



FACULTAD DE: INGENIERÍAS Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

“CARACTERIZACIÓN DEL POTENCIAL BIOLÓGICO DE *BACILLUS* SPP. Y  
SUS METABOLITOS PARA EL CONTROL DE *COLLETOTRICHUM*  
*ACUTATUM* CAUSANTE DE LA ANTRACNOSIS DEL CHOCHO ANDINO  
(*LUPINUS MUTABILIS*) EN LAS PROVINCIAS DE CHIMBORAZO Y  
COTOPAXI”

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos  
establecidos para optar por el título de Ingeniero en Biotecnología

Profesora guía

PhD. Viviana Yáñez Mendizábal

Autor

Carlos Eduardo Oliva Torres

Año

2015

## DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación.

---

Viviana Yáñez Mendizábal

PhD. en Ciencia y Tecnología Agraria y Alimentaria

C.I. 171046978-2

### DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.

---

Carlos Eduardo Oliva Torres

C.I. 171477604-2

## AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación y Desarrollo de Ingenierías (CIEDI) de la Universidad de las Américas por el soporte económico a través del proyecto “Control Biológico de Enfermedades del Chocho”.

A la SENESCYT y Universidad de las Fuerzas Armadas por el apoyo económico y logístico a través del programa “Mejora de la cadena productiva del chocho (*Lupinus mutabilis*) en el Ecuador”.

Al Programa Nacional de leguminosas y cereales andinos del INIAP y el Centro de Investigación Traslacional por el soporte logístico.

## DEDICATORIA

A mis padres, mi hermana, mis abuelitos y toda mi familia quienes han sabido apoyarme en el transcurso de toda mi vida y el desarrollo de este proyecto.

A mis amigos Andrea, Dayana, Galo, José, Andrés, Rainer, Luis Eduardo, Hernán, Carlos y Luis quienes me han apoyado durante el transcurso de mi vida universitaria y han compartido conmigo cada meta alcanzada.

## RESUMEN

El chocho andino o tarwi (*Lupinus mutabilis*) es un cultivo tradicional de la sierra ecuatoriana y de otros países andinos como Perú y Bolivia. Debido a su alto valor nutricional es un importante recurso agroalimentario a nivel nacional, especialmente de sectores indígenas. Uno de los principales problemas fitosanitarios de los cultivos de chocho son las enfermedades de origen fungoso. En el Ecuador la enfermedad fungosa de mayor impacto en el cultivo del chocho es la antracnosis causada por *Colletotrichum acutatum*. Actualmente el control de este patógeno se hace utilizando fungicidas químicos, los cuales incrementan el costo de la producción y representan un incremento en la toxicidad del producto. Otras estrategias utilizadas por los agricultores es la siembra de semillas de variedades mejoradas agrónomicamente por el INIAP y la selección de semilla propia de semilla luego de la siembra y cosecha. Sin embargo, este último incrementa la posibilidad del impacto y diseminación de la antracnosis por uso de materiales contaminados de baja calidad. Debido a esto, uso de métodos alternativos como el control biológico resultan de gran interés gracias a que los productos biológicos tienen una toxicidad más baja que los fungicidas químicos y son biodegradables en cortos periodos de tiempo. Dentro del control biológico el uso de microorganismos y sus metabolitos como bacterias del género *Bacillus* spp. han dado buenos resultados en la reducción de enfermedades de pre y poscosecha en otros cultivos incluyendo leguminosas. Por esta razón resulta interesante evaluar la actividad antifúngica de bacterias nativas para el manejo y control de *C. acutatum* causante de la antracnosis. Las cepas evaluadas en este estudio fueron aisladas de las zonas de Zumbahua y Salcedo fueron sometidos a diferentes ensayos de efectividad *in vitro* e *in vivo*, usando biomasa fresca así como sus metabolitos con *C. acutatum* con demostrada patogenicidad sobre *L. mutabilis*. Se obtuvieron dos cepas *Bacillus subtilis* con alto potencial antagónico contra *C. acutatum* las cuales mostraron una alta actividad antifúngica en todos los ensayos.

## ABSTRACT

The Andean lupin or *tarwi* (*Lupinus mutabilis*) is a traditional crop of the Ecuadorian region and other countries such as Peru and Bolivia. Due to its high nutritional value is an important domestic agrofood resource, especially for native population. One of the main phytosanitary issues of lupine crops are plant fungal diseases. In Ecuador, anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum* is the most destructive fungal disease of Andean lupin. Currently, the control of this pathogen is done using chemical fungicides, which increase the cost of production and represent an increase in product toxicity. Other strategies used by farmers are to plant seeds agronomically improved varieties by INIAP and selection of own seed after harvest seed. However, this activity increases the risk of impact and spread of anthracnose due to use of contaminated and low quality materials. Because of this, use of alternative methods such as biological control are important, thanks to the lower toxicity of the biological products compared to the chemical fungicides, and the fact that they are biodegradable in short periods of time. In biological control, the use of microorganisms such as bacteria of *Bacillus* spp. genus and their metabolites have been successful in reducing pre and post-harvest fungal diseases including legumes. For this reason it is important to evaluate the antifungal activity of native bacteria within the management and control of *C. acutatum* caused anthracnose. At present research, the effectiveness of native isolates from Salcedo and Zumbahua were evaluated in both *in vitro* and *in vivo* assays against *C. acutatum*, using fresh cells and its metabolites. Two strains of *Bacillus subtilis* showed high antagonistic potential against *C. acutatum* and high antifungal activity in all tests were obtained.

## ÍNDICE

1. Introducción.....	1
1.1. Objetivos.....	2
1.1.1. Objetivo general.....	2
1.1.2. Objetivos específicos.....	2
2. Marco teórico.....	4
2.1. Características agronómicas de chocho andino ( <i>Lupinus mutabilis</i> ).....	4
2.2. Problemas fitosanitarios de <i>Lupinus mutabilis</i> .....	5
2.2.1. Antracnosis del chocho.....	6
2.2.2. Manejo fitosanitario de enfermedades del chocho.....	7
2.3. Control biológico de patógenos fungosos.....	7
3. Materiales y métodos.....	9
3.1. Muestreo y aislamiento de antagonistas y patógenos.....	9
3.2. Caracterización de antagonistas y patógenos.....	10
3.2.1. Bacterias antagonistas.....	10
3.2.2. <i>Colletotrichum acutatum</i> .....	11
3.3. Conservación de antagonistas y patógenos.....	11
3.4. Determinación de parámetros de crecimiento y producción de endosporas y metabolitos antifúngicos de <i>Bacillus</i> spp. ....	12
3.4.1. Parámetros de crecimiento.....	12
3.4.2. Determinación de la producción de endosporas.....	13
3.4.3. Producción de metabolitos.....	14
3.5. Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i> de células, y metabolitos .....	16
3.5.1. Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i> con biomasa fresca.....	16

3.5.2. Pruebas de inhibición de la germinación de conidias de <i>Colletotrichum acutatum</i> .....	18
3.5.3. Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i> de extractos de lipopéptidos.....	20
3.6. Determinación de la efectividad <i>in vivo</i> de cepas de <i>Bacillus</i> spp. y sus metabolitos.....	20
3.6.1. Determinación del porcentaje de germinación de semillas de chocho andino.....	21
3.6.2. Determinación de patógenos en semilla.....	21
3.6.3. Ensayos de efectividad de antagonistas para el control de patógenos en semillas de chocho andino.....	22
3.7. Pruebas moleculares.....	23
3.7.1. Extracción de material genético de <i>Bacillus</i> spp. ....	23
3.7.2. Amplificación mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR).....	25
4. Resultados y discusión.....	26
4.1. Muestreo y aislamiento de antagonistas y patógenos.....	26
4.2. Pruebas duales de antagonismo <i>in vitro</i> .....	26
4.3. Parámetros de crecimiento de <i>Bacillus</i> spp. ....	29
4.4. Producción de endosporas.....	30
4.5. Cromatografía en capa fina.....	32
4.6. Caracterización del potencial antagónico.....	34
4.6.1. Ensayos de autobiografía.....	34
4.6.2. Inhibición de germinación de conidias de <i>Colletotrichum acutatum</i> .....	36
4.6.3. Pruebas de efectividad <i>in vivo</i> de aislados de <i>B. subtilis</i> . ....	37
4.7. Pruebas de identificación bioquímica.....	39
4.8. Pruebas moleculares.....	40
4.8.1. Extracción de DNA.....	40
4.8.2. Pruebas de PCR.....	41

5. Conclusiones.....	42
6. Recomendaciones.....	43
Referencias.....	44
Anexos.....	51

## 1. Introducción

El chocho (*Lupinus mutabilis*), también conocido como tarwi o lupino, es una legumbre nativa de los páramos andinos que ha sido cultivada y consumida desde civilizaciones prehispánicas (Popenoe *et al.*, 1989). Es además la única especie leguminosa originaria de América que ha sido domesticada y cultivada (Hondelmann, 1984). Actualmente, el chocho al igual que la quinua (*Chenopodium quinoa Willd.*), el amaranto (*Amaranthus caudatus Linneo*) y el ataco o sangorache (*Amaranthus quitensis H.B.K /A. hybridus L.*) son cultivos tradicionales, que han sido considerados como estratégicos para la soberanía alimentaria de la región Andina (Peralta *et al.*, 2012; Peralta *et al.*, 2006; Caicedo y Peralta, 2000; Guzmán, 2006; Jacobsen y Sherwood, 2002). Gracias a sus características nutricionales que incluyen un alto contenido proteico, cinc, hierro y grasa vegetal, la demanda de este cultivo a nivel mundial para la industria alimenticia humana y animal es creciente (Falconi, 2012; Aftab *et al.*, 2008; Pfeiffer y McClafferty, 2007; Kurlovich y Kartuzova, 2002; Lara *et al.*, 2000; Cowling *et al.*, 1998; Tapia, 1990; Schoeneberger *et al.*, 1982).

A pesar del potencial agrícola, alimentario e industrial del chocho andino, se ha realizado poca investigación en *L. mutabilis* a diferencia de otras especies de chocho usadas a nivel mundial, debido a su baja productividad. Según datos de productividad, *L. angustifolius* en el oeste de Australia alcanza 1.076 Kg ha<sup>-1</sup> comparado con *L. mutabilis* en Ecuador que es de 400 Kg ha<sup>-1</sup> (Junovich, 2003; Thomas, 2003; INIAP, 2001; Hardy y Huyghe, 1997). La baja productividad del chocho en la región andina es provocada principalmente por el estrés biótico causado por enfermedades de origen fungoso. Entre estas enfermedades fungosas del chocho la antracnosis causada por *Colletotrichum acutatum*, y antiguamente descrita como *C. gloeosporioides* (Insuati, 2001; Yang y Sweetingham, 1998), es la de mayor impacto en el cultivo (Falconí 2012).

En las últimas tres décadas para el manejo sostenible de enfermedades agrícolas se han desarrollado y utilizado diferentes métodos alternativos que involucran el uso de microorganismos con potencial de control biológico, productos químicos de baja toxicidad y métodos físicos. En la actualidad el

interés por el uso de control biológico se ha extendido a la investigación y aplicación industrial de metabolitos provenientes de agentes microbianos para su uso tanto en campo como poscosecha (Yáñez-Mendizábal *et al.*, 2012c). Los metabolitos son sustancias bioactivas que pueden ser enzimas o proteínas con características antifúngicas (Ongena, Henry y Thonart, 2009). Los metabolitos producidos por *Bacillus* spp. han mostrado ser eficientes en el control de otros agentes fitopatógenos (Yáñez, 2007; Yáñez-Mendizábal *et al.*, 2012c). Su potencial se basa en su capacidad para producir una amplia gama de moléculas bioactivas, con fuertes propiedades antifúngicas e inductoras de defensas secundarias de las plantas (Ongena *et al.*, 2009). Desde el punto de vista biotecnológico los metabolitos producidos por *Bacillus* spp. tienen una amplia aplicación en la agricultura por sus características amigables con el medio ambiente, de toxicidad baja y degradabilidad alta; comparadas con los pesticidas químicos convencionales (Chen *et al.*, 2008). Adicionalmente, estas bacterias tienen la capacidad de formar endosporas resistentes a condiciones ambientales extremas de temperatura y desecación, por lo cual pueden ser usadas dentro de procesos agroindustriales de producción y formulación de biopesticidas (Yáñez-Mendizábal *et al.*, 2012a; Fravel, 2005).

## **1.1. Objetivos**

### **1.1.1. Objetivo general**

Evaluar el potencial de aislados de *Bacillus* spp. y sus metabolitos para el control de *Colletotrichum acutatum* causante de la antracnosis del chocho andino (*Lupinus mutabilis*).

### **1.1.2. Objetivos específicos**

Identificar cepas locales del género *Bacillus* spp. mediante el aislamiento de bacterias de en diferentes localidades productoras de chocho con bajo manejo de agroquímicos.

Determinar los parámetros de crecimiento y producción de metabolitos de cepas locales de *Bacillus* spp. mediante técnicas de caracterización y

cuantificación de dinámica poblacional, producción de endosporas y metabolitos antifúngicos (sobrenadantes libres de células y extractos de lipopéptidos).

Evaluar el potencial de biocontrol de cepas locales del género *Bacillus* spp. y sus metabolitos contra *Colletotrichum acutatum* causante de la antracnosis del chocho andino (*Lupinus mutabilis*) mediante técnicas de análisis bioquímico y de actividad antifúngica *in vitro* (cromatografía y autobiografía) y ensayos *in vivo* en semillas y cotiledones bajo condiciones controladas.

## 2. Marco teórico

### 2.1. Características agronómicas de chocho andino (*Lupinus mutabilis*)

A nivel mundial la importancia del chocho como cultivo comercial radica en su alto valor nutritivo y medicinal. Según datos recientes de Jacobsen y Mujica (2006) más de la mitad del peso total de la semilla corresponden a proteínas (41-21%) y aceites esenciales (14-24%), además de una importante cantidad de fibra dietética (7.65%) y nutriente como el calcio y el magnesio. Otros estudios han atribuido, además del valor nutritivo, propiedades de relevancia para su uso en el tratamiento de enfermedades como la diabetes gracias a su efecto hipoglicemiante (Fornasini *et al*, 2012) o la prevención de la arteriosclerosis por su capacidad de reducir los niveles de colesterol en el organismo (Fontarani *et al*, 2011).

En el Ecuador las áreas de cultivo del chocho se encuentran limitadas a zonas andinas altas que van desde los 2500 hasta los 3600 m s.n.m. Según información de Caicedo y Peralta (2000), a partir de los 360 m s.n.m. existen factores limitantes como el riesgo a los efectos de heladas y granizadas. En cuanto a la organización de los productores de chocho hasta el año 2009 sólo existía una asociación dedicada a la producción de chocho registrada en el Servicio de Información y Censo Agropecuario (SICA) perteneciente a la provincia de Riobamba; mientras que en el resto del país, la producción se da de manera particular por agricultores no organizados (Cano y Acosta, 2009).

Según datos del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) el costo de producción de una hectárea de chocho, utilizando la variedad INIAP 450, estimado en junio del 2010 era de 1363.00 USD. y en promedio tenía una producción de 3000 kg·ha<sup>-1</sup> (Caicedo *et al*, 2010). Datos determinados en Perú por Jacobsen y Mujica (2006) indican que en óptimas condiciones de nutrición y un manejo adecuado del cultivo los rendimientos del chocho alcanzan los 3500 a 5000 kg·ha<sup>-1</sup>.

Estudios realizados por Peralta y colaboradores para el 2012, demostraron que los genotipos de la variedad "INIAP 450 Andino" presentan buenas

características agronómicas. Sin embargo estos genotipos son susceptibles a la Antracnosis (*Colletotrichum acutatum*), Roya (*Uromyces lupini*), Cercospora (*Cercospora* spp.), Mancha Anular (*Ovularia lupinicola*) y Ascochyta (*Ascochyta* spp.). Otros estudios realizados por Falconí (2012) demuestran la existencia de plantas individuales con resistencia a la Antracnosis, pero con susceptibilidad a *Uromyces* spp., *Ovularia* spp. y *Oidium* spp. que disminuyen significativamente la producción del cultivo, sin embargo, no se han identificado los genes responsables de esta resistencia.

## **2.2. Problemas fitosanitarios de *Lupinus mutabilis***

Los cultivos de chocho andino en el Ecuador se ven afectados principalmente por enfermedades causadas por agentes patógenos fungosos y plagas de insectos (Peralta *et al*, 2012). Entre las principales plagas que afectan a los cultivos se encuentran mosca de la semilla (*Delia platura* Meigen., *Díptera: Antomyiidae*), trozadores (*Agrotys* spp.), cutzo (*Barotheus castaneus*), chinche (*Rhinocloa* sp), barrenador del ápice (*Díptera:anthomyiidae*), polilla del chocho (*Crociosema aporema*), entre otros (Peralta *et al*, 2012).

Las enfermedades de mayor impacto en los cultivos de chocho en la sierra ecuatoriana según el Manual Agrícola de Granos Andinos del INIAP (Peralta *et al*, 2012) son: la Antracnosis (*Colletotrichum acutatum*), Roya (*Uromyces lupini*), Cercospora (*Cercospora* spp.), Mancha anular (*Ovularia lupinicola*) y Ascochyta (*Ascochyta* spp.). En una investigación previa realizada también en el INIAP por el Programa Nacional de Leguminosas (Caicedo y Peralta, 2001), se incluyen además enfermedades como la Fusariosis (*Fusarium oxysporum*), Mal del talluelo (*Pythium* sp.) y Rhizoctoniosis (*Rhizoctonia solani*). La mayoría de estas enfermedades tienen una epidemiología parecida, siendo la semilla su principal órgano de propagación y usando además métodos físicos como el agua de lluvia, el viento y suelos contaminados para su propagación; por esta razón la desinfección de la semilla y un buen manejo poscosecha son recomendados como principal método de control (Peralta *et al*, 2012).

### 2.2.1. Antracnosis del chocho

Las especies de hongos pertenecientes al género *Colletotrichum* son considerados como el octavo grupo de patógenos de plantas de mayor impacto negativo del mundo basado en las pérdidas económicas causadas (Dean *et al*, 2012). Debido a la amplia diversidad de huéspedes que pueden infectar, no se considera a la relación huésped-patógeno como un criterio de clasificación para especies de este género y en su lugar son agrupados basados en sus diferencias morfológicas y criterios moleculares (Cannon *et al*, 2012). Entre los agentes patógenos asociados con la antracnosis, *Colletotrichum acutatum* es una de las especies más reportadas a nivel mundial debido a su capacidad de infectar a una gran número de especies vegetales cultivadas provocando importantes pérdidas económicas en todo el mundo (Damm *et al*, 2012).

*Colletotrichum acutatum* fue descrito originalmente en Australia en cultivos infectados de *Capsicum frutescens*, *Delphinium ajacis* y *Carica papaya*, y se identificó como principal característica morfológica la forma aguda en la que terminan sus conidias (Simmonds, 1965).

La alta capacidad infecciosa que posee *C. acutatum* ante las semillas constituye su principal medio de diseminación. Además las esporas usan mecanismos de diseminación como los insectos, el viento, la lluvia y otros métodos de transporte físicos como herramientas agrícolas (Caicedo y Peralta, 2001). Una vez infectada, los principales síntomas que se presentan en la planta son: manchas cloróticas rojizas de forma irregular en los bordes de los folíolos; manchas de color oscuro, deformes, alargadas y deprimidas en los tallos, donde también se presentan fructificaciones de color naranja; cuando la infección es avanzada además puede llegar a presentarse una defoliación de la planta previamente a su etapa de floración (Caicedo y Peralta, 2001).

