis: 1×10^{-8} UFC.ml⁻¹ vs *Phytophthora infestans*, dosis: 3×10^3 esporangios.ml⁻¹) la dosis más sobresaliente con un promedio de diámetro de halo inhibitorio de 16,86 mm, mientras que el tratamiento con menor promedio de diámetro de halo inhibitorio corresponde al T4 (testigo, Propineb + Cimoxanil: dosis 0,025 g.ml⁻¹ vs *Phytophthora infestans*, dosis: 3×10^3 esporangios.ml⁻¹) con un diámetro de 12,36 mm.

Tabla 9.

Diámetro de halos inhibitorios (mm) de Bacillus subtilis vs Phytophthora infestans.

	R1	R2	R3	\bar{X}
T1	16,56	17,03	16,99	16,86
T2	14,11	14,49	15,24	14,61
T3	13,42	11,40	14,89	13,24
T4	14,65	9,42	13,01	12,36

Nota: T1= *Bacillus subtilis*, dosis 1×10^8 UFC.ml⁻¹ vs *Phytophthora infestans*, dosis 3×10^3 esporangios.ml⁻¹
T2= *Bacillus subtilis*, dosis 1×10^6 UFC.ml⁻¹ vs *Phytophthora infestans*, dosis 3×10^3 esporangios.ml⁻¹
T3= *Bacillus subtilis*, dosis 1×10^4 UFC.ml⁻¹ vs *Phytophthora infestans*, dosis 3×10^3 esporangios.ml⁻¹
T4= Testigo: Propineb + Cimoxanil, dosis 0,025 g.ml⁻¹ vs *Phytophthora infestans*, dosis 3×10^3 esporangios.ml⁻¹
R= Repetición
 \bar{X} = Promedio del diámetro de halos inhibitorios (mm)

El análisis de varianza (ADEVA) de la tabla 10, expresa los valores correspondientes al diámetro de halos inhibitorios (mm) a las 24 horas después de la incubación, evidenciando que existen diferencias significativas entre los tratamientos.

Además, revela que el coeficiente de variación 4,04 % indica que el análisis de los datos obtenidos de las unidades experimentales tuvo una confiabilidad aceptable, ya que el límite máximo permitido en pruebas *in vitro* es ($CV \leq 8 \%$).

Tabla 10.

Análisis de varianza del diámetro de halos inhibitorios (mm) de Bacillus subtilis vs Phytophthora infestans

F.V.	SC	gl	CM	F	p-value	Significancia
Tratamientos	34,63	3	11,54	5,49	0,0372	*
Repetición	8,63	2	4,32	2,05	0,2093	ns
Error	12,62	6	2,1			
Total	55,87	11				
			CV=	4,04 %		
			\bar{X} =	14,26 mm		

* Diferencia significativa ($p < 0,05$)

** Diferencia altamente significativa ($p < 0,01$)

ns No existe diferencia significativa ($p > 0,05$)

Nota: F.V.= Fuentes de Variación, SC= Suma de Cuadrados, gl= Grados de Libertad, CM= Cuadrados Medios, F= Valor F, CV= Coeficiente de variación, \bar{X} = Promedio del diámetro de halos inhibitorios (mm).

Al realizar la prueba Tukey 5 % (Figura 18), se observa la existencia de tres rangos de significancia (A); (AB) y (B), en el cual, se puede apreciar que existen diferencias significativas entre tratamientos. El tratamiento con mayor diámetro de halo inhibitorio (mm) pertenece al T1 (*Bacillus subtilis*, dosis: 1×10^{-8} UFC.ml⁻¹ vs *Phytophthora infestans*, dosis: 3×10^3 esporangios.ml⁻¹) con un diámetro de 16,86 mm, observándose en el rango A y el tratamiento con menor diámetro de halo inhibitorio corresponde a la dosis T4 (testigo, Propineb + Cimoxanil; dosis: 0,025 g.ml⁻¹ vs *Phytophthora infestans*, dosis: 3×10^3 esporangios.ml⁻¹) con un diámetro de 12,36 mm, observándose en el rango B.

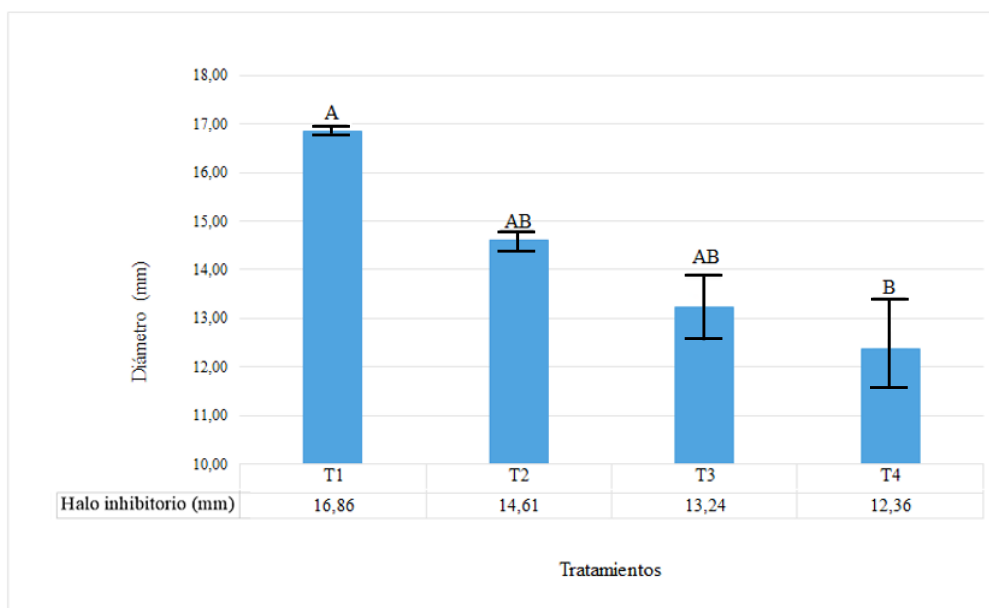


Figura 18. Prueba Tukey 5 % para el diámetro de halos inhibitorios (mm) de *Bacillus subtilis* vs *Phytophthora infestans*.

Nota: T1= *Bacillus subtilis*, dosis 1×10^8 UFC.ml⁻¹ vs *Phytophthora infestans*, dosis 3×10^3 esporangios.ml⁻¹
 T2= *Bacillus subtilis*, dosis 1×10^6 UFC.ml⁻¹ vs *Phytophthora infestans*, dosis 3×10^3 esporangios.ml⁻¹
 T3= *Bacillus subtilis*, dosis 1×10^4 UFC.ml⁻¹ vs *Phytophthora infestans*, dosis 3×10^3 esporangios.ml⁻¹
 T4= Testigo: Propineb + Cimoxanil, dosis 0,025 g.ml⁻¹ vs *Phytophthora infestans*, dosis 3×10^3 esporangios.ml⁻¹

De acuerdo a los valores expuestos en la tabla 10 y figura 18, se acepta la hipótesis alternativa determinando que la bacteria *Bacillus subtilis* presenta actividad biocontroladora frente a *Phytophthora infestans*, probablemente debido a los productos de los metabolitos extracelulares que afectan al crecimiento del microorganismo patógeno.

Ñacato y Valencia (2016), confirman que los resultados expuestos demuestran que *Bacillus subtilis* presenta actividad biocontroladora de fitopatógenos, por su capacidad de producir una gran cantidad de metabolitos inhibitorios, ya que la capacidad antagonista de la bacteria radica principalmente en la capacidad de producir antibióticos con capacidad antifúngica, contribuyendo a la inhibición del crecimiento del patógeno.

De igual manera, Villarreal-Delgado *et al.*, (2018) define que el efecto antagonista de *Bacillus subtilis* es producto de una antibiosis, la misma que tiene un efecto controlador de hongos filamentosos por acción de la Fengicina, siendo este un lipopéptido que actúa sobre

la membrana citoplasmática de las células fúngicas, provocando la formación de poros y un desbalance osmótico, lo que desencadena la muerte celular de los microorganismos fitopatógenos.

Mientras que Cobo (2017), menciona que el mecanismo de acción de *Bacillus subtilis* se da mediante la secreción de diversas sustancias metabólicas, como péptidos, fosfolípidos y lipopéptidos. Por lo general la actividad biocontroladora suprimir el crecimiento de hongos, oomicetos y bacterias fitopatógenas mediante la producción de metabolitos fúngicos, entre los cuales 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-Hernández *et al.*, 2011). Sin embargo, el mecanismo de antibiosis por *Bacillus subtilis* involucra la interacción de más de uno de estos metabolitos, para ejercer su actividad biocontroladora (Ñacato y Valencia 2016).

5.10 Crecimiento celular

Para seguir el curso del crecimiento bacteriano y de esporangios fue necesario emplear un método óptico, mediante la utilización del espectrofotómetro, el mismo que permitió determinar la cantidad de luz absorbida por la suspensión de células. Este método permitió realizar un proceso exacto y rápido para determinar la masa celular por unidad de volumen del cultivo (Sanz, 2011). De igual manera los resultados obtenidos por espectrofotometría fueron comprobados mediante el recuento de bacterias (UFC.ml⁻¹) y esporangios (esporangios.ml⁻¹) en cámara de Neubauer.

5.10.1 Resultados de la absorbancia por espectrofotometría (450 nm)

Los resultados de la absorbancia por espectrofotometría (450 nm) de la bacteria *Bacillus subtilis* frente a *Phytophthora infestans* evaluó 5 tratamientos con 3 repeticiones de muestras incubadas a 37,5 °C durante 48 horas en una estufa (Tabla 5), obteniendo valores de absorbancia cada hora durante 24 horas consecutivas; Anexo 36.

El análisis de varianza (ADEVA) de la tabla 11, expresa los valores correspondientes a la absorbancia por espectrofotometría (450 nm) durante 24 horas, evidenciando diferencias altamente significativas entre los tratamientos.

Además, revela que el coeficiente de variación 5,8 % indica que el análisis de los datos obtenidos de las unidades experimentales tuvo una confiabilidad aceptable, ya que el límite máximo permitido en pruebas *in vitro* es ($CV \leq 8 \%$).

Tabla 11.

Análisis de varianza de la absorbancia por espectrofotometría (450 nm).

F.V.	SC	gl	CM	F	p-value	Significancia
Tratamientos	0,14	4	0,04	144,23	<0,0001	**
Hora	0,11	24	0,0048	19	<0,0001	**
Error	0,02	96	0,00025			
Total	0,28	124				
			CV=	5,8 %		
			\bar{X} =	0,27 nm		

* Diferencia significativa ($p < 0,05$)

** Diferencia altamente significativa ($p < 0,01$)

ns No existe diferencia significativa ($p > 0,05$)

Nota: F.V.= Fuentes de Variación, SC= Suma de Cuadrados, gl= Grados de Libertad, CM= Cuadrados Medios, F= Valor F, CV= Coeficiente de variación, \bar{X} = Promedio de la absorbancia por espectrofotometría (450 nm).

Al realizar la prueba Tukey al 5 % (Figura 19), se observa la existencia de cuatro rangos de significancia (A); (B); (C) y (D), en el cual, se puede apreciar que existen diferencias altamente significativas entre tratamientos. El tratamiento que presenta mayor absorbancia por espectrofotometría (450 nm) pertenece al T2 (*Bacillus subtilis*, dosis 1×10^8 UFC.ml⁻¹ vs *Phytophthora infestans*, dosis 3×10^3 esporangios.ml⁻¹), observándose en el rango A y el tratamiento con menor absorbancia por espectrofotometría (450 nm) corresponde al T1 (*Bacillus subtilis*, dosis 1×10^8 UFC.ml⁻¹), observándose en el rango D.

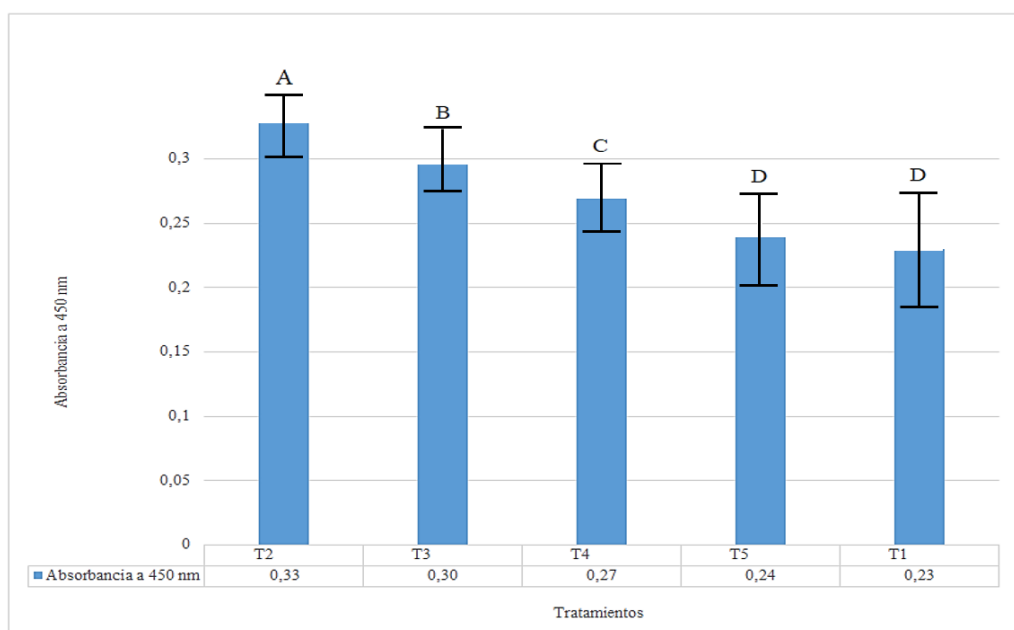


Figura 19. Prueba Tukey 5 % de la absorbancia por espectrofotometría (450 nm) de *Bacillus subtilis* vs *Phytophthora infestans*.

Nota: T1= *Phytophthora infestans*, dosis 3×10^3 esporangios.ml⁻¹
 T2= *Bacillus subtilis*, dosis 1×10^8 UFC.ml⁻¹ vs *Phytophthora infestans*, dosis 3×10^3 esporangios.ml⁻¹
 T3= *Bacillus subtilis*, dosis 1×10^6 UFC.ml⁻¹ vs *Phytophthora infestans*, dosis 3×10^3 esporangios.ml⁻¹
 T4= *Bacillus subtilis*, dosis 1×10^4 UFC.ml⁻¹ vs *Phytophthora infestans*, dosis 3×10^3 esporangios.ml⁻¹
 T5= *Bacillus subtilis*, dosis 1×10^8 UFC.ml⁻¹

De acuerdo al diagrama presente en la figura 20 se observa la absorbancia por espectrofotometría (450 nm) de la bacteria *Bacillus subtilis* vs *Phytophthora infestans* durante 24 horas, en el cual los tratamientos T1 (*Phytophthora infestans*, dosis 3×10^3 esporangios.ml⁻¹) y T5 (*Bacillus subtilis*, dosis 1×10^8 UFC.ml⁻¹) corresponden a las dosis puras de la bacteria *Bacillus subtilis* y *Phytophthora infestans*.

Mientras tanto, los tratamientos T2 (T2= *Bacillus subtilis*, dosis 1×10^8 UFC.ml⁻¹ vs *Phytophthora infestans*, dosis 3×10^3 esporangios.ml⁻¹), T3 (*Bacillus subtilis*, dosis 1×10^6 UFC.ml⁻¹ vs *Phytophthora infestans*, dosis 3×10^3 esporangios.ml⁻¹) y T4 (T4= *Bacillus subtilis*, dosis 1×10^4 UFC.ml⁻¹ vs *Phytophthora infestans*, dosis 3×10^3 esporangios.ml⁻¹) corresponden a las dosis en interacción con el oomiceto, (Tabla 5).

