



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

EVALUACIÓN DE *Bacillus spp.* Y SUS METABOLITOS EN EL CONTROL BIOLÓGICO
DE Ovularia Y Fusarium EN CHOCHO (*Lupinus mutabilis Sweet*)

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos
para optar por el título de Ingeniera en Agroindustria y de Alimentos

Profesora Guía

Viviana Yáñez Mendizábal., PhD.

Autora

Adriana Carolina Grijalva Calderón

Año

2015

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con la 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.

PhD en Ciencia y Tecnología Agraria y Alimentaria

C. I. 1710469782

DECLARACIÓN 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”

Adriana Carolina Grijalva Calderón

C. I. 1718817131

AGRADECIMIENTOS

Al Proyecto “Control biológico de enfermedades fungosas del chocho (*Lupinus mutabilis*) mediante *Bacillus* spp. y sus metabolitos 2013/8/ AGR” del Centro de Investigación y Desarrollo de Ingenierías (CIEDI), Facultad de Ingenierías y Ciencias Agropecuarias, Universidad de las Américas, por el aporte económico para el desarrollo de la investigación

Al Programa de Investigación y Desarrollo de la SENESCYT “Mejora de la cadena productiva del chocho (*Lupinus mutabilis*) en el Ecuador” por el aporte económico y logístico brindados a este trabajo.

Al Programa Nacional de leguminosas y cereales andinos del INIAP, El Laboratorio de Fitopatología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, los Laboratorios de la Universidad de las Américas y el Centro de Investigación Transnacional por el soporte logístico y la apertura brindada.

DEDICATORIA

Dedico el siguiente trabajo a mis padres Ernesto y Clemencia. Gracias por todos los sacrificios, darme su amor y apoyo incondicional; a mis hermanos Fabricio y Miguel por sus consejos y ayuda en todo momento; y a mi tía Ruth quien es mi segunda madre.

RESUMEN

El chocho andino o tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) es una leguminosa de gran valor nutricional, especialmente para las poblaciones indígenas del Ecuador, donde constituye parte fundamental de la alimentación básica. Además, el chocho es uno de los cultivos de alta demanda y proyección internacional. Sin embargo, es necesario buscar alternativas amigables con el medio ambiente que permitan incrementar el rendimiento y disminuir los problemas sanitarios.

En el Ecuador, entre los problemas fitosanitarios, las enfermedades fungosas causan daños importantes en el cultivo durante la fase de campo y reducen significativamente el rendimiento a la cosecha y el almacenamiento poscosecha. Entre estas enfermedades, la antracnosis causada por *Colletotrichum acutatum* reduce significativamente la producción. Otras enfermedades como *Ovularia*, *Fusarium* y otros patógenos fungosos pueden causar pérdidas especialmente durante el almacenamiento de la semilla.

Tradicionalmente el control de enfermedades se hace utilizando fungicidas químicos, los cuales incrementan el costo de la producción y representan un incremento en la toxicidad del producto y los riesgos de la salud humana. Otras estrategias utilizadas por los agricultores es la siembra de semillas de variedades mejoradas agronómicamente por el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias INIAP y la selección de semilla propia luego de la siembra y cosecha. Sin embargo, este último incrementa la incidencia y diseminación de las enfermedades por uso de materiales contaminados de baja calidad.

Actualmente, el uso de métodos alternativos como el control biológico, resulta interesante 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 cultivos incluyendo leguminosas. Por esta razón resulta interesante evaluar el potencial

control biológico de bacterias de este género provenientes de localidades productoras de chocho.

En el presente estudio, aislados nativos pertenecientes al género *Bacillus* spp. se obtuvieron de diferentes zonas productoras de chocho andino de Cotopaxi y Chimborazo. Fueron evaluados como potenciales controladores biológicos contra las infecciones causadas por *Ovularia* y *Fusarium*. Para esto se evaluó el potencial de biocontrol mediante la caracterización de los aislados de *Bacillus* spp., la producción de biomasa y de metabolitos antifúngicos y el efecto antagónico para el control de enfermedades *in vitro* e *in vivo*.

De los diferentes aislados muestreados en las localidades productoras de chocho, se obtuvieron cuatro cepas pertenecientes al género *Bacillus* spp. Según los resultados de caracterización microbiológica y bioquímica, estas corresponden a la especie *Bacillus subtilis* productoras de endosporas y metabolitos con potencial antifúngico. En los ensayos de actividad antifúngica por prueba dual *in vitro*, de actividad antifúngica de lipopéptidos por análisis de cromatografía en capa fina (TLC) y autobiografía los cuatro aislados mostraron inhibir el crecimiento de *Ovularia* y *Fusarium* hasta 57% y 59% respectivamente. En los ensayos de efectividad *in vivo*, los aislados de *Bacillus subtilis* mostraron reducir las infecciones artificiales de *Ovularia* y *Fusarium* en 80 y 50% comparados con los controles sin tratar. En tratamiento con infecciones latentes demostró reducir la incidencia hasta el 36.7% comparadas con 83% del control. En ensayos en semillero con cinco genotipos de *L. mutabilis*, *Bacillus* demostró tener efectividad en reducir la incidencia de enfermedades alrededor del 35% sin afectar la germinación y emergencia de las plantas. Todos estos resultados demostraron que aislados nativos de *B. subtilis*, tienen potencial antagónico contra *Ovularia* y *Fusarium* en chocho andino.

ABSTRACT

The Andean Lupin or tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) is a leguminous plant of great nutritional value, particularly for the indigenous communities in Ecuador, where it plays a key role in the basic diet. Furthermore, the Andean Lupin is one of the crops with one of the largest demands and international projection. However, it is also necessary to look for environmentally friendly alternatives which allow to increase crop yield and diminish sanitary issues.

In Ecuador, among the phytosanitary issues, fungus diseases cause important damage to crops during the field stage and significantly reduce the crop and post-harvest storage yield. Among the mentioned diseases the anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum* significantly reduce crop production. Other diseases such as the *Ovularia*, *Fusarium* and other fungal pathogens could cause loses particularly during seed storage stage.

Traditionally, disease control has been performed using chemical fungicides, which increase production cost, represent an increase in the product's toxicity and increase the risks to human health. Other strategies used by farmers are the sowing of a variety of INIAP's agronomically enhanced seeds and the selection of the seed owned by the farmers resulting after the sowing and harvesting process. The latest, however, increase the incidence and dissemination of the diseases due to the use of low quality contaminated materials.

Currently, the use of alternative methods such as the biological control, result interesting due to the fact that biological products contain a lower toxicity than chemical fungicides, plus, these products biodegrade in short periods of time. Among the biological control, the use of microorganisms and their metabolites, such as bacteria from the *Bacillus* spp., have yielded good results in the reduction of pre and post-harvest diseases in other crops containing leguminous plants. In order to control lupin diseases, it results interesting to evaluate bacterial biological potential from this genera obtained in lupin production facilities.

In the present study, *Bacillus* spp. isolates genera were obtained from different Andean lupin production areas of Cotopaxi and Chimborazo provinces, and evaluated as potential biological controls against *Ovularia* and *Fusarium* infections on seed. The potential biocontrol of different isolates was evaluated through the characterization of *Bacillus* species, the production of biomass and antifungal metabolites, and antagonistic effect against *Ovularia* and *Fusarium* *in vitro* and *in vivo*.

Out of the different isolated samples taken in the lupin production facilities, four isolates corresponded to *Bacillus* genus. According to the microbiologic and chemical characterization results, these isolates correspond to the *Bacillus subtilis* species which are producers of endospores and metabolites with antifungal potential.

In the antifungal activity assays performed by a dual and lipopeptides antifungal activity by Thin Layer Chromatography (TLC) and autobiography analysis, the four strains of *B. subtilis* showed an inhibition of the *Ovularia* and *Fusarium* growth up to 57 and 59%, respectively compared with untreated control. In the effectivity assays *in vivo*, *B. subtilis* strains showed a reduction of the artificial *Ovularia* and *Fusarium* infections up to 80% to 50% compared to the controls without treatment; and latent infection treatment showed reduced incidence to 36.7% compared to control 83% of control. In greenhouse trials with five genotypes of *L. mutabilis*, *Bacillus* demonstrated effectiveness reducing the incidence of disease about 35% without affecting germination and plant emergence. All these results showed that isolated cultures of *B. subtilis* have an antagonistic potential against *Ovularia* and *Fusarium* in the Andean lupin.

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO	4
1.1. Generalidades del chocho andino	4
1.1.1. Importancia agroindustrial y problemática de producción	4
1.1.2. Problemática de producción	4
1.2. Problemas fitosanitarios del chocho en poscosecha (enfermedades fungosas)	5
1.2.1. Antracnosis	6
1.2.2. Mancha anular	6
1.2.3. Fusariosis	6
1.3. Manejo fitosanitario	7
1.3.1. Tratamiento químico convencional	7
1.3.2. Mejoramiento vegetal (selección de variedades y genotipos)	7
1.4. Control biológico microbiano	8
1.4.1. Control biológico de poscosecha en semillas	8
1.4.2. Control biológico de patógenos de poscosecha de semillas con <i>Bacillus</i>	9
1.5. Generalidades <i>Bacillus</i>	9
1.5.1. Usos en la agricultura	10
1.5.1.1. Características antifúngicas	10
1.5.1.2. Aplicaciones comerciales	10
2. CAPÍTULO II. METODOLOGÍA	12
2.1. Aislamiento de microorganismos antagonistas y patógenos	12
2.1.1. Localidades de muestreo	12
2.1.2. Aislamiento de antagonistas	12
2.1.3. Aislamiento de patógenos	13
2.2. Caracterización de <i>Bacillus</i> spp. y patógenos del chocho	13
2.2.1. Antagonistas y patógenos	13

2.2.2. Conservación y mantenimiento de antagonistas y patógenos	15
2.2.3. Parámetros de crecimiento y producción de metabolitos antifúngicos de <i>Bacillus</i>	16
2.2.3.1. Crecimiento de aislados bacterianos (modelización).....	16
2.2.3.2. Producción de células vegetativas y endosporas	18
2.2.3.3. Producción de metabolitos (extracción de lipopéptidos).....	18
2.3 Ensayos de antagonismo <i>in vitro</i>	19
2.3.1. Pruebas de antagonismo duales con biomasa	20
2.3.2. Inhibición del crecimiento de <i>Ovularia</i> y <i>Fusarium</i> por extractos de lipopéptidos a partir de metabolitos de <i>Bacillus</i> spp.	21
2.3.2.1. Análisis en TLC y autobiografía	21
2.3.2.2. Pruebas moleculares de extracción de material genético de <i>Bacillus</i> spp.	22
2.3.2.3 Amplificación mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR)	23
2.4 Ensayos de efectividad <i>in vivo</i>	23
2.4.1. Lotes de semillas	23
2.4.2. Determinación de calidad de semillas (germinación y emergencia)..	24
2.4.3. Determinación de la efectividad de aislados de <i>Bacillus</i> spp. en inoculaciones artificiales e infecciones latentes	24
2.4.3.1. Efectividad de aislados de <i>Bacillus</i> en inoculaciones artificiales de <i>Ovularia</i> y <i>Fusarium</i>	25
2.4.3.2. Efectividad de aislados de <i>Bacillus</i> spp. en infecciones latentes.....	25
2.4.3.3 Determinación de la efectividad de <i>Bacillus subtilis</i> para el control de patógenos en semillero.....	26
3. CAPITULO III. RESULTADOS	28
3.1 Muestreo de potenciales antagonistas y patógenos	28
3.2. Caracterización de <i>Bacillus</i> spp. y patógenos del chocho	29
3.2.1. Identificación de antagonistas y patógenos	29
3.2.2. Dinámica de crecimiento de <i>B. subtilis</i> y producción de metabolitos antifúngicos	30

3.2.2.1. Modelización de crecimiento	31
3.2.2.2. Producción de células vegetativas y endosporas	32
3.2.2.3. Producción de metabolitos antifúngicos	34
3.3. Actividad antifúngica <i>in vitro</i> de aislados de <i>Bacillus</i> spp. contra <i>Ovularia</i> y <i>Fusarium</i>	34
3.3.1. Pruebas duales de antagonismo (biomasa).....	35
3.3.2. Inhibición del crecimiento de <i>Ovularia</i> y <i>Fusarium</i> por tratamientos de extractos de lipopéptidos de <i>B. subtilis</i>	38
3.3.2.1. Actividad antifúngica determinada, por TLC y Autobiografía	38
3.3.2.2. Identificación molecular de secuencias que codifican para lipopéptidos	40
3.4. Efectividad <i>in vivo</i> de aislados de <i>Bacillus</i> spp. contra <i>Ovularia</i> y <i>Fusarium</i> en semillas.....	41
3.4.1. Calidad de las semillas	41
3.4.2. Determinación de la efectividad de aislados de <i>Bacillus</i> spp. (Inoculaciones artificiales).....	42
3.4.3. Determinación de la efectividad de aislados de <i>Bacillus</i> spp. (Infecciones latentes).....	46
3.4.3 Determinación de la efectividad de <i>Bacillus</i> en campo	47
4. CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	52
4.1 Conclusiones	52
4.2 Recomendaciones	53
REFERENCIAS	55
ANEXOS	62

INTRODUCCIÓN

El chocho andino (*Lupinus mutabilis* Sweet) es una leguminosa domesticada por las poblaciones indígenas de las partes altas de los Andes, especialmente en Perú, Bolivia, Ecuador y Argentina (Popenoe *et al.*, 1989, pág. 415; Hondelmann, 1984, pág. 2). El chocho es conocido por su cantidad de proteína, alto contenido en aminoácidos que hace de éste, un producto principal en la dieta diaria de quienes viven en esta región (Falconí, 2012; Kurlovich & Kartuzova, 2002; Lara, Peralta, & Villacres, 2000). El rendimiento promedio del chocho es de 317 kg ha⁻¹ a 0,97 kg ha en una chacra (Jacobsen & Sherwood, 2002, pág. 15).

A nivel internacional, el chocho perteneciente a la especie *Lupinus albus*, se cultiva a gran escala en Australia, África y Asia, al igual que otras leguminosas como el fréjol. En estos países tiene una alta demanda creciente para producción de productos en fresco, procesados alimenticios y medicinales (Popenoe, King, León, & Kalinowski, 1989, pág. 415).

A pesar su importancia agroalimentaria, el chocho andino tiene limitaciones en los volúmenes de producción relacionadas principalmente a la falta de tecnología para el manejo óptimo de campo, cosecha y poscosecha; además de impacto negativo de problemas fitosanitarios causados mayormente por enfermedades fungosas. En cuanto al manejo, a pesar de la existencia de instituciones del estado dedicadas a la generación de tecnología adecuada para el cultivo; la producción se lleva a cabo de manera rudimentaria y casi manual. El destino comercial del producto dentro del país es básicamente para consumo familiar y utilización de su semilla (Falconí, 2012, pág. 35).

Los problemas fitosanitarios con *L. mutabilis*, especialmente las variedades comerciales desarrolladas por el INIAP como la variedad “450 Andino”, presentan bajas de rendimiento debido a su susceptibilidad a enfermedades fungosas, comparado con otras especies comerciales de chocho alrededor del mundo (Junovich, 2003; Thomas, 2003; Hardy y Huyghe, 1997). Entre estas enfermedades, la antracnosis causada por *Colletotrichum* spp. es la más

devastadora del cultivo (Falconí, 2012). Adicionalmente, enfermedades como la *Ovularia* y *Fusarium* son patógenos del cultivo que causan importantes pérdidas en Ecuador (Peralta E. , y otros, 2012, pág. 2).

ALCANCE

Incorporar controles de tipo biológico para enfermedades fúngicas del chocho, mediante el aislamiento de cepas nativas de *Bacillus* spp. y sus metabolitos, que permitirán el control de enfermedades en estos cultivos, reducir el uso de agroquímicos y mejorar la producción. Se espera demostrar que los aislados nativos de *Bacillus* spp. tienen potencial de biocontrol de patógenos en el chocho y además se los pueda utilizar como fungicida debido a sus propiedades antifúngicas de patógenos vegetales e inductores de crecimiento y defensa de las plantas.

JUSTIFICACIÓN

El desarrollo de este proyecto, se justifica porque busca mejorar el manejo sostenible (ecológico) del cultivo del chocho andino y el control de enfermedades que afecten a la productividad mediante el uso de microorganismos como controladores biológicos, para desarrollar posteriormente, bioproductos que protejan la salud humana y al ambiente.

La búsqueda de nuevos mecanismos de control está fundamentada por la disminución de la producción. La principal afectación de los cultivos, es la gran cantidad de enfermedades fungosas; las mismas que, no permiten un crecimiento y desarrollo adecuado de las plantas. El control adecuado de estas enfermedades, garantizará una mayor cosecha de esta leguminosa y además con altos estándares de calidad e inocuidad. Para que estos controles se lleven a cabo con resultados positivos, se utilizará cepas nativas de bacterias del género *Bacillus* spp aisladas de zonas productoras de chocho, con bajo uso de agroquímicos sintéticos que demuestren ser capaces de controlar e inhibir los principales patógenos, con énfasis en *Ovularia* y *Fusarium*, que afectan a los cultivos de chocho.

OBJETIVO GENERAL

Evaluación de *Bacillus* spp. y sus metabolitos en el control biológico de *Ovularia* y *Fusarium* en chocho (*Lupinus mutabilis*).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar cepas de *Bacillus* spp. a partir de muestras de suelo y la filósfera de cultivos de chocho con bajo uso de agroquímicos sintéticos, que permitan controlar los patógenos del chocho.
- Caracterizar cepas de *Bacillus* spp. y sus metabolitos que demuestren características antagonistas para controlar *Ovularia* y *Fusarium* del chocho.
- Determinar el efecto antagónico que causan los aislados de *Bacillus* spp. y sus metabolitos en los cultivos de chocho, mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*.

1. CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

1.1. Generalidades del chocho andino

Es necesario mencionar la importancia agroindustrial, problemas de producción y fitosanitarios que afectan al chocho; además, los controles a los que se someten a su cultivo.

1.1.1. Importancia agroindustrial y problemática de producción

El chocho andino (*Lupinus mutabilis*) es una leguminosa herbácea originaria de los Andes principalmente de Perú, Bolivia y Ecuador. Esta leguminosa, es un recurso agroalimentario de gran importancia dentro de la dieta de la población, ya que posee un alto contenido de proteína (40% a 50%), ácidos grasos, carbohidratos, vitaminas y minerales (INIAP, 2010).

Gran parte de la producción es destinada al consumo humano. Por su valor proteico, se elaboran harinas que sirven en la panificación y también para la elaboración de piensos y control de ectoparásitos intestinales para animales. Su uso, es restringido debido a sustancias tóxicas como alcaloides quinolizidínicos, que le da su sabor amargo.

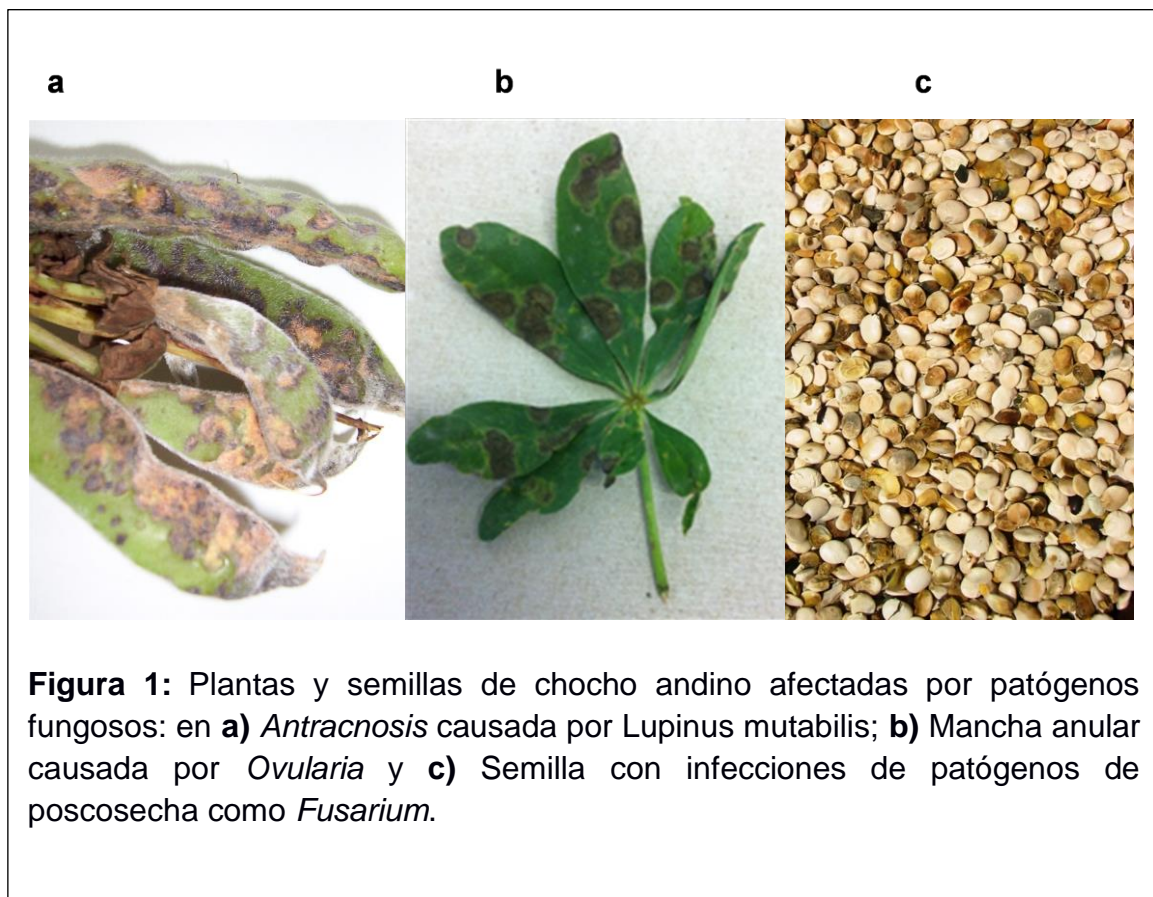
1.1.2. Problemática de producción

En Ecuador forma parte del sistema de producción en el sector de la Sierra, intercalado con otros cultivos principalmente gramíneos y leguminosos como la quinua, cebada y trigo. Debido a este sistema se presentan problemas de erosión y fitosanitarios, que inciden en la disminución de los niveles de producción de este cultivo. Según el III Censo Agropecuario Nacional en el Ecuador, se siembran 5974 has y se cosechan 3921 hectáreas con una pérdida del 34% (Peralta E. , y otros, 2012, pág. 10). Actualmente los agricultores, utilizan semilla certificada proveniente en su mayoría del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), que distribuye materiales genéticamente seleccionados como la variedad "INIAP 450 Andino". Esta variedad presenta características agronómicas favorables de tamaño y vigor,

pero no presenta resistencia a enfermedades comunes del chocho, como la Antracnosis y Ascoquita.

1.2. Problemas fitosanitarios del chocho en poscosecha (enfermedades fungosas)

Los problemas fitosanitarios de *L. mutabilis* se clasifican en plagas, enemigos naturales, patógenos virales, bacterianos y fungosos (Rogg D. W., 2000, pág. 14). Entre los problemas causados por enfermedades fungosas existen patógenos como la Antracnosis, Mancha anular e infecciones causadas por mohos como *Penicillium*, *Aspergillus* y *Fusarium* (Figura 1a-c).



1.2.1. Antracnosis

La Antracnosis (Figura 1a) es una enfermedad vegetal de alto impacto en diversos cultivos agrícolas. Esta enfermedad es causada por especies de hongos patógenos pertenecientes al género *Colletotrichum* (Dean, Van Kan, Pretorius, Hammond-Kosack, & Di Pietro, 2012, pág. 420). 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 son agrupados basados en sus diferencias morfológicas y criterios moleculares (Cannon *et al.*, 2012). Entre las especies de este género, *Colletotrichum acutatum*, ha sido reportado a nivel mundial como patógeno causante de importantes pérdidas económicas, en un amplio rango de cultivos vegetales incluyendo las leguminosas como el chocho (Damm, Cannon, Woudenberg, & Crous, 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).

1.2.2. Mancha anular

La mancha anular (Figura 1b), es producida por *Ovularia lupinicola*. Esta enfermedad presenta necrosis circulares en hojas tanto en el haz como en el envés. Presenta un color café y una capa blanquecina con la que se determina la completa fructificación del hongo, provocando necrosamiento y la defoliación de la planta. Las conidias de éste hongo son en forma ovular o globosas, comúnmente simples o en racimos. *Ovularia lupinicola* es muy agresivo ya que sus conidias se forman en grandes cantidades y se diseminan a través del viento (Caicedo V. & Peralta I., 2001, pág. 20).

1.2.3. Fusariosis

La *Fusariosis* (Figura 1c) causada principalmente por *Fusarium oxysporum* se describe como un hongo causante de la pudrición de la raíz en los cultivos. Algunos de los síntomas que presentan las plantas, son clorosis y flacidez de las hojas, además presencia de marchitez y posteriormente la muerte. En el

caso de la raíz, se observan manchas de color café claro que se extienden por toda la raíz y el tallo; este proceso deriva en una necrosis con la cual la planta es fácil de desprender de la tierra y su posterior muerte. *Fusarium oxysporum* produce clamidosporas resistentes; presenta crecimiento superficial en la que se observa como algodón blanco con hifas delgadas y conidióforos cortos. En poscosecha es uno de los hongos que puede afectar a la sanidad de semillas y leguminosas y producir micotoxinas (Olivain, Alabouvette, & Steinberg, 2004).

1.3. Manejo fitosanitario

El chocho, al igual que otras leguminosas, está expuesta a distintas plagas y enfermedades; por lo que sus cultivos, se controlan con plaguicidas y bioproductos con el objetivo de disminuir dichos problemas y aumentar su producción, con consecuencias negativas sobre el ambiente y la salud de los agricultores.

1.3.1. Tratamiento químico convencional

El control de plagas y enfermedades se realiza con productos químicos de poder residual y muchas veces no solo cumplen con la eliminación, sino que también, deterioran el suelo y el producto en sí. Según el INIAP se recomienda utilizar aquellos que sean menos tóxicos y a su vez económicos para los productores. Los controles deben realizarse en presencia de la plaga mas no como prevención, con criterio técnico y de manera oportuna (Peralta E. , y otros, 2012).

1.3.2. Mejoramiento vegetal (selección de variedades y genotipos)

El chocho al ser una leguminosa susceptible ante plagas y enfermedades lo que ocasiona que su producción sea baja; el INIAP ha trabajado en investigaciones en las cuales desarrolló una nueva especie con el fin de entregar a los agricultores, una mejor variedad la cual permita que este producto, tenga un mayor rendimiento y calidad (Peralta E. , y otros, 2012).

La variedad "INIAP 450 ANDINO", fue lograda gracias a la selección de una población de germoplasma de Perú en 1992, la cual después de ser

seleccionada y cultivada se introdujo en el Banco de Germoplasma del INIAP con identificación de ECU-2659. Ésta y otras variedades fueron las correctas ya que presentaban cualidades de adaptabilidad y estabilidad ante los distintos climas que existen en la Sierra ecuatoriana.

1.4. Control biológico microbiano

El control biológico se puede definir como la utilización de organismos vivos o de sus productos, para impedir o reducir (no eliminar) las pérdidas o daños ocasionados por los organismos nocivos, según la Organización Internacional de Lucha Biológica (OILB) (2002).

Los mecanismos a utilizarse para el control biológico son: inducción de resistencia, la competencia o eliminación del patógeno y la producción de antibióticos (Arriagada, 2000); en las que sus funciones van desde competir por alimento con otros microorganismos, a la producción de antibióticos; los mismos que, actúan sobre razas sensibles a los mismos.

Los estudios de controles biológicos con el uso de bacterias todavía se están desarrollando; sin embargo, existen resultados en los que se utilizó *B. subtilis* disminuyendo la germinación de conidios de patógenos de leguminosas en cepas de *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Colletotrichum* spp., *Phytophthora* spp., *Pythium* spp. y *Macrophomina phaseolina*.

1.4.1. Control biológico de poscosecha en semillas

Entre las principales enfermedades del chocho se encuentran aquellas que afectan a las flores, hojas y raíces. Estas aparecen en la etapa de floración por lo que es difícil su control con productos químicos. Es por eso que se busca alternativas de tipo biológico para el control de enfermedades del chocho. El género *Bacillus* es uno de los más utilizados para la elaboración de biofertilizantes y bioplaguicidas que, hoy en día, se han convertido en el mejor aliado del medio ambiente y el suelo. Éste género incluye más de 100 especies, las mismas que ejercen un efecto positivo tanto en el control biológico de patógenos, así como sobre el crecimiento vegetal ya que posee

diversos mecanismos como la fijación de fosfatos, nitrógeno y producción de fitohormonas (Ibarra, y otros, 2006).

Como ejemplos se encuentra, la disminución de incidencia de *antracnosis* de mango, *fusariosis* en garbanzo y *Curvularia* sp. en arroz. *Bacillus* presentó actividad antagónica en los tres casos disminuyendo el crecimiento del patógeno; evidenciando así, la cualidad de resistencia ante estos patógenos gracias a metabolitos antifúngicos (Tejera, Heydrich, & Rojas, 2008).

1.4.2. Control biológico de patógenos de poscosecha de semillas con *Bacillus*

Las bacterias del género *Bacillus* spp. son microorganismos Gram positivos que son potencialmente controladores biológicos de patógenos. Desarrollan mecanismos de competencia formando sustancias de tipo biocontroladoras, las mismas que pueden inhibir el crecimiento de otros microorganismos (Ongena, Henry, & Thonart, 2009). Las acciones biocontroladoras están asociadas a la producción de metabolitos antibióticos, capaces de actuar sobre microorganismos de diversa etiología. Los péptidos que producen y que tienen esta acción, son variados y representan un grupo de metabolitos activos no muy heterogéneo entre sí, que afectan directamente a algunos agentes fitopatógenos como *Fusarium oxysporum*. Entre los modos de acción de los agentes para el control biológico se puede identificar: la inhibición del crecimiento de esporas de hongos patógenos a través de la producción del ion hierro; competencia por sustrato; producción de sustancias biológicas con propiedades anti fúngicas como enzimas y proteínas; sustancias con efectos tóxicos contra patógenos, especialmente fungos; contribución para el crecimiento y absorción de nutrientes de las plantas y por último, activación de defensas secundarias (Obregón Gómez, 2002).

1.5. Generalidades *Bacillus*

Es una bacteria Gram positiva encontrada en el suelo y con características resistentes a condiciones extremas gracias a la formación de endosporas. Producen distintos tipos de enzimas hidrolíticas como quitinasas, celulasas,

amilasas, proteasas y glucanasas. Tiene forma bacilar por lo que se lo observa en forma individual, pares o cadenas de bacilos y en esporulación se ven en forma oval.

1.5.1. Usos en la agricultura

Las bacterias del género *Bacillus* tienen un amplio uso en la agricultura como bioproductos para el control de plagas y enfermedades. Este potencial se debe a que pueden producir un amplia gama de sustancias bioactivas (metabolitos) que inhiben el crecimiento de ciertos patógenos y plagas vegetales. Según datos reportados por (Fravel, 2005), más del 50% de los biopesticidas disponibles en el mercado corresponden a productos formulados a partir de biomasa o metabolitos activos de bacterias del género *Bacillus*. Entre los productos formulados, algunos ejemplos constituyen Serenade® (*Bacillus subtilis* QST 713 16% contiene un mínimo de 8×10^9 UFC/g o 146 g l. A. /Kg; BAYER de México, S. A.) y/o Rhapsody® (*Bacillus subtilis*, raza QTS 713 1×10^9 UFC/g 1.32%; BAYER CropScience una división de BAYER S. A.).

1.5.1.1. Características antifúngicas

Se ha considerado como un potente biocontrolador por su efecto de antibiosis ante otros patógenos, en los que puede comenzar una competencia con otros microorganismos ya sea por espacio o nutrientes; de esta forma, reducen los riesgos de infestación por patógenos; se convierte así, en un tratamiento de control amplio.

Las fitoalexinas confieren resistencia a las plantas contra ataques de hongos y nemátodos, haciendo de esta característica, una gran ventaja ante los fungicidas químicos ya que no es tóxico y es amigable con el medio ambiente.

1.5.1.2. Aplicaciones comerciales

Debido a las características de sus metabolitos, *Bacillus*, es utilizado en:

- Control biológico de patógenos: por sus antibióticos se producen productos los cuales son biodegradables y efectivos con el control de enfermedades.
- Control de enfermedades zoonóticas: en enfermedades entéricas como *salmonella*, enfermedades intestinales en animales de consumo humano.
- Producción de surfactantes: el lipopéptido surfactina que ayuda a la inhibición en medios acuáticos (eutrofización).

El género *Bacillus*, es conocido en su mayoría por su poder de controlador de enfermedades de plantas y es gracias a sus agentes biocontroladores, que producen componentes como sus lipopéptidos cíclicos como las surfactinas, iturrinas y fengycinas (Ongena, Henry, & Thonart, 2009). Por ejemplo la cepa de *Bacillus subtilis* S499, el cual posee surfactina S1 con potentes antifúngicos los mismos que permitirían la producción de biocontroladores (Jacques, y otros, 1999).

2. CAPÍTULO II. METODOLOGÍA

2.1. Aislamiento de microorganismos antagonistas y patógenos

Se obtuvo cultivos puros de bacterias del género *Bacillus* a partir de suelo y hojas de chocho

2.1.1. Localidades de muestreo

El muestreo de antagonistas y patógenos se realizó en tres diferentes localidades del cantón Salcedo en la provincia de Cotopaxi y una localidad en Guano de la provincia de Chimborazo. De cada localidad, se tomaron muestras por triplicado de suelo y de la filósfera de parcelas de *Lupinus mutabilis* con bajo manejo de agroquímicos. Se utilizó la metodología de muestreo de Ruiz Escudero, Ibañez, Padilla, Carnero, & Caballero (2004) para obtención de aislados de microorganismos del suelo, en la que se tomó 1 kg de suelo con un barreno a una profundidad de 20 cm aproximadamente. Las muestras fueron separadas en tres submuestras y colocadas en depósitos plásticos estériles, etiquetadas y guardadas en frío en un contenedor a 4 °C para ser transportadas al laboratorio.