Según información reportada por el INIAP en su Manual Agrícola de Granos Andinos se ha descrito a *Colletotrichum acutatum*, causante de la antracnosis, como una de las principales enfermedades que afecta a los cultivos de chocho en el Ecuador (Peralta *et al.*, 2012)

### **2.2.2. Manejo fitosanitario de enfermedades del chocho**

Las recomendaciones de manejo de las enfermedades fungosas del chocho se basan principalmente en el uso de productos químicos, en lo posible, de baja toxicidad y de costo contenido (Caicedo y Peralta, 2001). Específicamente para el control de la antracnosis el INIAP recomienda el uso de Benomil ( $250 \text{ g}\cdot\text{ha}^{-1}$ ), Carbendazim ( $120\text{-}240 \text{ mL}\cdot\text{ha}^{-1}$ ), Clorotalonil ( $700\text{-}1000 \text{ mL}\cdot\text{ha}^{-1}$ ), Difenconazol ( $1000 \text{ mL}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) y Propineb ( $600 \text{ g}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) (Peralta *et al.*, 2012; Caicedo *et al.*, 2010). Sin embargo, estos productos presentan desventajas en cuanto a toxicidad e incremento en el costo de los cultivos (Caicedo y Peralta, 2001) por ello se busca maximizar el uso de semilla certificada, así como la búsqueda de métodos de control alternativos como el uso de métodos físicos y de control biológico.

Entre los métodos de control que no involucran el uso de productos químicos se ha estudiado el uso de variedades resistentes a enfermedades; evaluando la variación que estas variedades presentan en las diferentes etapas de crecimiento y desarrollo de la planta en presencia del patógeno (Falconí, Visser y Heusden, 2015).

### **2.3. Control biológico de patógenos fungosos**

A nivel local, para el control de enfermedades se utilizan técnicas tradicionales como selección visual de semillas, muchas veces recicladas debido a que no se dispone de variedades resistentes y fumigación con productos químicos sintéticos durante la fase de crecimiento del cultivo (Peralta *et al.*, 2012). Sin embargo, estas técnicas representan un costo elevado tomando en cuenta el rubro del chocho; además pueden ser inconsistentes y generar un impacto negativo para la salud humana y el ambiente. Como alternativa el uso de técnicas relacionadas a la búsqueda de resistencia genética en cultivares locales y métodos de control físicos y biológicos usando microorganismos dentro de programas de manejo sostenible resultan atractivas (Lindhout *et al.*, 2007; Vigidal-Filho *et al.*, 2007; Murillo *et al.*, 2006).

El control biológico mediante el uso de organismos antagonistas ha sido probado en diferentes patógenos fungosos y en varias especies agrícolas como el chile habanero (*Capsicum chinensis*), mora (*Rubus* spp.), arroz (*Oryza sativa*) y maíz (*Zea mays*) (Tejera, et al., 2012; Reyes, et al., 2012; Calvo, et al., 2012). La capacidad antagónica de bacterias pertenecientes al género *Bacillus* spp. ha sido estudiada para el control de diversas enfermedades de origen fungoso. Estas especies han mostrado ser efectivas en el control de patógenos vegetales como *Curvularia* sp y *Pyricularia grisea* en cultivos de arroz (*Oryza sativa*). En estos estudios se determinó que gran parte de la capacidad antagónica de *Bacillus* spp. se debe a que gracias a su alta capacidad de crecimiento pueden alcanzar su estado estacionario en un corto tiempo y de esta manera conseguir una temprana producción de metabolitos secundarios los cuales son los principales responsables del efecto antifúngico (Tejera, Heydrich, y Rojas, 2012).

Otros géneros de bacterias como *Pseudomonas putida* también se han analizado como posibles agentes de control biológico contra *C. acutatum*, pero se demostró que tanto en la inhibición de germinación de conidias así como en el control de crecimiento micelial y la infección en semillas de manzana (*Malus domestica*), los aislados de bacterias del género *Bacillus* sp. y *Bacillus alcalophilus* tuvieron efectos antagónicos significativamente más efectivos (Moreira, Nunes y May De Mio, 2014)

En un estudio previo, Yáñez-Mendizábal y colaboradores (2012c) determinaron que la actividad antifúngica presentada por la cepa CPA-8 de *Bacillus subtilis* sobre *Monilinia fructicola* es posible gracias a la producción de lipopéptidos. Estos polipéptidos cíclicos están divididos en tres familias: fengicinas, iturinas y surfactinas. Entre ellas la familia de las fengicinas es la menos estudiada, sin embargo, sus efectos fungitóxicos han demostrado ser altos, destacando las fengicinas A y B (Romero et al, 2004).

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1. Muestreo y aislamiento de antagonistas y patógenos

El muestreo y el aislamiento de bacterias del género *Bacillus* se realizaron en localidades productoras de chocho de Cotopaxi y Chimborazo. Las localidades correspondieron a áreas de cultivo de chocho manejadas por grupos focales de agricultores y por Programa Nacional de Leguminosas y granos andinos del INIAP con bajo uso de agroquímicos y/o manejo ecológico. Se trabajó con cuatro muestras provenientes de la provincia de Cotopaxi, de las cuales, tres se obtuvieron en cultivos localizados en el cantón Salcedo y uno en la parroquia Zumbahua; y una muestra obtenida en la provincia de Chimborazo.

El muestreo y aislamiento de bacterias se hizo a partir de muestras vegetales de la filósfera y rizósfera de plantas de *Lupinus mutabilis* usando las metodologías descritas por Melnick (2011) y Ruiz de Escudero *et al* (2004) para aislamiento de bacterias del género *Bacillus* spp. A partir de cada muestra de filósfera y rizósfera se tomaron alícuotas de 1 g por triplicado y fueron suspendidos en 10 mL de solución tampón fosfato salino (PBS) ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2M 70 mL,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.2 M 30 mL y agua desionizada 300 mL, v/v/v, pH 6.5) estéril en tubos Falcon los cuales se agitaron a 150 rpm. durante 10 minutos con el objetivo de homogenizar las bacterias presentes en las muestras. Posteriormente las muestras se incubaron en un baño calibrado a 70° C durante 30 minutos y se sembraron en agar nutritivo levadura dextrosa (NYDA) (caldo nutritivo: 8 gL<sup>-1</sup>; extracto de levadura 5 gL<sup>-1</sup>; dextrosa 10 gL<sup>-1</sup> y agar 20 gL<sup>-1</sup>) usando la técnica de dilución y plateo para aislar colonias individuales.

Las muestras fueron incubadas 24 a 72 horas a una temperatura de 30° C luego de lo cual se examinaron las colonias obtenidas y se seleccionaron aquellas colonias que por su aspecto físico y morfología correspondieron a colonias de bacterias del género *Bacillus*. Las colonias seleccionadas fueron sembradas en nuevas cajas de NYDA para su purificación. Los cultivos finalmente se conservaron en medio NYDA a una temperatura de -4° C para su posterior uso en los siguientes ensayos. Se le asignó a cada cepa aislada un

nombre correspondiente con: lugar de origen de la muestra (S para muestras de Salcedo y Z para cepas de Zumbahua); número de muestra y repetición a partir de la cual fue aislada.

Los cultivos de *Colletotrichum acutatum* fueron obtenidos a partir de aislados pertenecientes a la colección de hongos fitopatógenos *in vitro* del Laboratorio de Fitopatología de la Universidad de las Fuerzas Armadas (ESPE). Los cultivos fueron resembrados en cajas de agar papa dextrosa (PDA) (Difco, BD Diagnostics, Sparks, MD, USA) y mantenidos a temperatura ambiente y condiciones de oscuridad para su posterior uso en futuros ensayos.

### **3.2. Caracterización de antagonistas y patógenos**

#### **3.2.1. Bacterias antagonistas**

Los aislados del género *Bacillus* con potencial para el control de enfermedades fungosas de chocho obtenidos de las diferentes localidades fueron caracterizados, inicialmente, mediante pruebas morfológicas. Los cultivos se sometieron a una tinción de Gram y de endosporas básica con verde de malaquita-fucsina y fueron observadas al microscopio (Olympus® CX-31) para corroborar la obtención de cultivos del género *Bacillus* spp.

Posterior a esto se realizó una identificación mediante pruebas de actividad antifúngica. Para la caracterización de la actividad antifúngica se siguieron los protocolos descritos por Yáñez *et al* (2011) para caracterización de bacterias con potencial de control de enfermedades fungosas de plantas.

En base a los resultados obtenidos en las pruebas morfológicas y de actividad antifúngica se hizo una primera selección de potenciales antagonistas mediante pruebas de antagonismo *in vitro* como se detalla en el apartado 3.5. Los cultivos que mostraron una actividad antifúngica fueron seleccionados para ser sometidos a pruebas de caracterización bioquímica.

Para la caracterización bioquímica de *Bacillus* spp. se pruebas de identificación: producción de almidón; Microgen GN-ID A panel y GN-ID B panel (Microgen Bioproducts Ltd. Admiralty Way Camberley Surrey GU15 3DT U.K.)

para la pruebas de producción de acetoina a partir de glucosa (VP) y pruebas de degradación de citrato (Anexo 1). Para esto se prepararon cultivos de 96 h. en caldo tripticasa-soya (TSB) de cada bacteria; 100  $\mu$ L de estos cultivos se sembraron en estriado recto en placas de PDA y se incubaron durante 4 días a 25° C para la posterior aplicación de lugol lo cual permitió la observación de halo de amilasa que determina la hidrólisis de almidón. Las pruebas de Microgen se realizaron como indica el procedimiento inoculando 4 a 5 gotas de suspensiones frescas de células de cada bacteria en PBS y se incubaron durante 48 horas a 37° C. Los resultados de estas pruebas fueron analizados según las características descritas para especies del género la *Bacillus* descritas en la sistemática de bacterias (Garrity *et al*, 2005).

### **3.2.2. *Colletotrichum acutatum***

El hongo *C. acutatum* se caracterizó mediante pruebas morfológicas y de crecimiento en medio de cultivo a partir de los aislados proporcionados por la Universidad de las Fuerzas Armadas. Además se corroboró su patogenicidad utilizando los postulados de Koch (Koch, 1891).

### **3.3. Conservación de antagonistas y patógenos**

A partir del material aislado y evaluado se formó un banco de cepas de antagonistas y patógenos de la UDLA. Las cepas de *Bacillus* spp. fueron codificadas y mantenidas siguiendo protocolos rutinarios para conservación de microorganismos en laboratorio a corto plazo a -4°C y -20°C (Anexo 2) y a largo plazo en criobolas y Dimetilsulfóxido (DMSO) (Fischer Scientific, CPS 67-68-5, LOT 137567) a -80°C (Yáñez-Mendizábal *et al.*, 2012b) (Anexo 3); para el almacenamiento de *Colletotrichum acutatum* se utilizaron también cultivos en glicerol.

Para la conservación de antagonistas, a partir de cultivos de cada bacteria en caldo nutritivo levadura dextrosa (NYDB) se prepararon suspensiones en PBS y se les añadió DMSO hasta una concentración de 9%. Las suspensiones fueron dispensadas en tubos Eppendorf de 2 mL y congelados a -80° C.

Además se inocularon criobolas por triplicado para cada cepa y se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Para la conservación de *C. acutatum*, las criobolas fueron inoculadas por cuadruplicado utilizando cultivos de PDA incubados previamente de 4 a 5 días a temperatura ambiente y se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para los criocultivos se realizó una suspensión concentrada de esporas en 40 mL de PBS y se añadieron 4 mL de DMSO estéril para obtener una concentración final de 9%. Se dispensó la suspensión en 5 tubos eppendorf de 2 mL, se selló con parafilm y se congeló a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para la conservación en glicerol se usaron cultivos del hongo en agar inclinado (PDA) incubados a temperatura ambiente durante 7 días, los cuales se cubrieron con 3-5 mL de glicerina o aceite de vaselina estéril y fueron sellados con la tapa propia del tubo y parafilm y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **3.4. Determinación de parámetros de crecimiento y producción de endosporas y metabolitos antifúngicos de *Bacillus* spp.**

#### **3.4.1. Parámetros de crecimiento**

Para la determinación de los parámetros de crecimiento y producción de metabolitos antifúngicos de cepas de *Bacillus* spp. efectivas en el control de enfermedades de chocho a escala de laboratorio, se efectuó un estudio de la dinámica poblacional de cepas bacterianas siguiendo la metodología descrita por Yáñez-Mendizábal *et al.* (2011) para modelización de crecimiento de *Bacillus subtilis* y producción de endosporas y sobrenadantes libres de células.

La curva de crecimiento de *B. subtilis* fue caracterizada y modelizada mediante cultivos bacterianos con toma de muestra desde 0 horas hasta 24 horas, 48 horas y 72 horas. El experimento fue llevado a cabo en un diseño completamente al azar con tres repeticiones, cada una de las cuales consistió en tres Erlenmeyer con 100 mL de caldo tripticasa soya. Los medios fueron incubados a  $30^{\circ}\text{C}$  a 150 rpm. Los datos provenientes de cada una de las repeticiones fueron estimados mediante el método de dilución y plateo en medio NYDA y expresados en concentraciones de unidades formadoras de colonias por mililitro ( $\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) en relación al tiempo. Los datos fueron

transformados a  $\text{Log}_{10}$  y modelizados usando la ecuación de Baranyi y Roberts (1994). Para modelizar el crecimiento bacteriano se utilizó la ecuación completa que especifica los cambios en las concentraciones celulares en unidades formadoras de colonias por mililitro ( $\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) en relación al tiempo.

Los parámetros de crecimiento determinados según el modelo de Baranyi y Roberts (1994) fueron: la duración de la fase  $\lambda$ -lag (horas), la máxima tasa de desarrollo ( $\mu_{\max}$   $\text{h}^{-1}$ ) y la máxima densidad de población [ $\text{log}_{10}$  ( $\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ )]. Los parámetros estimados se establecieron de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$y(t) = y_0 + \mu_{\max}A(t) - \frac{1}{m} \ln \left[ e^{m\mu_{\max}A(t)} - \frac{1}{e^{m(y_{\max}-y_0)}} \right] \quad \text{(Ecuación 1)}$$

$$A(t) = t + 1/\mu_{\max} \ln \left( e^{-\mu_{\max}t} + \frac{q_0}{1 + q_0} \right) \quad \text{(Ecuación 2)}$$

$$\lambda = \ln \left( 1 + \frac{1}{q_0} \right) / \mu_{\max} \quad \text{(Ecuación 3)}$$

Donde  $y(t)$  es el logaritmo natural de la concentración de células en el tiempo (h),  $y_0$  es el logaritmo natural de la concentración de células en tiempo 0;  $\mu_{\max}$  es la máxima tasa de desarrollo específico ( $\text{h}^{-1}$ );  $A(t)$  es la variable integral que va desde el tiempo 0 al tiempo t;  $m$  es el parámetro relacionado con curvatura después de la fase exponencial;  $y_{\max}$  es el logaritmo natural de la concentración máxima de la célula y  $q_0$  es el estado fisiológico de la célula al tiempo inicial.

Los datos experimentales fueron analizados y validados usando un *software* de modelización de crecimiento microbiano disponible en ComBase (Institute of Food Research, Norwich, United Kingdom).

#### 3.4.2. Determinación de la producción de endosporas

La producción de endosporas se determinó a partir de cultivos bacterianos de 24, 48 y 72 horas. Se tomaron muestras de *B. subtilis* por triplicado. Las muestras bacterianas (células vegetativas y endosporas) se separaron del sobrenadante mediante centrifugación a 10.000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5804R ®, Rotor A-4-44), y posteriormente fueron resuspendidas en PBS. Las

células vegetativas fueron eliminadas por incubación a 80°C durante 12 minutos y las concentraciones de endosporas (UFC·mL<sup>-1</sup>) se determinaron mediante dilución y plateo en NYDA como se describió anteriormente en el apartado 3.4.1.

### 3.4.3. Producción de metabolitos

Para la obtención de lipopéptidos se sembraron triples estrías de aislados de bacterias que presentaron una actividad antifúngica significativa en las pruebas de antagonismo con biomasa fresca y de las cepas de referencia en placas Petri con medio NYDA y fueron incubados a 30° C durante un periodo de 24 horas. Posteriormente se inocularon, a partir de los cultivos en NYDA, 50 mL de medio óptimo para la producción de lipopéptidos (MOLP) (Peptona 30 g·L<sup>-1</sup>; Sacarosa 20 g·L<sup>-1</sup>; Extracto de levadura 7 g·L<sup>-1</sup>; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.9 g·L<sup>-1</sup>; CuSO<sub>4</sub> 0.0001 mg·L<sup>-1</sup>; FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.0005 mg·L<sup>-1</sup>; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 0.004 mg·L<sup>-1</sup>; KI 0.0002 mg·L<sup>-1</sup>; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 3.6 mg·L<sup>-1</sup>; MgSO<sub>4</sub> 0.45 g·L<sup>-1</sup>; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.14 mg·L<sup>-1</sup>; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.01 mg·L<sup>-1</sup>; C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> 10 mg·L<sup>-1</sup>; pH 7) (Jacques *et al*, 1994) de cada cepa y se incubó a 30° C durante 72 horas. Se centrifugó cada cultivo a 10000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5804R ®, Rotor A-4-44) durante 20 minutos y 4° C y los sobrenadantes libres de células se obtuvieron por filtración en nitrocelulosa a 0.1 µm. Cada uno de los sobrenadantes libre de células fue mezclado con n-butanol en proporción 1:1 y se colocaron en agitación a 150 rpm a temperatura ambiente. Una vez separadas las fases, se recuperó la fase orgánica de la acuosa y se dejó evaporar el n-butanol en cajas de Petri bajo campana de extracción de gases, a 150 rpm y temperatura ambiente (20±5° C). Posterior al secado del n-butanol se resuspendieron los residuos de lipopéptidos al volumen original utilizando metanol absoluto. Los lipopéptidos extraídos se conservaron para análisis posterior a -4° C.

Los sobrenadantes filtrados también se utilizaron para una extracción de lipopéptidos mediante columna *Mega Bond Elut C<sub>18</sub>* (Agilent Technologies, USA. Part No. 12256023) y siguiendo la metodología descrita por Razafindralambo *et al* (1993) para extracción de lipopéptidos de bacterias. Para ello se activaron las columnas utilizando 10 mL de metanol absoluto.

Posteriormente se añadieron 20 mL de sobrenadante filtrado y se realizaron 3 lavados con 20 mL de agua grado molecular, 40 mL de una solución de agua con metanol al 50% y 20 mL de metanol absoluto, respectivamente. Para permitir el paso de las soluciones a través de las columnas se utilizó cámara de vacío a -15 kPa (Anexo 4). Finalmente los extractos se colocaron bajo extractor de gases hasta la evaporación completa de metanol y se resuspendieron en 0.5 mL de metanol absoluto.