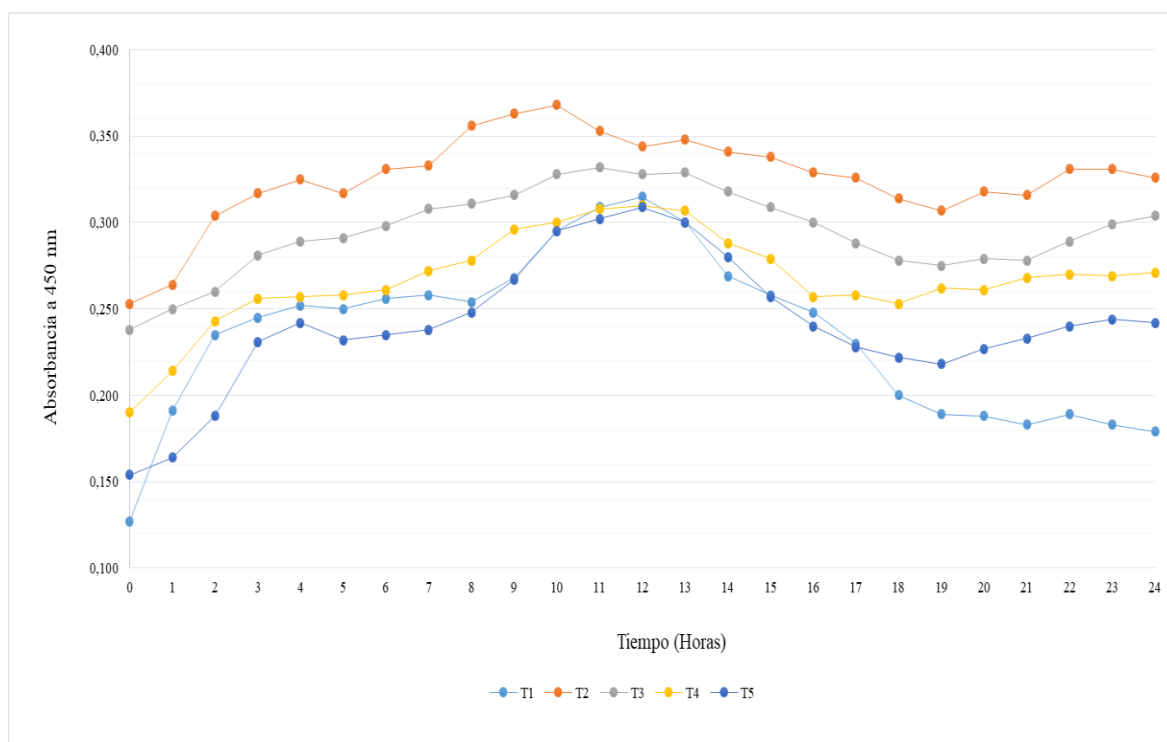


Figura 20. Determinación de la absorbancia por espectrofotometría (450 nm) de *Bacillus subtilis* vs *Phytophthora infestans*.

Nota: T1= *Phytophthora infestans*, dosis 3×10^3 esporangios.ml⁻¹
 T2= *Bacillus subtilis*, dosis 1×10^8 UFC.ml⁻¹ vs *Phytophthora infestans*, dosis 3×10^3 esporangios.ml⁻¹
 T3= *Bacillus subtilis*, dosis 1×10^6 UFC.ml⁻¹ vs *Phytophthora infestans*, dosis 3×10^3 esporangios.ml⁻¹
 T4= *Bacillus subtilis*, dosis 1×10^4 UFC.ml⁻¹ vs *Phytophthora infestans*, dosis 3×10^3 esporangios.ml⁻¹
 T5= *Bacillus subtilis*, dosis 1×10^8 UFC.ml⁻¹

Los valores de absorbancia obtenidos por espectrofotometría (450 nm) del T5 (*Bacillus subtilis*, dosis 1×10^8 UFC.ml⁻¹) demuestran que el crecimiento celular de la bacteria presenta tres fases en su crecimiento; en su fase exponencial ocurre una replicación acelerada entre un lapso no mayor a 4 horas, posterior a ello, aparece la fase de latencia la misma que produce una estabilización en su crecimiento, en la 8 hora vuelve a replicarse volviendo a su fase de latencia y finalmente en la hora 13 entra en su fase de muerte, hasta posteriormente a la 20 hora *Bacillus subtilis* inicia un nuevo ciclo.

Mientras que, los tratamientos en interacción: T2 (*Bacillus subtilis*, dosis 1×10^8 UFC.ml⁻¹ vs *Phytophthora infestans*, dosis 3×10^3 esporangios.ml⁻¹), T3 (*Bacillus subtilis*, dosis 1×10^6 UFC.ml⁻¹ vs *Phytophthora infestans*, dosis 3×10^3 esporangios.ml⁻¹) y T4 (*Bacillus subtilis*,

dosis 1×10^4 UFC.ml⁻¹ vs *Phytophthora infestans*, dosis 3×10^3 esporangios.ml⁻¹) mantienen competencia por nutrientes o espacio, provocando inhibición/muerte del fitopatógeno.

Evidenciando la acción antibiótica que produce la bacteria ante el oomiceto, se demuestra que los tratamientos con mayor concentración de UFC.ml⁻¹ tienen un mayor desarrollo y control. Mientras que, los tratamientos puros mantienen su crecimiento normal.

De acuerdo a Castañeda y Sánchez (2017), *Bacillus subtilis* demuestra ser una de las especies con mayor velocidad de crecimiento y muerte, siendo sus limitantes en el crecimiento la disminución de nutrientes, factores esenciales para respirar, aumento en la cantidad de otros metabolitos (sustancias tóxicas) y variación del pH (acidez).

Mientras que Castañeda y Sánchez (2017) afirman que:

Los metabolitos primarios, compuestos de bajo peso molecular que participan como productos intermediarios en las diversas rutas metabólicas, se sintetizan durante la fase exponencial, en tanto que los de tipo antibiótico o metabolitos secundarios, se producen en la fase estacionaria e intervienen en vías biosintéticas específicas del proceso celular como productos finales. (pp.54)

De esta manera se fundamenta que el control por antibiosis de la bacteria *Bacillus subtilis* frente a *Phytophthora infestans* ocurre en la fase estacionaria.

5.10.2 Recuento de bacterias (UFC.ml⁻¹) y esporangios (esporangios.ml⁻¹) en cámara de Neubauer a la hora 0-5-10-15-20 y 24

Se determinó el crecimiento celular a muestras pertenecientes al análisis de absorbancia por espectrofotometría (450 nm), realizando un recuento celular de bacterias (UFC.ml⁻¹) y esporangios (esporangios.ml⁻¹) en cámara de Neubauer, considerando las fases del crecimiento bacteriano, generando datos a la hora 0, 5, 10, 15, 20 y 24, (Tabla 12).

En el recuento de bacterias (UFC.ml⁻¹) y esporangios (esporangios.ml⁻¹) en cámara de Neubauer a la hora 0-5-10-15-20 y 24, se obtuvieron los siguientes resultados: Tabla 12.

Tabla 12.

Recuento de bacterias (UFC.ml⁻¹) y esporangios (esporangios.ml⁻¹) en cámara de Neubauer

	T1		T2		T3		T4		T5
Hora	H	B	H	B	H	B	H	B	
0	3x10 ⁻³	1x10 ⁻⁸	3x10 ⁻³	1x10 ⁻⁶	3x10 ⁻³	1x10 ⁻⁴	3x10 ⁻³	1x10 ⁻⁸	
5	7,9x10 ⁻³	1,6x10 ⁻⁸	2,9x10 ⁻³	1,3x10 ⁻⁶	2,9x10 ⁻³	1,3 x10 ⁻⁴	2,9 x10 ⁻³	1,8 x10 ⁻⁸	
10	9,9x10 ⁻³	2,1x10 ⁻⁸	2,7x10 ⁻³	1,6x10 ⁻⁶	2,8x10 ⁻³	1,5 x10 ⁻⁴	2,8 x10 ⁻³	2,5 x10 ⁻⁸	
15	8,3x10 ⁻³	1,9x10 ⁻⁸	2,6x10 ⁻³	1,5x10 ⁻⁶	2,8x10 ⁻³	1,3 x10 ⁻⁴	2,7 x10 ⁻³	2,0 x10 ⁻⁸	
20	5,7x10 ⁻³	1,8x10 ⁻⁸	2,5x10 ⁻³	1,4x10 ⁻⁶	2,6x10 ⁻³	1,4 x10 ⁻⁴	2,6 x10 ⁻³	1,7 x10 ⁻⁸	
24	5,4x10 ⁻³	1,8x10 ⁻⁸	2,4x10 ⁻³	1,6x10 ⁻⁶	2,6x10 ⁻³	1,4 x10 ⁻⁴	2,5 x10 ⁻³	1,9 x10 ⁻⁸	

Nota: T1= *Phytophthora infestans*, dosis 3x10³ esporangios.ml⁻¹

T2= *Bacillus subtilis*, dosis 1x10⁸ UFC.ml⁻¹ vs *Phytophthora infestans*, dosis 3x10³ esporangios.ml⁻¹

T3= *Bacillus subtilis*, dosis 1x10⁶ UFC.ml⁻¹ vs *Phytophthora infestans*, dosis 3x10³ esporangios.ml⁻¹

T4= *Bacillus subtilis*, dosis 1x10⁴ UFC.ml⁻¹ vs *Phytophthora infestans*, dosis 3x10³ esporangios.ml⁻¹

T5= *Bacillus subtilis*, dosis 1x10⁸ UFC.ml⁻¹

H= *Phytophthora infestans*

B= *Bacillus subtilis*

Al realizar la prueba t-student (Tabla 13), se establece que existen diferencias significativas y altamente significativas entre tratamientos. Siendo los tratamientos T3 (*Bacillus subtilis*, dosis 1x10⁶ UFC.ml⁻¹ vs *Phytophthora infestans*, dosis 3x10³ esporangios.ml⁻¹) y T4 (*Bacillus subtilis*, dosis 1x10⁴ UFC.ml⁻¹ vs *Phytophthora infestans*, dosis 3x10³ esporangios.ml⁻¹) los que presentan mayor variabilidad en su crecimiento.

Tabla 13.

Prueba t-student del recuento de bacterias (UFC.ml⁻¹) y esporangios (esporangios.ml⁻¹) en cámara de Neubauer

Variable	n	\bar{X}		T	p-value	Significancia
		<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Phytophthora infestans</i>			
T1	H	6		6,63	0,0012	*
T2	B vs H	6	1,7x10 ⁻⁸	10,92	0,0001	*
T3	B vs H	6	1,4x10 ⁻⁶	14,53	<0,0001	**
T4	B vs H	6	1,3x10 ⁻⁴	13,27	<0,0001	**
T5	B	6	1,8x10 ⁻⁸	8,98	0,0003	*

* Diferencia significativa

** Diferencia altamente significativa

ns No existe diferencia significativa

Nota: T1= *Phytophthora infestans*, dosis 3x10³ esporangios.ml⁻¹

T2= *Bacillus subtilis*, dosis 1x10⁸ UFC.ml⁻¹ vs *Phytophthora infestans*, dosis 3x10³ esporangios.ml⁻¹

T3= *Bacillus subtilis*, dosis 1x10⁶ UFC.ml⁻¹ vs *Phytophthora infestans*, dosis 3x10³ esporangios.ml⁻¹

T4= *Bacillus subtilis*, dosis 1x10⁴ UFC.ml⁻¹ vs *Phytophthora infestans*, dosis 3x10³ esporangios.ml⁻¹

T5= *Bacillus subtilis*, dosis 1x10⁸ UFC.ml⁻¹

H= *Phytophthora infestans*

B= *Bacillus subtilis*

T= Valor t-student tabulado

Conforme a los datos presentados en la tabla 14, se registró diferencias en el crecimiento de esporangios y esporas, afirmando lo mencionado por Barrera (2012) el cual menciona que el crecimiento celular sin limitación por otros microorganismos favorece el crecimiento del patógeno, ya que su ciclo biológico se expresa con naturalidad.

Tabla 14.

Recuento de esporangios (esporangios.ml⁻¹) de Phytophthora infestans, dosis 3x10³ esporangios.ml⁻¹ en cámara de Neubauer

T1	
Hora	<i>Phytophthora infestans</i>
0	3 x10 ³ esporangios.ml ⁻¹
5	7,9 x10 ³ esporangios.ml ⁻¹
10	9,9 x10 ³ esporangios.ml ⁻¹
15	8,3 x10 ³ esporangios.ml ⁻¹
20	5,7 x10 ³ esporangios.ml ⁻¹
24	5,4 x10 ³ .esporangios.ml ⁻¹

La Figura 21, muestra un diagrama de los valores correspondientes a la curva de crecimiento celular de *Phytophthora infestans* (dosis: 3x10³ esporangios.ml⁻¹), en el cual, se puede observar un incremento exponencial en su replicación, generando un aumento de esporangios y esporas entre la hora 0-10, mientras que, en la hora 15-20 existe un decrecimiento en su replicación, hasta mantener una estabilización a la hora 24, adjudicando este efecto al comportamiento natural en su ciclo biológico.

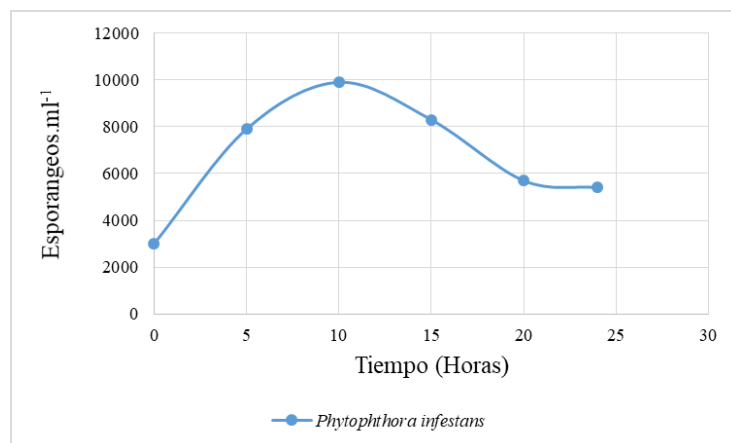


Figura 21. Recuento de esporangios (esporangios.ml⁻¹) en cámara de Neubauer de Phytophthora infestans, dosis 3x10³ esporangios.ml⁻¹

Conforme a los datos presentados en la tabla 15, se registró diferencias en el crecimiento celular, ya que la interacción entre microorganismos resulta en competencia y limitación, generando mayor probabilidad de crecimiento al microorganismo antagonista (Males 2002).

Tabla 15.