2.1.2. Aislamiento de antagonistas

El aislamiento de los potenciales antagonistas del género *Bacillus* spp. a partir de las diferentes muestras de filósfera y rizósfera de chocho de cada localidad, se realizó siguiendo las metodologías descritas por Melnick, Suarez, Bailey, & Backman, (2011); Rojas *et al.* (2011); Yáñez *et al.* (2011) y Ruiz de Escudero *et al.* (2004). De cada submuestra proveniente del campo se tomaron alícuotas de 1 g por triplicado y fueron suspendidas en 10 mL de solución tampón fosfato salino estéril (PBS; KH_2PO_4 0.2M 70 mL, K_2HPO_4 0.2 M 30 mL y agua desionizada 300 mL, v/v/v, pH 6.5) en tubos Falcon. Las muestras fueron sometidas a agitación a 150 rpm durante 10 minutos, para homogenizar los microorganismos presentes. Posteriormente, las muestras se incubaron en un baño a 70°C durante 30 minutos para eliminar hongos y bacterias no resistentes al calor y seleccionar las bacterias resistentes al calor por

producción de endosporas. De cada muestra se tomaron alícuotas de 100 μL y se sembraron en agar nutritivo extracto de levadura y dextrosa (NYDA; caldo nutritivo 8 g L^{-1} , extracto de levadura 5 g L^{-1} , dextrosa 10 g L^{-1} , agar 20 g L^{-1}) y fueron incubados a 30°C durante 24 a 72 horas hasta observar apareamiento de colonias bacterianas. A partir de los cultivos obtenidos, las colonias con morfología característica de bacterias del género *Bacillus* se seleccionaron y purificaron en medio NYDA para su análisis posterior.

2.1.3. Aislamiento de patógenos

Para la obtención de aislados fungosos patogénicos de *Fusarium* y *Ovularia* se utilizaron muestras de tejidos foliares y semillas con signos y síntomas de Fusariosis y Mancha anular respectivamente. El aislamiento de los patógenos se realizó, siguiendo la metodología descrita por Agrios (2005) para obtención de cultivos *in vitro* de hongos causantes de enfermedades en plantas. Para el aislamiento se usaron agar agua (AA; agar agar 20 g L^{-1}), agar papa dextrosa comercial (PDA; 39 g L^{-1} ; almidón de papa, agar y dextrosa) y PDA + rosa de bengala comercial (32 g L^{-1} de agua; peptona soja 10 g L^{-1} , fosfato monopotásico 2 g L^{-1} , sulfato de magnesio 1 g L^{-1} , dextrosa 20 g L^{-1} , rosa de bengala 0.1 g L^{-1} y agar 3 g L^{-1}). Adicionalmente, se utilizaron dos aislados de *Fusarium* y *Ovularia* provenientes del banco de hongos fitopatógenos del laboratorio del IASA de la Universidad de las Fuerzas Armadas (ESPE).

2.2. Caracterización de *Bacillus* spp. y patógenos del chocho

Se usaron procedimientos establecidos para pruebas de identificación morfológicas de endosporas, producción de almidón; Microgen GN-ID panel; GN-ID B panel; ID-A+B+ Suplementos y API 20 E.

2.2.1. Antagonistas y patógenos

La caracterización de los antagonistas pertenecientes al género *Bacillus*, provenientes de las diferentes localidades y codificados como CtpxS1-1, Ctpx S2-1, CtpxS3-5 y CtpxZ3, se realizó mediante pruebas morfológicas (microscópicas), bioquímicas y de potencial antagonista *in vitro*. Para la

caracterización morfológica de aislados bacterianos se usaron técnicas de tinción de Gram y endosporas (tinción con verde de malaquita y fucsina); a partir de cultivos en TSB, con verde de malaquita y se observó en el microscopio óptico convencional (Microscopio OLYMPUS CX31, Tokio). En los cultivos en PDA se colocó lugol y se observó hidrólisis de almidón y formación de halo de amilasa; para el test Microgen las lecturas de resultados se realizaron según la tabla en positivo o negativo. Todas las características morfológicas y bioquímicas se compararon con las tablas de identificación de especies de bacterias del género *Bacillus* descritas en la Sistemática Bacteriana de Bergey (2005) seguidas de análisis y registro en microscopio para identificación de morfología, tamaño celular y posición de endosporas.

Se llevó a cabo la caracterización morfológica de colonias en medio sólido y microscópica por tinción de Gram y producción de endosporas. Se identificaron para cada aislado forma, color y borde de las colonias puras y color en tinción de Gram, tamaño de las células vegetativas, presencia y posición de endosporas.

La caracterización bioquímica se realizó usando kits de pruebas bioquímicas para identificación de bacterias Microgen GN-ID panel; GN-ID B panel; ID A+ B+ Suplementos y API 20 E (Microgen Bioproducts Ltd U.K.) y adicionales de producción de amilasa y crecimiento en cloruro de sodio 6.5% a 37°C y 55°C (Anexo 1). Los datos fueron tabulados y confrontados con la identificación de microorganismos de la Sistemática de Bergey (2005). Las pruebas de identificación de potencial antagonista *in vitro*, se realizaron siguiendo la metodología descrita por Yáñez-Mendizábal, y otros (2011).

Para las pruebas de caracterización se prepararon cultivos de 24 a 96 horas de crecimiento en medios NYDA y 100 µL de caldo TSB durante 96 horas a 37°C. Se incuban en estriado recto, en placas con papa dextrosa agar (PDA) durante 4 días a 25° C. En el Test Microgen, según el procedimiento, se colocó de 4 a 5 gotas dejando incubar durante 24 a 48 horas a 37° C.

La caracterización de los aislados patogénicos, se realizó mediante análisis de sus características morfológicas microscópicas y comparación con claves para identificación de hongos fitopatógenos descritas por Agrios (2005). Adicionalmente, la patogenicidad de los distintos aislados de *Fusarium* y *Ovularia* fue corroborada mediante postulados de Koch.

2.2.2. Conservación y mantenimiento de antagonistas y patógenos

Los aislados bacterianos con potencial antagónico y de patógenos, se conservaron en un banco de cepas dentro de los laboratorios de la Universidad de las Américas (UDLA), siguiendo metodologías para conservación de microorganismos a largo plazo en criobolas (Anexo 2) o en Dimetilsulfóxido DMSO (Fisher Scientific, CPS 67-68-5, Lote 137567) conservadas a -80°C y en tubos con agar inclinado más aceite de vaselina a -20°C. (Yáñez-Mendizábal V. , Viñas, Usall, Solsona, Torres, & Teixidó, 2012a)

Cada cepa de bacteria se preparó en cajas de Petri medio NYDA durante 48 horas a 30°C. Se prepararon cultivos en caldo nutritivo dextrosa comercial (NYDB) en tubos con 10 mL y se incubaron durante 48 horas a 30° C y 150 rpm. Para la preparación de criobolas, criocultivos y cultivos en glicerol se tomaron cultivos almacenados en medio NYDA y se inocularon en criobolas congelándolas a -80°C. En el caso de los criocultivos en cada tubo con 10 mL de NYDB se adicionan 1000 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO) para obtener una concentración de 9% que luego se dispensa en tubos eppendors de 2 mL y se congela a -80°C. 0996079616

Para la conservación de aislados de hongos, se prepararon cultivos en papa dextrosa agar (PDA), tanto en cajas como en tubos y se incuban durante 4 a 5 días hasta que el hongo esporule. Para criobolas, se toman cultivos de cada cepa y se inoculan y se congelan en -80°C. En el caso de criocultivos, el procedimiento fue parecido al que se utilizó para bacterias, pero se utilizaron cultivos esporulados que provenían de PDA inoculados hace 4 o 5 días. Para los cultivos en glicerol, es necesario que el hongo esporule en tubos con papa

dextrosa agar (PDA) inclinado y se lo cubre con 3 a 5 mL de glicerina o aceite de vaselina y se almacenan a -80°C .

Se propagaron aislados puros de *Ovularia* y *Fusarium* a partir de cepas proporcionadas por la Universidad de las Fuerzas Armadas (ESPE) usando la metodología de mantenimiento y siembra de patógenos. Se tomó una muestra del patógeno y se lo sembró en cajas con agar papa dextrosa (PDA) dejándolo incubar durante 4 a 5 días de 20 a 28°C . Para la purificación de cada cultivo se repitió el procedimiento dos a tres veces por cepa y luego se almacenó en el refrigerador a 4°C .

2.2.3. Parámetros de crecimiento y producción de metabolitos antifúngicos de *Bacillus*

Para la determinación de parámetros de crecimiento y producción de metabolitos, se siguió la metodología usada por Yáñez-Mendizábal *et al.* (2012b). Cada aislado bacteriano se preparó en medio NYDA e incubó a 30°C durante 24 horas. A partir de estos cultivos, se realizaron las suspensiones de inóculo de cada cepa en 5 mL de solución tampón, seleccionando cuatro colonias y agitando en vórtex para asegurar la homogeneidad de la suspensión. Las concentraciones bacterianas de cada inóculo, se determinaron mediante lecturas de transmitancia y absorbancia a 700 nm de longitud de onda y por dilución y plateo en medio NYDA. Posteriormente, se tomaron alícuotas de 100 μL de cada suspensión y se inocularon en erlenmeyers de 250 mL con 100 mL de Caldo Trypticasa Soya (TSB; peptona de caseína 17 gL^{-1} , peptona de harina de soya 3.0 gL^{-1} , cloruro de sodio 5.0 gL^{-1} , hidrógeno fosfato di potásico 2.5 gL^{-1} , D-glucosa 2.5 gL^{-1}). Para cada aislado se evaluó el crecimiento por triplicado, determinando las concentraciones de UFC mL^{-1} durante 72 horas por dilución y plateo en medio NYDA.

2.2.3.1. Crecimiento de aislados bacterianos (modelización)

El crecimiento y dinámica poblacional (modelización de crecimiento bacteriano) de los cuatro aislados de *Bacillus* spp. se evaluó siguiendo las metodologías

descritas por Yáñez-Mendizábal *et al.* (2011) e igualmente Baranyi y Roberts (1994).

La curva de crecimiento de los cuatro aislados de *B. subtilis* fue caracterizada y modelizada mediante cultivo bacterianos con toma de muestra desde 0 horas hasta 24 horas, 48 horas y 72 horas. Los datos de las concentraciones provenientes de cada una de las repeticiones fueron estimados mediante el método de dilución y plateo en medio NYDA y expresados en unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC·mL⁻¹) en relación al tiempo. Los datos fueron transformados a Log¹⁰ 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 Log¹⁰ UFC·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 λ-lag (horas), la máxima tasa de desarrollo (μ_{max} h⁻¹) y la máxima densidad de población [\log^{10} (UFC·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; μ_{max} es la máxima tasa de desarrollo específico (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 0.

2.2.3.2. Producción de células vegetativas y endosporas

Se utilizaron cultivos bacterianos de los cuatro aislados de 24, 48 y 72 horas de incubación a 30°C y 150 rpm en el medio optimizado para producción de lipopéptidos (MOLP; peptona 30 g·L⁻¹; sacarosa 20 g·L⁻¹; extracto de levadura 7 g·L⁻¹; KH₂PO₄ 1.9 g·L⁻¹; CuSO₄ 0.0001 mg·L⁻¹; FeCl₃·6H₂O 0.0005 mg·L⁻¹; Na₂MoO₄ 0.004 mg·L⁻¹; KI 0.0002 mg·L⁻¹; MnSO₄·H₂O 3.6 mg·L⁻¹; MgSO₄ 0.45 g·L⁻¹; ZnSO₄·7H₂O 0.14 mg·L⁻¹; H₃BO₃ 0.01 mg·L⁻¹; C₆H₈O₇ 10 mg·L⁻¹; pH 7) (Jacques, y otros, 1999). Se tomaron muestras, por triplicado de cada cultivo; se separó el sobrenadante de la biomasa por medio de centrifugación a 10000 rpm y se suspendió nuevamente en PBS. Las diferentes suspensiones se incubaron a 80 °C durante 12 minutos para eliminar las células vegetativas. Las concentraciones de células totales (células vegetativas + endosporas) y endosporas en unidades de colonias formadoras por mililitro (UFC mL⁻¹) fueron determinadas antes y después de someter al tratamiento con calor por dilución y plateo en medio NYDA. Posteriormente, los datos de producción para cada microorganismo y tiempo fueron transformados a Log¹⁰ UFC mL⁻¹. Los datos de las concentraciones de células totales y endosporas para cada bacteria y tiempo, 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 9.1 *Institute Inc*, Cary, NC, USA).

2.2.3.3. Producción de metabolitos (extracción de lipopéptidos)

Para la obtención de lipopéptidos, los cuatro aislados de *B. subtilis* y la cepa de referencia, fueron repicados en triple estría en medio NYDA incubados 24 horas a 30°C. A partir de las triples estrías con biomasa fresca se prepararon cultivos de 72 horas de crecimiento en medio MOLP (Jacques *et al.* 1994) como se describió anteriormente. Posteriormente, cada cultivo se centrifugó a 10000 rpm para separar la biomasa del sobrenadante y se filtró a 0.1 µm. El filtrado sin células se mezcló con n-butanol 1:1 y se colocó en agitación a 150 rpm durante toda la noche para separar los lipopéptidos no solubles en agua (fase orgánica). La fase orgánica se puso a evaporar el n-butanol bajo la campana de extracción en agitación continua a 150 rpm. Una vez que las

fracciones de lipopéptidos se evaporaron se resuspendieron nuevamente en metanol absoluto y conservaron a -4°C para el análisis posterior.

Adicionalmente, se realizó una extracción de lipopéptidos a través de columna Mega Bond Elut C18 (Agilent Technologies, USA. Part No. 12256023) (Anexo 3) las que previamente se activó con butanol (10 mL) para a continuación añadir el sobrenadante filtrado (20 mL) y realizar lavados con: agua grado molecular (20 mL por cada lavado); mezcla de agua con metanol al 50% (40 mL) y finalmente metanol absoluto (20 mL). Se usó una cámara de vacío a -15 kPa que permitió el paso de la soluciones a través de cada columna. Se colocó las soluciones en la cámara extractora de gases, para de esta manera evaporar el metanol. Posteriormente los lipopéptidos fueron sometidos a una prueba de cromatografía de capa fina (TLC) en placas de 245 x 245 mm de gel sílica (sílica gel *platos* HPTLC 60-F254, Merck AG). Se inoculó cada muestra en la placa (100 µL cada muestra). La TLC se llevó a cabo en una mezcla de cloroformo, metanol y agua (65:25:4 mL v/v/v) durante 1.5 a 2 horas; se extrajo la placa de sílica gel inoculada y se dejó secar para ser transferida a un plato con las mismas medidas y observar bajo luz UV.

2.3 Ensayos de antagonismo *in vitro*

Para determinar la capacidad antagonista *in vitro* de aislados de *Bacillus* spp. y contra patógenos fungosos del chocho, se utilizaron cultivos bacterianos frescos de los aislados, para compararlos con cepas de referencia con potencial de biocontrol a través de protocolos optimizados. Se evaluó para cada cepa, la capacidad de inhibición del crecimiento de micelio, utilizando con un diseño completamente al azar con cinco repeticiones.

Se realizaron ensayos de efectividad bajo condiciones controladas en cinco genotipos de chocho. Se realizaron pruebas adicionales para determinar el genotipo de los aislados de *Bacillus*.

2.3.1. Pruebas de antagonismo duales con biomasa

Esta prueba se realizó con el objetivo de determinar la actividad antagonista de los aislados bacterianos de Cotopaxi (Salcedo y Zumbahua) sobre el crecimiento de los patógenos de *Ovularia* y *Fusarium*. Los cultivos de patógenos deben ser incubados entre 4 a 7 días a 25° C antes de la prueba. Se utilizó biomasa bacteriana de triples estrías, incubadas en medio NYDA, 24 horas a 30° C.

La prueba se lleva a cabo en cajas de Petri con PDA en las que se coloca una rodaja de agar de patógeno con micelio activo (0.5 mm de diámetro) y posteriormente 2 rodajas de biomasa bacteriana a 3 cm de distancia de la línea de siembra del patógeno (Anexo 4); se deja incubar durante 7 días a 25°C. El experimento se llevó a cabo con un diseño completamente al azar, con cinco repeticiones por cada uno de los tratamientos, donde cada unidad experimental fue una caja de Petri. Los datos de cada repetición-tratamiento, se tomaron midiendo el diámetro de crecimiento radial del micelio del patógeno. Los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial para cada tratamiento, se calcularon en base a la formula descrita en la Ecuación 5.

Datos del crecimiento micelial se transformaron a porcentaje (Ecuación 4) y para la evaluación de cada tratamiento, se compararon cada uno con el primer tratamiento, que consiste en un control en el que se encontraban rodajas de agar solo con el patógeno y dos rodajas con medio NYDA puro. Para la lectura de resultados en el experimento, se midió los diámetros de crecimiento micelial y se calculó el porcentaje de inhibición.

$$\%inhibición = \frac{Dc - Dt}{Dc} * 100$$

Ecuación 4

Donde Dc representa al diámetro de crecimiento micelial del control en centímetros y Dt 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.

2.3.2. Inhibición del crecimiento de *Ovularia* y *Fusarium* por extractos de lipopéptidos a partir de metabolitos de *Bacillus* spp.

El efecto en la inhibición del crecimiento micelial de *Ovularia* y *Fusarium* a partir de extractos de lipopéptidos obtenidos de metabolitos de los cuatro aislados de *B. subtilis*, se realizó usando la metodología de Yáñez *et al.* (2012c); Romero *et al.* (2007) y Razafindralambo *et al.* (1993) para actividad antifúngica para análisis en TLC y autobiografía. Los resultados fueron corroborados mediante biología molecular con amplificación de genes que codifican para fungicidas.