Los lipopéptidos obtenidos, fueron sometidos a cromatografía en capa fina (TLC) en placas de TLC (245 x 245 mm silica gel plates HPTLC 60-F<sub>254</sub>, Merck AG). Se cargó un volumen total de 100 µL de cada extracto y se dejó secar. La placa inoculada se colocó en una fase móvil conformada por una mezcla de cloroformo-metanol-agua para HPLC en una proporción 65:25:4 (v/v/v). Se corrió durante 2 horas y se observó los resultados bajo luz UV. Los resultados se midieron en base a los factores de retención ( $R_f$ ) de los componentes separados en cada extracto. Los factores de retención se calcularon utilizando la Ecuación 4 (Romero et al, 2004).

$$R_f = \frac{D_C}{D_T} \quad \text{(Ecuación 4)}$$

Donde  $D_C$  corresponde a la distancia migrada por el compuesto y  $D_T$  a la distancia total de recorrido de la fase móvil en la cromatografía o frente del solvente.

El ensayo se realizó en dos ocasiones; en la primera placa se inocularon las cepas S2-1 por duplicado, Z2 por duplicado y las cepas de referencia CPA-8 y B-12 (Yáñez et al, 2012) en los extremos izquierdo y derecho respectivamente como control; en la segunda placa se inocularon las cepas S2-1 por duplicado, S3-5 por duplicado y Z3, además de las cepas de referencia que fueron inoculadas de igual forma que en el primer ensayo.

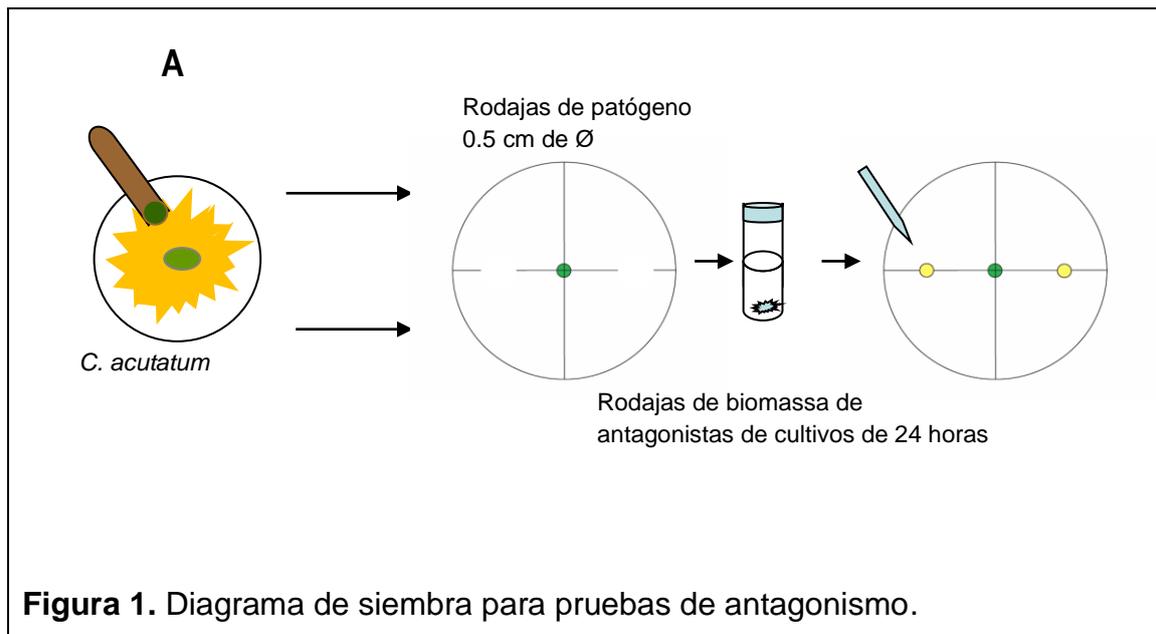
### **3.5. Pruebas de antagonismo *in vitro* de células, y metabolitos**

Con las cepas de potenciales antagonistas de *Bacillus* spp previamente aisladas se realizaron pruebas de actividad antifúngica *in vitro* contra *C. acutatum* causante de la antracnosis. Las pruebas de antagonismo se realizaron usando cultivos bacterianos frescos y sobrenadantes libres de células obtenidos a partir de las cepas de *Bacillus* spp. El potencial antagonista se comparará con cepas de referencia (probadas) con alto potencial de biocontrol. Se seguirán protocolos optimizados por Yáñez y colaboradores (2011) en prueba dual.

#### **3.5.1. Pruebas de antagonismo *in vitro* con biomasa fresca**

Las pruebas se llevaron a cabo en placas de Petri con agar PDA. En cada placa, usando un saca bocados estéril, se inoculó una rodaja de patógeno de 0.5 mm de diámetro en el centro de la placa, 24 horas antes de la inoculación de los potenciales antagonistas como se indica en la Figura 1.

Para las pruebas con cultivos bacterianos frescos se utilizaron triples estrías en medio NYDA de 24 h. de incubación de cada una de las cepas bacterianas a partir de los cuales se obtuvo la biomasa para ser utilizada en el ensayo. Se sembraron rodajas de biomasa de los cultivos de 24 horas a 3 cm de distancia de la línea de siembra del patógeno (Figura 1). En los cultivos de control negativo se sembró el patógeno y se colocaron rodajas de medio NYDA estéril en lugar de las rodajas con biomasa (Anexo 5). Las placas se incubaron a 25°C durante a 7 días. Cada tratamiento se evaluó con 5 repeticiones para cada cepa probada; 5 repeticiones para los controles positivos (cepas de referencia); y 5 repeticiones para los controles negativos. Se realizaron dos repeticiones de este ensayo para comparar todas las cepas de aislados.



Los resultados de los ensayos de antagonismo con biomasa fresca se midieron en base al radio de crecimiento micelial del patógeno en centímetros. Se siguió un diseño experimental completamente al azar con 5 repeticiones. Con los resultados obtenidos se calcularon los porcentajes de inhibición de crecimiento micelial utilizando la fórmula presentada en la Ecuación 5.

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \frac{D_c - D_t}{D_c} \cdot 100 \quad \text{(Ecuación 5)}$$

Donde  $D_c$  representa al diámetro de crecimiento micelial del control en centímetros y  $D_t$  al diámetro de crecimiento micelial del patógeno en presencia del antagonista. Los datos de porcentaje de inhibición se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y las medias fueron separadas por la prueba de Student Newman Keuls SNK ( $P < 0.05$ ) usando el software SAS (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA) para la selección de aislados de *Bacillus* spp. de significativa actividad antifúngica.

### 3.5.2. Pruebas de inhibición de la germinación de conidias de *Colletotrichum acutatum*

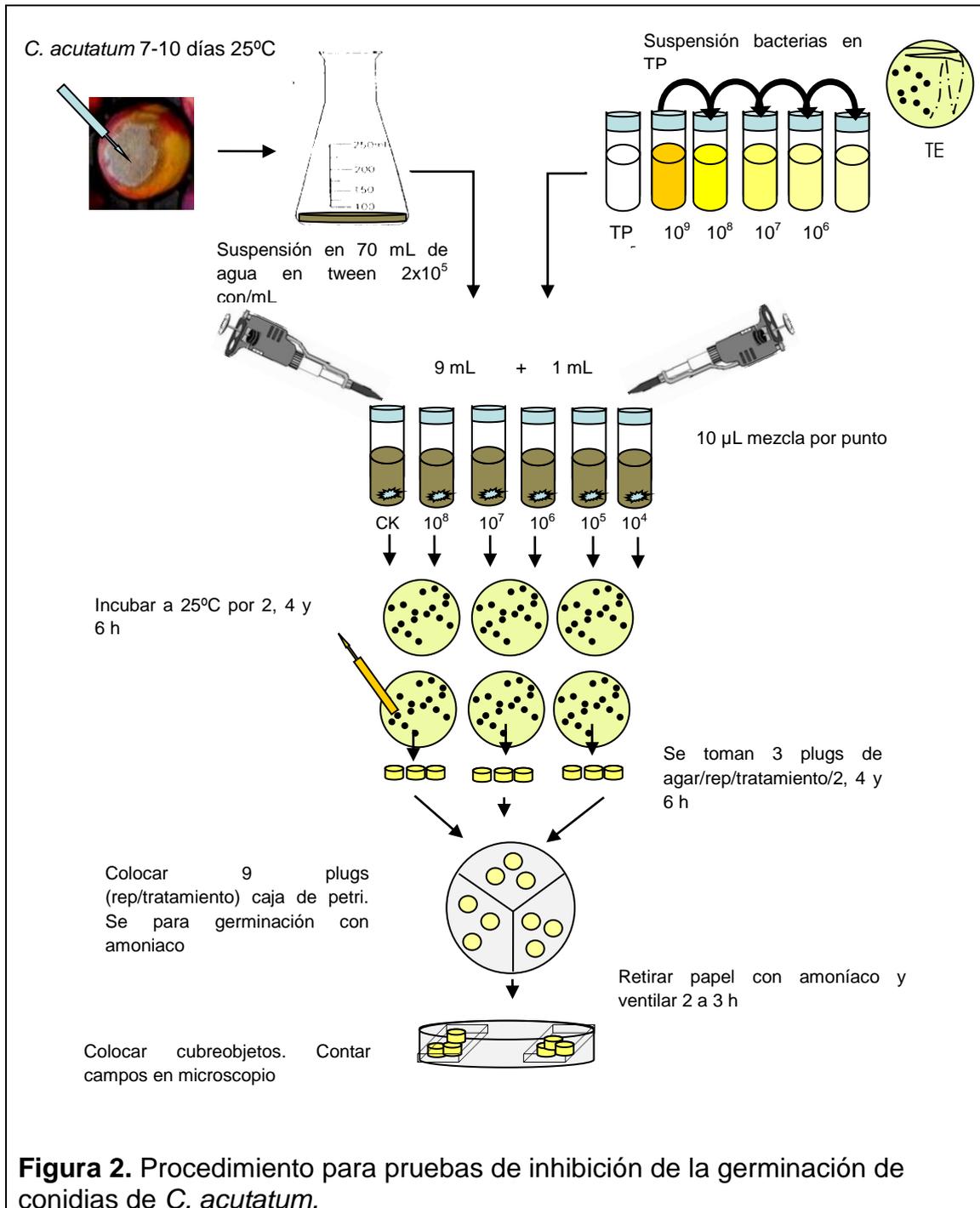
Para determinar la acción inhibitoria de los antagonistas en el proceso de germinación de conidias de *Colletotrichum acutatum*, se utilizó la metodología descrita por el Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentarias de Cataluña (IRTA) (Yáñez *et al*, 2012d) para germinación de conidias de *Monilinia fructicola*.

*C. acutatum* se obtuvo a partir de cultivos frescos esporulados en PDA, los cuales fueron incubados durante 7 días a una temperatura de 25° C. Se preparó una suspensión del hongo  $2 \times 10^5$  conidias·mL<sup>-1</sup> erlenmeyer con 70 mL de agua en *tween*. Se dispensaron 9 tubos con 9 ml cada uno de la suspensión.

Se incubaron triples estrías de las cepas de *Bacillus* spp. que presentaron una inhibición significativa del crecimiento micelial y de las cepas de referencia, a partir de las cuales, prepararon 5 ml de una suspensión  $10^9$  UFC·mL<sup>-1</sup> en solución tampón (PBS) estéril. Se prepararon diluciones sucesivas de  $10^{-8}$  a  $10^{-5}$ .

Posteriormente se dispensaron, en un tubo vacío para cada cepa de antagonista, 9 mL de suspensión del patógeno y 1 mL suspensión de suspensión de bacterias; en el caso de los controles se dispensó 1 mL de solución tampón. En una caja Petri con PDA para cada tratamiento se marcaron puntos de inoculación, en los cuales, se inoculó 10 µL de mezcla en cada uno correspondientemente con tratamiento (Anexo 6). Las cajas inoculadas se incubaron a 25°C durante 2, 4 y 6-horas.

Utilizando un sacabocados se tomaron 3 rodajas de 5 mm. por cada repetición- de cada tratamiento-tiempo y se coloca en cajas de Petri divididas en tres secciones como se indica en la (Figura 2).



La germinación se detuvo respetivamente a cada tiempo establecido, utilizando pedazos de papel toalla humedecidos con amoniaco, los cuales se colocaron en el interior de la tapa de cada caja Petri para permitir que la solución ejerza su efecto. Antes de la observación de los resultados, se retiró el papel y se dejó ventilar las cajas de 2 a 3 horas dentro de campana extractora. Se cubrieron 3

rodajas con un cubre objetos y se observó al microscopio 3 campos de cada rodaja, contando en cada uno 100 conidias en total e identificando el número de conidias germinadas y no germinadas. Se calculó el porcentaje de germinación a las 2, 4 y 6 horas. Se hicieron dos repeticiones de este ensayo.

### **3.5.3. Pruebas de antagonismo *in vitro* de extractos de lipopéptidos**

La actividad antifúngica de metabolitos y extractos de lipopéptidos se analizaron siguiendo la metodología de análisis químico de lipopéptidos aislados de *B. subtilis* por cromatografía de capa fina y autobiografía optimizados por Razafindralambo *et al* (1993) y Yáñez *et al* (2012c) respectivamente, descritos para la identificación de compuestos antifúngicos.

Para la autobiografía se dejó evaporar completamente los solventes presentes en las placas de TLC obtenidos previamente (apartado 3.4.3.) manteniendo un ambiente estéril y sobre una placa de cultivo *Bioassay* (245 x245 x 25 mm, *Thermo Scientific*®, USA). Los puntos de inoculación y final de la TLC fueron marcados en la superficie de la caja Petri. Se preparó una suspensión de patógeno a una concentración de  $5 \times 10^5$  conidias·mL<sup>-1</sup> en PDA que previamente se fundió mediante calor y se dejó enfriar hasta una temperatura segura para mantener la viabilidad del inóculo pero sin que el medio haya comenzado a solidificar. El inóculo se obtuvo a partir de cultivos frescos esporulados del patógeno los cuales se incubaron a 25° C durante 7 días. La suspensión se homogenizó mediante agitación manual y se esparció uniformemente sobre la placa de TLC, se dejó solidificar y finalmente se incubó el cultivo a 25° C durante 7 días. Los valores de R<sub>f</sub> de las diferentes zonas de inhibición se calcularon en base a la distancia de cada fragmento sobre la placa. El ensayo fue ejecutado respectivamente para las dos placas de TLC obtenidas previamente.

### **3.6. Determinación de la efectividad *in vivo* de cepas de *Bacillus* spp. y sus metabolitos**

Se usaron, para este ensayo, semillas de chocho de la variedad INIAP 450-Andino proveniente del banco del Programa Nacional de Leguminosas y

Cereales Andinos así como semillas de grupos focales del INIAP de la Provincia de Cotopaxi. Se manejó la conservación de semillas, crecimiento de plantas en condiciones controladas en la UDLA, sede Queri, bajo parámetros agrícolas de manejo de cultivo del chocho establecidos por el INIAP (Peralta *et al.*, 2012).

### **3.6.1. Determinación del porcentaje de germinación de semillas de chocho andino**

Para determinar el porcentaje de germinación de cada lote de semillas se realizaron ensayos de germinación de semillas. Se tomaron 50 semillas de chocho de cada lote, se desinfectaron superficialmente usando una solución de hipoclorito de sodio al 5% durante 5 minutos y se inocularon en cámaras de humedad (cajas de Petri). Se incubaron a temperatura ambiente durante 7 a 10 días, luego de lo cual se contaron las semillas germinadas y se determinó el porcentaje de germinación.

El ensayo se realizó en 3 ocasiones. En el primer ensayo se evaluaron semillas del lote INIAP 450, se realizaron 4 repeticiones de 25 semillas cada una. En el segundo ensayo se evaluaron semillas de los lotes Salcedo 1, Salcedo 2-1, Salcedo 2-2 y Zumbahua, con 9 repeticiones de cada lote con 6 semillas por repetición. En el último ensayo se evaluaron los lotes Salcedo 1, Salcedo 2-1 y Zumbahua, se realizaron 10 repeticiones de 6 semillas cada una. En el caso del tercer ensayo se contaron además el número de semillas que presentaron contaminación visible

### **3.6.2. Determinación de patógenos en semilla**

La determinación de patógenos se realizó utilizando la metodología descrita por Falconí (2012) para aislamiento de patógenos de muestras vegetales. Se tomaron de semillas de chocho de cada lote y se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 5% durante 5 minutos, se sembraron medio PDA+rosa de bengala. Se incubó a 25°C hasta observar crecimiento de patógenos. Finalmente se purificó los patógenos observados.

### 3.6.3. Ensayos de efectividad de antagonistas para el control de patógenos en semillas de chocho andino

En base a los protocolos optimizados por Álvarez y Torés (1997) y Romero *et al* (2004) se evaluó la efectividad de las cepas de *Bacillus* spp. y sus metabolitos para reducir o controlar los patógenos fungosos en semillas de chocho.

Los ensayos de efectividad se fueron realizados en dos ocasiones cuyos protocolos particulares de detallan a continuación.

Para todos los ensayos de efectividad la semilla fue desinfectada utilizando una solución de hipoclorito de sodio al 10% durante 4 minutos a 200 rpm., seguido de 2 lavados en agua estéril durante 5 minutos a 200 rpm

En el primer ensayo se utilizaron semillas del lote INIAP 450 y se evaluaron las cepas de antagonistas S2-1 y Z3, la cepa de referencia y el producto comercial Rhapsody® (*Bacillus subtilis* QST-173, Bayer CropScience C.A. Canadá). Se realizaron inoculaciones artificiales de *Colletotrichum acutatum*, para lo cual se usaron cultivos puros del hongo mantenidos en PDA durante 7 días a 20° C. Se prepararon 200 mL de una suspensión  $2 \times 10^6$  conidias·mL<sup>-1</sup> en agua con tween. La concentración se calibró utilizando hematocitómetro. La semilla desinfectada fue tratada en la suspensión durante 10 minutos a 200 rpm., después de lo cual se retiró el exceso de agua y se sembró las semillas en platos con tapa.

El producto comercial fue aplicado en las semillas siguiendo las indicaciones del fabricante con una concentración de 2.5mL·L<sup>-1</sup>. Las cepas bacterianas se inocularon a partir de cultivos de cada bacteria en medio MOLP. Se prepararon suspensiones de 20 mL de estos cultivos en tubos Falcon de 50 mL a una concentración de  $2 \cdot 10^8$  UFC·mL<sup>-1</sup>. Las semillas desinfectadas fueron colocadas en la suspensión y se las trató durante 4 minutos a 200 rpm luego de lo cual se retiró el exceso de suspensión y se sembró las semillas en los platos correspondientes al tratamiento.

Como control se sembró semilla desinfectada sin inóculo de ningún tipo. Además se realizaron inoculaciones de cada cepa bacteriana y el producto comercial en semillas desinfectadas sin inóculo de patógeno con el fin de evaluar el efecto que tienen en la semilla. Para la evaluación de la efectividad se realizaron inoculaciones tanto del patógeno como de cada cepa bacteriana así como del producto comercial Rhapsody® respectivamente. Las concentraciones de los tratamientos fueron verificadas por dilución y plateo.

Para cada tratamiento se prepararon tres platos cada uno correspondiente a una repetición conteniendo doce semillas cada uno. Todas las semillas se dejaron incubar durante ocho días con una humedad del 60%. Para los resultados se contaron el número de semillas germinadas y el número de semillas afectadas por el patógeno.