Recuento de bacterias (UFC.ml⁻¹) y esporangios (esporangios.ml⁻¹) de Bacillus subtilis (dosis 1x10⁸ UFC.ml⁻¹) vs Phytophthora infestans (dosis 3x10³ esporangios.ml⁻¹) en cámara de Neubauer

T2		
Hora	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Phytophthora infestans</i>
0	1 x10 ⁸ UFC.ml ⁻¹	3 x10 ³ esporangios.ml ⁻¹
5	1,6 x10 ⁸ UFC.ml ⁻¹	2,9 x10 ³ esporangios.ml ⁻¹
10	2,1 x10 ⁸ UFC.ml ⁻¹	2,7 x10 ³ esporangios.ml ⁻¹
15	1,9 x10 ⁸ UFC.ml ⁻¹	2,6 x10 ³ esporangios.ml ⁻¹
20	1,8 x10 ⁸ UFC.ml ⁻¹	2,5 x10 ³ esporangios.ml ⁻¹
24	1,8 x10 ⁸ UFC.ml ⁻¹	2,4 x10 ³ esporangios.ml ⁻¹

La Figura 22, muestra un diagrama de los valores correspondientes a la curva de crecimiento celular de *Bacillus subtilis* vs *Phytophthora infestans*; mediante un análisis de tratamientos apareados se determinó el crecimiento individual de cada microorganismo. Demostrando que la dosis de *Bacillus subtilis* (dosis: 1x10⁸ UFC.l⁻¹) mantuvo un crecimiento mayor en relación a la dosis de *Phytophthora infestans* (dosis: 3x10³ esporangios.ml⁻¹).

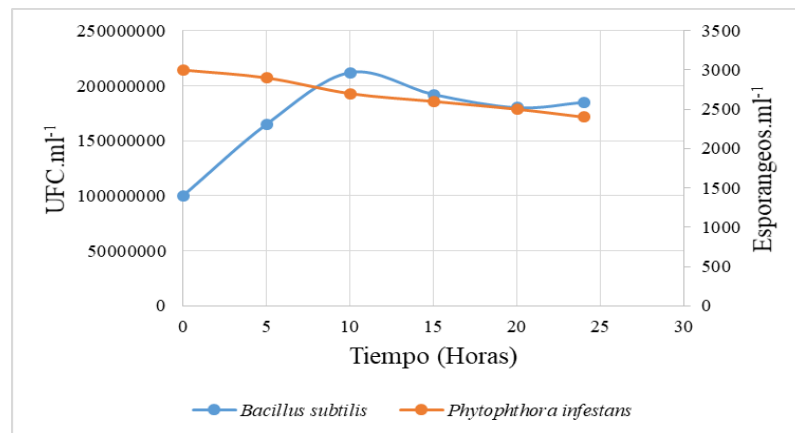


Figura 22. Recuento de bacterias (UFC.ml⁻¹) y esporangios (esporangios.ml⁻¹) en cámara de Neubauer de *Bacillus subtilis* (dosis 1x10⁸ UFC.ml⁻¹) vs *Phytophthora infestans* (dosis 3x10³ esporangios.ml⁻¹)

Conforme a los datos presentados en la tabla 16, se registró diferencias en el crecimiento celular, ya que la interacción entre microorganismos resulta en competencia y limitación, generando mayor probabilidad de crecimiento al microorganismo antagonista (Males 2002).

Tabla 16.

Recuento de bacterias (UFC.ml⁻¹) y esporangios (esporangios.ml⁻¹) de Bacillus subtilis (dosis 1x10⁶ UFC.ml⁻¹) vs Phytophthora infestans (dosis 3x10³ esporangios.ml⁻¹)

T3		
Hora	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Phytophthora infestans</i>
0	1 x10 ⁶ UFC.ml ⁻¹	3 x10 ³ esporangios.ml ⁻¹
5	1,3 x10 ⁶ UFC.ml ⁻¹	2,9 x10 ³ esporangios.ml ⁻¹
10	1,6 x10 ⁶ UFC.ml ⁻¹	2,8 x10 ³ esporangios.ml ⁻¹
15	1,5 x10 ⁶ UFC.ml ⁻¹	2,7 x10 ³ esporangios.ml ⁻¹
20	1,4 x10 ⁶ UFC.ml ⁻¹	2,6 x10 ³ esporangios.ml ⁻¹
24	1,6 x10 ⁶ UFC.ml ⁻¹	2,5 x10 ³ esporangios.ml ⁻¹

La Figura 23, muestra un diagrama de los valores correspondientes a la curva de crecimiento celular de *Bacillus subtilis* vs *Phytophthora infestans*; mediante un análisis de tratamientos apareados se determinó el crecimiento individual de cada microorganismo. Demostrando que la dosis de *Bacillus subtilis* (dosis: 1x10⁶ UFC.l⁻¹) mantuvo un crecimiento mayor en relación a la dosis de *Phytophthora infestans* (dosis: 3x10³ esporangios.ml⁻¹).

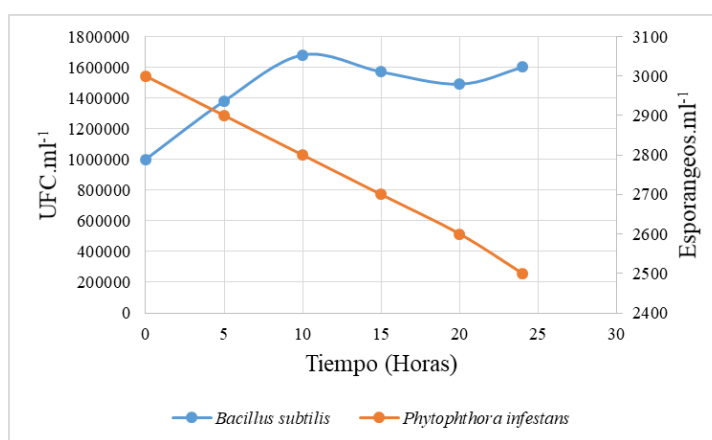


Figura 23. Recuento de bacterias (UFC.ml⁻¹) y esporangios (esporangios.ml⁻¹) en cámara de Neubauer de *Bacillus subtilis* (dosis 1x10⁶ UFC.ml⁻¹) vs *Phytophthora infestans* (dosis 3x10³ esporangios.ml⁻¹)

Conforme a los datos presentados en la tabla 17, se registró diferencias en el crecimiento celular, ya que la interacción entre microorganismos resulta en competencia y limitación, generando mayor probabilidad de crecimiento al microorganismo antagonista (Males 2002).

Tabla 17.

Recuento de bacterias (UFC.ml⁻¹) y esporangios (esporangios.ml⁻¹) de *Bacillus subtilis* (1x10⁴ UFC.ml⁻¹) vs *Phytophthora infestans* (dosis 3x10³ esporangios.ml⁻¹)

T4		
Hora	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Phytophthora infestans</i>
0	1 x10 ⁴ UFC.ml ⁻¹	3 x10 ³ esporangios.ml ⁻¹
5	1,3 x10 ⁴ UFC.ml ⁻¹	2,9 x10 ³ esporangios.ml ⁻¹
10	1,5 x10 ⁴ UFC.ml ⁻¹	2,8 x10 ³ esporangios.ml ⁻¹
15	1,3 x10 ⁴ UFC.ml ⁻¹	2,7 x10 ³ esporangios.ml ⁻¹
20	1,4 x10 ⁴ UFC.ml ⁻¹	2,6 x10 ³ esporangios.ml ⁻¹
24	1,4 x10 ⁴ UFC.ml ⁻¹	2,5 x10 ³ esporangios.ml ⁻¹

La Figura 24, muestra un diagrama de los valores correspondientes a la curva de crecimiento celular de *Bacillus subtilis* vs *Phytophthora infestans*; mediante un análisis de tratamientos apareados se determinó el crecimiento individual de cada microorganismo. Demostrando que la dosis de *Bacillus subtilis* (1x10⁴ UFC.ml⁻¹) mantuvo un crecimiento mayor en relación a la dosis de *Phytophthora infestans* (3x10³ esporangios.ml⁻¹).

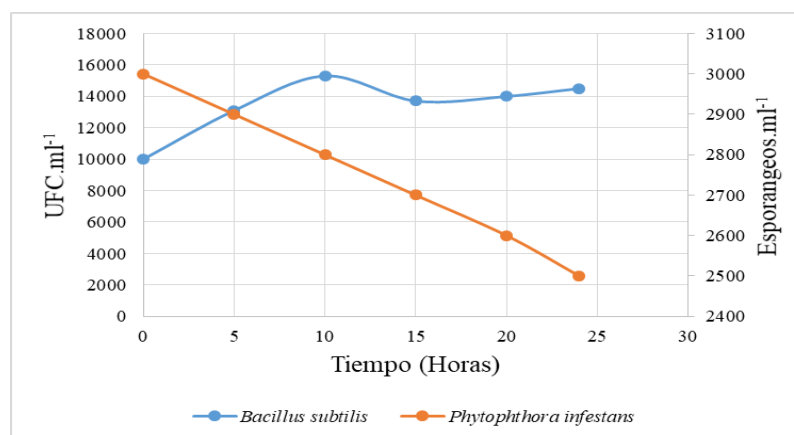


Figura 24. Recuento de bacterias (UFC.ml⁻¹) y esporangios (esporangios.ml⁻¹) en cámara de Neubauer de *Bacillus subtilis* (1x10⁴ UFC.ml⁻¹) vs *Phytophthora infestans* (dosis 3x10³ esporangios.ml⁻¹)

Conforme a los datos presentados en la tabla 18, se registró diferencias en el crecimiento de esporangios, afirmando lo mencionado por Barrera (2012) el cual menciona que el crecimiento celular sin limitación por otros microorganismos favorece el crecimiento para el patógeno.

Tabla 18.

Recuento de bacterias (UFC.ml⁻¹) de *Bacillus subtilis*, (dosis 1x10⁸ UFC.ml⁻¹)

T5	
Hora	<i>Bacillus subtilis</i>
0	1 x10 ⁸ UFC.ml ⁻¹
5	1,8 x10 ⁸ UFC.ml ⁻¹
10	2,5 x10 ⁸ UFC.ml ⁻¹
15	2,0 x10 ⁸ UFC.ml ⁻¹
20	1,7 x10 ⁸ UFC.ml ⁻¹
24	1,9 x10 ⁸ UFC.ml ⁻¹

La Figura 25, muestra un diagrama de los valores correspondientes a la curva de crecimiento celular de la bacteria *Bacillus subtilis* (dosis: 1x10⁸ UFC.ml⁻¹), en el cual, se puede observar un incremento en su esporulación, generando un aumento de esporas entre la hora 0 – 10, mientras que, en la hora 15-20 existe un decrecimiento en su replicación, hasta mantener una estabilización y crecimiento a la hora 24, adjudicando este efecto al comportamiento natural en su ciclo biológico.

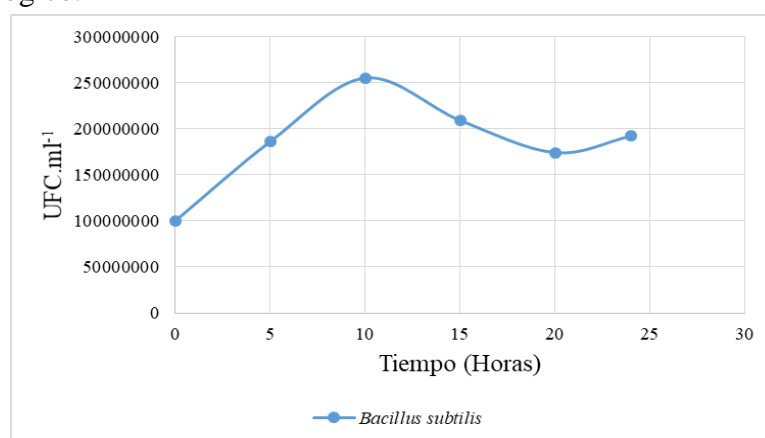


Figura 25. Recuento de bacterias (UFC.ml⁻¹) en cámara de Neubauer de *Bacillus subtilis*, (dosis 1x10⁸ UFC.ml⁻¹)

5.11 Resultados de la socialización

La socialización de resultados se realizó en la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra a estudiantes de 8vo nivel de Ingeniería Agropecuaria.

Se tuvo una audiencia de 16 personas, a las cuales, se les entregó encuestas para determinar el impacto de la investigación y el desenvolvimiento de la exposición, obteniendo los siguientes resultados; (Anexo 36).

Resultados de las encuestas

Pregunta 1. ¿Considera usted que la sala donde se desarrolló este evento brindó las comodidades necesarias?

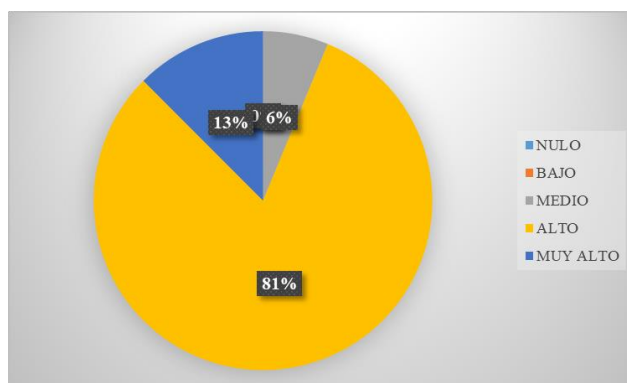


Figura 26. Resultado de la pregunta 1

La Figura 26 correspondiente al resultado de la pregunta 1, demuestra que un 81 % de la audiencia manifiesta un nivel alto de comodidad respecto a la sala de socialización.

Pregunta 2. ¿Considera usted que el material audiovisual utilizado en la presentación fue adecuado?

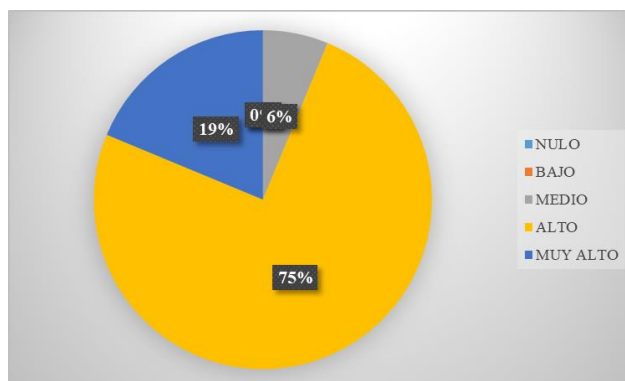


Figura 27. Resultado de la pregunta 2

La Figura 27 correspondiente al resultado de la pregunta 2, demuestra que un 75 % de la audiencia manifiesta un nivel alto de conformidad respecto al material audio visual utilizado en la socialización.

Pregunta 3. ¿Considera usted que el expositor mostró dominio del tema?

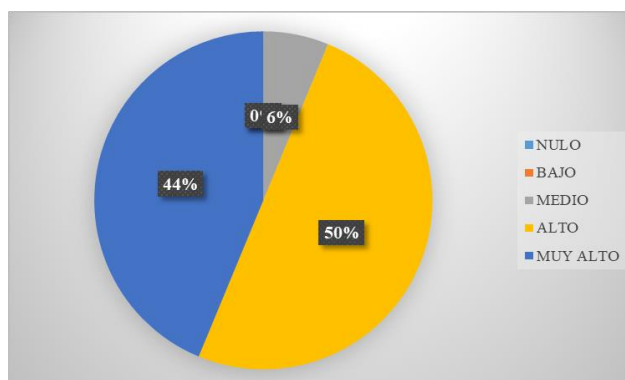


Figura 28. Resultado de la pregunta 3

La Figura 28 correspondiente al resultado de la pregunta 3, demuestra que un 50 % de la audiencia manifiesta un nivel alto de conformidad respecto al dominio del tema del expositor presentado en la socialización.

Pregunta 4. ¿Estima usted que el manejo del auditorio por parte del expositor fue adecuado?