2.3.2.1. Análisis en TLC y autobiografía

Para la obtención de lipopéptidos se utilizó la metodología que se explicó anteriormente. Para realizar la TLC se prepara la placa (245x245 mm sílica gel *plates* HPTLC 60-F₂₅₄, Merck AG) marcando los puntos donde se inoculó los lipopéptidos con un volumen de 100 μ L. La TLC se llevó a cabo en una mezcla de cloroformo, metanol y agua (65:25:4 mL v/v/v) durante 1.5 a 2 horas; se extrajo y se dejó secar para ser transferida a una caja de Petri con las mismas dimensiones, donde se evaporaron los solventes. Se preparó un inóculo del hongo en papa dextrosa agar 5×10^5 UFC y se dispersó sobre la placa de TLC dejándolo secar hasta que el agar este firme. Se dejó incubar a 25°C durante 5 a 7 días, después de este tiempo se observó zonas de inhibición. Los resultados se midieron en base a los factores de retención (R_f) de cada extracto. Los factores de retención se calcularon utilizando la Ecuación 5.

$$R_f = \frac{D_C}{D_T} \quad \text{Ecuación 5.}$$

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.

2.3.2.2. Pruebas moleculares de 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, se hicieron cultivos en 250 mL de MOLP y se incubaron a 30°C durante 72 horas. Cada cultivo fue centrifugado a 5000 rpm. 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 2×10^9 de cada aislado. La resuspensión fue homogenizada usando vórtex durante tres 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 brevemente usando 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 durante unos tres segundos.

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 durante un minuto. Se añadieron 500 µL de *Wash Buffer 1* (proporcionado en kit) y se centrifugó a 10000 g durante 1 minuto. Se colocaron 500 µL de *Wash Buffer 2* (incluido en kit) y se centrifugó a 15000 rpm. durante 3 minutos. Finalmente, las columnas se colocaron en tubos Eppendors estériles, se añadieron 75 µL de *buffer* de elución, se dejó incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto y se centrifugó a 15000 rpm durante un minuto. Se repitió el último paso para una recolección total de 150 µL de solución de DNA. 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.

2.3.2.3 Amplificación mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR)

Se amplificó mediante PCR de punto final, el gen *fenB* productor de fungicidas, 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 MgCl₂ (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.

2.4 Ensayos de efectividad *in vivo*

2.4.1. Lotes de semillas

Para determinar la presencia de patógenos fúngicos en las semillas de chocho, se usaron diferentes de lotes de *Lupinus mutabilis* de la variedad "INIAP 450 Andino" provenientes del banco de germoplasma del INIAP; e igualmente, de semilla provenientes de agricultor con alto porcentaje de incidencia de patógenos fúngicos de las localidades de Salcedo y Zumbahua.

2.4.2. Determinación de calidad de semillas (germinación y emergencia)

Para cada ensayo, las semillas fueron desinfectadas en una solución de agua estéril y cloro al 10% durante 4 minutos en agitación constante de 200 rpm. Después de ese tiempo, se lavó en agua estéril durante 10 minutos en agitación constante de 200 rpm para posteriormente quitar el exceso de agua. Para cada sublote de semillas, se tomaron entre 50 semillas como unidad experimental y se usaron tres repeticiones. Se usó un diseño experimental completamente al azar. Cada repetición se inoculó en una cámara de humedad y se mantuvieron durante 7 días a temperatura ambiente, foto período de 12 horas y HR de 60%. Posteriormente, se contabilizan las semillas germinadas por tratamiento y se determinó el porcentaje de germinación. Para determinar el porcentaje de emergencia, se repitió el proceso anterior de desinfección y las semillas fueron sembradas en bandejas de germinación en un sustrato estéril, manteniéndolas en foto período de 12 horas y HR de 60%. Los ensayos fueron repetidos tres veces.

Para la determinación de patógenos en los diferentes lotes de semillas, se utilizó la metodología descrita anteriormente (apartado 2.1.3) para aislamiento de patógenos (Agrios, 2005; Falconí 2012). Se desinfectó la semilla superficialmente con hipoclorito al 5%; se sembraron las semillas en medio PDA + Rosa de bengala. Se incubó a 25°C hasta observar crecimiento de patógenos. Posteriormente se purificaron dichos patógenos.

2.4.3. Determinación de la efectividad de aislados de *Bacillus* spp. en inoculaciones artificiales e infecciones latentes

Se evaluó la efectividad de aislados de *Bacillus* para el control de *Ovularia* y *Fusarium* en chocho andino, en base a los protocolos de Álvarez y Torés (1997).

2.4.3.1. Efectividad de aislados de *Bacillus* en inoculaciones artificiales de *Ovularia* y *Fusarium*

Se evaluó la efectividad de los aislados de *Bacillus* para reducir las infecciones artificiales de semilla de chocho causadas por *Ovularia* y *Fusarium*. Se usó lotes de semilla de la variedad "INIAP 450 Andino". La semilla se preparó desinfectándola como se describió anteriormente. Para la obtención del patógeno se necesitó cultivos puros mantenidos en PDA durante 7 a 10 días a 20°C. se realizó una suspensión del patógeno 2×10^6 conidias/mL en 200 mL de agua con tween; la concentración se determinó mediante un hematocitómetro; la semilla se trató en dicha suspensión durante 4 minutos a 200 rpm, se retiró el exceso de agua. Para los tratamientos, se utilizaron los aislados *B. subtilis* (referencia CIEDI), CTPX S2-1, Z3 y el producto comercial Rhapsody® (*Bacillus subtilis* QST-173, Bayer CropScience C.A. Canadá). Para preparar los tratamientos bacterianos, se utilizaron cultivos en medio de optimización MOLP y se ajustó las concentraciones a 2×10^8 UFC mL⁻¹. Para Rhapsody® el tratamiento fue preparado en base a la dosis comercial a 0.1 mL en 20 mL. A la semilla se le aplicó cada uno de los tratamientos durante 4 minutos a 200 rpm. Posteriormente se quitó el exceso de agua y se colocó a las semillas en platos con tapa y papel filtro húmedo durante siete días a temperatura ambiente con 60% de HR y se determinó el número de semillas germinadas e infectadas. Para el control se siguió el mismo procedimiento pero los tratamientos fueron remplazados por PBS estéril sin inóculo bacteriano o Rhapsody®. Cada tratamiento incluyendo el control, se hizo con tres repeticiones. Se realizó un diseño experimental completamente al azar. Luego del período de incubación se determinaron el número de semillas infectadas y germinadas. Con estos datos, se determinaron los porcentajes de incidencia y germinación por cada tratamiento. Estos datos fueron analizados en el software SAS 9.1 como se describió anteriormente en el apartado 2.3.1.

2.4.3.2. Efectividad de aislados de *Bacillus* spp. en infecciones latentes

Se realizó el mismo procedimiento de determinación de la efectividad para inoculaciones artificiales en cuanto a desinfección de la semilla. Se usó lotes de

semilla de *L. mutabilis* proveniente del agricultor con alto porcentaje de incidencia de enfermedades latentes. Se usaron cepas antagonistas (Ctpx S2-1, CtpxS3-5, CtpxZ3 y *B. subtilis* referencia CIEDI), un control que consistió en la semilla desinfectada y el producto Rhapsody®. La preparación de tratamientos con los antagonistas y Rhapsody®, se realizó de la misma forma que el ensayo con inoculaciones artificiales (apartado 2.4.3.1). Además se tomaron semillas desinfectadas y se sembraron en PDA, 10 semillas por caja y 5 repeticiones por tratamiento, y se repitió el procedimiento en medio PDA + rosa de bengala. El experimento se llevó a cabo en tres ocasiones. Se realizó un diseño experimental completamente al azar y los datos fueron analizados con el software SAS como se describió anteriormente en el apartado 2.3.1.

2.4.3.3 Determinación de la efectividad de *Bacillus subtilis* para el control de patógenos en semillero

El estudio se realizó dentro de un invernadero cuarentenario con condiciones controladas de temperatura y humedad con cinco genotipos de chocho Andino (INIAP-450 ANDINO, F3 (ECU-2658XECU-4815), ECU-2658 y ECU-2700-2). Se evaluó el efecto de *B. subtilis* CptxS2-1 y VITAVAX® (Polvo mojable que contiene 400 g; 200 g de carboxin + 200 g de captan de ingrediente activo por kg de producto comercial; ECUAQUIMICA S. A.) en la reducción de la incidencia de enfermedades y emergencia de plántulas de chocho comparados con semillas sin aplicación de cinco genotipos diferentes como se observa en la Tabla 1.

Tabla 1: Descripción de los 5 genotipos para la determinación de la efectividad de *Bacillus* en el control del semillero.

Cultivar	Origen	Institución contribuidora	Selección por parte del IASA-ESPE
I-450 ANDIO	ECU-2659 introducida del Perú al Ecuador 1992. Evaluada en varios ambiente. Las selecciones fueron hechas y publicadas como I-450 ANDINO cultivar en 1992	INIAP. DENAREF	Plantas individuales con tolerancia a la antracnosis obtenidas luego de 4 años consecutivos de evaluación
F3 (ECU-2658XECU-4815)	Perú, Mantaro Estación experimental de investigación	INIAP. DENAREF	Plantas individuales con tolerancia a la antracnosis obtenidas luego de 4 años consecutivos de evaluación
ECU-2658	Perú, Lima Instituto de nutrición, 200 msnm	INIAP. DENAREF	Plantas individuales con tolerancia a la antracnosis obtenidas luego de 4 años consecutivos de evaluación
ECU-2700-2	Bolivia (UNTA)	INIAP. DENAREF	Plantas individuales con tolerancia a la antracnosis obtenidas luego de 4 años consecutivos de evaluación
I-451 Guaranguito	ECU-2658-2 selección de la línea ECU-2658 proveniente del Perú (1992)	INIAP. DENAREF	Plantas individuales con tolerancia a la antracnosis obtenidas luego de 4 años consecutivos de evaluación

Nota: Se observa la semilla, origen, institución contribuidora y selección por parte del IASA-ESPE.

Cada tratamiento constó de 3 repeticiones donde cada repetición fue un semillero de 50 (5x10). En cada pocillo se inoculó sustrato estéril y se sembraron dos semillas de chocho. Las semillas fueron tratadas previamente con suspensiones de cada uno de los tratamientos de cepas antagonistas (Ctpx S2-1, y el producto comercial VITAVAX®) y posteriormente transferidas al semillero. Los semilleros se colocaron en mesas dentro del invernadero donde se mantuvieron las condiciones de humedad al 60°C a 65°C; temperatura ambiente y 12 horas de fotoperiodo. Los semilleros fueron regados con agua estéril semanalmente. Datos de incidencia y emergencia de plantas

fueron tomados a los 20 días posteriores a la siembra. El ensayo se repitió 2 veces.

3. CAPITULO III. RESULTADOS

3.1 Muestreo de potenciales antagonistas y patógenos

Se tomaron muestras de suelo y filósfera de cultivos de chocho con bajo uso de agroquímicos sintéticos, a partir de los cuales se obtuvieron ocho aislados de las localidades de Salcedo, tres de Zumbahua en la provincia de Cotopaxi, y tres de Guano de la provincia de Chimborazo (Tabla 2).

Tabla 2. Aislados de *Bacillus* spp.

# Muestra	Localidad					
	Cotopaxi			Chimborazo		
	Salcedo			Zumbahua	Guano	
	1	2	3	1	1	2
Código	CtpxS1-1	CtpxS2-1	CtpxS3-5	CtpxZ1	Chim1-1	Chim2-1
	CtpxS1-2	CtpxS2-2	CtpxS3-6	CtpxZ2	Chim1-2	
	CtpxS1-3		CtpxS3-7	CtpxZ3		

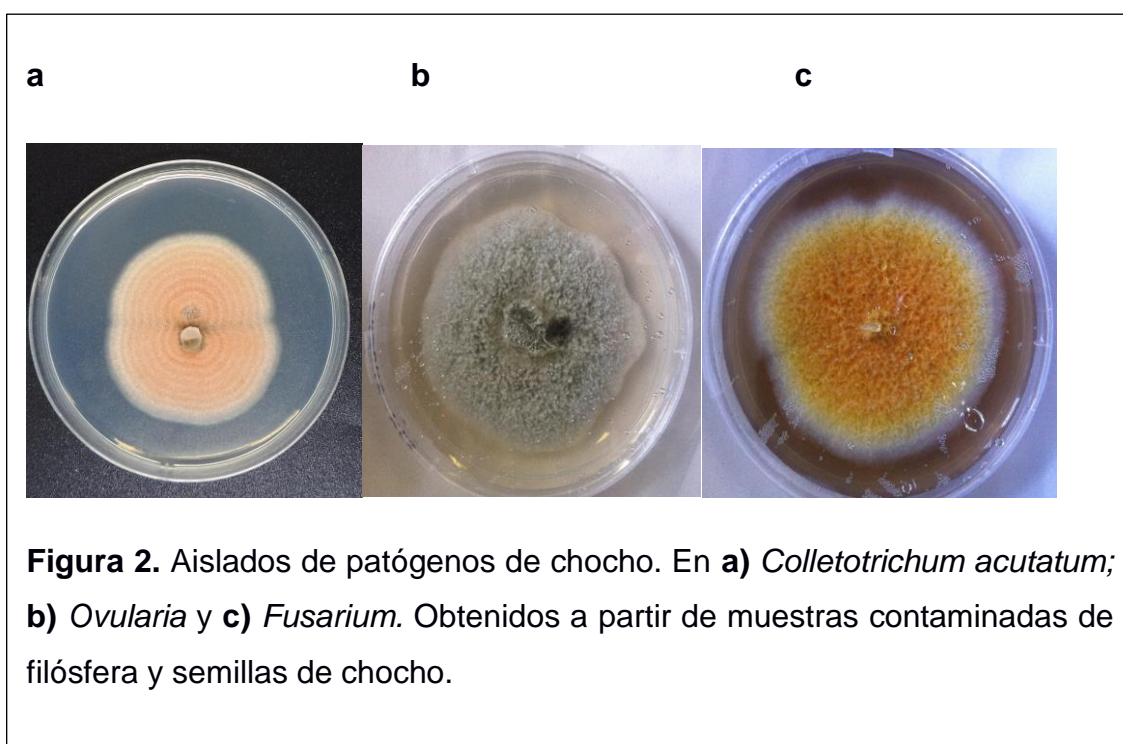
Nota: Obtenidos a partir de muestras de suelo y material vegetal de diferentes localidades de Cotopaxi y Chimborazo.

De las muestras de plantas y semillas enfermas, se aislaron varias muestras de hongos en los diferentes medios, tales como: Papa Dextrosa Agar (PDA) y Agar Nutritivo Levadura Dextrosa (NYDA). Adicionalmente, se aislaron de la superficie de las semillas, hongos identificados como mohos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*.

Las cepas CtpxS1-1, CtpxsS2-1, CtpxS3-5, y CtpxZ3 fueron seleccionadas para ser sometidas a análisis posterior, debido a que mostraron un potencial antagonico contra *Ovularia* y *Fusarium*. Posterior al análisis de inoculación de plantas y semillas con los cuatro aislados fúngicos seleccionados anteriormente, se demostró que los patógenos potencialmente infectan a la planta debido a que, las observadas, presentaron signos y síntomas de podredumbres de poscosecha. Esta comparación se realizó en relación a los aislados patógenos de *Colletotrichum acutatum*, *Ovularia* y *Fusarium*.

3.2. Caracterización de *Bacillus* spp. y patógenos del chocho

En base a la revisión de las características de los aislados de hongos obtenidos a partir de muestras enfermas, las pruebas de reinoculación y las características descritas en Agrios (2005), fueron identificados como hongos del género *Ovularia* y *Fusarium* (Figura 2 a-c). Adicionalmente, los géneros identificados fueron corroborados en base a la comparación de aislados de referencia.



3.2.1. Identificación de antagonistas y patógenos

Una vez seleccionados los aislados CtpxS1-1, CtpxsS2-1, CtpxS3-5, y CtpxZ3, se realizó la identificación de los mismos. Con la información obtenida en la Tabla 2 y a través de pruebas morfológicas y bioquímicas, se procedió a comparar los aislados con las descripciones para especies bacterianas de Bergey (2005) (Anexo 1a-b) y con las características de la cepa de referencia de *Bacillus subtilis*. Se determinó que efectivamente los aislados pertenecen a las bacterias del género *Bacillus* de especie *B. subtilis*.

Tabla 3. Caracterización de aislados bacterianos.

	Prueba	Aislados				
		<i>B. subtilis</i> (referencia)	CtpxS 1-1	Ctpx S2-1	Ctpx S3-5	CtpxZ3
Morfológicas	Gram	+	+	+	+	+
	Forma celular	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo
	Diámetro celular $\geq 1\mu\text{m}$	1.1 μm	1.1 μm	1.2 μm	1 μm	1.1 μm
	Producción de endosporas (70° C/30 min)	+	+	+	+	+
	Anaerobios estrictos	-	-	-	-	-
	Halo de almidón (producción de amilasa)	+	+	+	+	+
	Voges-Proskauer (VP) más creatinina	+	+	+	+	+
Bioquímicas	Citrato	+	+	+	+	+
	Crecimiento en NaCl 6.5% a 37° C	+	+	+	+	+
	Crecimiento en NaCl 6.5% NaCl 55° C	-	-	-	-	-

Nota: Los diferentes ítems muestran características microscópicas y bioquímicas, en base a observaciones morfológicas (macro y microscópicas); las pruebas bioquímicas consistieron en: medios de cultivo, microgen GN-ID A + B + Suplementos y API 20 E. La identificación a nivel de género y especie corresponde a comparación con taxonomía de Bergey (2005) (Anexo 1).

3.2.2. Dinámica de crecimiento de *B. subtilis* y producción de metabolitos antifúngicos

La dinámica de crecimiento de *B. subtilis* se determinó mediante factores como la modelización de crecimiento; producción de células vegetativas y endosporas y producción de metabolitos que se describen a continuación.