Para el segundo ensayo se utilizaron semillas del lote LOT-2015. Las semillas fueron desinfectadas siguiendo el mismo protocolo utilizado en el primer ensayo. Para este ensayo se buscó evaluar el control de los antagonistas ante infecciones latentes por lo que no se realizó inoculación artificial de *Colletotrichum acutatum*. Se utilizaron las cepas de antagonistas S2-1, S3-5, Z3, la cepa de referencia y el producto comercial Rhapsody®. Las inoculaciones del producto comercial y de las cepas bacterianas se realizaron del mismo modo que en el primer ensayo. Como control se utilizó semilla desinfectada sin inóculo. En este ensayo las semillas se colocaron en platos estériles de seis pocillos sembrando tres semillas por pocillo para un total de 18 semillas por plato correspondientes a una repetición. Cada tratamiento correspondió a tres platos de 18 semillas para un total de tres repeticiones por tratamiento. Al igual que en el primer ensayo las semillas fueron incubadas durante ocho días con una humedad del 60% y los resultados de germinación e incidencia se contabilizaron del mismo modo.

Los ensayos se realizaron siguiendo un diseño experimental completamente al azar. Los datos infección fueron expresados como porcentajes de incidencia de la enfermedad y porcentajes de geminación de semilla y analizados con el software SAS (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA).

### 3.7. Pruebas moleculares

#### 3.7.1. Extracción de material genético de *Bacillus* spp.

El material genético se extrajo mediante el kit de extracción y purificación de ácidos nucleicos PureLink™ (Genomic DNA Mini Kit Catalog No. K1820-00) utilizando los protocolos descritos por el fabricante (Anexo 7).

Se cultivaron aislados de *B. subtilis* en NYDA y fueron incubados durante 48 h. a 30° C. A partir de estos hicieron cultivos en 250 mL de MOLP y se incubaron a 30° C durante 72 h. Cada cultivo fue centrifugado a 5000 rpm. (Eppendorf Centrifuge 5804R®, Rotor ML-154) durante 20 minutos y se separó la biomasa del sobrenadante. La biomasa fue resuspendida en buffer de lisis (incluido en kit de extracción) hasta obtener 200 µL. de una suspensión  $2 \cdot 10^9$  de cada aislado. La resuspensión fue homogenizada usando vórtex durante pocos segundos. Los tubos fueron colocados en termobloque a 37° C durante 30 minutos. Posterior a esto se añadieron 20 µL de Proteinasa K (incluida en kit de extracción) a cada tubo y se mezcló mediante breve vórtex para colocar los tubos en termobloque a 55° C. durante 30 minutos. Se añadieron 200 µL de etanol al 96% y se homogenizó la suspensión mediante vórtex.

Para el protocolo de purificación se colocaron 640 µL de suspensión de cada aislado en columnas de purificación PureLink™ y se centrifugaron a 10000 G (Eppendorf Centrifuge 5804R®, Rotor ML-154) durante un minuto. Se añadieron 500 µL de *Wash Buffer 1* (proporcionado en kit) y se centrifugó a 10000 G (Eppendorf Centrifuge 5804R®, Rotor ML-154) durante 1 minuto. Se colocaron 500 µL de *Wash Buffer 2* (incluido en kit) y se centrifugó a 15000 rpm. (Eppendorf Centrifuge 5804R®, Rotor ML-154) durante tres minutos. Finalmente las columnas se colocaron en tubos Eppendorf estériles, se añadieron 75 µL de *buffer* de elución, se dejó incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto y se centrifugó a 15000 rpm. (Eppendorf Centrifuge 5804R®, Rotor ML-154) durante un minuto. Se repitió el ultimo paso para una recolección total de 150 µL de solución de DNA genómico. Se cuantificó la

concentración de DNA utilizando el equipo Synergy™HT (BioTek Instruments, Inc., Highland Park, Winooski, USA). Las muestras se almacenaron a 4° C.

### **3.7.2. Amplificación mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR)**

Se amplificó, mediante PCR de punto final, el gen *fenB* productor de fengicinas, para lo cual se usó el protocolo de amplificación optimizado por Yáñez-Mendizábal *et al* (2012c) para amplificación del gen *fenB* en *M. fructicola*. La secuencia usada para el *primer forward* fue CGACCGCCATGATATTTTCAGA y para el *primer reverse* fue CATTTCAAAGGTGACGGCGTCAAAGC. Los *primers* se diluyeron utilizando agua grado molecular y se almacenaron a una concentración 50 mM. Se hicieron alícuotas 10 mM de cada *primer* para su uso.

Para la reacción de PCR se usaron 5 µL de muestra de DNA, 1.25 U de Taq polimerasa (*Taq DNA recombinant, Life technologies*. Ref 11615-010), 1 µM de cada *primer* (3 µL de una solución 10 µM), 200 µM de solución de DNTPs (0.6 µL de una solución 10000 µM) 3 µL de *buffer* de reacción 10X y 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub> (0.9 µL de una solución 50 mM) para un volumen final de reacción de 30 µL.

Los ciclos de reacción tuvieron las siguientes condiciones: 94° C durante dos minutos seguido de 30 ciclos de 94° C por un minuto, 60° C por 1 minuto y 72° C por un minuto y una extensión final de 72° C durante ocho minutos.

Los resultados se observaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2%. Las muestras fueron teñidas utilizando *Sybr Green (Life Technologies)* añadido en un *buffer* de carga 1:9 v/v con azul de bromofenol y se observó en transiluminador.

## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Muestreo y aislamiento de antagonistas y patógenos

A partir de las muestras de suelo y material vegetal se aislaron once cepas de *Bacillus* spp.; ocho de la localidad de Salcedo y tres de Zumbahua (Tabla 1). No se logró aislar cepas de *Bacillus* spp. a partir de las muestras de suelo y material vegetal provenientes de la provincia de Chimborazo.

**Tabla 1.** Aislados de *Bacillus* spp. obtenidos a partir de muestras de suelo y material vegetal de diferentes localidades de Salcedo y Zumbahua.

	Localidad			
	Salcedo		Zumbahua	
<b>Código</b>	S1-1	S2-1	S3-5	Z1
	S1-2	S2-2	S3-6	Z2
	S1-3		S3-7	Z3

Las pruebas de tinción de Gram y tinción de endosporas corroboraron que las cepas aisladas fueron cultivos puros de *Bacillus* spp.

### 4.2. Pruebas de antagonismo *in vitro* de *Bacillus* spp.

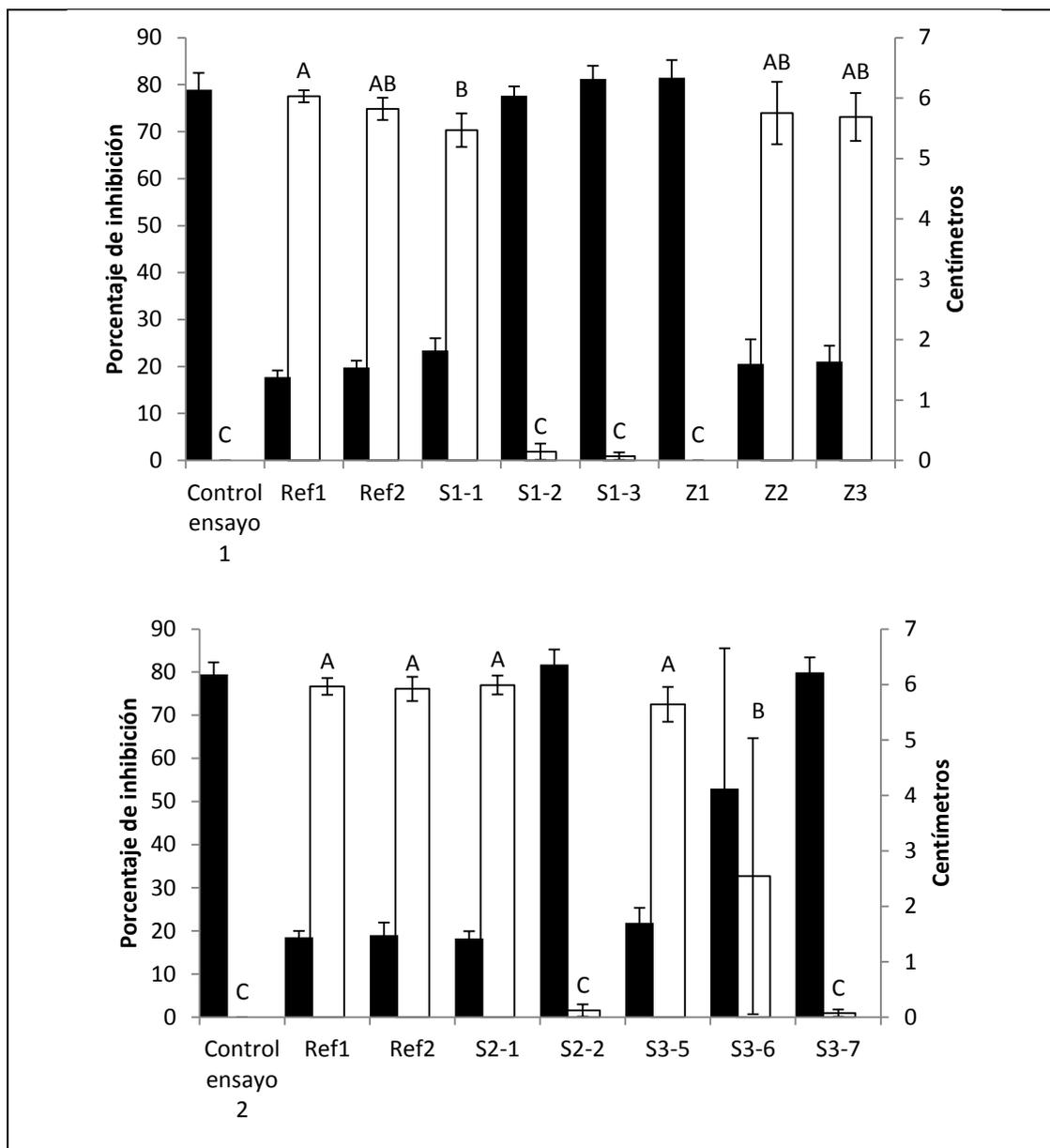
Las pruebas duales mostraron que las cepas Z2, Z3, S2-1 y S3-5 fueron efectivas en la inhibición del crecimiento micelial de *C. acutatum*. Los porcentajes de inhibición de estas cepas fueron similares a los que mostraron las cepas de referencia mostrando valores de inhibición promedio superiores al 70% (Anexo 12). Mediante la prueba de SNK ( $P < 0.05$ ) se determinó que estas cepas mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control sin tratar. En el análisis estadístico del primer ensayo, la separación de medias demostró que no existieron diferencias significativas entre las cepas Z2 y Z3 y la cepa de referencia 1, tampoco fueron significativamente diferentes a la cepa S1-1 y la cepa de referencia 2, siendo agrupadas por la letra B. Las cepas que fueron ordenadas en el grupo C no mostraron diferencias significativas con respecto al control por lo que se concluyó que no presentaron

efecto de inhibición (Figura 3). En este ensayo se seleccionaron las cepas del grupo A debido a que mostraron el mayor porcentaje de inhibición.

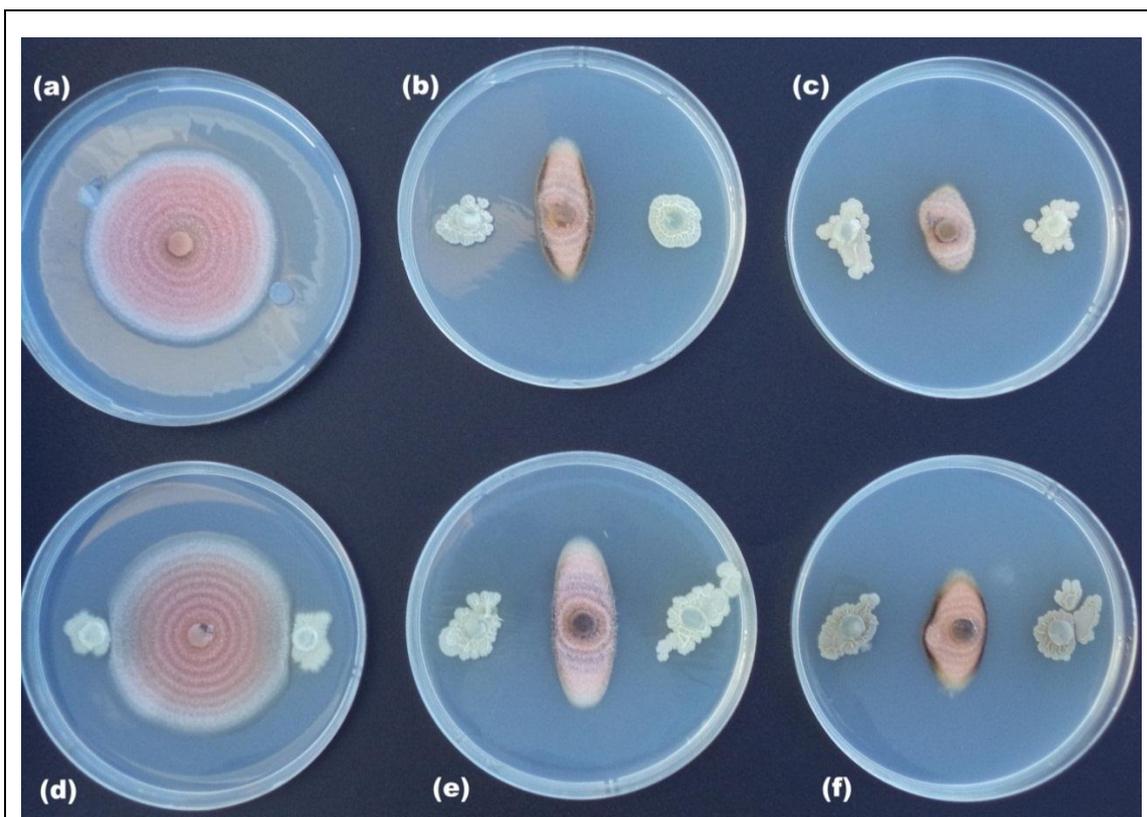
En el análisis estadístico del segundo ensayo se separaron en tres grupos significativamente diferentes. En el grupo A se incluyeron las cepas de referencia así como las cepas S2-1 y S3-5, en el grupo C las cepas S2-2, S3-7 y el control, mostrando que no hubo actividad inhibitoria mostrada por estas cepas. La cepa S3-6 fue significativamente diferente a todos los demás tratamientos. Sin embargo, se observó que su porcentaje de inhibición promedio fue menor a los observados en el grupo A, adicionalmente, se mostró una alta desviación estándar por lo cual se deduce que no hay consistencia en sus resultados. Las cepas del grupo A se seleccionaron como potenciales antagonistas. Los detalles de las pruebas estadísticas se resumen en el Anexo 8.

En la Figura 3 se evidencia la capacidad antagónica que estas cepas presentaron con respecto a los demás aislados de bacterias observándose marcadas diferencias de efecto inhibitorio. Como se muestra en la Figura 4 las cepas que presentaron una alta actividad antifúngica forman un halo de inhibición a su alrededor.

Es visible que los efectos antagónicos de las cepas Z2 y Z3 fueron comparables a los presentados por las cepas de referencia, sin embargo la cepa Z1 no tuvo una acción antifúngica y el crecimiento micelial de *C. acutatum* en este cultivo es similar al observado en el cultivo de control, como se corrobora en los datos cuantitativos de la Anexo 13.



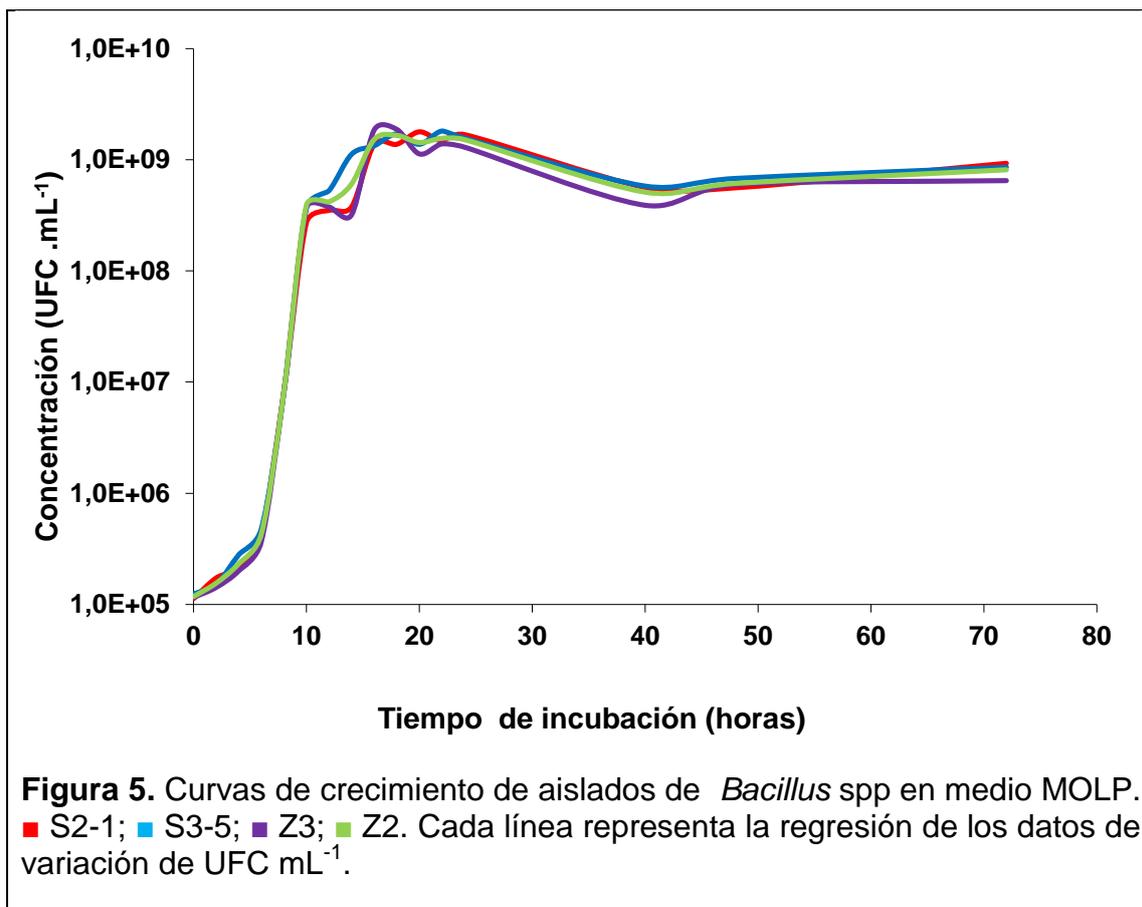
**Figura 3.** Inhibición del crecimiento micelial *in vitro* de *Colletotrichum acutatum* causado por diferentes aislados de *Bacillus* spp. (■) Diámetros promedio de crecimiento micelial de *C. acutatum* (cm). (□) Porcentajes de inhibición del crecimiento micelial. Los datos corresponden a la media de cinco repeticiones para cada tratamiento. Las barras con diferentes letras representan diferencias significativas de acuerdo a la prueba SNK ( $P < 0.05$ ).