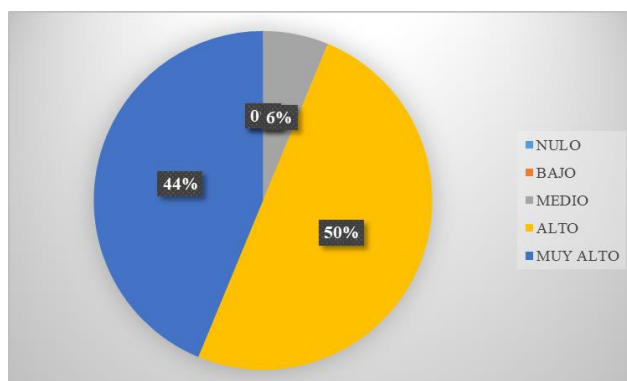


Figura 29. Resultado de la pregunta 4

La Figura 29 correspondiente al resultado de la pregunta 4, demuestra que un 50 % de la audiencia manifiesta un nivel alto de conformidad respecto al manejo del auditorio por parte del expositor presentado en la socialización.

Pregunta 5. ¿Considera usted que el expositor demostró facilidad de expresión?

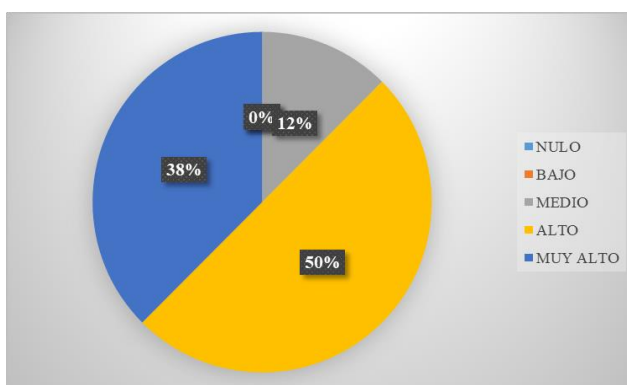


Figura 30. Resultado de la pregunta 5

La Figura 30 correspondiente al resultado de la pregunta 5, demuestra que un 33 % de la audiencia manifiesta un nivel muy alto de conformidad respecto a la facilidad de expresión del expositor presentado en la socialización.

Pregunta 6. ¿Considera usted que el tema investigativo posee relevancia para algún actor y/o sector de la sociedad?

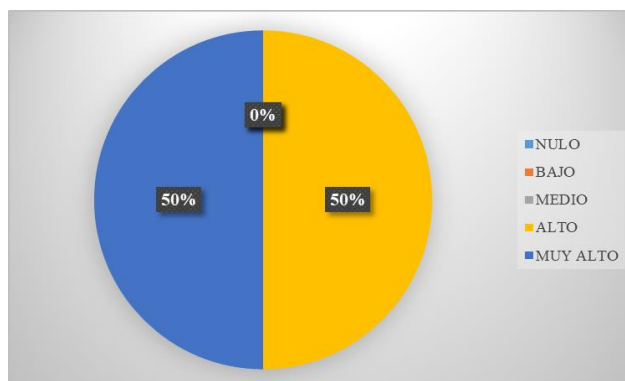


Figura 31. Resultado de la pregunta 6

La Figura 31 correspondiente al resultado de la pregunta 6, demuestra que un 50 % de la audiencia manifiesta un nivel muy alto de conformidad respecto a la importancia de realizar ensayos con microorganismos en el control biológico de fitopatógenos.

Pregunta 7. ¿Considera usted que ésta investigación posee perspectiva para estudios complementarios posteriores?

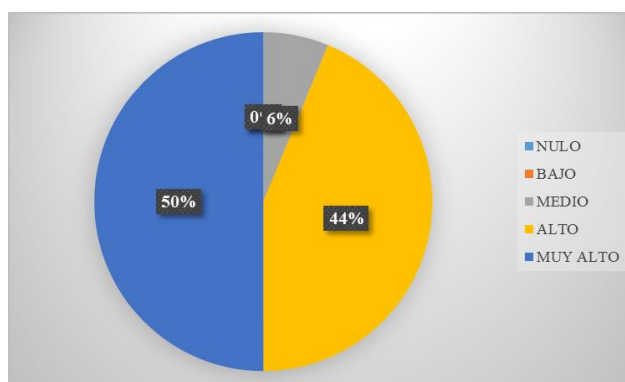


Figura 32. Resultado de la pregunta 7

La Figura 32 correspondiente al resultado de la pregunta 7, demuestra que un 50 % de la audiencia manifiesta un nivel muy alto de conformidad respecto a la importancia de continuar realizando ensayos prácticos con microorganismos patógenos.

Pregunta 8. ¿Considera usted que el tema investigado genera actualmente o a futuro un beneficio concreto para alguna organización empresa pública o privada, comunidad o institución?

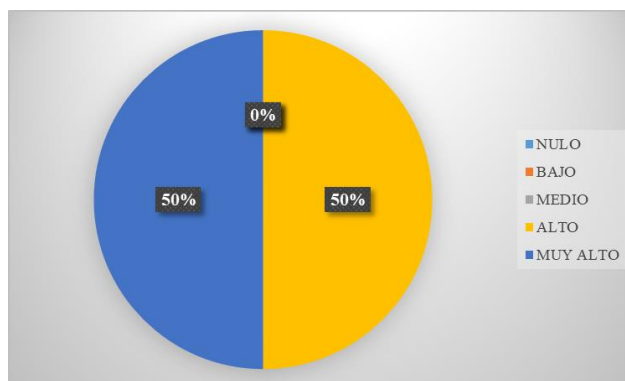


Figura 33. Resultado de la pregunta 8

La Figura 33 correspondiente al resultado de la pregunta 8, demuestra que un 50 % de la audiencia manifiesta un nivel muy alto de conformidad respecto al beneficio concreto que aporta la integración de microorganismos patógenos al control tradicional agrícola.

Pregunta 9. ¿En función de los objetivos planteados expuestos en la investigación, considera usted que éstos se cumplieron?

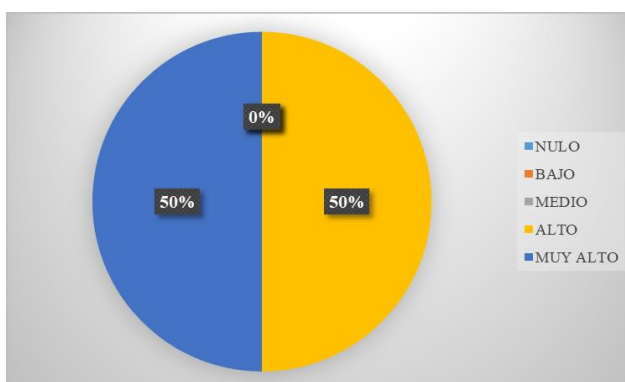


Figura 34. Resultado de la pregunta 9

La Figura 34 correspondiente al resultado de la pregunta 9, demuestra que un 50 % de la audiencia manifiesta un nivel muy alto de conformidad respecto al cumplimiento de los objetivos planteados en la investigación.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

1. Los resultados de la investigación demuestran que la bacteria *Bacillus subtilis* presenta un efecto antagonista ante *Phytophthora infestans*, por medio de su capacidad para producir antibióticos capaces de inhibir agentes fitopatógenos (antibiosis), los mismos que involucran la producción de metabolitos fúngicos como los lipopéptidos, siendo la fengicina su mayor representante en el control y/o inhibición de hongos filamentosos. El mecanismo de acción de este lipopéptido tiene lugar en la interacción con la membrana citoplasmática de células fúngicas provocando la formación de varios poros, los mismos que ocasionan un desbalance osmótico por el cual se desencadena la muerte celular de los microorganismos fitopatógenos.
2. El proceso de aislamiento de *Bacillus subtilis* se lo realizó utilizando el medio de cultivo MRS, permitiendo la propagación y purificación *in vitro* de la bacteria. Las cepas aisladas fueron identificadas mediante observación directa (identificación macroscópica) sobre un contador de colonias, determinando sus características morfológicas. Mientras que la identificación microscópica se la efectuó por medio de la técnica de tinción Gram. Adicionalmente, se realizó el aislamiento y purificación *in vitro* de *Phytophthora infestans* en medio de cultivo PDA, identificando sus características macroscópicas y microscópicas, por medio de la identificación de estructuras especiales para hongos.
3. Por medio de los resultados de los cultivos duales se determinó la susceptibilidad de *Phytophthora infestans* ante *Bacillus subtilis* presentando un efecto inhibitorio sobre el crecimiento del patógeno, demostrando que:

El tratamiento 1 (*Bacillus subtilis*, dosis: 1×10^8 UFC.ml⁻¹ vs *Phytophthora infestans*, dosis: 3×10^3 esporangios.ml⁻¹) tuvo como resultado un halo de inhibición de 16,86 mm; el tratamiento 2 (*Bacillus subtilis*, dosis: 1×10^6 UFC.ml⁻¹ vs *Phytophthora infestans*, dosis: 3×10^3 esporangios.ml⁻¹) tuvo como resultado un halo de inhibición de 14,61 mm; el tratamiento 3 (*Bacillus subtilis*, dosis: 1×10^4 UFC.ml⁻¹ vs *Phytophthora*

infestans, dosis: 3×10^3 esporangios.ml⁻¹) tuvo como resultado un halo de inhibición de 13,24 mm; mientras que el testigo (Propineb + Cimoxanil, dosis: 0,025 g.ml⁻¹ vs *Phytophthora infestans*, dosis: 3×10^3 esporangios.ml⁻¹) tuvo un halo de inhibición de 12,36 mm.

La bacteria *Bacillus subtilis* demuestra capacidad antagónica en las pruebas *in vitro* realizadas frente a *Phytophthora infestans*, evidenciando un control y/o inhibición en el desarrollo del patógeno. Mientras que el tratamiento correspondiente al testigo, no tuvo mayor control sobre *Phytophthora infestans*, debido al mecanismo de acción de los productos fitosanitarios translaminares o sistémicos, estos actúan con movimiento acropétalo por el xilema de la planta; al no presentarse este movimiento su efecto de control fue limitado.

4. La prueba de absorbancia por espectrofotometría (450 nm) y el recuento de bacterias (UFC.ml⁻¹) y esporangios (esporangios.ml⁻¹) en cámara de Neubauer evidenció el crecimiento celular e interacción entre *Bacillus subtilis* y *Phytophthora infestans*, demostrando que los tratamientos en dosis pura (T1= *Phytophthora infestans*, dosis: 3×10^3 esporangios.ml⁻¹; T5= *Bacillus subtilis*, dosis: 1×10^4 UFC.ml⁻¹) no sufrieron mayor interrupción en su ciclo biológico normal. Mientras que los tratamientos mixtos en interacción (T2= *Bacillus subtilis*, dosis: 1×10^8 UFC.ml⁻¹ vs *Phytophthora infestans*, dosis: 3×10^3 esporangios.ml⁻¹; T3= *Bacillus subtilis*, dosis: 1×10^6 UFC.ml⁻¹ vs *Phytophthora infestans*, dosis: 3×10^3 esporangios.ml⁻¹; T4= *Bacillus subtilis*, dosis: 1×10^4 UFC.ml⁻¹ vs *Phytophthora infestans*, dosis: 3×10^3 esporangios.ml⁻¹) obtuvieron variabilidad en su crecimiento, aludiendo estos resultados al comportamiento antagónico de *Bacillus subtilis*.
5. En conclusión, todos los procesos evaluados demuestran que la bacteria *Bacillus subtilis* posee un control antagónico de *Phytophthora infestans*, resultando la Dosis 1 (*Bacillus subtilis*, dosis 1×10^8 UFC. ml⁻¹) la que mayor efecto inhibitorio ocasiono. Sin embargo, el efecto antagónico de *Bacillus subtilis* y otros biocontroladores genera un proceso lento en comparación con la utilización de los agroquímicos, aun que, si consideramos que la acción de los microorganismos antagonistas no tiene un solo

mecanismo de acción, la utilización de estos organismos reduce los riesgos de desarrollar una resistencia en el patógeno. De igual manera, si se mantienen las condiciones favorables para la adaptabilidad del biocontrolador a la rizosfera el efecto antagonista será prolongado.

6. El resultado obtenido de la investigación se socializó a estudiantes de 8vo nivel de Ingeniería Agropecuaria, obteniendo un entendimiento satisfactorio en la presentación de los resultados.

CAPÍTULO VII

RECOMENDACIONES

1. Se recomienda seguir investigando las potencialidades del genero *Bacillus* en el mejoramiento de los cultivos de importancia económica y social. En particular de la especie *Bacillus subtilis* ya que esta bacteria ofrece grandes expectativas para ser aprovechadas en el manejo agronómico de los cultivos.
2. Los resultados obtenidos en la investigación apuntan a que la acción protectora de *Bacillus subtilis* como agente controlador de fitopatógenos es muy compleja, por lo que se debería profundizar el estudio de los distintos mecanismos de acción, optimizando su utilidad en el campo agrícola.
3. Para futuras investigaciones se recomienda analizar la producción de metabolitos secundarios producidos por *Bacillus subtilis*, permitiendo identificar cuál es el antibiótico producido por la bacteria que permite la inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos.
4. Introducir programas de manejo integrado de cultivos con *Bacillus subtilis*, mediante la combinación con otros microorganismos que permitan un control biológico en campo, con la finalidad de demostrar el comportamiento *in situ* del microorganismo.
5. Realizar aislamientos e identificación de microorganismos antagónicos autóctonos, ya que la determinación de cepas adaptadas al control químico en la localidad, permitirán una mejor apreciación en el control de patógenos.