3.2.2.1. Modelización de crecimiento

En la Figura 3 (a-d) se muestra el crecimiento de los aislados de *B. subtilis* en medio TSB. En todos los aislados se observa un crecimiento sigmoide característico de bacterias con una fase de latencia, seguida de una fase de crecimiento exponencial y una fase estacionaria durante 0 a 60 horas. Al someter estos datos al análisis de Baranyi y Roberts (1994), se corroboró que los cuatro aislados bacterianos tienen un crecimiento sigmoide con una correlación superior al 0.98.

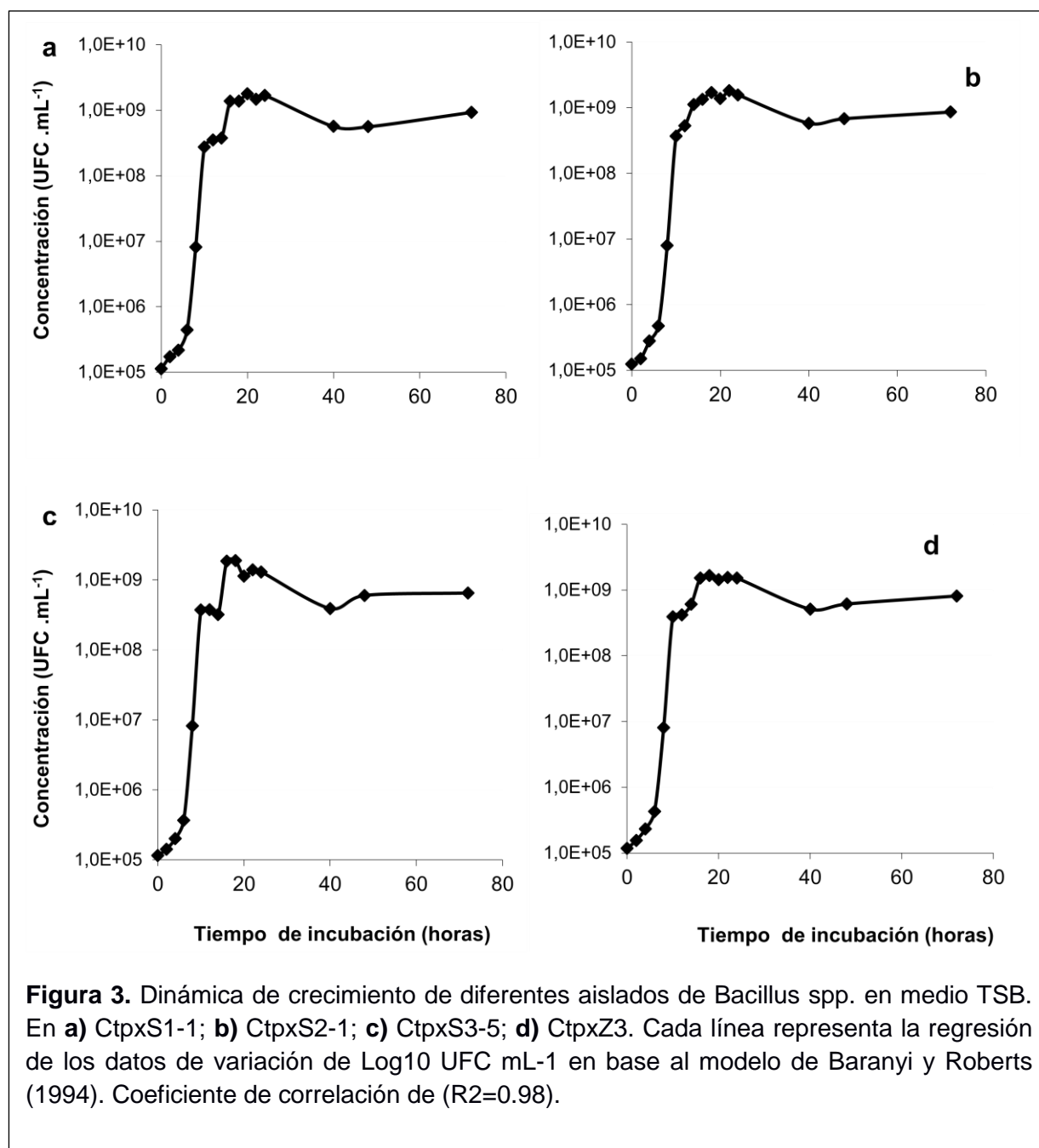


Figura 3. Dinámica de crecimiento de diferentes aislados de *Bacillus* spp. en medio TSB. En **a)** CtpxS1-1; **b)** CtpxS2-1; **c)** CtpxS3-5; **d)** CtpxZ3. Cada línea representa la regresión de los datos de variación de Log₁₀ UFC mL⁻¹ en base al modelo de Baranyi y Roberts (1994). Coeficiente de correlación de (R²=0.98).

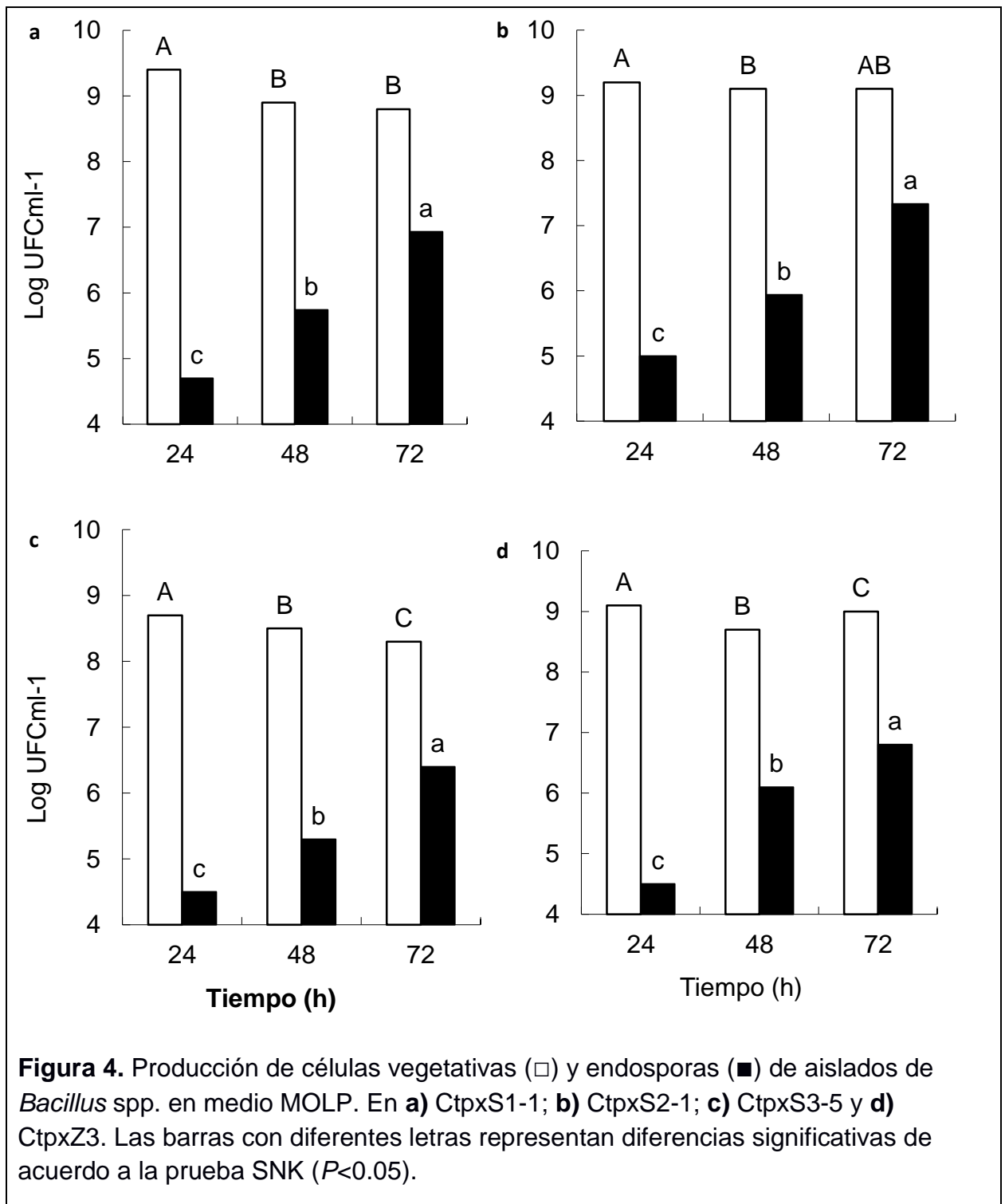
3.2.2.2. Producción de células vegetativas y endosporas

Según se muestra en la Tabla 4 y Figura 4, el crecimiento de células vegetativas no varía significativamente en el transcurso de las horas, mientras que el crecimiento de endosporas incrementa a medida que el tiempo avanza; por lo tanto, se observó mayor concentración a las 72 horas. Los datos corresponden a la media de tres repeticiones para cada tratamiento. Se observa que el aislado CtpxS2-1 muestra niveles de crecimiento más altos, tanto en células totales como en endosporas con un 9.1 y 7.3 respectivamente.

Tabla 4. Producción de células vegetativas y endosporas de diferentes aislados de *Bacillus* spp.

Aislado	Tiempo (h)	# Cel. Totales (Vegetativas + Endosporas)	Endosporas	Significancia SNK	
				Cel. Tot	Endos.
CtpxS1-1	24	9.4	4.7	A	c
	48	8.9	5.7	B	b
	72	8.8	6.9	B	a
CtpxS2-1	24	9.2	5.0	A	c
	48	9.1	5.9	B	b
	72	9.1	7.3	AB	a
CtpxS3-5	24	8.7	4.5	A	c
	48	8.5	5.3	B	b
	72	8.3	6.4	C	a
CtpxZ3	24	9.1	4.5	A	c
	48	8.7	6.1	B	b
	72	9.0	6.8	C	a

Nota: (Log UFC•MI⁻¹) a partir de cultivos de 24, 48 y 72 horas en medio MOLP. Se muestran las concentraciones y la desviación estándar.



Los datos de producción de endospora, son importantes porque tienen una relación directamente proporcional a la producción de metabolitos secundarios, responsables de la actividad antifúngica de las bacterias según estudios reportados para otras cepas de *B. subtilis* (Jacques *et al.*, 1999).

3.2.2.3. Producción de metabolitos antifúngicos

En base a TLC se observó que los extractos lipopéptidos provenientes de metabolitos producidos por los diferentes aislados de *B. subtilis*, produjeron fengycinas, iturrinas y surfactinas; demostrando que los procesos de extracción de metabolitos fueron efectivos. La distancia total recorrida por la fase móvil fue de 17 cm. Se observó patrones de lipopéptidos para cada aislado bajo luz ultravioleta como lo muestra la Figura 5.

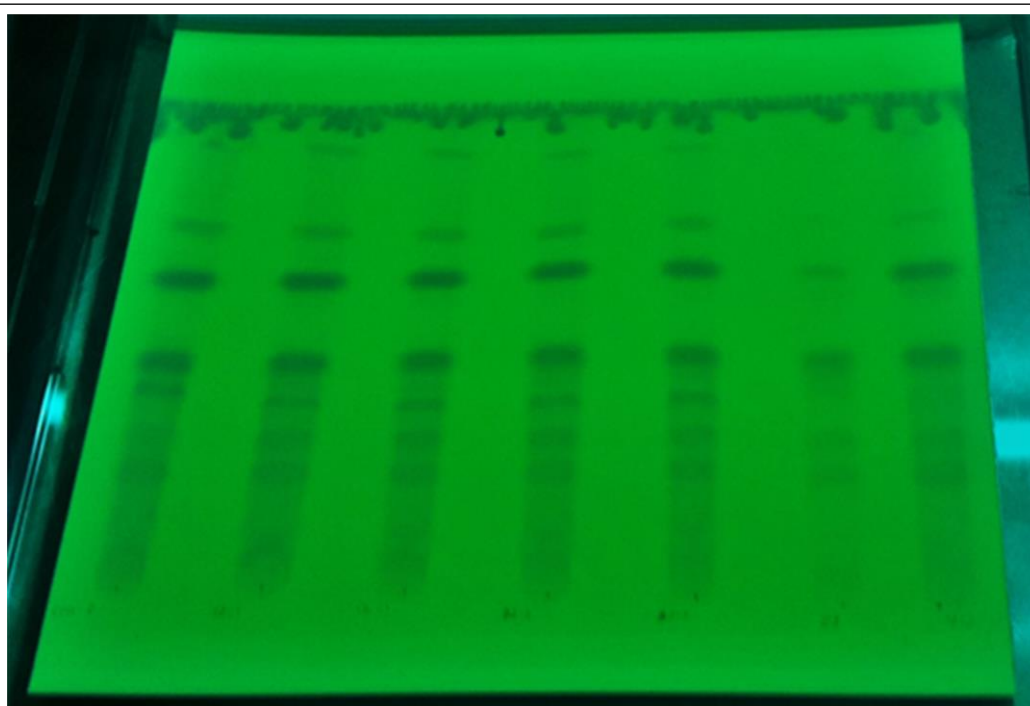


Figure 5. Cromatograma en capa fina (TLC) de lipopéptidos extraídos de aislados de *B. subtilis*.

3.3. Actividad antifúngica *in vitro* de aislados de *Bacillus* spp. contra *Ovularia* y *Fusarium*

La actividad antifúngica *in vitro*, se determinó mediante factores tales como: pruebas duales de antagonismo e inhibición del crecimiento por extracción de lipopéptidos; en ésta última, se llevaron a cabo ensayos como: actividad antifúngica por TLC y autobiografía e identificación molecular de secuencias.

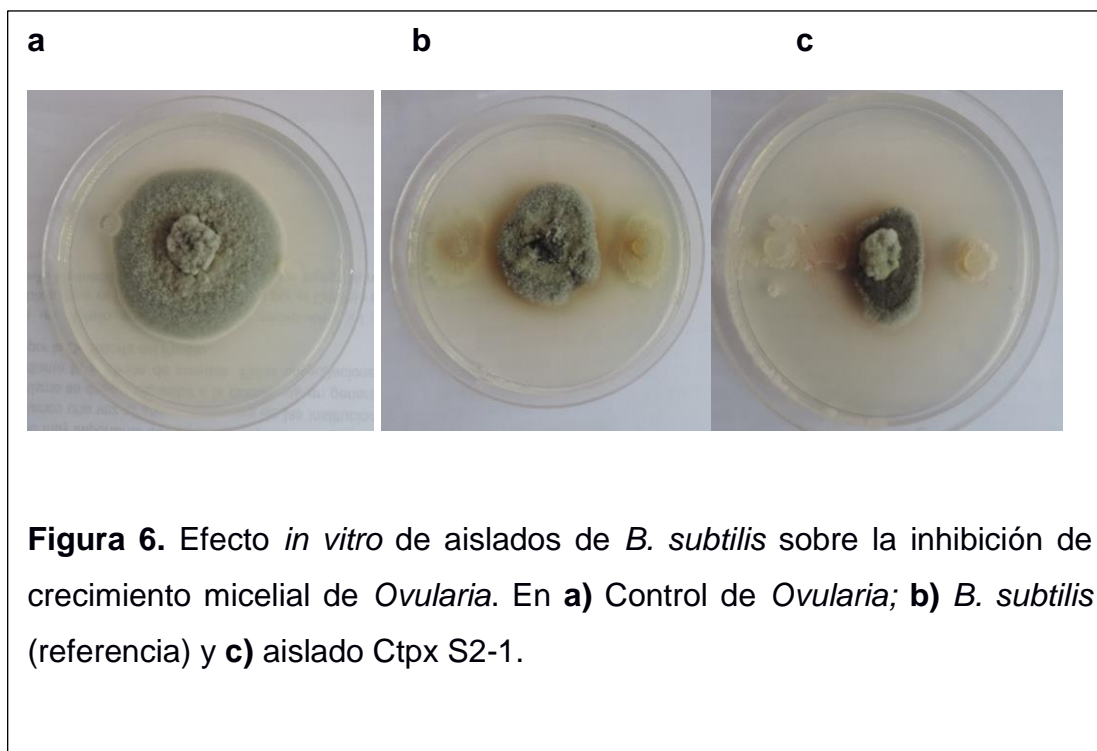
3.3.1. Pruebas duales de antagonismo (biomasa)

Las pruebas duales para el caso de *Ovularia*, demostraron que todos los aislados bacterianos tienen un porcentaje inhibitorio contra el patógeno entre un 49.7% a 56.8 % comparados con el 0% del control sin bacteria (Tabla 5; Figura 6a-c).

Tabla 5: Efecto de distintos aislados de *B. subtilis* en la inhibición del crecimiento de *Ovularia* en pruebas duales.

Tratamientos	Crecimiento (Ø cm)	Inhibición (%)	Significancia SNK
CK: <i>Ovularia</i>	4.5±0.7	0.0±0.0	B
<i>B. subtilis</i> referencia <i>Ovularia</i>	2.3±0.1	51.6±2.7	A
CtxS1-1 - <i>Ovularia</i>	2.4±0.3	49.7±8.5	A
CtxS2-1 - <i>Ovularia</i>	2.1±0.3	56.8±6.2	A
CtxS3-5 - <i>Ovularia</i>	2.2±0.3	53.1±7.6	A
CtxZ3 - <i>Ovularia</i>	3.1±0.3	51.1±7.9	A

Nota: Se muestra la desviación estándar y significancia SNK ($P < 0.05$).