**Figura 4.** Inhibición del crecimiento micelial *in vitro* de *Colletotrichum acutatum* en presencia de aislados de *Bacillus* spp. **(a)** Control sin inoculo bacteriano; **(b)** y **(c)** Cepas de referencia; **(d)**, **(e)** y **(f)** aislados Z1, Z2 y Z3 respectivamente.

#### 4.3. Parámetros de crecimiento de *Bacillus* spp.

Para la determinación de los parámetros de crecimiento se seleccionaron las cepas que mostraron mayor actividad antifúngica en los ensayos de actividad antifúngica. Las curvas de crecimiento se resumen en la Figura 5, donde se puede observar que el crecimiento de las cepas evaluadas (S2-1, S3-5, Z2 y Z3) fue similar. En todos los casos se observa que la etapa de crecimiento exponencial comienza aproximadamente a las 6 horas; entre las 10 y las 20 horas es donde mayor diferencia se observa entre las curvas, sin embargo, a partir de las 24 horas aproximadamente los cultivos entran en fase estacionaria y muestran de nuevamente una similitud entre sí a partir de esta etapa.



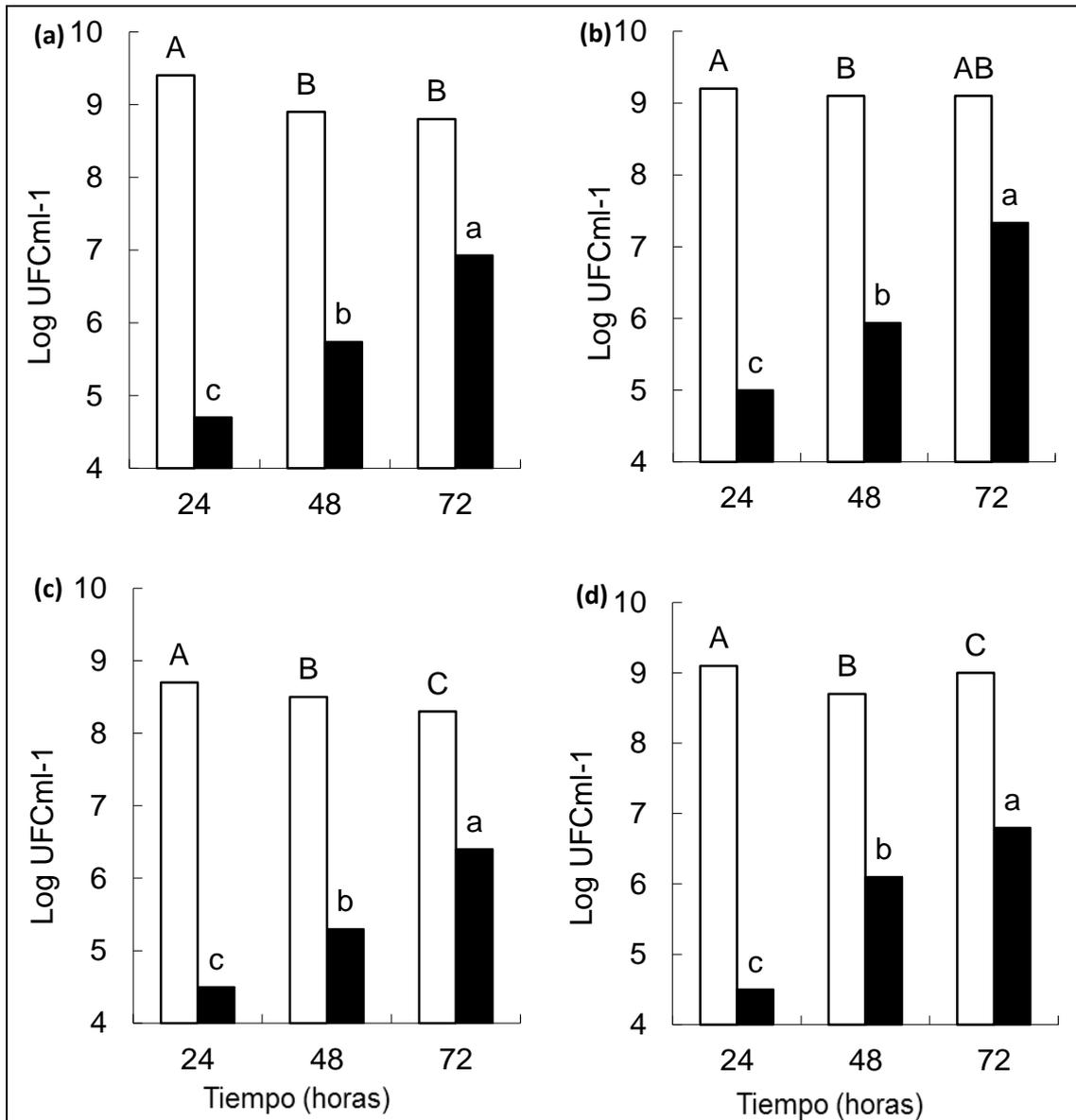
#### 4.4. Producción de endosporas de *Bacillus* spp.

Los ensayos mostraron que durante el crecimiento de los diferentes aislados en medio MOLP la concentración de viables (células vegetativas y endosporas) no varía en función del tiempo, manteniéndose en todos los tiempos alrededor de  $10^9$  UFC·mL<sup>-1</sup>. Respecto a las concentraciones de endosporas, en todas las cepas muestreadas se observó que éstas variaron en función de tiempo. Se observó que las máximas concentraciones de endosporas fueron a las 72 horas en las cuatro cepas evaluadas (Figura 6). Se evidenció una variación en la concentración de endosporas producidas por las cepas S2-1 y S3-5. Las cepas Z2 y Z3 mostraron una producción similar entre sí, menor a las otras dos cepas (Figura 6).

En el análisis estadístico mediante la prueba de SNK ( $P < 0.05$ ) se observó que existe una diferencia estadísticamente significativa en la producción de

endosporas con respecto al tiempo en todas las cepas. Se observa que el valor de las medias de la concentración de endosporas incrementó con respecto al paso del tiempo. En el caso de las cepas Z2 y Z3 hubo diferencias significativas en el valor de las medias de células vegetativas y endosporas a las 24, 48 y 72 horas. En la cepa S2-1 no hay diferencias significativas entre 48 y 72 horas y en la cepa S3-5 se observa que a las 72 horas no existe una variación significativa comparada con las medias a las 24 y 48 horas. Sin embargo, existe una diferencia estadísticamente significativa entre los valores de las 24 y de las 48 horas. Debido a que los valores de las células totales no tuvieron una tendencia clara de aumento o incremento en todos los tratamientos, se señala que no guardan una relación directa con respecto al paso del tiempo.

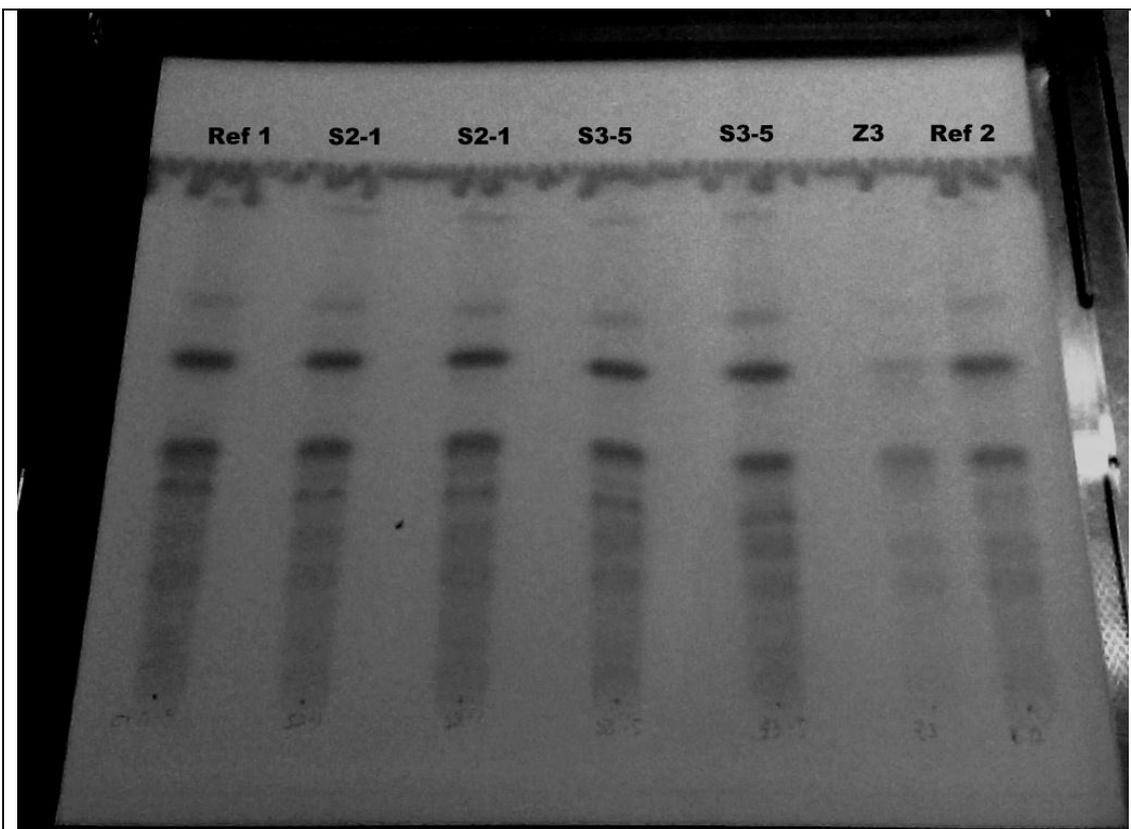
Los datos de producción de endosporas resultan importantes debido a que guardan una relación directamente proporcional a la producción de metabolitos secundarios, responsables de la actividad antifúngica de las bacterias (Jacques *et al*, 1999).



**Figura 6.** Producción de endosporas y células vegetativas de aislados de *Bacillus* spp. en medio MOLP. El medio MOLP fue diseñado por Jacques *et al.* 1997. □ Células vegetativas y endosporas; ■ Endosporas. **(a)** S2-1; **(b)** S3-5; **(c)** Z2; **(d)** Z3. Los datos corresponden a la media de tres repeticiones para cada tratamiento. Las barras con diferentes letras representan diferencias significativas de acuerdo a la prueba SNK ( $P < 0.05$ ).

#### 4.5. Cromatografía en capa fina (TLC)

En la TLC se observaron resultados óptimos de la separación de los lipopéptidos cargados (Figura 7) mostrando que los procesos de extracción de metabolitos fueron efectivos. La distancia total recorrida por la fase móvil fue de 17 cm.



**Figura 7.** Cromatograma en capa fina (TLC) de lipopéptidos extraídos de aislados de *B. subtilis*. La figura muestra los patrones de lipopéptidos para cada aislado bajo luz ultravioleta.

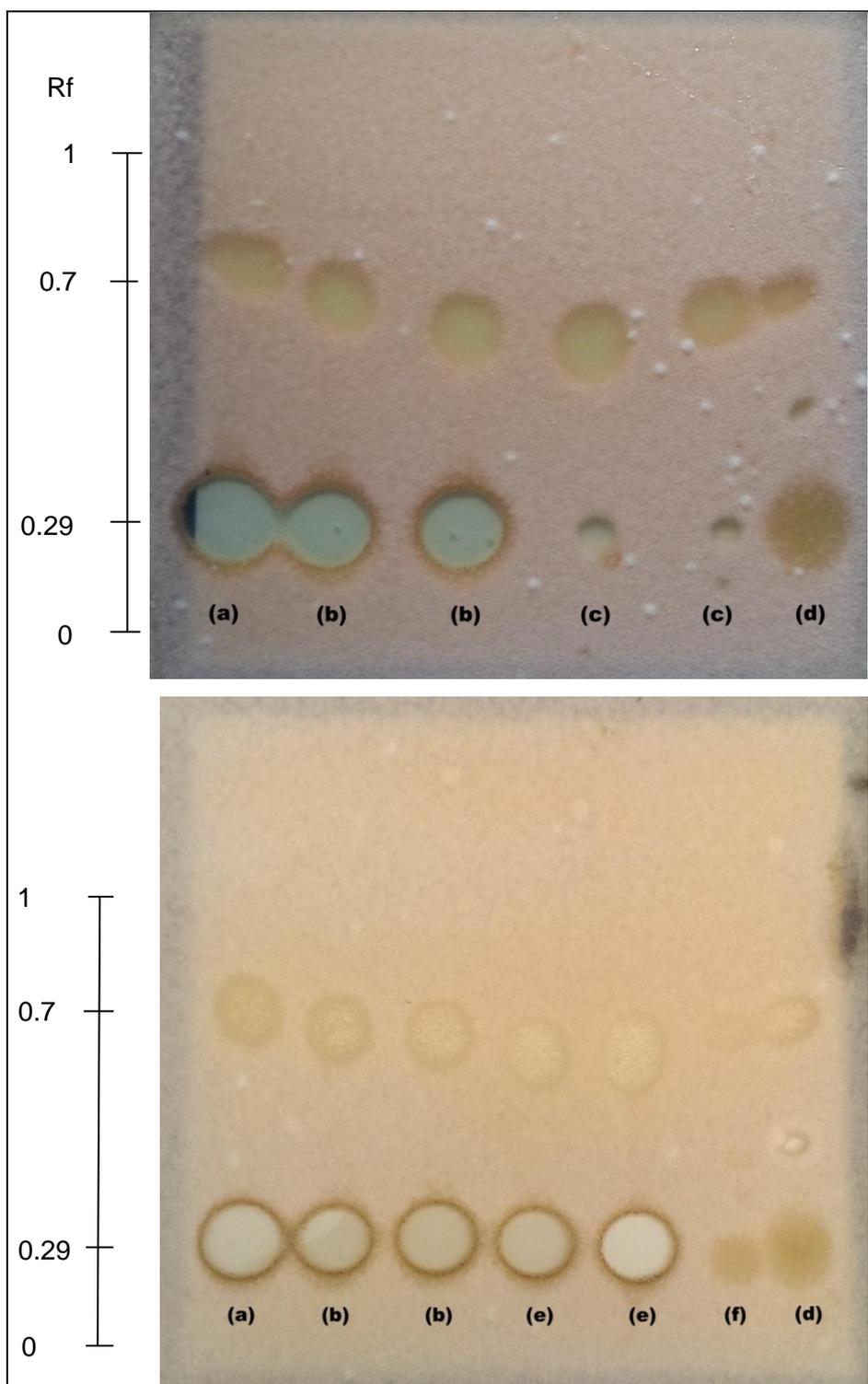
## 4.6. Caracterización del potencial antagónico

### 4.6.1. Ensayos de autobiografía

Los lipopéptidos extraídos a partir de los aislados que presentaron potencial antagónico en las pruebas duales resultaron efectivos en la inhibición del crecimiento micelial de *C. acutatum* en los ensayos de autobiografía. Los lipopéptidos de las cepas S2-1, S3-5 y Z3 presentaron un efecto inhibitorio superior al observado en los lipopéptidos de las cepas Z2 y S1-1. Adicionalmente se observó una diferencia de la capacidad antagónica de los lipopéptidos de las dos cepas de referencia (Figura 8).

Los datos de  $R_f$  de las zonas donde se presentó la mayor inhibición fueron de 0.29 a 0.28 lo cual indica que los compuestos de mayor actividad antifúngica correspondieron a la familia de las fengicinas, similar a los resultados reportados por Romero *et al* (2004) y Yáñez-Mendizábal *et al* (2012c). Se observó también una inhibición menos marcada en zonas de  $R_f$  0.61 a 0.7 los cuales corresponden a la familia de las iturinas A y bacidiomicina (Romero *et al*, 2004).

Estos resultados además se corresponden con obtenidos en los ensayos de formación de endosporas; se observa que los lipopéptidos extraídos de las cepas que presentaron una mayor producción de endosporas fueron los que mostraron una mayor actividad antifúngica ratificando lo concluido por Jacques *et al* (1999).



**Figura 8.** Análisis en Autobiografía de lipopéptidos extraídos de aislados de *B. subtilis* y su actividad antifúngica sobre *C. acutatum*. (a) Cepa de referencia (b) S2-1 (c) Z2 (d) Z3 (e) S3-5 (f) S1-1.

#### 4.6.2. Inhibición de germinación de conidias de *Colletotrichum acutatum*

Un primer ensayo de referencia usando solo controles mostró que 6 horas después de haber sido inoculadas las conidias de *C. acutatum*, el porcentaje de germinación fue superior al 80%. Por esta razón la germinación de conidias en presencia de los tratamientos también se midió en el mismo rango de tiempo. Los resultados de estos ensayos (Tabla 2) fueron, consistentes con los observados en las pruebas duales de inhibición del crecimiento micelial y las autobiografías, mostrando que la capacidad antagónica de estas cepas es eficaz en diferentes etapas de desarrollo del patógeno.

**Tabla 2.** Porcentaje de germinación de conidias de *C. acutatum* en presencia de cepas de *B. subtilis* con potencial antifúngico.

Germinación de conidias (%)					
	Control				
Horas	negativo	Ref.	S2-1	S3-5	Z3
2 horas	2.67	0.22	0.33	0.11	1.22
4 horas	38.44	10.22	10.11	6.22	19.56
6 horas	69.67	22.56	24.56	18.00	40.78
SNK	A	C	C	D	B

**Nota:** Los datos mostrados corresponden a las medias de los datos de porcentaje de germinación de conidias de nueve campos para cada tratamiento de cada hora. Se muestra los grupos obtenidos de la prueba de SNK ( $P < 0.05$ ) para los datos de las 6 horas.