CAPÍTULO VIII

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acuña, I. (2008). *Manejo integrado del tizón tardío y estrategias de control químico*. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA Remehue, Chile. Recuperado de: <http://biblioteca.inia.cl/medios/biblioteca/informativos/NR35165.pdf>
- Agrios, G. (2004). *Plant Pathology*, 5ta ed. Florida: Elsevier Academic Press.
- Agrios, G. (2005). *Fitopatología*, 2da edi. Florida: Elsevier Academic Press.
- Albornoz, F., y Salinas, M. (2011). *Controladores biológicos: Bacillus subtilis y B. thuringiensis*. Recuperado de: https://www.opia.cl/static/website/601/articulos-75602_archivo_01.pdf
- Alor, N. (2015). *Caracterización de Phytophthora infestans y mejora genética para la resistencia en patata*. (Tesis doctoral, Universidad de Lleida). Recuperado de: <http://hdl.handle.net/10803/286188>
- Andre, C., Ghislain, M., Bertin, P., Oufir, M., Herrera, M., Hoffmann, L., Hausman, J-F., Larondelle, Y., y Evers, D. (2007). Andean potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.) as a source of antioxidant and mineral micronutrients. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(2), pp. 366–378. Recuperado de: https://www.academia.edu/18568053/Andean_Potato_Cultivars_Solanum_tuberosum_L._as_a_Source_of_Antioxidant_and_Mineral_Micronutrients
- Aylor, D., Fry, W., Mayton, H., y Andrade-Piedra, J. (2001). Quantifying the rate of release and escape of *Phytophthora infestans* sporangia from a potato canopy. *The American Phytopathological Society*, 91(12), pp. 1189-1196. Recuperado de: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO.2001.91.12.1189>
- Barahona, C. (2012). *Control biológico de Rhizoctonia solani Kühn en papa (Solanum tuberosum L), mediante diferentes concentraciones y formulados de una cepa de Bacillus subtilis Cohn*. (Tesis de pregrado, Universidad Austral de Chile). Recuperado de: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2012/fab224c/doc/fab224c.pdf>

- Benavides, H. (2007). *Propuesta de guía de aplicación de técnicas de microbiología (bacterias y hongos) para ser utilizado en microbiología general*. (Tesis de pregrado, Universidad de El Salvador). Recuperado de: <http://ri.ues.edu.sv/4768/1/16100029.pdf>
- Bustamante, A. (2015). *Control biológico del tizón tardío *Phytophthora infestans* en papa *Solanum tuberosum* a través de consorcios microbianos formados por hongos nativos del género *Trichoderma* sp.* (Tesis de maestría, Universidad Politécnica Salesiana). Recuperado de: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/7692/1/UPS-CT004553.pdf>
- Caicedo, S., y Chacón, J. (2017). *Pruebas bajo inveradero de cepas de *Bacillus subtilis* como agente de biocontrol de *Alternaria* spp. en *Brassica oleracea* var *italica* y técnicas de conservación de cepas*. (Tesis de pregrado, Universidad Politécnica Salesiana sede Quito). Recuperado de: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/13545/1/UPS-QT11349.pdf>
- Calvo, P., y Zúñiga, D. (2010). Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). *Ecología Aplicada*, 9(1), pp. 31–39. Recuperado de: <http://www.scielo.org.pe/pdf/ecol/v9n1/a04v9n1>
- Carreras, B. (2011). Aplicaciones de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* en el control de fitopatógenos. *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 12(2), pp. 129–133. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/pdf/4499/449945031006.pdf>
- Castañeda, E., y Sánchez, L. (2017). Evaluación del crecimiento de cuatro especies del género *Bacillus* sp., primer paso para entender su efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. *Nova*, 14(26), pp. 53–62. Recuperado de: <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v14n26/v14n26a06.pdf>
- Castellanos, J., Ortiz, L., Oliva, P., Dueñas, J., Fresneda, J., Fraga, S., y Meléndez, O. (2008). Estudios relacionados con el uso del *Bacillus subtilis* en el control de hongos fitopatógenos. *Revista Agrotecnia de Cuba*, 12, pp. 1-12. Recuperado de: http://www.actaf.co.cu/revistas/agrotecnia_05_2008/agrot2005-1/EPRO65.pdf

- Cazorla, F., Romero, D., Pérez-García, A., Lugtenberg, B., Vicente, A., y Bloemberg, G. (2007). Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizoplane displaying biocontrol activity. *Journal of Applied Microbiology*, 103(5), pp. 1950–1959. Recuperado de: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1365-2672.2007.03433.x>
- Cevallos, P. (2015). *Tamizaje molecular de genotipos nativos de papa (Solanum spp.) en busca de QTLS de resistencia a Phytophthora infestans*. (Tesis de pregrado, Universidad Central del Ecuador). Recuperado de: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/6735/3/T-UCE-0004-13.pdf>
- Cobo, C. (2017). *Evaluación de medios líquidos para la multiplicación de la bacteria Bacillus subtilis*. (Tesis de pregrado, Universidad San Francisco de Quito). Recuperado de: <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/6598/1/131031.pdf>
- Comina, P. (2016). *Estudio del efecto genotipo por ambiente sobre la expresión de la resistencia a tizón tardío Phytophthora infestans (Mont) de Bary y los contenidos de Fe y Zn en clones y variedades de papa*. (Tesis de maestría, Universidad de las Fuerzas Armadas). Recuperado de: <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/13143/1/T-ESPE-049881.pdf>
- Condor, M. (2018). *Efecto antibacteriano In vitro de extracto del maguey (Agave americana) sobre Streptococcus spp. de linfadenitis en cuyes (Cavia porcellus) – Abancay*. (Tesis de posgrado, Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac) Recuperado de: http://repositorio.unamba.edu.pe/bitstream/handle/UNAMBA/752/T_0460.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Cuervo, J. (2010). *Aislamiento y caracterización de Bacillus spp como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales*. (Tesis de pregrado, Pontificia Universidad Javeriana). Recuperado de: https://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis404.pdf?fbclid=IwAR1xYpK6AGltvI6atq5UZ8yF8pCzp_wQ3rlMAcnIgIT4eRFz2vMH4LPuPHg
- Cuvi, L. (2010). *Eficiencia y estabilidad de fungicidas sistémicos para el control de tizón*

- tardío (Phytophthora infestans) en el cultivo de papa variedad Superchola en la Estación Experimental Santa Catalina, Pichincha.* Recuperado de: <http://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/894/1/iniapscP.C992e2010.pdf>
- De la Cruz, A. (2014). *Caracterización de bacterias antagonistas en el control de hongos fitopatógenos in vitro.* (Tesis de pregrado, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro). Recuperado de: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/1153/62961>
- DE LA CRUZ ARMAS%2C ALEJANDRO TESIS.pdf?sequence=1&isAllowed=y&fbclid=IwAR2VnfTbd6yAEISRCSjTJwFumgV_HrTf52UySUdehDddQOplke07omufPvo
- Delgado, R., Monteros-Altamirano, A., Li, Y., Visser, R., Van der Lee, T., y Vosman, B. (2013). Large subclonal variation in *Phytophthora infestans* populations associated with Ecuadorian potato landraces. *Plant Pathology*, 62(5), pp. 1081–1088. Recuperado de: <https://doi.org/10.1111/ppa.12039>
- Errington, J. (2003). Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nature Reviews Microbiology*, 1(2), pp. 117–126. Recuperado de: https://www.researchgate.net/profile/Jeffery_Errington/publication/8666587_Regulation_of_endospore_formation_in_Bacillus_subtilis/links/0fcfd50f587e8baec0000000.pdf
- Fernández-Northcote, E., Navia, O., y Gandarillas, A. (1999). Bases de las estrategias de control químico del tizón tardío de la papa desarrolladas por PROINPA en Bolivia. *Revista Latinoamericana de La Papa*, 11, pp. 1–25. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/237686835_ARTICULO_INVITADO_Bases_de_las_Estrategias_de_Control_Quimico_del_Tizon_Tardio_de_la_Papa_Developadas_por_PROINPA_en_Bolivia
- Flores, A., Egúsqüiza, R., Patiño, A., Sanchez, T., Alcarraz, M., Claudio, J., Trigos, C., y Evangelio, A. (2014). Selección evaluación de microorganismos nativos con potencial antagonista de *Rhizoctonia solani* y *Phytophthora infestans* promotores del crecimiento de tuberculillos de papa *Solanum tuberosum* L. *in vitro*. *Theorema - UNMSM*, 1(1), pp.

- 27–36. Recuperado de:
<http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/Theo/article/view/11935/10680>
- Fravel, D. (2005). Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*, 43(1), pp. 337–359. Recuperado de:
<https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.032904.092924>
- Freire, M. (2017). *Validación de una estrategia en el control de tizón tardío (Phytophthora infestans) en papa (Solanum tuberosum L.) con las variedades INIAP-LIBERTAD, INIAP-CECILIA Y SUPERCHOLA, en la provincia de Tungurahua.* (Tesis de maestría, Universidad Técnica de Ambato). Recuperado de:
<http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/25472/1/tesis-062> Maestría en Agroecología y Ambiente - CD 481.pdf
- Garibaldi, P., Santambrosio, E., y Ortega, M. (2009). Siembra y recuento de microorganismos. *Universidad Tecnológica Nacional*, pp. 1–8. Recuperado de:
https://www.fro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5_anio/biotecnologia/practicoIII.pdf
- Gavilánez, L., y Salazar, A. (2016). *Evaluación del efecto biológico del hongo Ustilago quitensis sobre la maleza Cortaderia jubata.* (Tesis de pregrado, Universidad de las Américas). Recuperado de: <http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/5465/1/UDLA-EC-TIB-2016-10.pdf>
- Grünwald, N., y Flier, W. (2005). The biology of *Phytophthora infestans* at its center of origin. *Annual Review of Phytopathology*, 43(1), pp. 171–190. Recuperado de:
<https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.135906>
- Guédez, C., Castillo, C., Cañizales, L., y Olivar, R. (2008). Control biológico: Una herramienta para el desarrollo sustentable y sostenible. *ACADEMIA*, 13(13), pp. 50–74. Recuperado de:
<http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/29752/1/articulo5.pdf>
- Guillén-Cruz, R., Hernández-Castillo, F., Gallegos-Morales, G., Rodríguez-Herrera, R., Aguilar-González, C., Padrón-Corral, E., y Reyes-Valdés, M. (2006). *Bacillus spp.*

- como biocontrol en un suelo infestado con *Fusarium spp.*, *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora capsici* Leonian y su efecto en el desarrollo y rendimiento del cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24(2). Recuperado de: <https://www.redalyc.org/html/612/61224204/>
- Henfling, J. (1987). *El tizón tardío de la papa, Phytophthora infestans*. Centro internacional de la papa CIP, Lima, Peru. Recuperado de: <http://cipotato.org/library/pdfdocs/TIBes4988.pdf>
- Hidalgo, V. (2006). *Caracterización molecular de la progenie de Phytophthora infestans*. (Tesis de pregrado, Escuela Politécnica del Ejercito). Recuperado de: <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/955/1/T-ESPE-025022.pdf>
- Huilcapi, E. (2012). *Combate de tizón tardío (Phytophthora infestans) con activadores de defensas naturales en el cultivo de papa (Solanum tuberosum) c.v. Superchola*. (Tesis de pregrado, Universidad Técnica de Ambato). Recuperado de: http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/1607/1/Tesis_010agr.pdf
- Inca, Á. (2015). *Validación de la herramienta circular de toma de decisiones para el control del tizón tardío (Phytophthora infestans) (Mont.) de Bary de la papa (Solanum tuberosum L.) en Tunshi, provincia de Chimborazo*. (Tesis de pregrado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo). Recuperado de: <http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/4268/1/13T0812.pdf>
- Jaramillo, P. (2015). *Estudio de los componentes genéticos de la resistencia al tizón tardío (Phytophthora infestans) (Mont.) de Bary en papa (Solanum phureja) Cutuglahua, Pichincha*. (Tesis de pregrado, Universidad Central del Ecuador). Recuperado de: <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/4549>
- Kloepper, J., Ryu, C.-M., y Zhang, S. (2007). Induced systemic esistance and promotion of plant growth by *Bacillus spp.* *Phytopathology*, 94(11), pp. 1259–1266. Recuperado de: <https://doi.org/10.1094/phyto.2004.94.11.1259>
- Layton, C., Maldonado, E., Monroy, L., Corrales, L., y Sánchez, L. (2011). *Bacillus spp.*; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por

- fitopatógenos. *Nova*, 9(16), pp. 177–187. Recuperado de: <https://doi.org/10.22490/24629448.501>
- López, S. (2015). *Bacillus* un género que alberga especies que cumplen diversos roles biológicos. Recuperado de: https://inta.gob.ar/sites/default/files/lic._lopez_bacillus.pdf
- Macrogen, Inc. (2019). Technology. Recuperado de: <https://dna.macrogen.com/eng/member/login.jsp>
- MAG. (2018). *Informe de rendimientos de papa en el Ecuador 2017*. Ministerio de agricultura, ganadería y Pesca. Recuperado de: http://sipa.agricultura.gob.ec/descargas/estudios/rendimientos/papa/rendimiento_papa_2017.pdf
- Méndez-Úbeda, J., Flores, M., y Páramo-Aguilera, L. (2017). Aislamiento e identificación de *Bacillus subtilis* y evaluación del antagonismo *in vitro* frente hongos fitopatógenos. *Nexo Revista Científica*, 30(02), pp. 96–110. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.5377/nexo.v30i2.5530>
- Mendoza, R., y Espinoza, A. (2017). *Guía Técnica para muestreo de suelos*. Managua-Nicaragua: Complejo Gráfico TMC
- Ñacato, C., y 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*. (Tesis de pregrado, Universidad Politécnica Salesiana). Recuperado de: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/12144/1/UPS-QT09671.pdf>
- Oliva, R., Erselius, L., Adler, N., y Forbes, G. A. (2002). Potential of sexual reproduction among host-adapted populations of *Phytophthora infestans* sensu lato in Ecuador. *Plant Pathology*, 51(6), pp. 710–719. Recuperado de: <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2002.00784.x>
- Oliva, R., Kroon, L., Chacón, G., Flier, W., Ristaino, J., y Forbes, G. (2010). *Phytophthora andina* sp. nov., a newly identified heterothallic pathogen of solanaceous hosts in the andean highlands. *Plant Pathology*, 59(4), pp. 613–625. Recuperado de:

<https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02287.x>

- Olmos, J., y Paniagua-Michel, M. (2014). *Bacillus subtilis* a potential probiotic bacterium to formulate functional feeds for aquaculture. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 06(07), pp. 361–365. Recuperado de: <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000169>
- Ongena, M., Duby, F., Jourdan, E., Beaudry, T., Jadin, V., Dommes, J., Thonart, P. (2005) *Bacillus subtilis* M4 decreases plant susceptibility towards fungal pathogens by increasing host resistance associated with differential gene expression. *Appl Microbiol Biotechnol*, 67, pp, 692–698.
- Orberá, T., Pérez, I., Ferrer, D., Cortés, N., y González, Z. (2005). Aislamiento de cepas del genero *Bacillus sp.* con potencialidades para la bioprotección y la estimulación del crecimiento vegetal., *Revista Cubana de Química*, 17(1), pp. 189–195. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/pdf/4435/443543685078.pdf>
- Ordoñez, M., Hohl, H., Velasco, J., Ramon, M., Oyarzun, P., Smart, C., Fry, W., Forbes, G., y Erselius, L. (2000). A novel population of *Phytophthora* , similar to *P. infestans* , attacks wild *Solanum* species in Ecuador. *Phytopathology*, 90(2), pp. 197–202. Recuperado de: <https://doi.org/10.1094/phyto.2000.90.2.197>
- Paulet, M. (1999). Los recursos de agua y suelo para la agricultura y el desarrollo rural. *COMUNIICA*, 4(11), pp. 35–50. Recuperado de: <http://repiica.iica.int/docs/B1782e/B1782e.pdf>
- Pérez, W., y Forbes, G. (2008). *MANUAL TÉCNICO - El tizón tardío de la papa*. Recuperado de: www.cipotato.org
- Pérez, W., y Forbes, G. (2011). *Guía de identificación de plagas que afectan a la papa en la zona andina*. Lima - Perú. Recuperado de: <http://www.fao.org/3/as407s/as407s.pdf>
- Picazo, J. (2000). *Procedimientos en microbiología clínica: Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2016.05.008>
- Pozo, M. (2015). *Evaluación de la efectividad de estrategias convencionales y alternativas*

- para el manejo de tizón tardío (*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary) en papa (*Solanum tuberosum* L.), Montufar - Carchi. (Tesis de pregrado, Universidad Central del Ecuador). Recuperado de: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/7392/1/T-UCE-0004-45.pdf>
- Pumisacho, M., y Sherwood, S. (2002). *El cultivo de la papa en Ecuador*. 1ra ed. Quito-Ecuador.
- Puño, R., Terrazas, E., Alvares, T., Giménez, A., Mendoza, L., Smeltekop, H., y Loza-Murguía, M. (2011). Evaluación de la capacidad biocontroladora de metabólicos de *Trichoderma inhamatum* Bol12 QD sobre cepas nativas de *Phytophthora infestans* *in vitro*. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 2(1), pp. 26–33. Recuperado de: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2072-92942011000100004
- Realpe, E. (2010). *Evaluación de la eficiencia de fungicidas protectantes y sistémicos para el control de tizón tardío (Phytophthora infestans) en el cultivo de papa en San Pedro de Huaca provincia del Carchi*. (Tesis de pregrado, Universidad Técnica del Norte). Recuperado de: http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/146/2/03_AGP_95_TESIS.pdf
- Realpe, M., Hernández, C., y Agudelo, C. (2014). Especies del género *Bacillus*: morfología macroscópica y microscópica. *Biomédica*, 22(2), pp. 106–109. Recuperado de: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v22i2.1148>
- Reynoso, M., Magnoli, C., Barros, G., y Demo, M. (2015). *Manual de microbiología general*. 1ra ed. Río Cuarto: UniRío.
- Robalino, W. (2015). *Control biológico del Oídium sp mediante el uso de fungicidas biocontroladores en el cultivo del rosal (Rosa sp), en la zona de Cayambe, provincia de Pichincha*. (Tesis de pregrado, Universidad Técnica de Babahoyo). Recuperado de: <http://dspace.utb.edu.ec/bitstream/49000/1065/1/T-UTB-FACIAG-AGR-000217.pdf>
- Robles, A. (2011). *Evaluación de microorganismos antagonistas y sustancias naturales en el control de enfermedades foliares en tomate*. (Tesis de maestría, Universidad Central