El análisis estadístico (SNK $P<0.05$) demostró que, todos los aislados tienen efectividad para inhibir al patógeno comparados con la cepa de referencia de *B. subtilis* y el control sin bacteria. Entre los aislados, no existieron diferencias significativas ya que poseen un porcentaje de inhibición similar. Los aislados de mayor actividad de inhibición fueron CtxS2-1, CtxS3-5 y CtxZ3. La prueba SNK agrupó los aislados con mayor inhibición en el grupo A y bajo porcentaje de inhibición en el grupo B. Los datos corresponden a la media de cinco repeticiones para cada tratamiento.

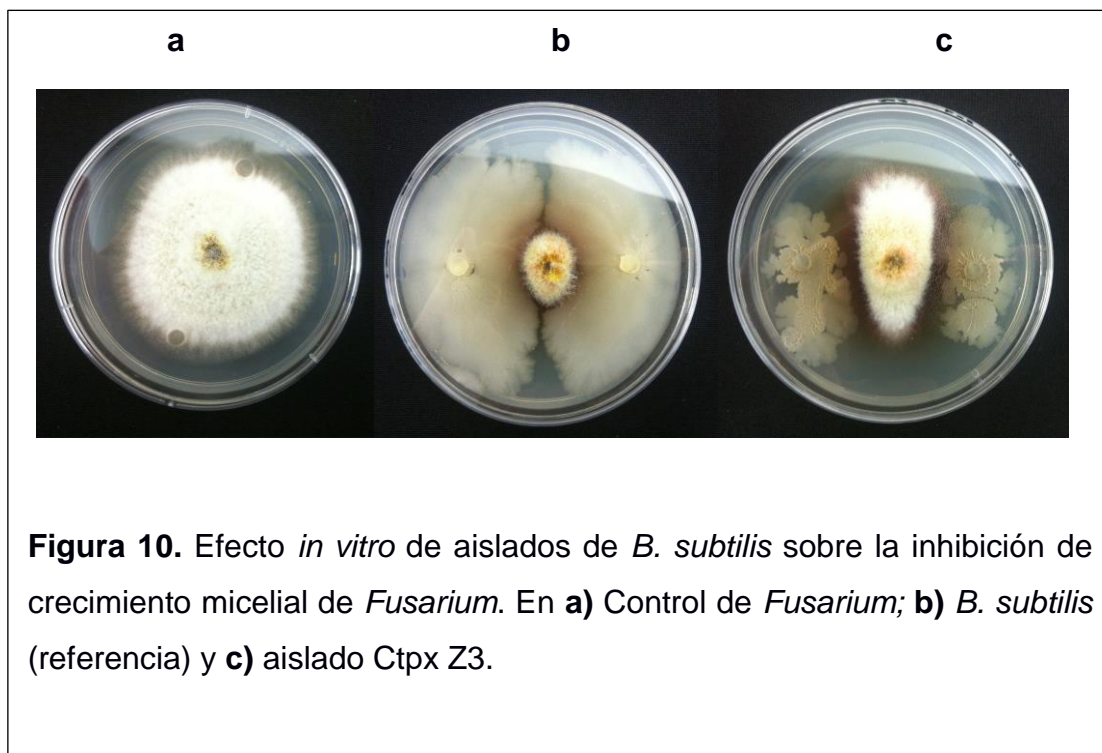
En el caso de *Fusarium*, las pruebas duales demostraron que los aislados bacterianos de *B. subtilis* tienen un porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del patógeno entre 40% y 59.1% como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6: Efecto de distintos aislados de *B. subtilis* en la inhibición del crecimiento de *Fusarium* en pruebas duales.

Tratamientos	Crecimiento (\emptyset cm)	Inhibición (%)	Significancia SNK
CK: <i>Fusarium</i>	4.7 \pm 0.6	0.0 \pm 0.0	C
<i>B. subtilis</i> referencia <i>Fusarium</i>	3.1 \pm 0.4	40.0 \pm 5.7	B
CtxS1-1 <i>Fusarium</i>	3.0 \pm 0.0	42.2 \pm 3.0	B
CtxS2-1 <i>Fusarium</i>	2.9 \pm 0.1	59.1 \pm 5.2	A
CtxS3-5 <i>Fusarium</i>	2.6 \pm 0.2	53.1 \pm 5.6	A
CtxZ3 <i>Fusarium</i>	2.8 \pm 0.1	43.7 \pm 2.8	B

Nota: Se muestra la desviación estándar y significancia SNK ($P<0.05$)

El análisis estadístico con la prueba de SNK ($P < 0.05$), demostró la existencia de diferencias significativas entre los aislados bacterianos y el control sin bacteria. Los aislados Ctpx S2-1 y Ctpx S3-5 fueron los que presentaron los porcentajes más altos de inhibición de *Fusarium* comparados con el control sin bacteria y la cepa de referencia. Los datos corresponden a la media de cinco repeticiones para cada tratamiento (Figura 10).



Los aislados presentan diferencias significativas entre ellas. La prueba SNK agrupó los aislados Ctpx S2-1 y Ctpx S2-1 con mayor efecto de inhibición en el grupo A; seguido de CtpxS1-1, CtpxZ3 y *B. subtilis* de referencia bajo porcentaje de inhibición en el grupo B y el control sin actividad inhibitoria en el grupo C.

Todos los resultados de las pruebas de antagonismo comparados con los reportados por Yáñez *et al.* 2011 demuestran que los aislados de *B. subtilis* tienen capacidad para inhibir el crecimiento *in vitro* de *Ovularia* y *Fusarium*.

3.3.2. Inhibición del crecimiento de *Ovularia* y *Fusarium* por tratamientos de extractos de lipopéptidos de *B. subtilis*

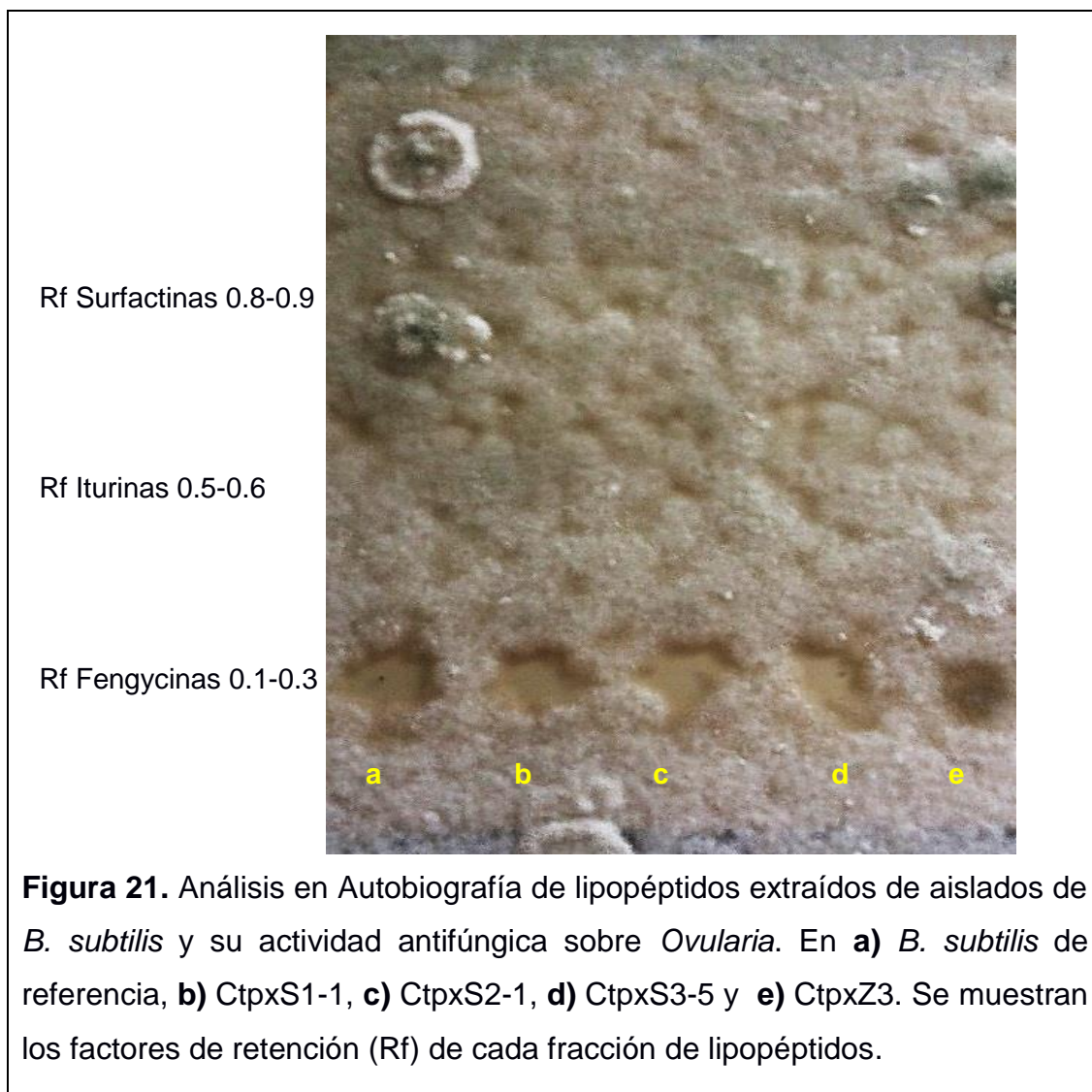
El efecto en la inhibición del crecimiento micelial de *Ovularia* y *Fusarium* a partir de extractos de lipopéptidos obtenidos de metabolitos de los cuatro aislados de *B. subtilis* mostraron resultados positivos. Dichos resultados se muestran gracias a las pruebas de actividad antifúngica para análisis en TLC y autobiografía y los resultados fueron corroborados mediante biología molecular con amplificación de genes que codifican para fungicidas.

3.3.2.1. Actividad antifúngica determinada, por TLC y Autobiografía

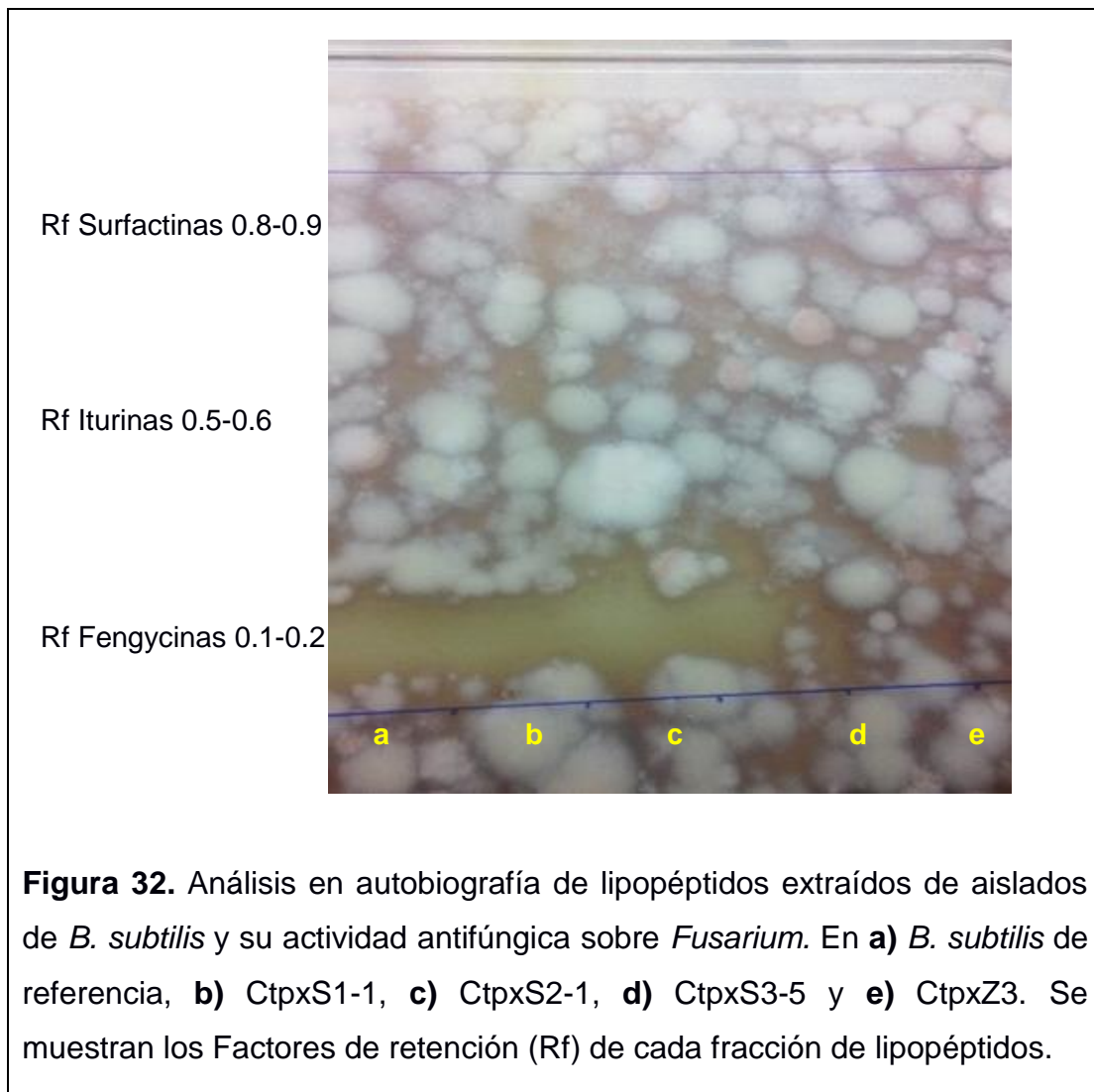
A partir del análisis en TLC (apartado 3.2.2.3), los extractos de lipopéptidos provenientes de los aislados de *B. subtilis* seleccionados, demostraron producir lipopéptidos de las familias fengycinas, iturrinas y surfactinas. Posteriormente al analizar los perfiles de lipopéptidos de la TLC en autobiografía con micelio activo de *Ovularia* (Figura 11), las fracciones correspondientes a fengycinas demostraron tener diferentes grados de inhibición micelial. Los aislados con mayor inhibición fueron CtpxS1-1; CtpxS2-1 y CtpxS3-5 comparadas con la *B. subtilis* (referencia 1); mientras que el aislado CtpxZ3 no presentó un efecto inhibitorio.

Los resultados mostraron claramente que la actividad antifúngica, corresponde al grupo de los fengycinas ya que los datos de factor de retención (Rf) de los aislados con mayor inhibición se encuentran en el rango de 0.1 a 0.3. Las fracciones correspondientes a iturrinas y surfactinas no demostraron actividad inhibitoria.

Estos resultados, comparados del efecto de fracciones de lipopéptidos del grupo de fengycinas, concuerdan con los reportados por Yáñez *et al.* (2012c) para *Monilinia fructicola* en melocotón y por Romero *et al.* (2007) para *Podosphaera fusca* en cucurbitáceas; y constituye, un nuevo reporte para *Ovularia* en chocho andino.



Los extractos de lipopéptidos de *Bacillus subtilis* mostraron efectividad para la inhibición de micelio en *Fusarium* (Figura 12). Los aislados con mayor inhibición fueron *B. subtilis* (referencia 1) y CtpxS2-1 a diferencia del aislado CtpxZ3 que no presentó efecto inhibitorio. El aislado CtpxS3-5, mostró una efectividad media comparada con CtpxS2-1 y la cepa *B. subtilis* (referencia 1). Los resultados mostraron que la actividad antifúngica, corresponde al grupo de los fengycinas ya que los datos de Rf de los aislados con mayor inhibición se encuentran en el rango de 0.2; sin embargo, no se muestra una actividad correspondiente a iturinas.



Los resultados obtenidos en las pruebas duales de antagonismo con biomasa y en los análisis de la actividad antifúngica de lipopéptidos TLC y Autobiografía, demuestran los cuatro aislados que poseen actividad antifúngica *in vitro* sobre *Ovularia* y *Fusarium*, por lo cual fueron promisorios para ser evaluados en ensayos de efectividad.

3.3.2.2. Identificación molecular de secuencias que codifican para lipopéptidos

En la reacción de PCR se corroboró que la síntesis de metabolitos antifúngicos, se debió a la expresión de genes que codifican para lipopéptidos, específicamente de la familia de las fengycinas. Se observó que los aislados CtpxS2-1 y CtpxS3-5 mostraron una amplificación del gen *fenB*, al igual que la

cepa de referencia; mientras que CtpxZ3, no mostró amplificación para este gen (Figura 13). Los resultados obtenidos tanto del análisis en autobiografía y molecular son similares a los obtenidos por Yáñez y colaboradores (2012c) de la actividad antifúngica de lipoproteínas producidas por bacterias de la especie *B. subtilis* y potencial de biocontrol; además, constituyen un reporte inédito para aislado con capacidad de biocontrol de enfermedades de poscosecha de chocho.