La cepa S2-1 mostró un porcentaje de germinación similar al de la cepa de referencia. La cepa Z3, a pesar de mostrar un porcentaje de germinación mayor al de la cepa de referencia, mostró disminuir el porcentaje de germinación de conidias en todas las mediciones. La cepa S3-5 mostró el menor porcentaje de germinación, por debajo de la cepa de referencia, siendo la más efectiva en la inhibición de la germinación de conidias de *C. acutatum*. Esto se corroboró mediante la prueba estadística de SNK ( $P < 0.05$ ) en la cual se observa que no existe diferencias significativas entre los porcentajes de germinación de la cepa S2-1 y la cepa de referencia (grupo B) pero si hubo una diferencia significativa en el porcentaje de S3-5 con respecto a los demás

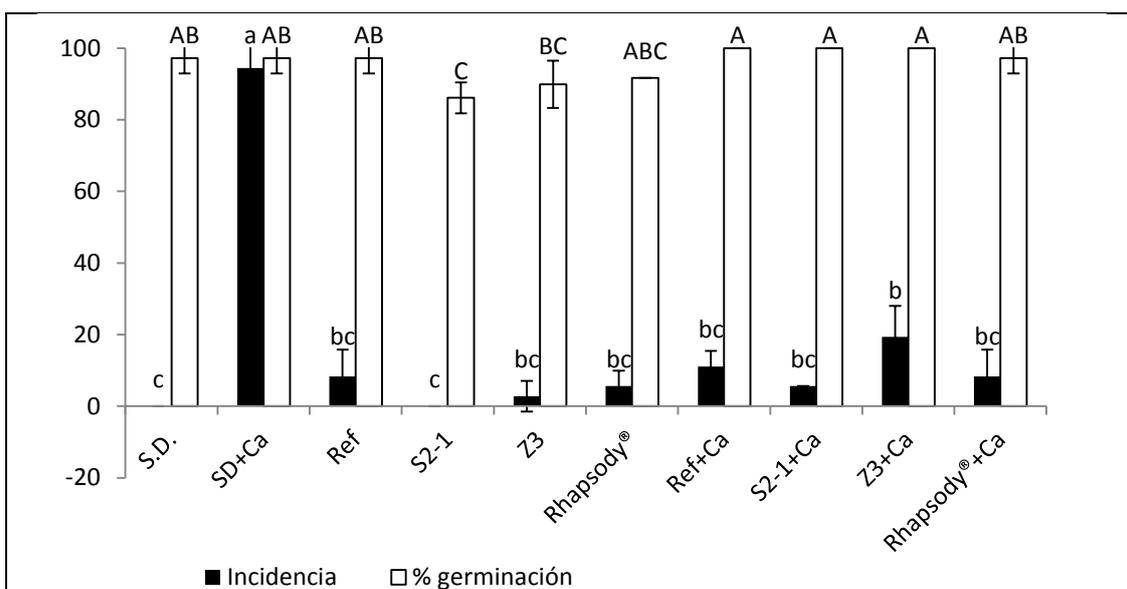
tratamientos, mostrando los menores valores de porcentaje de germinación y por tanto, la mayor efectividad de inhibición de la germinación de conidias. También se comprobó que existió una diferencia estadística significativa de la cepa Z3 presentando un porcentaje de germinación menor al del control pero mayor al del grupo B (Tabla 2). La prueba estadística se detalla en el Anexo 10. Se observó que en las mediciones de las dos horas no hubo diferencias significativas entre los tratamientos. A las cuatro horas se formaron dos grupos de tratamientos siendo un grupo formado solamente por la cepa Z3 y otro grupo formado por los demás tratamientos y la cepa de referencia.

#### **4.6.3. Pruebas de efectividad *in vivo* de aislados de *B. subtilis***

Los ensayos de efectividad con inoculaciones artificiales de *C. acutatum* mostraron resultados acordes a los observados en las pruebas *in vitro*, observándose que los aislados de *Bacillus subtilis* fueron efectivos en el control de las infecciones causadas por *C. acutatum* y no afectaron a la germinación de las semillas. El análisis estadístico corroboró una diferencia significativa de los porcentajes de germinación y de incidencia entre las semillas infectadas artificialmente del control sin tratar y las que fueron inoculadas con los diferentes tratamientos de *B. subtilis*. También se comprobó que las semillas control inoculadas artificialmente con *C. acutatum* comparadas con las semillas desinfectadas y las tratadas solamente con las bacterias mostraron un valor de incidencia significativamente superior al del resto del ensayo. Tanto la semilla desinfectada sin inóculo como la semilla desinfectada inoculada con la cepa S2-1 mostraron una incidencia del 0%; Las incidencias de todos los tratamientos excepto Z3 no mostraron diferencias significativas entre sí. La cepa Z3 mostró una menor actividad antifúngica siendo la de mayor incidencia al inocularse con *C. acutatum*. Además se pudo comprobar que no existió una diferencia significativa entre el porcentaje de germinación de la semilla desinfectada sin inóculo de patógeno y las semillas inoculadas solamente con aislados de *B. subtilis*, demostrando que estas bacterias no tienen efectos contraproducentes en las semillas de *L. mutabilis* (Anexo 15).

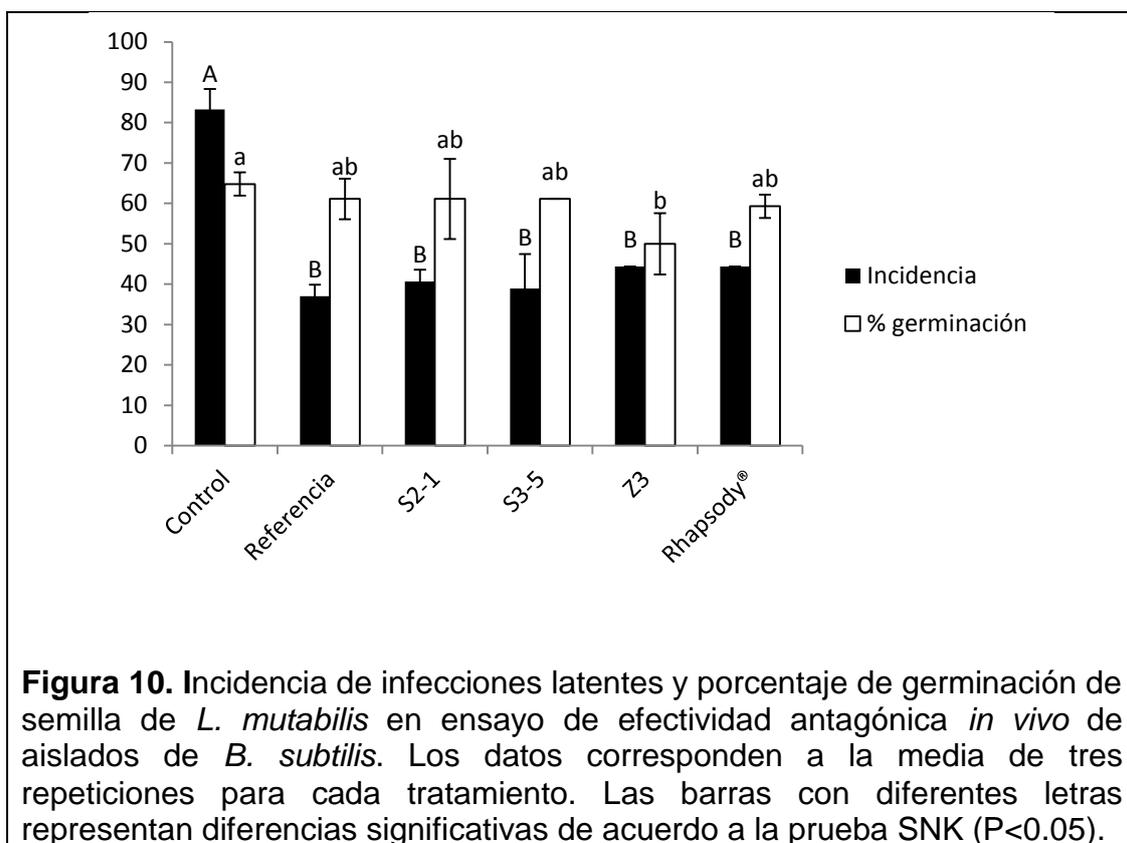
Como se muestra en la Figura 9, la cepa S2-1 presentó la mayor efectividad en el control de las infecciones por *C. acutatum* en semilla de *L. mutabilis*, mostrando una actividad antagónica superior a las obtenidas por cepa de referencia y el producto comercial Rhapsody®.

En los ensayos de efectividad de aislados de *B. subtilis* sobre infecciones latentes de semillas, no se observó una diferencia significativa de los porcentajes de germinación entre los diferentes tratamientos. Solamente se observó valores estadísticamente diferentes entre el control y la cepa Z3 la cual tuvo el porcentaje de germinación de semilla más bajo. Se observó una disminución significativa de la incidencia de infecciones latentes en las semillas inoculadas con los aislados de *Bacillus subtilis* con respecto al control (Figura 10), sin diferencias significativas entre las diferentes cepas aisladas, el producto comercial Rhapsody® y la cepa de referencia (Anexo 15).



**Figura 9.** Porcentajes de incidencia de *C. acutatum* y germinación de semilla de *L. mutabilis* en ensayo de efectividad antagónica *in vivo* de *B. subtilis* con infecciones artificiales.

S.D. representa la abreviatura de “semilla desinfectada” la cual se usó como control en el ensayo. Ref representa a la cepa de *Bacillus subtilis* de referencia. Los datos corresponden a la media de tres repeticiones para cada tratamiento. Las barras con diferentes letras representan diferencias significativas de acuerdo a la prueba SNK ( $P < 0.05$ ).



A pesar de que la actividad antifúngica fue menor a la observada en los anteriores ensayos, los resultados observados demuestran que los aislados de *B. subtilis* tienen potencial antagonico sobre otros patógenos que atacan a *Lupinus mutabilis*.

#### 4.7. Pruebas de identificación bioquímica

Los resultados de las pruebas bioquímicas se resumen en la Tabla 3, en la cual se puede observar las pruebas de caracterización bioquímica de Bergey (2005) para la identificación de *Bacillus subtilis*.

Se identificó a todas las cepas aisladas, con potencial antagonico como *Bacillus subtilis*. Se corroboró los resultados comparándolos con la cepa de referencia, identificada previamente como *Bacillus subtilis* (Yáñez-Mendizábal *et al*, 2012c).

**Tabla 3.** Pruebas bioquímicas y morfológicas para identificación de *Bacillus subtilis*.

Cepa	Gram	Forma	Endosporas	Anaerobio		V.P.	Diámetro	
				estricto	Almidón		celular	Citrato
Ref.	+	Bacilo	+	-	+	+	<1 µm	+
S2-1	+	Bacilo	+	-	+	+	<1 µm	+
S3-5	+	Bacilo	+	-	+	+	<1 µm	+
Z3	+	Bacilo	+	-	+	+	<1 µm	+

**Nota:** Las pruebas se realizaron según la sistemática de Bergey (2005) con aislados de *Bacillus* spp. y cepa de referencia.

#### 4.8. Pruebas moleculares

##### 4.8.1. Extracción de DNA

Los datos cuantificados de concentración y pureza de material genético extraído de los aislados de *B. subtilis* con potencial antagónico se muestran en la Tabla 4.

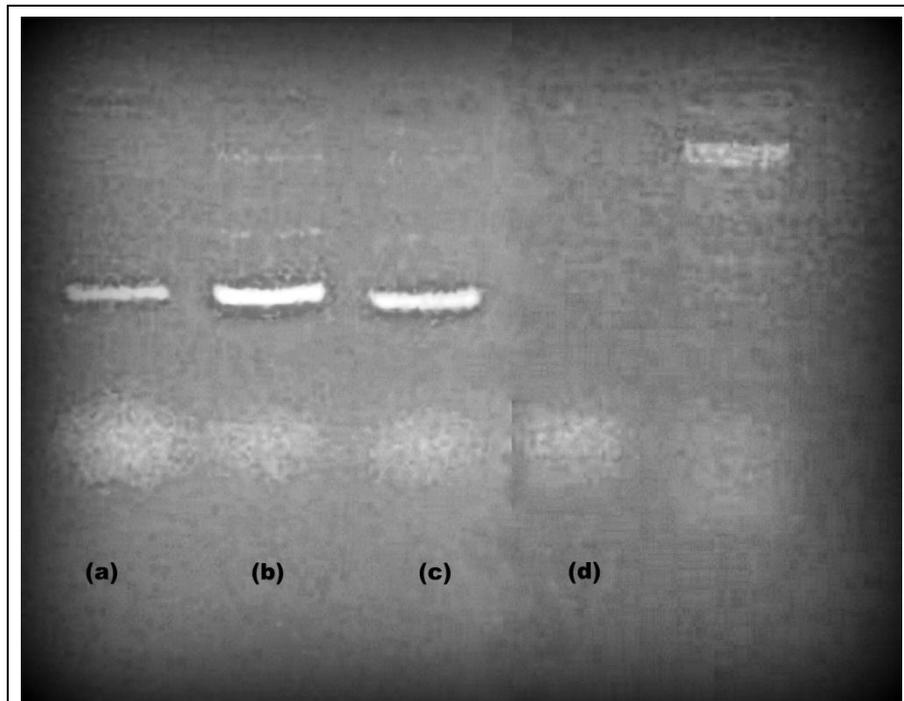
**Tabla 4.** Concentración de DNA y coeficiente 260/280 del material genético extraído de cepas de *B. subtilis*.

Muestra	Concentración	
	(ng·µL <sup>-1</sup> )	260/280
Referencia	43.16	1.809
S2-1	32.9	1.857
S3-5	51.6	1.9
Z3	12.8	1.67

La concentración de material genético de la cepa Z3 fue baja, probablemente debido a que en su cultivo produce metabolitos que forman un *film* en las colonias, el cual probablemente haya interferido en el proceso de lisis, necesario para la extracción de DNA. Los coeficientes 260/280 de todas las muestras fueron aceptables para su uso en pruebas de PCR.

#### 4.8.2. Pruebas de PCR

Mediante la reacción de PCR se observó que las cepas S2-1 y S3-5 mostraron una amplificación del gen *fenB*, al igual que la cepa de referencia. La cepa Z3 no mostró amplificación para este gen (Figura 11).



**Figura 11.** Gel de electroforesis de la reacción de amplificación por PCR del gen *fenB* (~1481 bp) con muestras de *B. subtilis*. **(a)** Cepa de referencia, **(b)** S2-1, **(c)** S3-5, **(d)** Z3. A la derecha de las muestras se observan las bandas del marcador de peso molecular.

## 5. Conclusiones

Se lograron aislar cepas de bacterias del género *Bacillus* spp. de las localidades de Salcedo y Zumbahua.

Las cepas S2-1 y S3-5 presentaron los niveles más altos de actividad antifúngica en todos los ensayos, *in vitro* e *in vivo*, comprobando ser efectivas en el control biológico de *Colletotrichum acutatum*.

Se observó que existió una relación directamente proporcional entre la producción de metabolitos secundario y la producción de endosporas

Se identificó a las cepas con potencial antagonista contra *C. acutatum* como bacterias de la especie *Bacillus subtilis*.

Los compuestos de mayor actividad antifúngica fueron los lipopéptidos de la familia de las fengicinas y en menor proporción la familia de las iturinas.

Se comprobó que las cepas con mayor actividad antifúngica presentaron una amplificación positiva del gen *fenB*.

Este trabajo constituye un reporte inédito del potencial de *Bacillus subtilis* y sus metabolitos bioactivos para el control de la antracnosis del chocho causada por *Colletotrichum acutatum*.

## **6. Recomendaciones**

En base a los resultados obtenidos en los ensayos de efectividad en semillas con infecciones latentes es recomendable evaluar la actividad antifúngica de las cepas seleccionadas con potencial antagónico en otros patógenos fungosos.

En base a los resultados obtenidos en el análisis de autobiografía y biología molecular se recomienda realizar estudios más profundos de caracterización de los isómeros de fengicinas, iturinas y basidiomicina mediante pruebas de HPLC y ensayos moleculares para genes de las diferentes familias de lipopéptidos, así como probar métodos más específicos de caracterización química de los compuestos obtenidos.

Es recomendable evaluar el control biológico de las cepas con potencial antagónico en ensayos de campo.

La optimización de la producción de biomasa y metabolitos secundarios de los aislados de mayor actividad antifúngica es importante para el uso de las bacterias a nivel agrícola.

## REFERENCIAS

- Aftab, M., Freeman, A., Bretag, T. (2008). *Seed Health Testing in Pulse Crops, Agriculture Notes. Department of Primary Industries, Victoria, Australia.* p 4.
- Álvarez, B. y Torés, J. (1997). *Cultivo in vitro de Sphaerotheca fuliginea (Schlecht, ex Fr.), efecto de diferentes fuentes de carbono sobre su desarrollo.* 23: 283-288.
- Baranyi, J. y Roberts, T. (1994). *A dynamic approach to predicting the bacterial growth in food.* *Int. J. Food Microbiol.* 23(3-4), 277-294.
- Caicedo, C. y Peralta, E. (2000). *Zonificación potencial, sistemas de producción y procesamiento artesanal del chocho (Lupinus mutabilis Sweet) en Ecuador.* Estación Experimental Santa Catalina INIAP, Boletín Técnico No. 89. 38p.
- Caicedo, C. y Peralta, E. (2001). *El cultivo de chocho Lupinus mutabilis Sweet: fitonutrición, enfermedades y plagas, en el Ecuador.* Estación Experimental Santa Catalina INIAP, Boletín Técnico No. 103.
- Caicedo, C., Peralta, E., Murillo, A., Rivera, M., Pinzón, J. (2010). *INIAP 450 Andino, Variedad de chocho (Lupinus mutabilis Sweet). Plegable divulgativo No. 169.* Programa Nacional de Leguminosas y Granos Andinos. Estación Experimental Santa Catalina.
- Calvo, J.,-Rivera, J., Orozco, S., Orozco,-R. (2012). *Aislamiento y evaluación in vitro de antagonistas de Botrytis cinerea en mora.* *Agronomía mesoamericana* 23(2):225-231. 2012. Issn: 1021-7444.
- Cano, I. y Acosta, T. (2009). *“Plan de negocios para la creación de una empresa productora de cevichocho industrial para su comercialización por medio de las principales cadenas de supermercados del norte de Quito”.* Universidad Técnica Particular de Loja. Quito, Ecuador.
- Cannon, P., Damm, U., Johnston, P. y Weir, B. (2012). *Colletotrichum – current status and future directions.* *Studies in Mycology* 73: 181–213.
- Chen, H., Wang, L., Su, C., Gong, G., Wang, P., Yu, A. (2008). *Isolation and characterization of lipopeptide antibiotics produced by Bacillus subtilis.* *Lett. Appl. Microbiol.* 47, 180–186.

- Cowling, W., Huyghe, C., Swiecicki, W. (1998). *Lupine Breeding*. In: Gladstones J.S., Atkins C., and Hamblin J. (Eds), *Lupines as crop plants: Biology, production and utilization*. CAB International, UK., p 93-120.
- Damm, U., Cannon, P., Woudenberg, J., Crous, P. (2012). *The Colletotrichum acutatum species complex*. *Studies in Mycology* 73: 37–113. doi:10.3114.
- Dean, R., Van Kan, J., Pretorius, Z., Hammond-Kosack, K., Di Pietro, A. (2012). *The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology*. *Molecular Plant Pathology* 13: 414–430.
- Falconí, C. (2012). *Lupinus mutabilis in Ecuador with special emphasis on anthracnose resistance*. PhD. Thesis. Wageningen University. The Netherlands. 150 p.
- Falconí, C., Visser, R., Heusden, S. (2015). *Influence of plant growth stage on resistance to anthracnose in Andean lupin (Lupinus mutabilis)*. *Crop & Pasture Science*. doi:10.1071/CP14104.
- Fontarani, G., Batistuti, J., da Cruz, R., Nascimento, P. y Gomes, J.(2011). *Cholesterol-lowering effect of whole lupin (Lupinus albus) seed and its protein isolate*. *Food Chemistry* 132 (2012) 1521–1526.
- Fornasini, M., Castro, J., Villacrés, E., Narváez L., Villamar, M., y Baldeón, M. (2012). *Hypoglycemic effect of Lupinus mutabilis in healthy volunteers and subjects with dysglycemia*. DOI:10.3305/nh.2012.27.2.5412.
- Fravel, D. (2005). *Commercialization and implementation of biocontrol*. *Annual Review of Phytopathology* 43, 337–359.
- Garrity, G., Krieg D., Noel R., Staley N., James R. (Eds.). (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2: The Proteobacteria*. ISBN: 978-0-387-95042-6
- Guzmán, M. (2006). *Cultivo del Tarwi o Chocho (Lupinus mutabilis Sweet)*. Perú. Ministerio de Agricultura
- Hardy, A. y Huyghe, C. (1997). *Physiological bases of the poor adaptation of current Lupinus mutabilis genotypes to European conditions*. *Grain Legumes* 15: 9-10.