- del Ecuador). Recuperado de:
<http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/bitstream/28000/335/1/T-SENESCYT-0105.pdf>
- Robles, A. (2014). Uso de microorganismos antagonistas y sustancias naturales como una alternativa ecológica en el control de enfermedades en cultivos. *Centro de Biotecnología*, pp. 34–43. Recuperado de:
http://unl.edu.ec/sites/default/files/investigacion/revistas/2014-9-6/5_articulo_de_revision_34-43_b1.pdf
- Rodríguez, A. (2012). *Manual de prácticas de laboratorio..* Recuperado de:
<http://www.plerus.ac.cr/docs/manual-de-practicas-biometrica-hermatica.pdf>
- Rodríguez, A., Guillen, C., Uva, V., Segura, R., Laprade, S., y Sandoval, J. (2010). *Aspectos a considerar sobre el control biológico.* Corbana. Recuperado de:
<https://doi.org/10.1088/0953-4075/49/24/245204>
- Ruiz-Sánchez, E., Mejía-Bautista, M., Serrato-Díaz, A., Reyes-Ramírez, A., Estrada-Girón, Y., y Valencia-Botín, A. (2016). Antifungal activity and molecular identification of native strains of *Bacillus subtilis*. *Agrociencia*, 50(2), pp. 133–148. Recuperado de:
<https://www.redalyc.org/pdf/302/30244591001.pdf>
- Salas, V. (2015). *Determinación del antagonismo in vitro de Bacillus spp. aislado del suelo de los cultivos de banano de la región costa del Ecuador frente al hongo fitopatógeno Fusarium oxysporum f. sp. cubense raza tropical 1.* (Tesis de pregrado, Pontificia Universidad Católica del Ecuador). Reueperado de:
<http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/10162/SalasVeronica.pdf?sequence=1>
- Sanz, S. (2011). *Prácticas de Microbiología.* 2da edi. Logroño, La Rioja: Universidad de La Rioja.
- Schweizer, S. (2011). *Muestreo y análisis de suelos para diagnóstico de fertilidad.* San Jose-Costa Rica: INTA/MAG
- Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions.

- Molecular Microbiology*, 56(4), pp. 845–857. Recuperado de: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x>
- Tejera-Hernández, B., Rojas-Badía, M., y Heydrich-Pérez, M. (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 42(3), pp. 131–138. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/html/1812/181222321004/>
- Vilañez, P. (2019). *Evaluación de Bacillus thuringiensis y Bacillus subtilis aisladas de la rizosfera de papa (Solanum tuberosum) para el control de Phytophthora infestans*. (Tesis de pregrado, Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra; en revisión).
- Villarreal-Delgado, M., Villa-Rodríguez, E., Cira-Chávez, L., Estrada-Alvarado, M., Parra Cota, F., y De los Santos-Villalobos, S. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Mexican Journal of Phytopathology*, 36(1), pp. 95–130. Recuperado de: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1706-5>
- Yáñez, V. (2012). *Potencial de la cepa CPA-8 de Bacillus subtilis como agente de biocontrol de enfermedades de postcosecha de fruta*. (Tesis Doctoral, Universidad de Leida). Recuperado de: <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/80456/Tvrymlde1.pdf>
- Yanggen, D., Crissman, C., y Espinoza, P. (2003). Los plaguicidas; impactos en producción, salud y medio ambiente en Carchi, Ecuador. Quito-Ecuador: Abyayala.
- Yépez, L. (2016). *Validación de estrategias de manejo del tizón tardío (Phytophthora infestans) de la papa, en tres variedades, Píllaro 2016*. (Tesis pregrado, Universidad Central del Ecuador). Recuperado de: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/8223/1/T-UCE-0004-53.pdf>
- Yupanguí, L. (2016). *Validación de los parámetros de control interno de calidad en la producción de tubérculo-semilla, en la variedad INIAP- LIBERTAD.CADER*. (Tesis de pregrado, Universidad Central del Ecuador). Recuperado de:

<http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/8051/1/T-UCE-0004-29.pdf>

CAPÍTULO IX

ANEXOS

Anexo 1. Parcelas de producción de papa (*Solanun tuberosum*) de la propiedad ubicada en el sector Solferino, parroquia rural Mariscal Sucre, cantón San Pedro de Huaca, provincia del Carchi.



Fuente: El autor

Anexo 2. Toma de muestras de suelo de la rizosfera de papa (*Solanum tuberosum*) y material vegetal (hojas y tallos) infectados con *Phytophthora infestans*.



Fuente: El autor

Anexo 3. Disolución de muestra de suelo de la rizosfera de papa (*Solanum tuberosum*); Laboratorios PUCESI.



Fuente: El autor

Anexo 4. Medios de Cultivo, MRS-Agar (MERCK®) y POTATO DEXTROSE AGAR (TM MEDIA®).



Fuente: El autor

Anexo 5. Pesaje y preparación de medios de cultivo; Laboratorios PUCESI.



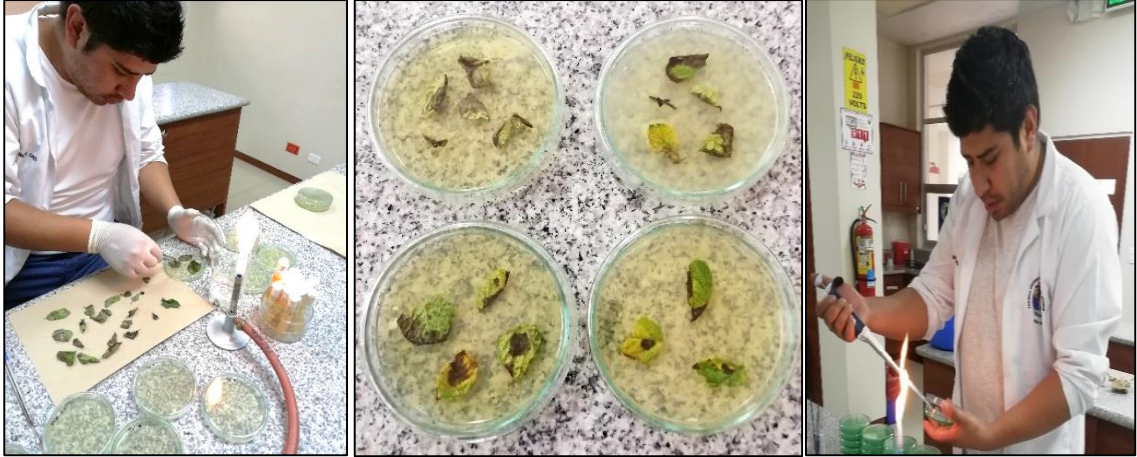
Fuente: El autor

Anexo 6. Esterilización de materiales; Laboratorios PUCESI.



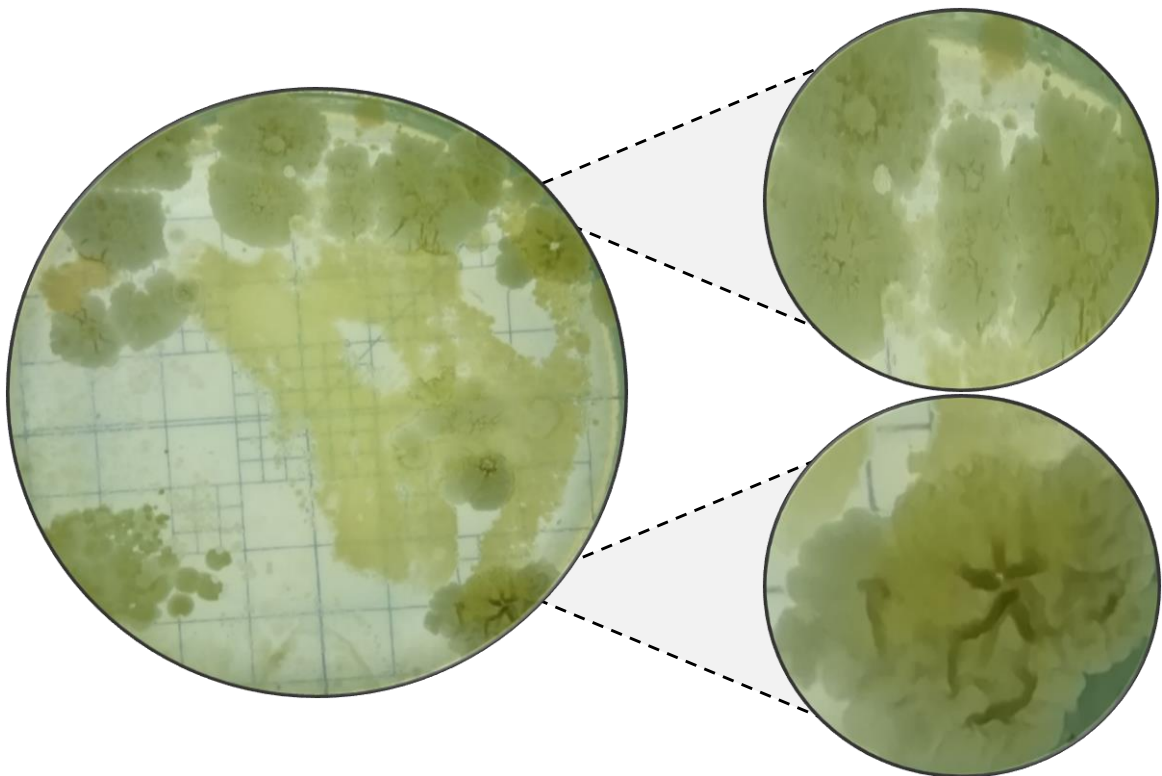
Fuente: El autor

Anexo 7. Inóculos primarios de *Bacillus subtilis* y *Phytophthora infestans*; Laboratorios PUCESI.



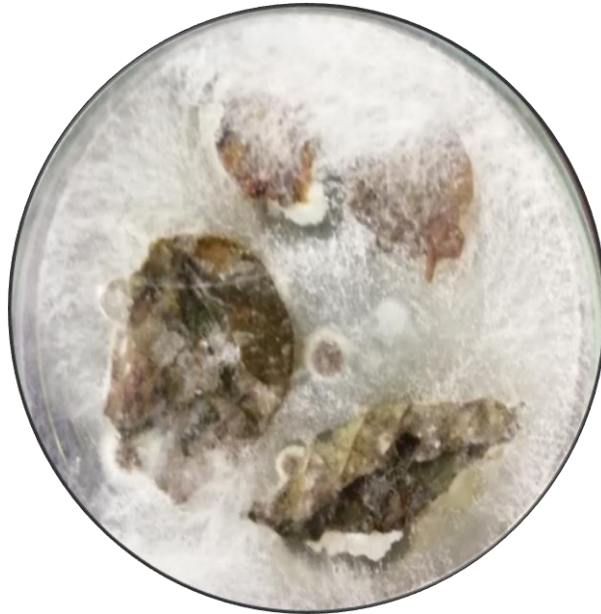
Fuente: El autor

Anexo 8. Inóculo primario de *Bacillus subtilis* aislada de la rizosfera de papa (*Solanum tuberosum*), incubadas a 37,5 °C durante 72 horas, en medio de cultivo MRS-Agar (MERCK®). Laboratorios PUCESI.



Fuente: El autor

Anexo 9. Inóculo primario de *Phytophthora infestans* aislada de material vegetal infectado, incubadas a 25 °C durante 72 horas con exposición a la luz, en medio de cultivo POTATO DEXTROSE AGAR (TM MEDIA®). Laboratorios PUCESI.



Fuente: El autor

Anexo 10. Siembra de cepas de *Bacillus subtilis* y *Phytophthora infestans*; Laboratorios PUCESI.



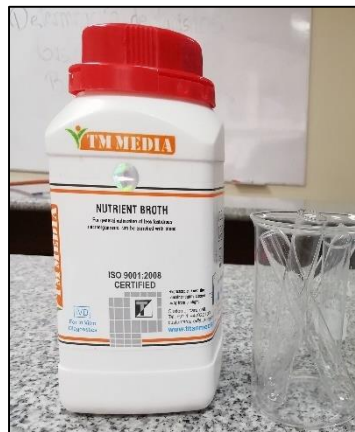
Fuente: El autor

Anexo 11. Incubación en estufa a 37,5 °C por 24 horas; Laboratorios PUCESI.



Fuente: El autor

Anexo 12. Purificación de cepas, Medio de cultivo liquido NUTRIENT BROTH (TM MEDIA®).



Fuente: El autor

Anexo 13. Llenado de tubos de ensayo con caldo NUTRIENT BROTH (TM MEDIA®); Laboratorios PUCESI.



Fuente: El autor

Anexo 14. Purificación de la bacteria *Bacillus subtilis*; Laboratorios PUCESI.



Fuente: El autor

Anexo 15. Purificación de *Phytophthora infestans*; Laboratorios PUCESI.



Fuente: El autor

Anexo 16. Cepas puras; Tercera purificación de *Bacillus subtilis* y *Phytophthora infestans*. Laboratorios PUCESI.



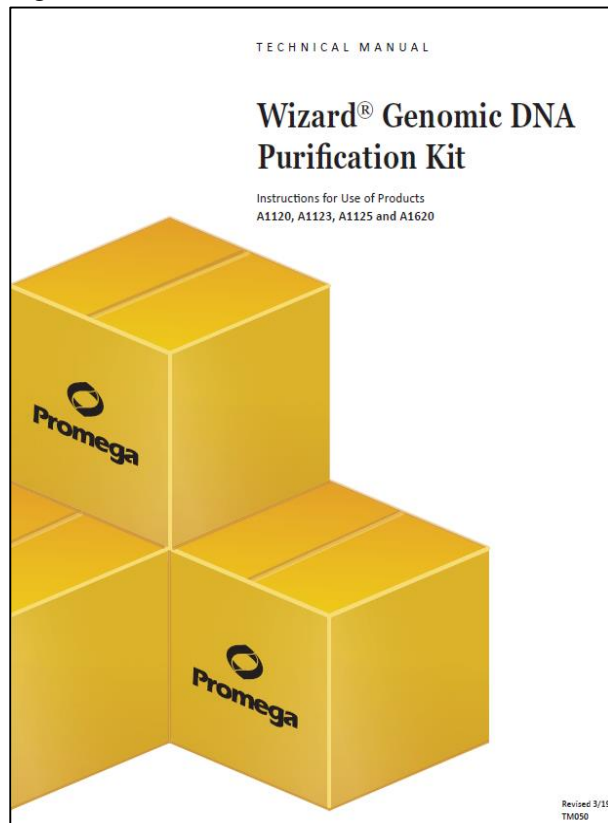
Fuente: El autor

Anexo 17. Identificación de cepas; Tinción de Gram para bacterias y Tinción de hongos; Laboratorios PUCESI.