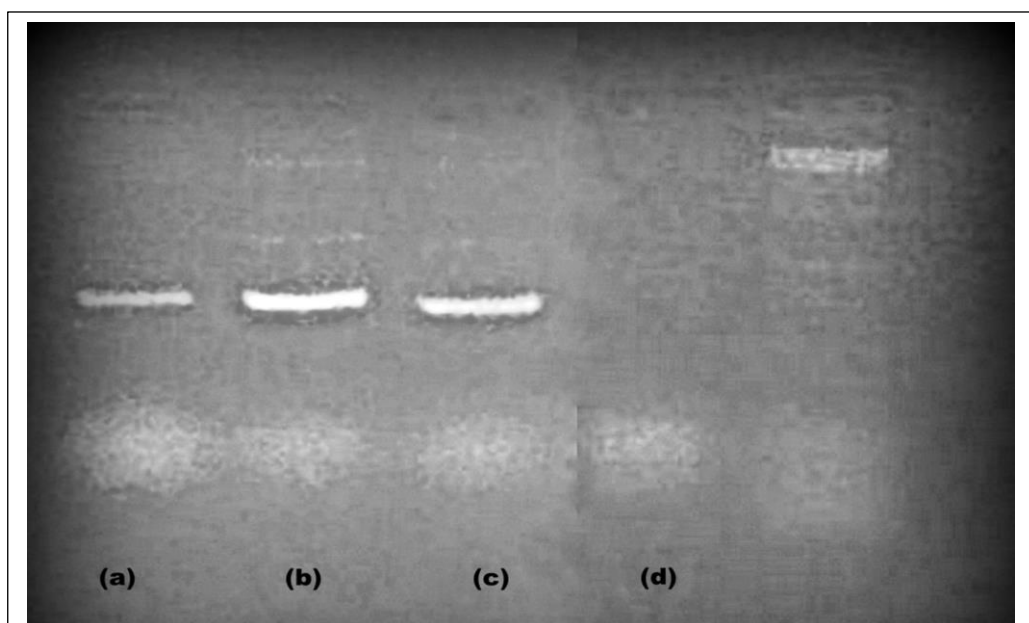


Figura 53. Gel de electroforesis de la reacción de PCR con las muestras de *B. subtilis* amplificadas para gen fenB (~1481 bp). **a)** *B. subtilis* de referencia; **b)** Ctpx S2-1; **c)** Ctpx S3-5; **d)** CtpxZ3. Se observa los productos PCR amplificados de las muestras

3.4. Efectividad *in vivo* de aislados de *Bacillus* spp. contra *Ovularia* y *Fusarium* en semillas

La efectividad *in vivo* de los aislados de *Bacillus* spp determinó efectividad para el control de *Ovularia* y *Fusarium* de hasta un 13% y 40% respectivamente.

3.4.1. Calidad de las semillas

El análisis de calidad de los diferentes lotes de *L. mutabilis* de la variedad “INIAP 450 Andino”, demostró tener un porcentaje de germinación y

emergencia de alrededor del 90%. En comparación con los lotes de semilla del agricultor, demostró tener una germinación más baja del 60%. A partir de semillas enfermas (en germinación y semillero), se aislaron hongos patógenos de *C. acutatum*; *Ovularia*; *Fusarium* y otros como *Aspergillus* y *Penicillium*.

3.4.2. Determinación de la efectividad de aislados de *Bacillus* spp. (Inoculaciones artificiales)

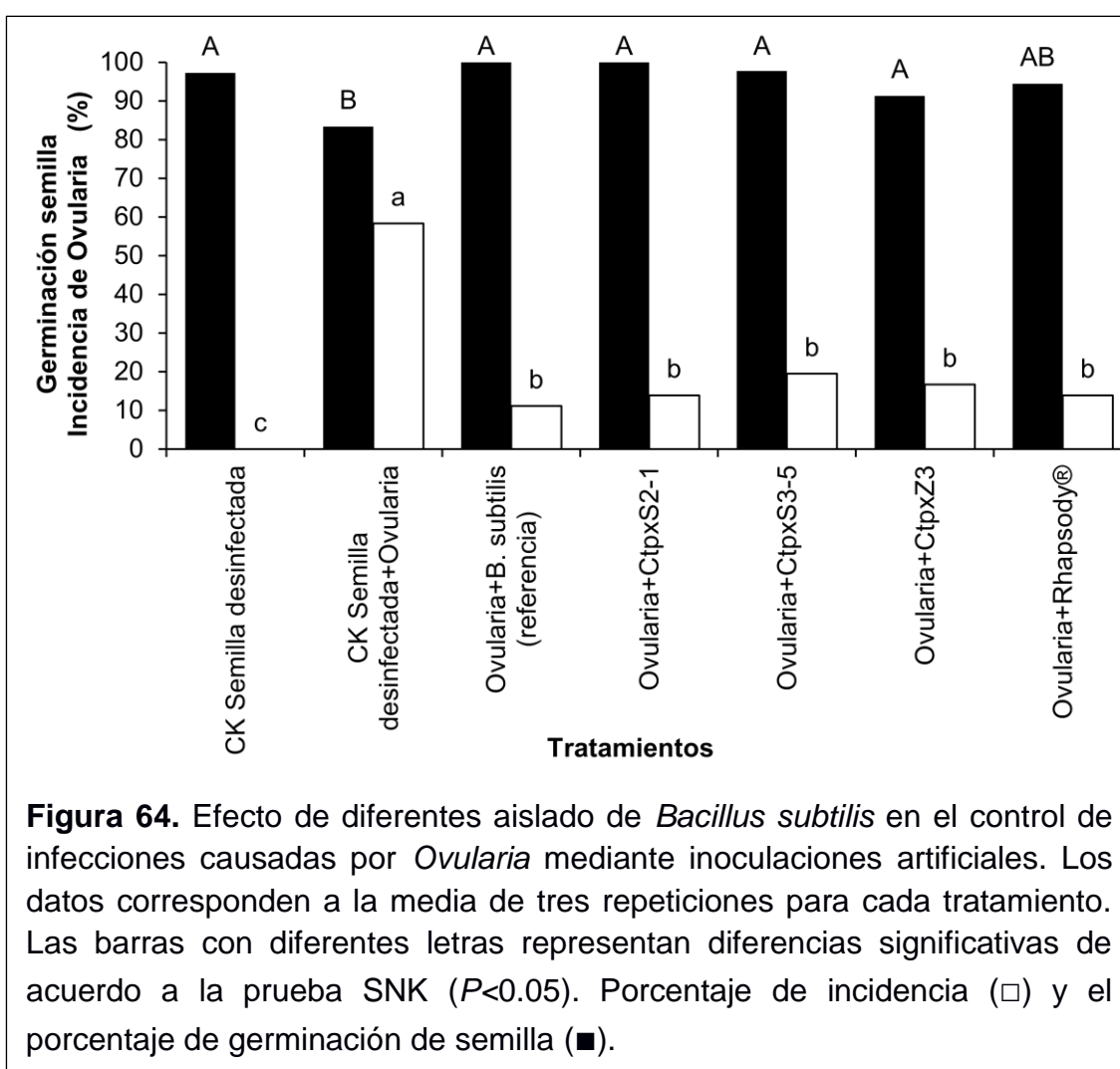
En las pruebas de efectividad con inoculaciones artificiales, con *Ovularia*, se demostró que todos los aislados tienen efectividad para inhibir al patógeno. En todos los tratamientos, se observó un porcentaje de germinación de la semilla de hasta el 100% y de reducción de la incidencia contra el patógeno entre un 11.1% a 13.9 %, exceptuando un 58% del control de la semilla inoculada con la bacteria, en comparación con el 0% del control de semilla desinfectada. (Tabla 7).

Tabla 7. Efectividad de *B. subtilis* en la reducción de *Ovularia* y la germinación de semilla artificialmente inoculada.

Tratamiento	Germinación (%)	Incidencia (%)	Significancia SNK	
			Germ	Inc
CK: Sem. Desinfectada	97.0±5.0	0.0±0.0	A	c
CK: <i>Ovularia</i>	83.3±2.8	58.0±1.4	B	a
<i>Ovularia</i> + <i>B. subtilis</i> (referencia1)	100.0±0.0	11.1±4.8	A	b
<i>Ovularia</i> + CtpxS2-1	100.0±0.5	13.9±5.0	A	b
<i>Ovularia</i> + CtpxS3-5	97.7±1.5	19.4±4.8	A	b
<i>Ovularia</i> + CtpxZ3	91.3±9.6	16.7±8.3	A	b
<i>Ovularia</i> + Rhapsody®	94.4±4.8	13.9±4.8	AB	b

Nota: Los datos representan la medida de tres repeticiones por tratamiento. Se presentan los datos de desviación estándar y significancia SNK.

El análisis estadístico SNK ($P<0.05$) demostró que todos los aislados tienen efectividad para inhibir al patógeno comparados con el control de la semilla con el patógeno y el control sin bacteria. Entre los aislados no existieron diferencias estadísticas significativas ya que poseen porcentajes de incidencia similar. La prueba SNK agrupó los aislados con mayor germinación en el grupo A, bajo porcentaje de germinación en el B; además agrupó los aislados con reducción de la incidencia en el grupo b, aumento incidencia en el grupo a y el control sin actividad en el grupo c. En la Figura 14 se muestra el análisis estadístico SNK ($P<0.05$)



En las pruebas de efectividad con *Fusarium*, los aislados bacterianos de *B. subtilis* demostraron una incidencia del patógeno entre 12.5% a un 40%. (Tabla 8).

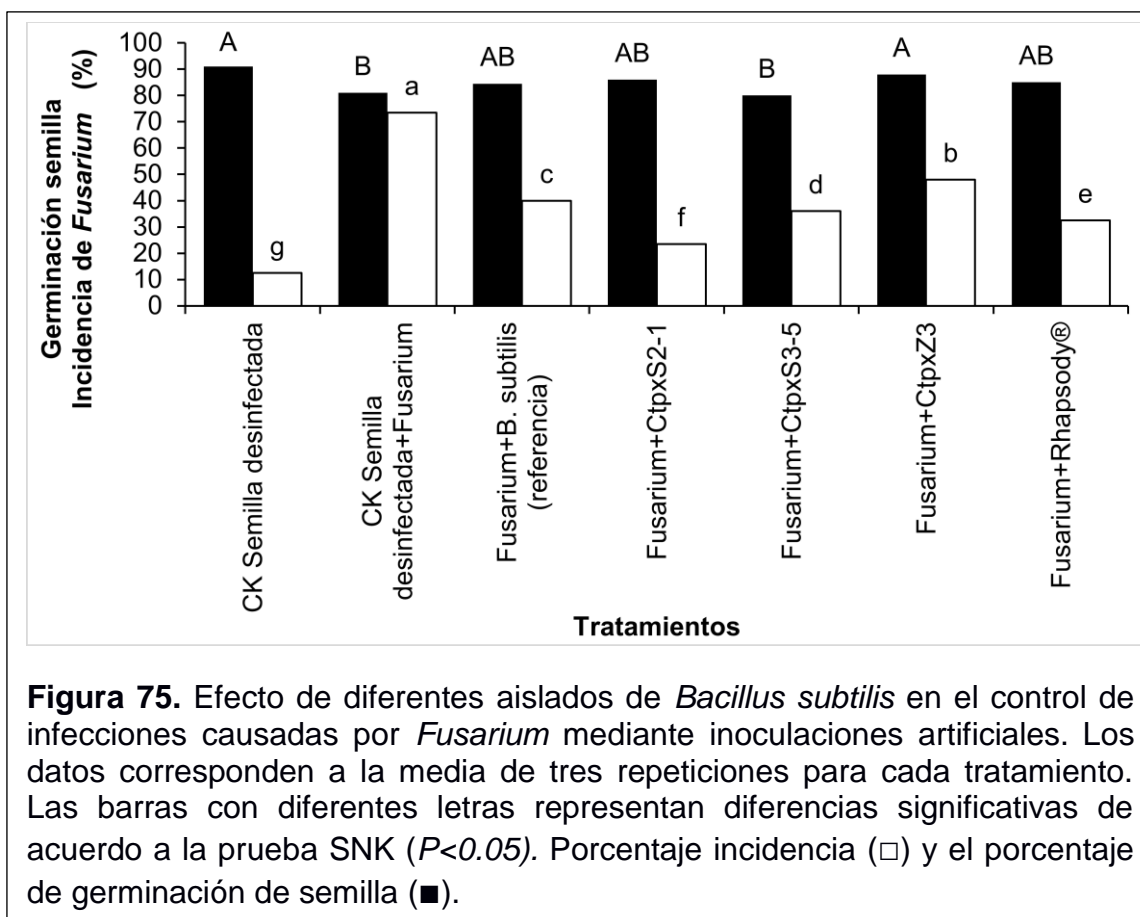
Tabla 8: Efectividad de aislados de *Bacillus subtilis* en la reducción de *Fusarium* y la germinación de semilla artificialmente inoculada.

Tratamiento	Germinación (%)	Incidencia (%)	Significancia SNK	
			Germ	Inc
CK: Sem. Desinfectada	91.0±2.0	12.5±1.0	A	g
CK: <i>Fusarium</i>	81.0±1.2	73.3±2.3	B	a
<i>Fusarium</i> + <i>B. subtilis</i> (referencia1)	84.5±6.0	40.0±2.1	AB	c
<i>Fusarium</i> + CtpxS2-1	86.0±1.2	23.5±2.0	AB	f
<i>Fusarium</i> + CtpxS3-5	80.0±2.0	36.0±0.5	B	d
<i>Fusarium</i> + CtpxZ3	88.0±3.1	48.0±5.0	A	b
<i>Fusarium</i> + Rhapsody®	85.0±1.2	32.7±1.3	AB	e

Nota: Los datos representan la media de tres repeticiones para cada tratamiento. Se presentan datos de desviación estándar y significancia SNK ($P<0.05$)

El análisis estadístico con la prueba de SNK ($P<0.05$), demostró la existencia de diferencias significativas entre los aislados bacterianos y el control sin bacteria.

Los aislados CtpxS2-1 y el producto comercial Rhapsody® fueron los que presentaron los porcentajes más bajos de incidencia, 23.5% y 32.7% respectivamente, comparados con el control con bacteria y los aislados de referencia (Figura 15).



La prueba SNK clasificó a los aislados según el aumento o disminución de su porcentaje de incidencia y por sus diferencias significativas en distintos grupos: **a)** CK + *Fusarium*, **b)** CtpxZ3, **c)** *B. subtilis* (referencia1), **d)** CtpxS3-5, **e)** Rhapsody®, **f)** CtpxS2-1 y **g)** CK: Semilla desinfectada. También se observa que la prueba agrupó los aislados según su porcentaje de germinación, donde los aislados CtpxZ3 y el control sin patógeno se encuentran en el grupo A representando a los porcentajes más altos de germinación, seguido de CK + *Fusarium* y CtpxS3-5 bajo porcentaje de germinación B y CtpxS2-1, *B. subtilis* (referencia1) y el producto comercial Rhapsody® en el grupo AB los mismos que no mostraron diferencias significativas.

3.4.3. Determinación de la efectividad de aislados de *Bacillus* spp. (Infecciones latentes)

Los ensayos de efectividad con infecciones latentes, demostraron que la semilla tratada con los cuatro aislados antagónicos, presentó una incidencia menor en comparación al control y la que no fue tratada (Tabla 9).

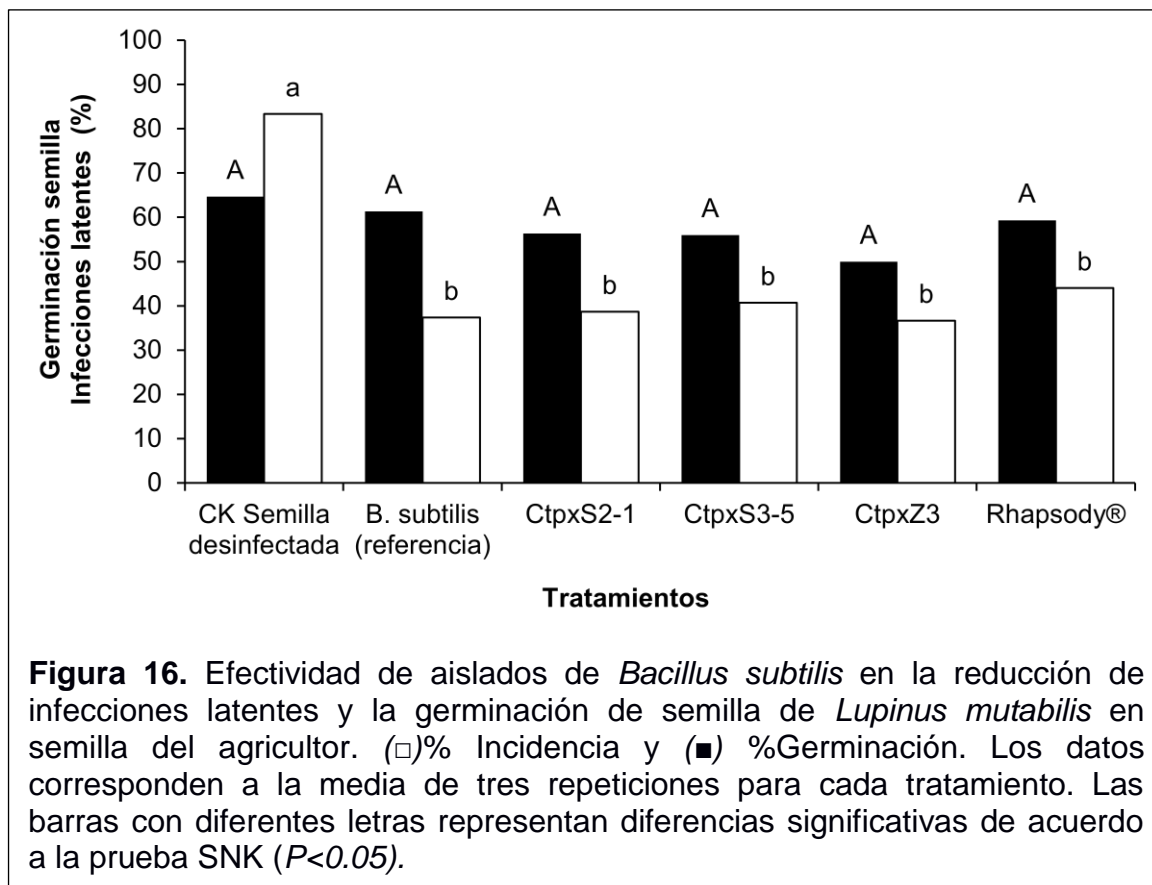
Tabla 9: Efectividad de aislados de *Bacillus subtilis* en la reducción de infecciones latentes y la germinación de semilla de *Lupinus mutabilis* en semilla del agricultor.