- Hondelmann, W. (1984). *The Lupine – An ancient and modern crop plant. Theor. Appl. Genet.* 68: 1-9.
- INIAP (2001). *Poscosecha y Mercado de chocho (Lupinus mutabilis Sweet) en Ecuador, Programa de Leguminosas y Granos Andinos*. Publicación Miscelánea No. 105, Quito, Ecuador. Estación Experimental Santa Catalina., p 55.
- Insuati, M. (2001). *Enfermedades foliares. En: El cultivo del chocho Lupinus mutabilis Sweet Fitonutricion, enfermedades y plagas en el Ecuador*. Peralta, E. y Caicedo, C. (Edit). Boletín Técnico No. 103. INIAP, p. 24-25.
- Jacobsen, S., Sherwood, S. (2002). *Cultivo de granos andinos en Ecuador: Informe sobre los rubros quinua, chocho y amaranto*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), Centro Internacional de la Papa (CIP) y Catholic Relief Services (CRS), Editorial Abya-Yala. Ecuador, p 34.
- Jacques, P., Hbid, C., Destain, J., Razafindralambo, H., Paquot, M., De Pauw, E., Thonart, P. (1999). *Optimization of biosurfactant lipopeptide production from Bacillus subtilis S499 by Plackett-Burman design. Applied Biochemistry and Biotechnology* 77, 223–233.
- Junovich, A. (2003). *El cultivo de chocho a través de los datos del III Censo Nacional Agropecuario*. Proyecto SICA-Banco Mundial. Recuperado el 7 de septiembre del 2011 de: <http://www.sica.gov.ec/censo/contenido/chocho.pdf>.
- Koch, R. (1891). *Über bakteriologische Forschung Verhandlung des X Internationalen Medicinischen Congresses, Berlin, 1890, Hirschwald, Xth International Congress of Medicine, Berlin*. Berlín, Alemania.
- Kurlovich, B., Kartuzova, L. (2002). *Lupine breeding. En: Kurlovich B.S. (Ed). Lupines: Geography, Classification, Genetic Resources and Breeding. St. Petersburg*, p. 351- 374.
- Lara, K., Peralta, E., Villacres, E. (2000). *Mejor alimentación, mejor nutrición, recetas con leguminosas*. Programa Nacional de Leguminosas, E.E. Santa Catalina. 135p.

- Lindhout, P., Danial, D., Parlevliet, J. (2007). *Introduction: focusing on breeding for durable disease resistance of the Andean highland food crops. Euphytica* 153: 283-285.
- Melnick, R., Suárez, C., Bailey, B., Backman, P. (2011). *Isolation of endophytic endospore-forming bacteria from Theobroma cacao as potential biological control agents of cacao diseases. Biological Control* 57 (2011) 236–245.
- Moreira, R., Nunes, C., May De Mio, L. (2014). *Bacillus spp. and Pseudomonas putida as inhibitors of the Colletotrichum acutatum group and potential to control Glomerella leaf spot. Biological Control* 72 (2014) 30–37. doi: 1049-9644.
- Murillo, A., Rivera, M., Peralta, E., Mazon, N., Vargas, F. (2006). *Avances preliminares en el mejoramiento genético del chocho (Lupinus mutabilis Sweet) para resistencia a antracnosis. INIAP, Ecuador. Memorias del XII Congreso Internacional de cultivos andinos, 23 -27 Julio. p26.*
- Ongena, M., Henry, G., Thonart, P. (2009). *The roles of cyclic lipopeptides in the biocontrol activity of Bacillus subtilis. En: Gisi, U., Chet, L., Gullino, M.L. Recent Developments in Management of Plant Diseases, Plant Pathology in the 21st Century Springer Verlag. Berlin, pp. 59–69.*
- Peralta, E. (2007). *Evaluación de cinco productos para desinfección de semilla de chocho. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Quito (Ecuador). Estación Experimental Santa Catalina. Programa Nacional de Leguminosas Informe Técnico Anual – INIAP. Ecuador.*
- Peralta, E., Mazón, N., Villacrés, E., Taípe, J., Olmos, W. (2006). *Sustainable production systems for guaranteeing food security in poor communities of the Province of Cotopaxi, Ecuador. Year 1 progress report (May 2005 - April 2006), 30p.*
- Peralta, E., Mazón, N., Murillo, A., Rivera, M., Rodríguez, D., Lomas, L., Monar, C. (2012). *Manual agrícola de granos andinos: chocho, quinua, amaranto y ataco. Cultivos, variedades y costos de producción. Publicación Miscelánea No. 69, Programa Nacional de Leguminosas y*

- Granos Andinos. Estación Experimental Santa Catalina. INIAP, Quito – Ecuador.
- Pfeiffer, WH. y McClafferty M (2007) *HarvestPlus: breeding crops for better nutrition. Crop Science 47 (S3) S88-S105.*
- Popenoe, H., King, S., León, J., Kalinowski, L. (1989). *Lost crops of the Incas. National Academy Press, Washington, EU. p 415.*
- Razafindralambo, H., Paquot, M., Hbid, C., Jacques, P., Destain, J., Thonart, P. (1993). *Purification of antifungal lipopeptides by reversed-phase high performance liquid chromatography. Journal of Chromatography, 639, 81–85.*
- Reyes, A., Cristóbal J., Ruiz, E., Tun J. (2012). *Inhibición del crecimiento in vitro de Fusarium sp. aislado de chile habanero (Capsicum chinensis) con hongos antagonistas.* Fitosanidad, vol. 16, núm. 3, pp. 161-165 Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. La Habana, Cuba.
- Romero, D, de Vicente, A, Rakotoaly, R, Dufour, S, Veening, J, Arrebola, E, Cazorla, F, Kuipers, O, Paquot, M, Pérez-García, A. (2004). *The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of Bacillus subtilis toward Podosphaera fusca. Mol. Plant Microbe Interact. ;13:430–440. doi: 10.1094/MPMI-20-4-0430.*
- Ruiz de Escudero, I., Ibáñez, I., Padilla, M., Carnero A., Caballero P. (2004). *Aislamiento y caracterización de nuevas cepas de Bacillus thuringiensis procedentes de muestras de tierra de Canarias.* Bol. San. Veg. Plagas, 30: 703-712.
- Schoeneberger, H., Gross, R., Cremer, H., Elmadfa, I. (1982). *Composition and Protein Quality of Lupinus mutabilis. The Journal of Nutrition 112: 70-76.*
- Simmonds JH (1965). *A study of the species of Colletotrichum causing ripe fruit rots in Queensland. Queensland Journal of Agricultural and Animal Science 22: 437–459.*
- Tapia, M. (1990). *Cultivos andinos subexplotados y su aporte a la alimentación.* FAO. Santiago de Chile.

- Tejera, B., Heydrich, M., Rojas, M. (2012). *Antagonismo de Bacillus spp. frente a hongos fitopatógenos del cultivo del arroz (Oryza sativa L.)*. Rev. Protección Veg. Vol. 27 No. 2: 117-122.
- Thomas, G. (2003). *Lupine anthracnose – identification and management*. Government of Western Australia Department of Agriculture, Farmnote No. 15, Recuperado el 15 de septiembre del 2011 de: <http://www.agric.wa.gov.au>.
- Torés, A., y Alvarez, B. (1997). *Cultivo in vitro de Sphaerotheca fuliginea (Schlecht. ex Fr.), efecto de diferentes fuentes de carbono sobre su desarrollo*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación: Centro de Publicaciones Agrarias, Pesqueras y Alimentarias.
- Vigidal-Filho, P., Goncalves-Vigidal, M., Kelly, J., Kirk, W. (2007). *Sources of resistance to anthracnose in traditional common bean cultivars from Parana – Brazil*. J. Phytopathology 155: 108-113.
- Yáñez-Mendizábal, V. Falconí C. (2007). *Validación de biopesticidas para el control de la moniliasis y manejo sostenible del cacao fino de aroma en el Ecuador*. Señal, Quito, Ecuador. p. 37–50.
- Yáñez–Mendizábal, V., Usall, J., Viñas, I., Casals, C., Marín, S., Solsona, C., Teixidó, N. (2011). *Potential of a new strain of Bacillus subtilis CPA–8 to control the major postharvest diseases of fruit*. Biocontrol Science and Technology, 21: 409–426
- Yáñez–Mendizábal, V., Viñas, I., Usall, J., Torres, R., Abadías, M., Solsona, C., Teixidó, N. (2012a). *Formulation development of the biocontrol agent Bacillus subtilis CPA–8 by spray–drying*. J. Appl. Microbiol. 112: 954–965.
- Yáñez–Mendizábal, V., Viñas, I., Usall, J., Torres, R., Solsona, C., Teixidó, N. (2012b). *Production of the postharvest biocontrol agent Bacillus subtilis CPA–8 using low cost commercial products and by–products*. Biological Control, 60: 280–289.
- Yáñez–Mendizábal, V., Zerriouh, H., Viñas, I., Torres, R., Usall, J., de Vicente, A., Pérez–García, A., Teixidó, N. (2012c). *Biological control of peach brown rot (Monilinia spp.) by Bacillus subtilis CPA–8 is based on*

*production of fengycin-like lipopeptides. European Journal of Plant Pathology* 132: 609–619.

- Yáñez-Mendizábal, V., Viñas, I., Usall, J., Cañamás, T., Teixidó, N. (2012d). *Endospore production allows using spray-drying as a possible formulation system of the biocontrol agent Bacillus subtilis CPA-8. 34:729–735.*
- Yang, H. y Sweetingham, M. (1998). *The taxonomy of Colletotrichum isolates associated with lupine anthracnose. Aust. J. Agric. Res* 49:1213-1223.

## **ANEXOS**

Anexo 1

Ejemplo de resultados de pruebas Microgen GN-ID panel

**GN-ID A+B PANEL**  
**REPORT FORM**

2

Lab. No. \_\_\_\_\_ Specimen Type: 52-1  
Date: 04/03/2015

Well Number	GN A wells												GN B wells															
	Oxidase	Motility	Nitrate	Lysine	Ornithine	H <sub>2</sub> S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	(VP)	Citrate	TDA	Gelatin	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Flatinose	Salicin	Arginine	
Reaction	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reaction Index	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	
Sum of Positive Reactions																												

Octal Code: \_\_\_\_\_ Final Identification: \_\_\_\_\_

WF6125/08/03

**GN-ID A+B PANEL**  
**REPORT FORM**

2

Lab. No. \_\_\_\_\_ Specimen Type: S3-5  
Date: 09/03/2015

Well Number	GN A wells												GN B wells															
	Oxidase	Motility	Nitrate	Lysine	Ornithine	H <sub>2</sub> S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	(VP)	Citrate	TDA	Gelatin	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Flatinose	Salicin	Arginine	
Reaction	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Reaction Index	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	
Sum of Positive Reactions																												

Octal Code: \_\_\_\_\_ Final Identification: \_\_\_\_\_

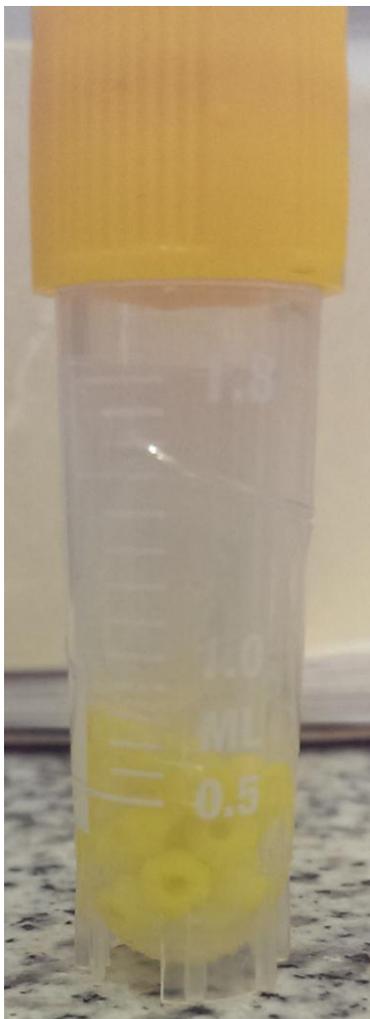
WF6125/08/03

ALM100N/AULSA (H2O) +  $\phi$  celula z10um.  
EM0032025 +

## Anexo 2

### Procedimiento de replicación rutinaria de aislados de *Bacillus* spp.



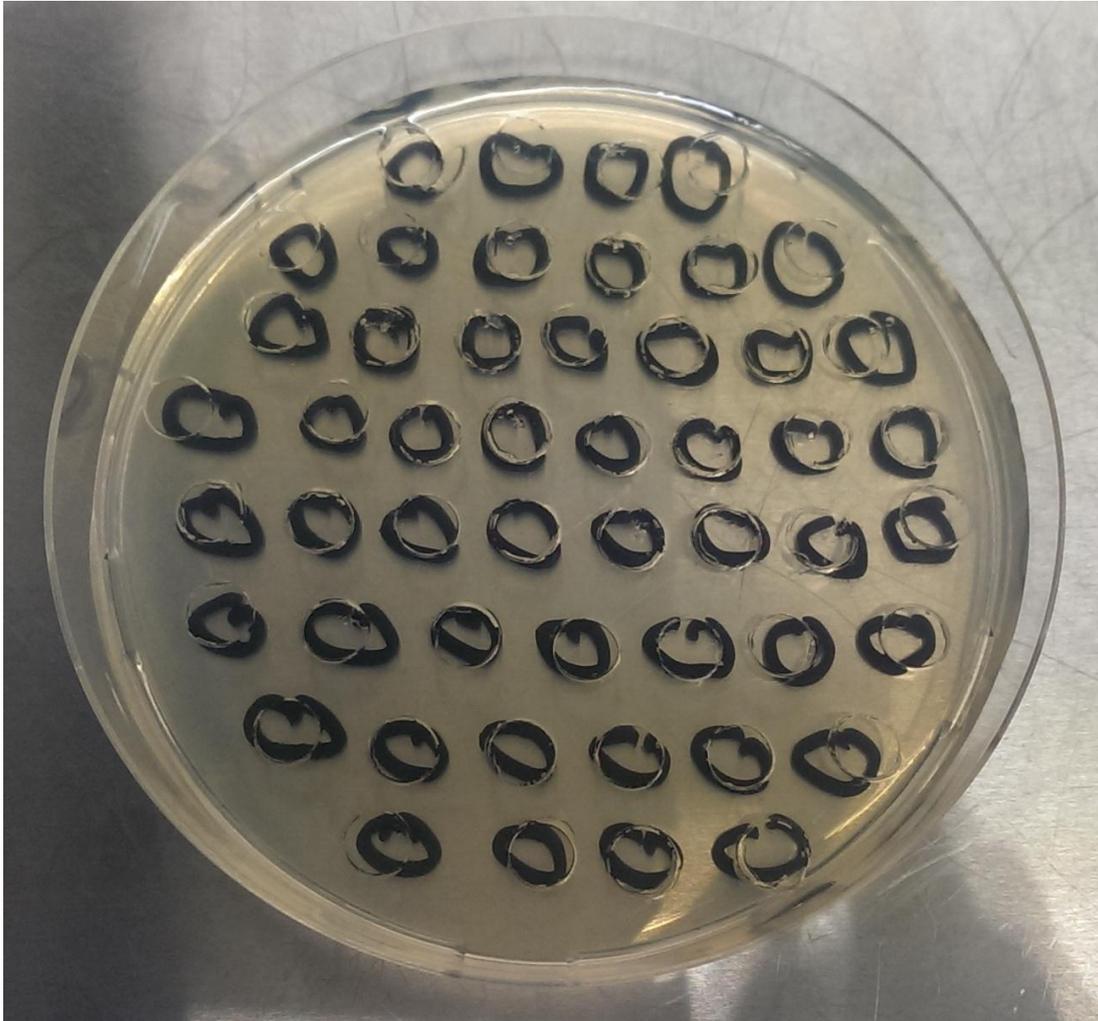
**Anexo 3****Criobolas para conservación de microorganismos en congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$ .**

## Anexo 4

### Procedimiento de extracción de lipopéptidos utilizando columna *Mega Bond Elut C<sub>18</sub>*



**Anexo 5****Preparación de pruebas duales de antagonismo *in vitro***

**Anexo 6****Marcas de puntos de inoculación de ensayos de inhibición de germinación de conidias de *C. acutatum***

## Anexo 7

## Manual de extracción de material genético de bacterias Gram positivas mediante kit PureLink®

### Preparing Lysates–Mini Kit, Continued

#### Gram Negative Bacterial Cell Lysate

---

Use the following protocol to prepare Gram negative bacterial cell lysate.

1. Set a water bath or heat block at 55°C.
2. Harvest up to  $2 \times 10^9$  Gram negative (~1 mL of overnight *E. coli* culture) by centrifugation. If you are using a frozen cell pellet, proceed to Step 3.
3. Resuspend the cell pellet in 180  $\mu$ L PureLink® Genomic Digestion Buffer. Add 20  $\mu$ L Proteinase K (supplied with the kit) to lyse the cells. Mix well by brief vortexing.
4. Incubate the tube at 55°C with occasional vortexing until lysis is complete (30 minutes to up to 4 hours).
5. Add 20  $\mu$ L RNase A (supplied with the kit) to the lysate, mix well by brief vortexing, and incubate at room temperature for 2 minutes.
6. Add 200  $\mu$ L PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer and mix well by vortexing to obtain a homogenous solution.
7. Add 200  $\mu$ L 96–100% ethanol to the lysate. Mix well by vortexing for 5 seconds to yield a homogenous solution.

**Note:** When processing multiple samples, you may prepare a master Buffer/ethanol Mix by mixing 200  $\mu$ L Lysis/Binding Buffer and 200  $\mu$ L 96–100% ethanol for each sample.

8. Proceed to **Binding DNA** (page 23).
- 

#### Gram Positive Bacterial Cell Lysate

Use the following protocol to prepare Gram positive bacterial cell lysate.

1. Set two water baths or heat blocks at 37°C and 55°C, respectively.
  2. Prepare Lysozyme Digestion Buffer (see recipe on page 15). To ~200  $\mu$ L Lysozyme Digestion Buffer/sample, add **fresh** Lysozyme to obtain a final Lysozyme concentration of 20 mg/mL.
  3. Harvest up to  $2 \times 10^9$  Gram positive cells by centrifugation. If you are using a frozen cell pellet, proceed to Step 3.
  4. Resuspend the cell pellet in 180  $\mu$ L Lysozyme Digestion Buffer containing Lysozyme from Step 2. Mix well by brief vortexing.
  5. Incubate at 37°C for 30 minutes.
  6. Add 20  $\mu$ L Proteinase K (supplied with the kit). Mix well by brief vortexing.
  7. Add 200  $\mu$ L PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer and mix well by brief vortexing.
  8. Incubate at 55°C for 30 minutes.
  9. Add 200  $\mu$ L 96–100% ethanol to the lysate. Mix well by vortexing for 5 seconds to yield a homogenous solution.
  10. Proceed to **Binding DNA** (page 23).
-

## Purification Procedure Using Spin Columns

**Introduction** The purification procedure is designed for purifying genomic DNA using a spin column-based centrifugation procedure in a total time of **10–15 minutes**.