Fuente: El autor

Anexo 18. Protocolo Wizard® Genomic DNA Purification Kit utilizado en la identificación molecular de los microorganismos.



Fuente: Macrogen. Inc. (2019)

Anexo 19. Protocolo utilizado en el aislamiento de ADN genómico de *Bacillus subtilis*.



3.F. Isolating Genomic DNA from Yeast (continued)

19. Rehydrate the DNA by incubating at 65°C for 1 hour. Periodically mix the solution by gently tapping the tube. Alternatively, rehydrate the DNA by incubating the solution overnight at room temperature or at 4°C.
20. Store the DNA at 2–8°C.

3.G. Isolating Genomic DNA from Gram Positive and Gram Negative Bacteria

Materials to Be Supplied by the User

- 1.5ml microcentrifuge tubes
 - water bath, 80°C
 - water bath, 37°C
 - isopropanol, room temperature
 - 70% ethanol, room temperature
 - water bath, 65°C (optional; for rapid DNA rehydration)
 - 50mM EDTA (pH 8.0) (for gram positive bacteria)
 - 10mg/ml lysozyme (Sigma Cat.# L4919) (for gram positive bacteria)
 - 10mg/ml lysostaphin (Sigma Cat.# L7386) (for gram positive bacteria)
1. Add 1 ml of an overnight culture to a 1.5ml microcentrifuge tube.
 2. Centrifuge at 13,000–16,000 × *g* for 2 minutes to pellet the cells. Remove the supernatant. For Gram Positive Bacteria, proceed to Step 3. **For Gram Negative Bacteria go directly to Step 6.**
 3. Resuspend the cells thoroughly in 480µl of 50mM EDTA.
 4. Add the appropriate lytic enzyme(s) to the resuspended cell pellet in a total volume of 120µl, and gently pipet to mix. The purpose of this pretreatment is to weaken the cell wall so that efficient cell lysis can take place.
Note: For certain *Staphylococcus* species, a mixture of 60µl of 10mg/ml lysozyme and 60µl of 10mg/ml lysostaphin is required for efficient lysis. However, many Gram Positive Bacterial Strains (e.g., *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Nocardia otitidiscaviarum*, *Rhodococcus rhodochrous*, and *Brevibacterium albidum*) lyse efficiently using lysozyme alone.
 5. Incubate the sample at 37°C for 30–60 minutes. Centrifuge for 2 minutes at 13,000–16,000 × *g* and remove the supernatant.
 6. Add 600µl of Nuclei Lysis Solution. Gently pipet until the cells are resuspended.
 7. Incubate at 80°C for 5 minutes to lyse the cells; then cool to room temperature.
 8. Add 3µl of RNase Solution to the cell lysate. Invert the tube 2–5 times to mix.
 9. Incubate at 37°C for 15–60 minutes. Cool the sample to room temperature.
 10. Add 200µl of Protein Precipitation Solution to the RNase-treated cell lysate. Vortex vigorously at high speed for 20 seconds to mix the Protein Precipitation Solution with the cell lysate.
 11. Incubate the sample on ice for 5 minutes.

Anexo 20. Protocolo utilizado en el aislamiento de ADN genómico de *Phytophthora infestans*.



3.E. Isolating Genomic DNA from Plant Tissue

Materials to Be Supplied by the User

- 1.5ml microcentrifuge tubes
 - liquid nitrogen
 - microcentrifuge tube pestle or mortar and pestle
 - water bath, 65°C
 - water bath, 37°C
 - isopropanol, room temperature
 - 70% ethanol, room temperature
1. Process leaf tissue by freezing with liquid nitrogen and grinding into a fine powder using a microcentrifuge tube pestle or a mortar and pestle. Add 40mg of this leaf powder to a 1.5ml microcentrifuge tube.
 2. Add 600µl of Nuclei Lysis Solution, and vortex 1–3 seconds to wet the tissue.
 3. Incubate at 65°C for 15 minutes.
 4. Add 3µl of RNase Solution to the cell lysate, and mix the sample by inverting the tube 2–5 times. Incubate the mixture at 37°C for 15 minutes. Allow the sample to cool to room temperature for 5 minutes before proceeding.
 5. Add 200µl of Protein Precipitation Solution, and vortex vigorously at high speed for 20 seconds.
 6. Centrifuge for 3 minutes at 13,000–16,000 × *g*. The precipitated proteins will form a tight pellet.
 7. Carefully remove the supernatant containing the DNA (leaving the protein pellet behind) and transfer it to a clean 1.5ml microcentrifuge tube containing 600µl of room temperature isopropanol.
Note: Some supernatant may remain in the original tube containing the protein pellet. Leave this residual liquid in the tube to avoid contaminating the DNA solution with the precipitated protein.
 8. Gently mix the solution by inversion until thread-like strands of DNA form a visible mass.
 9. Centrifuge at 13,000–16,000 × *g* for 1 minute at room temperature.
 10. Carefully decant the supernatant. Add 600µl of room temperature 70% ethanol and gently invert the tube several times to wash the DNA. Centrifuge at 13,000–16,000 × *g* for 1 minute at room temperature.
 11. Carefully aspirate the ethanol using either a drawn Pasteur pipette or a sequencing pipette tip. The DNA pellet is very loose at this point and care must be used to avoid aspirating the pellet into the pipette.
 12. Invert the tube onto clean absorbent paper and air-dry the pellet for 15 minutes.
 13. Add 100µl of DNA Rehydration Solution and rehydrate the DNA by incubating at 65°C for 1 hour. Periodically mix the solution by gently tapping the tube. Alternatively, rehydrate the DNA by incubating the solution overnight at room temperature or at 4°C.
 14. Store the DNA at 2–8°C.

Anexo 21. Identificación molecular de los microorganismos.

The screenshot shows the BLAST web interface with the following elements:

- Header:** NIH, Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos, Centro Nacional de Información Biotecnológica, NCBI, Inicia sesión en NCBI.
- Navigation:** Casa, Resultados recientes, Estrategias guardadas, Ayuda.
- Main Title:** Herramienta básica de búsqueda de alineación local.
- Description:** BLAST encuentra regiones de similitud entre secuencias biológicas. El programa compara secuencias de nucleótidos o proteínas con secuencias de bases de datos y calcula la significación estadística.
- News:** Los programas y bases de datos de BLAST ahora están listos para la nube. NCBI ahora proporciona una versión ecoplada de BLAST que puede usar en la nube. Jue 27 jun 2019 17:00:00 EST.
- Web BLAST Options:**
 - Nucleotide BLAST:** nucleotide to nucleotide.
 - blastx:** translated nucleotide to protein.
 - tblastn:** protein to translated nucleotide.
 - Protein BLAST:** protein to protein.
- Genomas de BLAST:** A search bar with the placeholder text 'Enter organism common name, scientific name, or tax id' and a 'Buscar' button.

Fuente: Herramienta BLAST Online en la página del Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estado Unidos (2019).

Anexo 22. ADN secuenciado de la cepa *Bacillus subtilis*.

```

AATATGGGGC GTCCTAATAC ATGCAAGTCG AGCGGACAGA TGGGAGCTTG CTCCTGATG
TTAGCGGCGG ACGGGTGAGT AACACGTGGG TAACCTGCCT GTAAGACTGG GATAACTCCG
GGAAACCGGG GCTAATACCG GATGGTTGTT TGAACCGCAT GGTTCAAACA TAAAAGGTGG
CTTCGGCTAC CACTTACAGA TGGACCCGCG GCGCATTAGC TAGTTGGTGA GGTAACGGCT
CACCAAGGCA ACGATGCGTA GCCGACCTGA GAGGGTGATC GGCCACACTG GGACTGAGAC
ACGGCCCAGA CTCCTACGGG AGGCAGCAGT AGGGAATCTT CCGCAATGGA CGAAAGTCTG
ACGGAGCAAC GCCGCGTGAG TGATGAAGGT TTTCCGATCG TAAAGCTCTG TTGTTAGGGA
AGAACAAGTA CCGTTCGAAT AGGGCGGTAC CTTGACGGTA CCTAACCAGA AAGCCACGGC
TAACTACGTG CCAGCAGCCG CGGTAATACG TAGGTGGCAA GCGTTGTCCG GAATTATTGG
GCGTAAAGGG CTCGCAGGCG GTTTCTTAAG TCTGATGTGA AAGCCCCCG CTCAACCGGG
GAGGGTCATT GGAAACTGGG GAACCTGAGT GCAGAAGAGG AGAGTGGAA TCCACGTGTA
GCGGTGAAAT GCGTAGAGAT GTGGAGGAAC ACCAGTGGCG AAGGCGACTC TCTGGTCTGT
AACTGACGCT GAGGAGCGAA AGCGTGGGGA GCGAACAGGA TTAGATACC TGGTAGTCCA
CGCCGTAAAC GATGAGTGCT AAGTGTTAGG GGGGTTTCCG CCCCTTAGTG CTGCAGCTAA
CGCATTAAGC ACTCCGCTG GGGAGTACGG TCGCAAGACT GAAACTCAA GGAATTGACG
GGGGCCCGCA CAAGCGGTGG AGCATGTGGT TTAATTCGAA GCAACGCGAA GAACCTTACC
AGGTCTTGAC ATCCTCTGAC AATCCTAGAG ATAGGACGTC CCCTTCGGGG GCAGAGTGAC
AGGTGGTGCA TGGTTGTCGT CAGCTCGTGT CGTGAGATGT TGGGTTAAGT CCCGCAACGA
GCGCAACCTT TGATCTTAGT TGCCAGCATT CAGTTGGGCA CTCTAAGGTG ACTGCCGGTG
ACAAACCGGA GGAAGGTGGG GATGACGTC AATCATCATG CCCCTTATGA CCTGGGTAC
ACACGTGCTA CAATGGACAG AACAAAGGGC AGCGAAACCG CGAGGTTAAG CCAATCCCAC
AAATCTGTTC TCAGTTCGGA TCGCAGTCTG CAACTCGACT GCGTGAAGCT GGAATCGCTA
GTAATCGCGG ATCAGCATGC CGCGGTGAAT ACGTTCCCGG GCCTTGTAACA CACCGCCCGT
CACACCACGA GAGTTTGTA CACCCGAAGT CGGTGAGGTA ACCTTTTAGAG ATTACAGCG
GACTTTGTTA CAAGCCCAAC CACTGTGGGC C

```

Fuente: Herramienta BLAST Online en la página del Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estado Unidos (2019).

Anexo 23. ADN secuenciado de la cepa *Phytophthora infestans*.

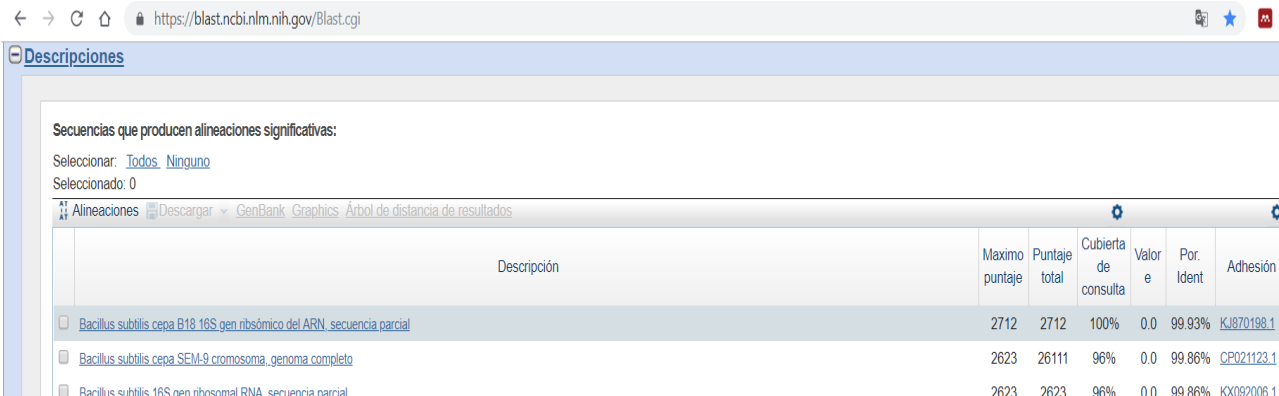
```

CCACACCTAA  AAAC TTTCCA  CGTGAACCGT  TTCAACCCAA  TAGTTGGGGG  TCTTACTTGG
CGGCGGCTGC  TGGCTTTATT  GCTGGCGGCT  ACTGCTGGGC  GAGCCCTATC  AAAAGGCGAG
CGTTTGACT   TCGGTCTGAG  CTAGTAGCTT  TTTTATTTTA  AACCTTTAC   TTAATACTGA
TTATACTGTG  GGGACGAAAG  TCTCTGCTTT  TAACTAGATA  GCAACTTTCA  GCAGTGGATG
TCTAGGCTCG  CACATCGATG  AAGAACGCTG  CGAACTGCGA  TACGTAATGC  GAATTGCAGG
ATTCAGTGAG  TCATCGAAAT  TTTGAACGCA  TATTGCACTT  CCGGGTTAGT  CCTGGAAGTA
TGCCTGTATC  AGTGTCCGTA  CAACAAACTT  GGCTTTCTTC  CTCCGTGTA   GTCGGTGGAG
GAGATGCCAG  ATGTGAAGTG  TCTTGCGGTT  GGTTTTCGGA  CCGACTGCGA  GTCCTTTTAA
ATGTACTAAA  CTGTACTTCT  CTTTGCTCCA  AAAGTGGTGG  CATTGCTGGT  TGTGGACGCT
GCTATTGTAG  CGAGTTGGCG  ACCGGTTTGT  CTGCTGCGGC  GTTAATGGAG  AAATGCTCGA
TTCGTGGTAT  GGTGGCTTTC  GGCTGAACAA  TGCCTTATT   GGGTGATTTT  CCTGCTGTGG
CGTGATGGAC  TGGTGAACCA  TGGCTCTTTA  GCTTGGCATT  TGAATCGGCT  TTGCTGTTGC
GAAGTAGAGT  GCGGCTTCG  GCTGCCGAGG  GTCGATCCAT  TTGGGAAATG  TTGTGTACTT
CGGTATGCAT  CTCAA

```

Fuente: Herramienta BLAST Online en la página del Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estados Unidos (2019).

Anexo 24. Herramienta BLAST Online – secuencias significativas de *Bacillus subtilis*.



The screenshot shows the BLAST Online interface with the following details:

- URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Section: **Descripciones**
- Header: **Secuencias que producen alineaciones significativas:**
- Options: Seleccionar: [Todos](#), [Ninguno](#); Seleccionado: 0
- Navigation: [Alineaciones](#), [Descargar](#), [GenBank](#), [Graphics](#), [Árbol de distancia de resultados](#)

Descripción	Maximo puntaje	Puntaje total	Cubierta de consulta	Valor e	Por. Ident	Adhesión
<input type="checkbox"/> Bacillus subtilis cepa B18 16S gen ribosómico del ARN, secuencia parcial	2712	2712	100%	0.0	99.93%	KJ870198.1
<input type="checkbox"/> Bacillus subtilis cepa SEM-9 cromosoma, genoma completo	2623	26111	96%	0.0	99.86%	CP021123.1
<input type="checkbox"/> Bacillus subtilis 16S gen ribosomal RNA, secuencia parcial	2623	2623	96%	0.0	99.86%	KX092006.1

Fuente: Herramienta BLAST Online en la página del Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estados Unidos (2019).

Anexo 25. Herramienta BLAST Online – secuencias significativas de *Phytophthora infestans*.