**Materials Needed**

*Components supplied by the user*

- Lysates prepared as described on pages 16–21
- Sterile, DNase-free 1.5-mL microcentrifuge tubes for elution
- Microcentrifuge capable of centrifuging  $>10,000 \times g$
- Optional: sterile water, pH 7.0–8.5, if you are using water for elution

*Components supplied with the Kit*

- PureLink® Genomic Wash Buffers 1 and 2
- PureLink® Genomic Elution Buffer
- PureLink® Spin Columns in Collection Tubes
- PureLink® Collection Tubes



Follow the recommendations below to obtain the best results:

- Perform all centrifugation steps at room temperature
- Review **Elution Parameters** on page 13 to determine the suitable elution volume for your requirements
- Perform a 1 minute incubation step with PureLink® Genomic Elution Buffer
- Be sure to perform the recommended wash steps to obtain the best results
- If you are using water for elution, always use sterile water, pH 7.0–8.5

**Before Starting** Add 96–100% ethanol to PureLink® Genomic Wash Buffer 1 and PureLink® Genomic Wash Buffer 2 according to instructions on each label. Mix well. Mark on the labels that ethanol is added. Store both wash buffers with ethanol at room temperature.

**Binding DNA**

1. Remove a PureLink® Spin Column in a Collection Tube from the package.
2. Add the lysate (~640  $\mu\text{L}$ ) prepared with PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer and ethanol to the PureLink® Spin Column.
3. Centrifuge the column at  $10,000 \times g$  for 1 minute at room temperature.  
**Note:** If you are processing  $>200 \mu\text{L}$  starting material such as blood, buccal swabs, or Oragene™ preserved saliva, you need to perform multiple loading of the lysate by transferring any remaining lysate to the same PureLink® Spin Column (above) and centrifuge at  $10,000 \times g$  for 1 minute.
4. Discard the collection tube and place the spin column into a clean PureLink® Collection Tube supplied with the kit.
5. Proceed to **Washing DNA**, page 24.

## Purification Procedure Using Spin Columns, Continued

---

### Washing DNA

1. Add 500  $\mu$ L Wash Buffer 1 prepared with ethanol (page 23) to the column.
  2. Centrifuge column at room temperature at 10,000  $\times g$  for 1 minute.
  3. Discard the collection tube and place the spin column into a clean PureLink<sup>®</sup> collection tube supplied with the kit.
  4. Add 500  $\mu$ L Wash Buffer 2 prepared with ethanol (page 23) to the column.
  5. Centrifuge the column at maximum speed for 3 minutes at room temperature. Discard collection tube.
  6. Proceed to **Eluting DNA**.
- 

### Eluting DNA

1. Place the spin column in a sterile 1.5-mL microcentrifuge tube.
  2. Add 25–200  $\mu$ L of PureLink<sup>®</sup> Genomic Elution Buffer to the column. See **Elution Parameters** (page 13) to choose the suitable elution volume for your needs.
  3. Incubate at room temperature for 1 minute. Centrifuge the column at maximum speed for 1 minute at room temperature. *The tube contains purified genomic DNA.*
  4. To recover more DNA, perform a second elution step using the same elution buffer volume as first elution in another sterile, 1.5-mL microcentrifuge tube.
  5. Centrifuge the column at maximum speed for 1.5 minutes at room temperature.  
*The tube contains purified DNA. Remove and discard the column.*
- 

### Storing DNA

- Store the purified DNA at  $-20^{\circ}\text{C}$  or use DNA for the desired downstream application.
  - For long-term storage, store the purified DNA in PureLink<sup>®</sup> Genomic Elution Buffer at  $-20^{\circ}\text{C}$  as DNA stored in water is subject to acid hydrolysis.
  - To avoid repeated freezing and thawing of DNA, store the purified DNA at  $4^{\circ}\text{C}$  for immediate use or aliquot the DNA and store at  $-20^{\circ}\text{C}$  for long-term storage.
-

## Anexo 8

Pruebas estadísticas SNK ( $P < 0.05$ ) para pruebas de antagonismo *in vitro*

(a)

<b>Alpha</b>	0.05
<b>Error Degrees of Freedom</b>	36
<b>Error Mean Square</b>	11.74849

<b>Means with the same letter are not significantly different.</b>				
<b>SNK Grouping</b>		<b>Mean</b>	<b>N</b>	<b>Tratamiento</b>
	A	77.540	5	Ref1
	A			
B	A	74.870	5	Ref2
B	A			
B	A	73.946	5	Z2
B	A			
B	A	73.146	5	Z3
B				
B		70.318	5	S1-1
	C	1.872	5	S1-2
	C			
	C	0.924	5	S1-3
	C			
	C	0.000	5	Z1
	C			
	C	0.000	5	Control Ca

(b)

<b>Alpha</b>	0.05
<b>Error Degrees of Freedom</b>	32
<b>Error Mean Square</b>	226.5198

<b>Means with the same letter are not significantly different.</b>			
<b>SNK Grouping</b>	<b>Mean</b>	<b>N</b>	<b>Tratamiento</b>
A	77.003	5	S2-1
A			
A	76.676	5	Ref1
A			
A	76.114	5	Ref2
A			
A	72.530	5	S3-5
B	32.692	5	S3-6
C	1.563	5	S2-2
C			
C	0.964	5	S3-7
C			
C	0.000	5	Control Ca

## Anexo 9

**Pruebas estadísticas SNK ( $P < 0.05$ ) para ensayos de producción de endosporas**

**Cepa S2-1 – Datos de endosporas**

<b>Alpha</b>	0.05
<b>Error Degrees of Freedom</b>	6
<b>Error Mean Square</b>	0.011111

<b>Means with the same letter are not significantly different.</b>			
<b>SNK Grouping</b>	<b>Mean</b>	<b>N</b>	<b>tiempo</b>
A	6.93000	3	72
B	5.70667	3	48
C	4.70000	3	24

**Cepa S2-1 – Datos de células vegetativas y endosporas**

<b>Alpha</b>	0.05
<b>Error Degrees of Freedom</b>	6
<b>Error Mean Square</b>	0.014222

<b>Means with the same letter are not significantly different.</b>			
<b>SNK Grouping</b>	<b>Mean</b>	<b>N</b>	<b>tiempo</b>
A	9.38333	3	24
B	8.89000	3	48
B			
B	8.81333	3	72

**Cepa S3-5 – Datos de endosporas**

<b>Alpha</b>	0.05
<b>Error Degrees of Freedom</b>	6
<b>Error Mean Square</b>	0.013044

<b>Means with the same letter are not significantly different.</b>			
<b>SNK Grouping</b>	<b>Mean</b>	<b>N</b>	<b>tiempo</b>
A	7.33450	3	72
B	5.85036	3	48
C	5.01667	3	24

**Cepa S3-5 – Datos de células vegetativas y endosporas**

<b>Alpha</b>	0.05
<b>Error Degrees of Freedom</b>	6
<b>Error Mean Square</b>	0.003061

<b>Means with the same letter are not significantly different.</b>				
<b>SNK Grouping</b>		<b>Mean</b>	<b>N</b>	<b>tiempo</b>
	A	9.22333	3	24
	A			
B	A	9.11633	3	72
B				
B		9.08000	3	48

**Cepa Z2 – Datos de endosporas**

<b>Alpha</b>	0.05
<b>Error Degrees of Freedom</b>	6
<b>Error Mean Square</b>	0.006944

<b>Means with the same letter are not significantly different.</b>				
<b>SNK Grouping</b>		<b>Mean</b>	<b>N</b>	<b>tiempo</b>
A		6.36667	3	72
B		5.30000	3	48
C		4.50000	3	24

**Cepa Z2 – Datos de células vegetativas y endosporas**

<b>Alpha</b>	0.05
<b>Error Degrees of Freedom</b>	6
<b>Error Mean Square</b>	0.005782

<b>Means with the same letter are not significantly different.</b>			
<b>SNK Grouping</b>	<b>Mean</b>	<b>N</b>	<b>tiempo</b>
A	8.70037	3	24
B	8.50333	3	48
C	8.30000	3	72

**Cepa Z3 – Datos de endosporas**

<b>Alpha</b>	0.05
<b>Error Degrees of Freedom</b>	6
<b>Error Mean Square</b>	0.004421

<b>Means with the same letter are not significantly different.</b>			
<b>SNK Grouping</b>	<b>Mean</b>	<b>N</b>	<b>tiempo</b>
A	6.79567	3	72
B	6.12213	3	48
C	4.51467	3	24

**Cepa Z3 – Datos de células vegetativas y endosporas**

<b>Alpha</b>	0.05
<b>Error Degrees of Freedom</b>	6
<b>Error Mean Square</b>	0.001261

<b>Means with the same letter are not significantly different.</b>			
<b>SNK Grouping</b>	<b>Mean</b>	<b>N</b>	<b>tiempo</b>
A	9.10370	3	24
B	9.03000	3	72
C	8.69267	3	48

## Anexo 10

**Pruebas estadísticas SNK ( $P < 0.05$ ) para ensayos de inhibición de la germinación de conidias de *C. acutatum***

**2 horas**

<b>Alpha</b>	0.05
<b>Error Degrees of Freedom</b>	40
<b>Error Mean Square</b>	1.25

<b>Means with the same letter are not significantly different.</b>			
<b>SNK Grouping</b>	<b>Mean</b>	<b>N</b>	<b>Tratamiento</b>
A	2.6667	9	CK-2h
B	1.2222	9	Z32h
B			
B	0.3333	9	S2-12h
B			
B	0.2222	9	Ref2h
B			
B	0.1111	9	S3-52h

4 horas

<b>Alpha</b>	0.05
<b>Error Degrees of Freedom</b>	40
<b>Error Mean Square</b>	13.56111

<b>Means with the same letter are not significantly different.</b>			
<b>SNK Grouping</b>	<b>Mean</b>	<b>N</b>	<b>Tratamiento</b>
A	38.444	9	CK-4h
B	19.556	9	Z34h
C	10.222	9	Ref4h
C			
C	10.111	9	S2-14h
C			
C	6.222	9	S3-54h

## 6 horas

<b>Alpha</b>	0.05
<b>Error Degrees of Freedom</b>	40
<b>Error Mean Square</b>	13.3

<b>Means with the same letter are not significantly different.</b>			
<b>SNK Grouping</b>	<b>Mean</b>	<b>N</b>	<b>Tratamiento</b>
A	69.667	9	CK-6h
B	40.778	9	Z36h
C	24.556	9	S2-16h
C			
C	22.556	9	Ref6h
D	18.000	9	S3-56h

## Anexo 11

Pruebas estadísticas SNK ( $P < 0.05$ ) para ensayos de efectividad *in vivo*

## Ensayo con inoculaciones artificiales. Porcentaje de germinación

<b>Alpha</b>	0.05
<b>Error Degrees of Freedom</b>	20
<b>Error Mean Square</b>	13.88889

<b>Means with the same letter are not significantly different.</b>					
<b>SNK Grouping</b>		<b>Mean</b>	<b>N</b>	<b>Tratamiento</b>	
	A	100.000	3	SD-Ref1-Ca	
	A				
	A	100.000	3	SD-Z3-Ca	
	A				
	A	100.000	3	SD-S2-1-Ca	
	A				
B	A	97.222	3	CK-SD	
B	A				
B	A	97.222	3	SD-Rhapsody-Ca	
B	A				
B	A	97.222	3	SD-Ca	
B	A				
B	A	97.222	3	SD-Ref1	
B	A				
B	A	C	91.667	3	SD-Rhapsody
B		C			
B		C	88.889	3	SD-Z3
		C			
		C	86.111	3	SD-S2-1

### Ensayo con inoculaciones artificiales. Incidencia

<b>Alpha</b>	0.05
<b>Error Degrees of Freedom</b>	20
<b>Error Mean Square</b>	41.66667

<b>Means with the same letter are not significantly different.</b>				
<b>SNK Grouping</b>		<b>Mean</b>	<b>N</b>	<b>Tratamiento</b>
	A	94.444	3	SD-Ca
	B	19.444	3	SD-Z3-Ca
	B			
C	B	11.111	3	SD-Ref1-Ca
C	B			
C	B	8.333	3	SD-Rhapsody-Ca
C	B			
C	B	8.333	3	SD-Ref1
C	B			
C	B	5.556	3	SD-Rhapsody
C	B			
C	B	5.556	3	SD-S2-1-Ca
C	B			
C	B	2.778	3	SD-Z3
C				
C		0.000	3	SD-S2-1
C				
C		0.000	3	CK-SD

**Ensayo con infecciones latentes. Porcentaje de germinación**

<b>Alpha</b>	0.05
<b>Error Degrees of Freedom</b>	12
<b>Error Mean Square</b>	29.14952

<b>Means with the same letter are not significantly different.</b>				
<b>SNK Grouping</b>		<b>Mean</b>	<b>N</b>	<b>Tratamiento</b>
	A	64.815	3	CK-SD
	A			
B	A	61.111	3	SD-Ref1
B	A			
B	A	61.111	3	SD-S3-5
B	A			
B	A	61.111	3	SD-S2-1
B	A			
B	A	59.259	3	SD-Rhapsody
B				
B		50.000	3	SD-Z3

### Ensayo con infecciones latentes. Incidencia

<b>Alpha</b>	0.05
<b>Error Degrees of Freedom</b>	12
<b>Error Mean Square</b>	39.43759

<b>Means with the same letter are not significantly different.</b>			
<b>SNK Grouping</b>	<b>Mean</b>	<b>N</b>	<b>Tratamiento</b>
A	83.333	3	CK-SD
B	44.444	3	SD-Z3
B			
B	44.444	3	SD-Rhapsody
B			
B	40.741	3	SD-S2-1
B			
B	38.889	3	SD-S3-5
B			
B	37.037	3	SD-Ref1

## Anexo 12

Inhibición del crecimiento micelial de *C. acutatum* causado por diferentes aislados de *Bacillus* spp. Se muestran el diámetro de crecimiento (cm) y el porcentaje de inhibición promedio con su desviación estándar. (a) Datos correspondientes al primer ensayo. (b) Datos correspondientes al segundo ensayo. Los datos corresponden a la media de cinco repeticiones para cada tratamiento. Se muestra representados con letras las diferencias significativas de acuerdo a la prueba SNK ( $P < 0.05$ )

**(a)**

Tratamiento	$\bar{\phi}$ crecimiento promedio (cm)	% inhibición promedio		SNK
Control	6.1	0.0	± 0.0	C
Ref-1	1.4	77.5	± 1.3	A
Ref-2	1.5	74.9	± 2.4	AB
S1-1	1.8	70.3	± 3.6	B
S1-2	6.0	1.9	± 3.3	C
S1-3	6.3	0.9	± 2.1	C
Z1	6.3	0.0	± 0.0	C
Z2	1.6	74.0	± 6.7	AB
Z3	1.6	73.2	± 5.1	AB

**(b)**

Tratamiento	$\bar{\phi}$ crecimiento promedio (cm)	% inhibición promedio		SNK
Control	6.2	0.0	± 0.0	C
Ref-1	1.4	76.7	± 2.0	A
Ref-2	1.5	76.1	± 2.8	A
S2-1	1.4	77.0	± 2.2	A
S2-2	6.4	1.6	± 4.1	C
S3-5	1.7	72.5	± 4.0	A
S3-6	4.1	32.7	± 42.0	B
S3-7	6.2	1.0	± 1.4	C

### Anexo 13

Datos de producción de endosporas y células vegetativas (UFC·mL<sup>-1</sup>) de aislados de *Bacillus* spp. hasta las 72 horas en medio MOLP.

Cepa	Tiempo (horas)	Células vegetativas y endosporas	
		(UFC·mL <sup>-1</sup> )	(UFC·mL <sup>-1</sup> )
S2-1	24	9.4	4.7
	48	8.9	5.7
	72	8.8	6.9
S3-5	24	9.2	5
	48	9.1	5.9
	72	9.1	7.3
Z2	24	8.7	4.5
	48	8.5	5.3
	72	8.3	6.4
Z3	24	9.1	4.5
	48	8.7	6.1
	72	9.0	6.8

## Anexo 14

Efecto de *B. subtilis* en la reducción de la incidencia de *C. acutatum* y la germinación de semillas de *L. mutabilis* mediante inoculaciones artificiales. Los datos mostrados corresponden a las media de tres repeticiones para cada tratamiento. Las letras junto a las medias de incidencia y germinación indican diferencias significativas en base a la prueba de SNK ( $P < 0.05$ ).

<b>Tratamiento</b>	<b>Incidencia (%)</b>	<b>SNK</b>	<b>Germinación (%)</b>	<b>SNK</b>
Control	0	C	97.2 ± 4.3	AB
Control+Ca	94.4 ± 8.6	A	97.2 ± 4.3	AB
Referencia	8.3 ± 7.5	BC	97.2 ± 4.3	AB
S2-1	0	C	86.1 ± 4.3	C
Z3	2.8 ± 4.3	BC	89.9 ± 6.6	BC
Rhapsody®	5.6 ± 4.3	BC	91.7 ± 0.0	ABC
Ref.+Ca	11.1 ± 4.3	BC	100.0	A
S2-1+Ca	5.6 ± 0.0	BC	100.0	A
Z3+Ca	19.4 ± 8.6	B	100.0	A
Rhapsody®+Ca	8.3 ± 7.5	BC	97.2 ± 4.3	AB

## Anexo 15

Efecto de *B. subtilis* en la reducción de la incidencia de infecciones latentes y la germinación de semillas de *L. mutabilis*. Los datos mostrados corresponden a las media de tres repeticiones para cada tratamiento. Las letras junto a las medias de incidencia y germinación indican diferencias significativas en base a la prueba de SNK ( $P < 0.05$ ).

<b>Tratamiento</b>	<b>Incidencia</b>	<b>SNK</b>	<b>Germinación (%)</b>	<b>SNK</b>
Control	83.3 ± 5.0	A	64.8 ± 2.9	A
Referencia	37.0 ± 2.9	B	61.1 ± 5.0	AB
S2-1	40.7 ± 2.9	B	61.1 ± 9.9	AB
S3-5	38.9 ± 8.6	B	61.1 ± 0.0	AB
Z3	44.4 ± 0.0	B	50.0 ± 7.6	B
Rhapsody®	44.4 ± 0.0	B	59.3 ± 2.9	AB

**Anexo 16****Lista de abreviaturas**

ANOVA	Análisis de varianza (inglés)
CIEDI	Centro de Investigación, Estudio y Desarrollo de Ingenierías
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (inglés)
ESPE	Universidad de las Fuerzas Armadas
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (inglés)
INIAP	Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias
IRTA	Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (catalán)
G	Fuerza gravitacional
m s.n.m	Metros sobre el nivel del mar
mM	Mili molar
MOLP	Medio óptimo para la producción de lipopéptidos
NYDA	Agar nutritivo levadura-dextrosa (inglés)
NYDB	Caldo nutritivo levadura-dextrosa (inglés)
PBS	Solución tampón fosfato salino (inglés)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (inglés)
PDA	Agar papa dextrosa (inglés)
qq·ha <sup>-1</sup>	Quintales por hectárea
Ref	Cepa de referencia
R <sub>f</sub>	Factor de retención (inglés)

rpm	Revoluciones por minuto
SD	Semilla desinfectada
SICA	Servicio de Información y Censo Agropecuario
SNK	Student Newman Keuls
TLC	Cromatografía en capa fina (inglés)
TSB	Caldo tripticasa-soya (inglés)
UDLA	Universidad de las Américas
UFC	Unidad formadora de colonia