← → ↻ 🏠 🔒 https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

Descripciones

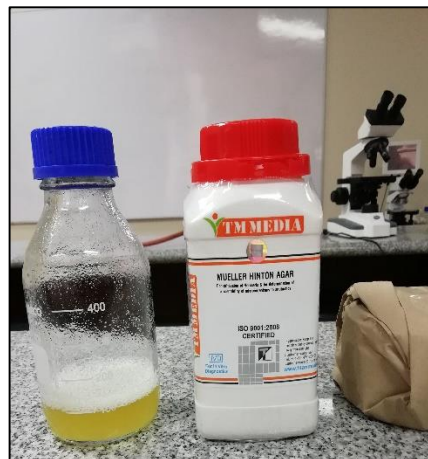
Secuencias que producen alineaciones significativas:
Seleccionar: [Todos](#) [Ninguno](#)
Seleccionado: 0

Alineaciones Descargar GenBank Graphics Arbol de distancia de resultados

Descripción	Maximo puntaje	Puntaje total	Cubierta de consulta	Valor e	Por. Ident	Adhesión
<input type="checkbox"/> Phytophthora infestans gen 13-A2 18S ARN ribosomal gen, secuencia parcial, espaciador transcrito interno 1, gen del ARN ribosomal 5.8S, y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa,...	1469	1469	100%	0.0	100.00%	MH401206.1
<input type="checkbox"/> Phytophthora infestans aislan el gen del ARN ribosómico de la subunidad pequeña phyto24, secuencia parcial, espaciador transcrito interno 1, gen del ARN ribosomal 5.8S, y espaciador transcrito...	1469	1469	100%	0.0	100.00%	MH178350.1
<input type="checkbox"/> Phytophthora mirabilis cepa transcrita interna 1 tipo CPHST BL 25 tipo Ex, secuencia parcial, 5.8S gen de ARN ribosomal, secuencia completa, y espaciador transcrito interno 2, secuencia parcial...	1469	1469	100%	0.0	100.00%	MG865541.1

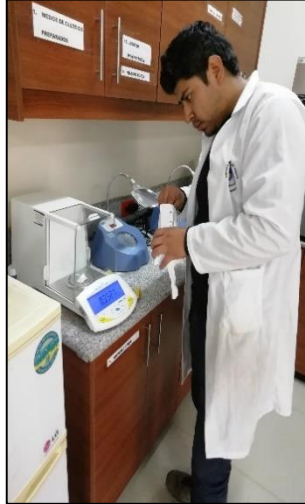
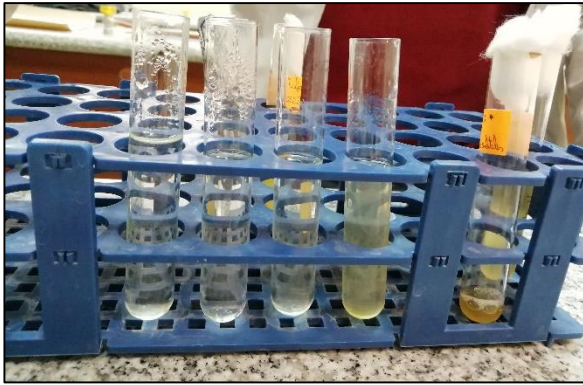
Fuente: Herramienta BLAST Online en la página del Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estados Unidos (2019).

Anexo 26. Pruebas de antagonismo; Preparación de medio de cultivo MUELLER HINTON AGAR (TM MEDIA®).



Fuente: El autor

Anexo 27. Preparación de dosis de la bacteria *Bacillus subtilis* y testigo (Propineb + Cimoxanil); (absorción con discos de papel); Laboratorios PUCESI.



Fuente: El autor

Anexo 28. Elaboración de cultivos duales; Laboratorios PUCESI.



Fuente: El autor

Anexo 29. Incubación de los tratamientos en estufa a 37,5 °C por 24 horas; Laboratorios PUCESI.



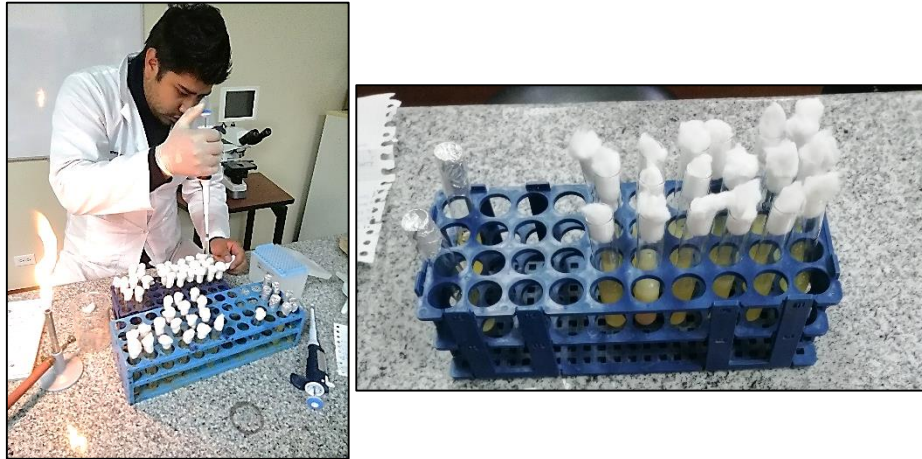
Fuente: El autor

Anexo 30. Revisión y toma de medidas de los halos inhibitorios (mm); Laboratorios PUCESI.



Fuente: El autor

Anexo 31. Crecimiento celular, Preparación de los tratamientos para espectrofotometría; Laboratorios PUCESI.



Fuente: El autor

Anexo 32. Determinación de la absorbancia por espectrofotometría (450 nm), cada hora durante 24 horas consecutivas; Laboratorios PUCESI.





Fuente: El autor

Anexo 33. Tabla de promedios de absorbancia por espectrofotometría (450 nm) de *Bacillus subtilis* vs *Phytophthora infestans*

Hora	T1	T2	T3	T4	T5
0	0,127	0,253	0,238	0,190	0,154
1	0,191	0,264	0,250	0,214	0,164
2	0,235	0,304	0,260	0,243	0,188
3	0,245	0,317	0,281	0,256	0,231
4	0,252	0,325	0,289	0,257	0,242
5	0,250	0,317	0,291	0,258	0,232
6	0,256	0,331	0,298	0,261	0,235
7	0,258	0,333	0,308	0,272	0,238
8	0,254	0,356	0,311	0,278	0,248
9	0,268	0,363	0,316	0,296	0,267
10	0,295	0,368	0,328	0,300	0,295
11	0,309	0,353	0,332	0,308	0,302
12	0,315	0,344	0,328	0,310	0,309
13	0,300	0,348	0,329	0,307	0,300
14	0,269	0,341	0,318	0,288	0,280
15	0,258	0,338	0,309	0,279	0,257
16	0,248	0,329	0,300	0,257	0,240
17	0,230	0,326	0,288	0,258	0,228
18	0,200	0,314	0,278	0,253	0,222

19	0,189	0,307	0,275	0,262	0,218
20	0,188	0,318	0,279	0,261	0,227
21	0,183	0,316	0,278	0,268	0,233
22	0,189	0,331	0,289	0,270	0,240
23	0,183	0,331	0,299	0,269	0,244
24	0,179	0,326	0,304	0,271	0,242

Nota: T1= *Phytophthora infestans*, dosis 3×10^3 esporangios.ml⁻¹
T2= *Bacillus subtilis*, dosis 1×10^8 UFC.ml⁻¹ vs *Phytophthora infestans*, dosis 3×10^3 esporangios.ml⁻¹
T3= *Bacillus subtilis*, dosis 1×10^6 UFC.ml⁻¹ vs *Phytophthora infestans*, dosis 3×10^3 esporangios.ml⁻¹
T4= *Bacillus subtilis*, dosis 1×10^4 UFC.ml⁻¹ vs *Phytophthora infestans*, dosis 3×10^3 esporangios.ml⁻¹
T5= *Bacillus subtilis*, dosis 1×10^8 UFC.ml⁻¹

Fuente: El autor

Anexo 34. Invitación a la socialización de resultados.



UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR SEDE IBARRA

ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES

Le extienden la más cordial invitación a la socialización del trabajo de investigación:

"Evaluación in vitro de la bacteria Bacillus subtilis aislada de la rizosfera de papa (Solanum tuberosum) como potencial antagonista en el control de Phytophthora infestans"

cuyo autor es el señor Chiza Romo Erick Reinaldo, de la carrera de Ingeniería Agropecuaria

Fecha: 08 de mayo del 2019

Lugar: Laboratorio de Biotecnología - PUCESI

Hora: 9:00 am

RESUMEN

En el Ecuador, el control de la enfermedad fúngica *Phytophthora infestans* se realiza de manera tradicional mediante la aplicación inconsciente de productos químicos, por este motivo la presente investigación trata de mitigar el excesivo consumo de fungicidas por parte de los agricultores. En la actualidad la demanda creciente de productos libres de enfermedades y residuos químicos nocivos para la salud, obliga al agricultor a buscar métodos alternativos para el control del fitopatógeno, como alternativa a resolver estos problemas se plantea evaluar el comportamiento antagonista de la bacteria *Bacillus subtilis* ante el hongo *Phytophthora infestans*. El ensayo se lo realizó en base a un Diseño Completamente al Azar (DCA) con 4 tratamientos y 3 repeticiones dando un total de 12 unidades experimentales, para los ensayos in vitro se utilizó microorganismos aislados de la rizosfera de papa (*Solanum tuberosum*), pertenecientes a la colección microbiológica de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCESI). Los resultados de la investigación se los obtuvo a través de procesos específicos, como: Medición de halos inhibitorios en antibiogramas, Absorbancia por espectrofotometría y Conteo celular en cámara de Neubauer, los mismos que fueron realizados en los laboratorios de Biología, Microbiología y Biotecnología de la (PUCESI), ubicada en la provincia de Imbabura, ciudad de Ibarra, parroquia San Francisco.


Fuente: El autor

Anexo 35. Socialización de resultados.



Fuente: El autor

Anexo 36. Formato de encuesta.



**Pontificia Universidad
Católica del Ecuador**

**ESCUELA CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES
ÁREA DE VINCULACIÓN CON LA COMUNIDAD**

PROCESO DE SOCIALIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN

El siguiente cuestionario nos permitirá implementar mejoras constantes en los procesos de socialización de trabajos de investigación, por favor háganos llegar sus comentarios y sugerencias:


FECHA	08 de mayo 2019		
EXPOSITOR	Erick Reinaldo Chiza Romo		
LUGAR	DENTRO PUCESI	X	FUERA PUCESI

NOTA IMPORTANTE: Por favor conteste las preguntas según la siguiente escala:
5. MUY ALTO / 4. ALTO / 3. MEDIO / 2. BAJO / 1. NULO

DETALLE DE VALORACIÓN	1	2	3	4	5
ORGANIZACIÓN DEL EVENTO DESOCIALIZACIÓN:					
1. ¿Considera Usted que la sala donde se desarrolló este evento brindó las comodidades necesarias?					X
2. ¿Considera Usted que el material audiovisual utilizado en la presentación fue adecuado?					X
EJECUCIÓN DEL EVENTO POR PARTE DEL EXPOSITOR					
3. ¿Considera Usted que el expositor mostró dominio del tema?					X
4. ¿Estima Usted que el manejo del auditorio por parte del expositor fue adecuado?					X
5. ¿Considera Usted que el Expositor demostró facilidad de expresión?					X
MEDICIÓN DE IMPACTO DE LA INVESTIGACIÓN:					
6. ¿Considera Usted que el tema investigado posee relevancia para algún actor y/o sector de la sociedad?					X
7. ¿Considera Usted que esta investigación posee perspectivas para estudios complementarios posteriores?					X
8. ¿Considera Usted que el tema investigado genera actualmente o a futuro un beneficio concreto para alguna organización, empresa pública o privada, comunidad o institución?					X
9. ¿En función de los objetivos planteados expuestos en la investigación, considera Usted que éstos se cumplieron?					X
REALICE UN COMENTARIO O SUGERENCIA PARA LOS ORGANIZADORES DE ESTE EVENTO					
MENCIONE USTED OTRAS PROBLEMÁTICAS QUE A SU PARECER PODRÍAN SER INVESTIGADAS Y QUE POSEAN IMPORTANCIA PARA ALGÚN ACTOR Y/O SECTOR DE NUESTRA COLECTIVIDAD					
INSTITUCIÓN U ORGANIZACIÓN A LA QUE PERTENECE EL ENCUESTADO					PUCF-SI

Fuente: El autor

Anexo 37. Lista de asistencia a la socialización de la investigación.



**Pontificia Universidad
Católica del Ecuador**

ESCUELA CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES
ÁREA DE VINCULACIÓN CON LA COMUNIDAD

LISTA DE ASISTENCIA A SOCIALIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN

NOMBRE DEL EXPOSITOR: Erick Reinaldo Chiza Romo
 CARRERA: Ingeniería Agropecuaria
 FECHA: 08 de mayo del 2019

NOMBRE ASISTENTE	NÚMERO DE CÉDULA	INSTITUCION A LA QUE REPRESENTA	FIRMA
Zitieri Alexander	1003700997	PUCE-SI	<i>Zitieri Alexander</i>
Gonzalez Nicole	100217242-2	PUCE-SI	<i>Nicole Gonzalez</i>
Baez Jennifer	100291360-9	PUCE-SI	<i>Jennifer Baez</i>
Pasquel Joselyn	1003795299	PUCE-SI	<i>Joselyn Pasquel</i>
Esteban Mena C.	172232323-3	PUCE	Esteban Mena C.
Alexander Vasquez U.	100378742-9	PUCE-SI	<i>Alexander Vasquez</i>
Erika Gonzalez	172484964-9	PUCE-SI	<i>Erika Gonzalez</i>
David Chazdi	060183109-8	PUCE-SI	<i>David Chazdi</i>
Erick Vaca	100365108-3	PUCE-SI	<i>Erick Vaca</i>
Johani Regalado	100323622-9	PUCE-SI	<i>Johani Regalado</i>
Karla Guanduzza	100378028-3	PUCE-SI	<i>Karla Guanduzza</i>
Jorge Pasquel	100333877	PUCE-SI	<i>Jorge Pasquel</i>

Fuente: El autor

Anexo 38. Resultados de la socialización.

PREGUNTAS - SOCIALIZACIÓN		NULO	BAJO	MEDIO	ALTO	MUY ALTO
Pregunta 1	¿Considera usted que la sala donde se desarrolló este evento brindó las comodidades necesarias?	0	0	1	13	2
Pregunta 2	¿Considera usted que el material audiovisual utilizado en la presentación fue adecuado?	0	0	1	12	3
Pregunta 3	¿Considera usted que el expositor mostró dominio del tema?	0	0	1	8	7
Pregunta 4	¿Estima usted que el manejo del auditorio por parte del expositor fue adecuado?	0	0	1	8	7
Pregunta 5	¿Considera usted que el expositor demostró facilidad de expresión?	0	0	2	8	6
Pregunta 6	¿Considera usted que el tema investigativo posee relevancia para algún actor y/o sector de la sociedad?	0	0	0	8	8
Pregunta 7	¿Considera usted que ésta investigación posee perspectiva para estudios complementarios posteriores?	0	0	1	7	8
Pregunta 8	¿Considera usted que el tema investigado genera actualmente o a futuro un beneficio concreto para alguna organización empresa pública o privada, comunidad o institución?	0	0	0	8	8
Pregunta 9	¿En función de los objetivos planteados expuestos en la investigación, considera usted que éstos se cumplieron?	0	0	0	8	8

Fuente: El autor