Tratamiento	Incidencia (%)	Germinación (%)	Significancia SNK	
			Ger	Inc
Control	83.3±5,6	64.7±4.2	A	a
B. subtilis (referencia)	37.3±6.4	61.3±1.2	A	b
CtpxS2-1	38.7±9.6	56.3±14.3	A	b
CtpxS3-5	40.7±3.2	56.0±2.0	A	b
CtpxZ3	50.0±5.3	50.0±5.3	A	b
Rhapsody®	44.4±0.0	59.3±3.1	A	b

Nota: Los datos corresponden a la media de tres repeticiones para cada tratamiento. Representan las medias de los diferentes tratamientos. Se muestra la desviación estándar y significancia de la prueba SNK ($P < 0.05$).

Se puede decir que los aislados de *Bacillus*, tuvieron efectividad en el control de los patógenos poscosecha que afectan al chocho. También se observó que no afectaron a la germinación.

Los porcentajes de incidencia, mostraron diferencias significativas por lo que el análisis estadístico SNK ($P < 0.05$) los agrupa en: **a)** control (CK: semilla desinfectada) con el porcentaje más alto de incidencia y en el grupo **b)** con una incidencia menor; en éste grupo se encuentran los tratamiento B. subtilis (referencia1) y CtpxS2-1 con porcentajes de 37.3% y 38% respectivamente. En cuanto a la germinación los resultados mostraron que no existieron diferencias significativas.



3.4.3 Determinación de la efectividad de *Bacillus* en campo

Los ensayos de efectividad de *Bacillus* con cinco genotipos de chocho (ver apartado 2.4.3.3), demostraron reducción significativa de la incidencia en comparación al control con semilla no tratada como se observa en la figura 16.

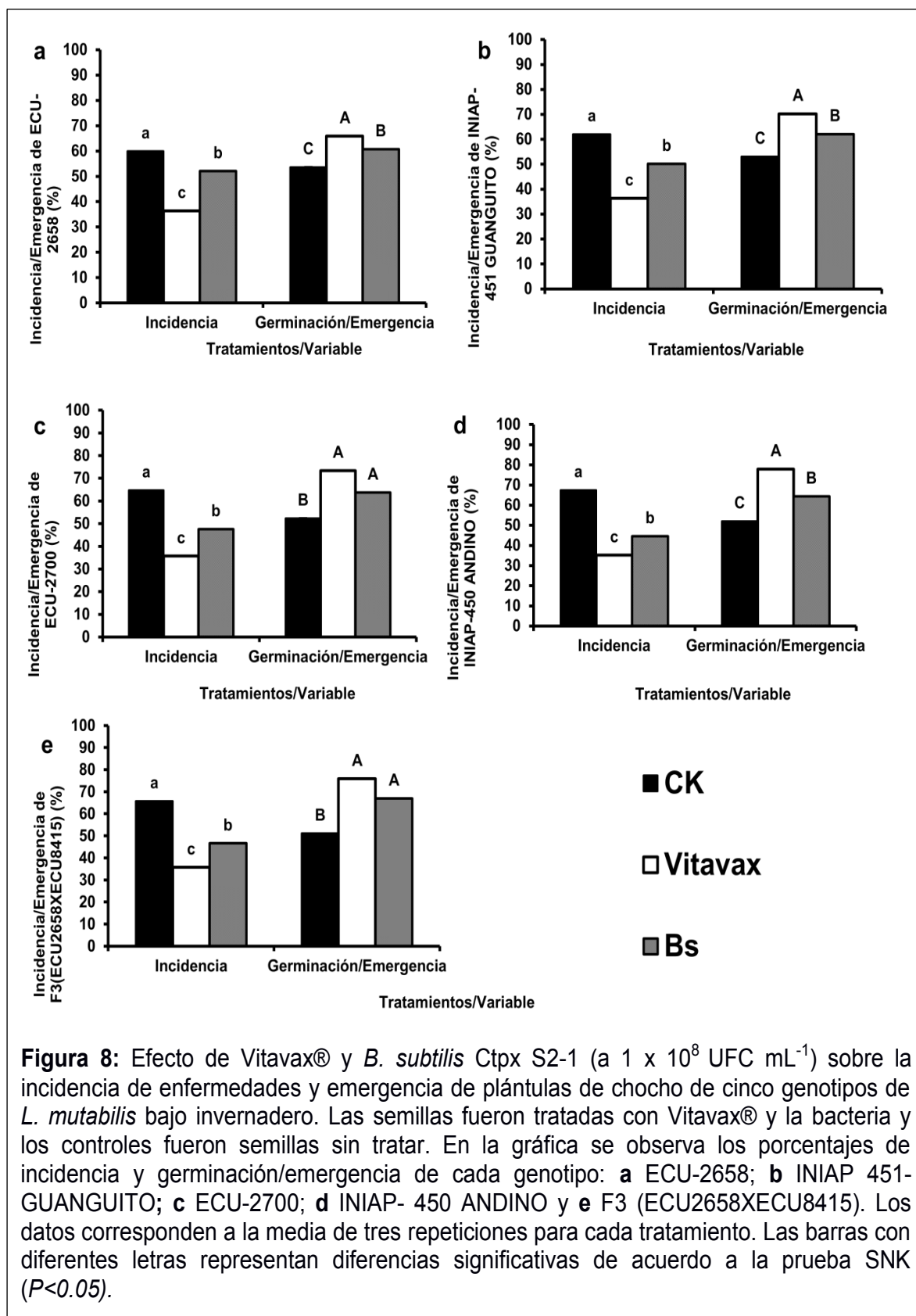


Figura 8: Efecto de Vitavax® y *B. subtilis* Ctpx S2-1 (a 1×10^8 UFC mL⁻¹) sobre la incidencia de enfermedades y emergencia de plántulas de chocho de cinco genotipos de *L. mutabilis* bajo invernadero. Las semillas fueron tratadas con Vitavax® y la bacteria y los controles fueron semillas sin tratar. En la gráfica se observa los porcentajes de incidencia y germinación/emergencia de cada genotipo: **a** ECU-2658; **b** INIAP 451-GUANGUITO; **c** ECU-2700; **d** INIAP- 450 ANDINO y **e** F3 (ECU2658XECU8415). 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 ($P < 0.05$).

Para el primer ensayo, con el lote ECU-2658 (Figura 17a), la semilla tratada con VITAVAX® y CtpxS2-1 presentó una reducción significativa de la incidencia desde 52.1% y 36.4%, respectivamente en comparación el 59.9% de la semilla no tratada (control). De modo que se puede decir, que tanto el producto químico y *Bacillus* fueron efectivos en el control de infecciones que afectan al chocho. El análisis estadístico SNK ($P < 0.05$) ordenó los grupos de la siguiente manera para el caso de incidencia: **a)** mayor porcentaje a la semilla no tratada (control), **b)** menor porcentaje (Bs CtpxS2-1) y **c)** porcentaje más bajo (VITAVAX®). El aumento significativo de la germinación se observó en la semilla tratada con el producto químico y la bacteria (65.8% y 59.9% respectivamente) en comparación con la semilla no tratada (control) con un 52.4%. El análisis estadístico SNK ($P < 0.05$) determinó para germinación los grupos de la siguiente manera: **A)** mayor porcentaje (VITAVAX®), **B)** menor porcentaje (Bs CtpxS2-1) y **C)** porcentaje más bajo a la semilla no tratada (control).

Para el segundo ensayo, se utilizó la semilla INIAP-451 GUANGUITO (Figura 17b). Se observó que la semilla tratada con el producto comercial VITAVAX® y los aislados CtpxS2-1 presentó una reducción significativa de la incidencia en un 32.2% y 44.6% respectivamente en comparación al 67.51% con la semilla no tratada (control). De tal forma que tanto el producto químico y *Bacillus* fueron efectivos en el control de infecciones que afectan al chocho. El análisis estadístico SNK ($P < 0.05$) ordenó los grupos de la siguiente manera para el caso de incidencia: **a)** mayor porcentaje a la semilla no tratada (control), **b)** menor porcentaje (Bs CtpxS2-1) y **c)** porcentaje más bajo (VITAVAX®). La germinación se vio afectada con un aumento significativo en la semilla tratada con el producto químico y la bacteria con un 70% y 60% respectivamente, a comparación de la semilla no tratada (control) con un 51%. El análisis estadístico SNK ($P < 0.05$) determinó para germinación los grupos de la siguiente manera: **A)** mayor porcentaje (VITAVAX®), **B)** menor porcentaje (Bs CtpxS2-1) y **C)** porcentaje más bajo a la semilla no tratada (control).

En el tercer ensayo, (Figura 17c) en el que se utilizó un lote ECU-2700, se observó que la semilla tratada con el producto comercial VITAVAX® y los aislados CtpxS2-1 presentaron una reducción significativa de la incidencia desde 34.94% y 49.86% respectivamente en comparación de la semilla no tratada (control) con un 66.9%. Tanto el producto como los aislados de *Bacillus* ejercen un poder antagónico frente a los patógenos que afectan al chocho. El análisis estadístico SNK ($P < 0.05$) presentó los grupos en el siguiente orden para el caso de incidencia: **a)** mayor porcentaje a la semilla no tratada (control), **b)** menor porcentaje (Bs CtpxS2-1) y **c)** porcentaje más bajo (VITAVAX®). Los porcentajes de germinación son favorables con un aumento significativo en la semilla tratada con el producto químico y la bacteria con un 71.8% y 62.4% respectivamente, a comparación de la semilla no tratada (control) con un 51%. El análisis estadístico SNK ($P < 0.05$) determinó para germinación los grupos de la siguiente manera: **A)** mayor porcentaje VITAVAX® y Bs CtpxS2-1; y **B)** porcentaje más bajo a la semilla no tratada (control).

Para el cuarto ensayo se utilizó la semilla INIAP-450 ANDINO (Figura 17d) se observó que la semilla tratada con el producto comercial VITAVAX® y los aislados Ctpx S2-1 presentaron una disminución significativa de la incidencia en un 35.62% y 46.81% comparación a la semillas no tratadas (control) con un 68.79%. El análisis estadístico SNK ($P < 0.05$) ordenó los grupos de la siguiente manera para el caso de incidencia: **a)** mayor porcentaje a la semilla no tratada (control), **b)** menor porcentaje (Bs CtpxS2-1) y **c)** porcentaje más bajo (VITAVAX®). El aumento significativo de la germinación se observó en la semilla tratada con el producto químico y la bacteria (60.8% y 70.9% respectivamente) a comparación de la semilla no tratada (control) con un 50.8%. El análisis estadístico SNK ($P < 0.05$) determinó para germinación los grupos de la siguiente manera: **A)** mayor porcentaje (VITAVAX®), **B)** menor porcentaje (Bs CtpxS2-1) y **C)** porcentaje más bajo a la semilla no tratada (control).

En la semilla FE (ECU2658 X ECU8415) (Figura 17e) se observó que la semilla tratada con el producto comercial VITAVAX® y los aislados CtpxS2-1

presentaron una disminución significativa en la incidencia desde 35.50% y un 48.40% respectivamente en comparación el 65.38% de las semillas no tratadas (control). De modo que se puede decir que tanto el producto químico y Bacillus fueron efectivos en el control de infecciones que afectan al chocho. El análisis estadístico SNK ($P < 0.05$) ordenó los grupos de la siguiente manera para el caso de incidencia: **a)** mayor porcentaje a la semilla no tratada (control), **b)** menor porcentaje (Bs CtpxS2-1) y **c)** porcentaje más bajo (VITAVAX®). Se observó un aumento significativo de la germinación de la semilla tratada con el producto químico y la bacteria con un 76.4% y 69.05% respectivamente, a comparación de la semilla no tratada (control) con un 52%. El análisis estadístico SNK ($P < 0.05$) presentó los grupos para germinación ordenados de la siguiente manera: **A)** mayor porcentaje VITAVAX® y Bs CtpxS2-1; y **B)** porcentaje más bajo a la semilla no tratada (control).

4. CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

Se aislaron cepas de *Bacillus spp* de las muestras obtenidas del suelo y filósfera de localidades de Salcedo y Zumbahua; las mismas que demostraron actividad antagónica, por lo que fueron seleccionadas para los análisis posteriores.

Los ensayos de caracterización con los aislados bacterianos provenientes de localidades productoras de chocho, mediante pruebas morfológicas (microscópicas), bioquímicas y de actividad antifúngica preliminar, demostraron pertenecer al género *Bacillus* y la especie *B. subtilis*.

Los ensayos de actividad antifúngica mediante pruebas de antagonismo *in vitro* como extracción de lipopéptidos, pruebas de antagonismo duales y cromatografía de capa fina (TLC), demostraron que los cuatro aislados seleccionados y sus metabolitos tienen actividad antifúngica contra *Ovularia* y *Fusarium*.

Los análisis moleculares junto con los de autobiografías, dieron como resultado que los lipopéptidos correspondientes a la familia de las fengycinas producidos por los aislados de *Bacillus*, son los responsables del efecto antagónico para el control de patógenos del chocho constituyéndose en un nuevo reporte para la ciencia.

En los ensayos de efectividad *in vivo* con inoculaciones artificiales de *Ovularia* y *Fusarium*, los cuatro aislados de *Bacillus spp.* demostraron tener capacidad de reducir las infecciones causadas por los patógenos, sin disminuir la capacidad de germinación.

El análisis estadístico SNK ($P < 0.05$) demostró que todos los aislados tienen efectividad para inhibir al patógeno comparados con el control de la semilla.

La prueba SNK ($P < 0.05$) clasificó a los aislados según el aumento o porcentaje de su incidencia y germinación en distintos grupos. Agrupó a los aislados según su porcentaje de germinación.

La semilla tratada con los aislados antagónicos presentó una incidencia menor en comparación de la semilla desinfectada y la que no fue tratada.

Los aislados de *Bacillus* tuvieron efectividad en los patógenos poscosecha que afectan al chocho. Los aislados bacterianos no afectaron a la germinación.

Con inoculaciones latentes en semilla y bajo invernadero, el aislado CtpxS2-1 demostró tener capacidad para controlar infecciones de patógenos presentes en la semilla, durante la germinación y la emergencia de plantas de chocho.

4.2 Recomendaciones

Profundizar en el estudio e investigación para producir biomasa y metabolitos con un mayor grado de antagonismo contra enfermedades de tipo fúngica y en especial contra *Ovularia* y *Fusarium*.

Continuar en la investigación en nuevas localidades productoras de chocho, para la obtención de nuevas cepas con características antagónicas.

Llevar a cabo más ensayos que permitan el aislamiento y caracterización de nuevas y mejores cepas con metabolitos con mayor potencial en el control biológico para la elaboración de productos para el uso agrícola que sean amigables con el ambiente.

Enfatizar en el estudio de bacterias del género *Bacillus* en la antibiosis de hongos.

Continuar con los ensayos *in vivo* con inoculaciones artificiales porque los aislados de *Bacillus* tienen la capacidad de reducir las infecciones causadas por los patógenos sin que disminuya su capacidad de germinación.

REFERENCIAS

- Aftab, M., Freeman, A., & Bretag, I. (2008). Seed Health Testing in Pulse Crops. *Agriculture Notes*, Department of Primary Industries.
- Agrios, G. (2005). *Plant Pathology* (Quinta ed.). Elsevier Academic Press.
- Alvarez, B., & Torés, J. (1997). Cultivo in vitro de *Sphaerotheca fuliginea* (Schlecht. ex Fr), efecto de diferentes fuentes de carbono sobre su desarrollo. 283-286.
- Arriagada, V. (2000). *SEMILLAS Inspección, análisis, tratamientos y legislación*. Venezuela: IICA Venezuela.
- Baranyi, J., & Roberts, T. (1994). *A dynamic approach to predicting the bacterial growth in food*. Int. J. Food Microbiol.
- Bergey, A. (2005). *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology* (Segunda ed.). (G. Garrity, Ed.) Michigan, Estados Unidos: Springer.
- Caicedo V., C., & Peralta I., E. (2001). El cultivo de chocho: Fitonutrición, enfermedades y plagas, en el Ecuador. 67.
- Caicedo, C., & Peralta, E. (2000). *Zonificación potencial, sistemas de producción y procesamiento artesanal del chocho (Lupinus mutabilis Sweet) en Ecuador*. Boletín Técnico No. 89, Estación Experimental Santa Catalina INIAP, Quito.
- Calvo, J., Rivera, J., & Orozco, S. (2012). Aislamiento y evaluación in vitro de antagonistas de *Botrytis cinerea* en mora. *Agronomía mesoamericana*, 1021-7444.
- 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.
- Crowling, W., Huyghe, C., & Swiecicki, W. (1998). Lupine Breeding. (J. Gladstones, C. Atkins, & J. Hamblin, Eds.) *Lupines as crop plants: Biology, production and utilization*, 93-120.

- Damm, U., Cannon, P., Woudenberg, J., & Crous, P. (2012). The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in Mycology*, 73, 37-113.
- Dean, R., Van Kan, J., Pretorius, Z., Hammond-Kosack, K., & Di Pietro, A. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. (R. Dean, A. Lichens-Park, & C. Kole, Eds.) *Molecular Plant Pathology*, 13, 414-430.
- Falconí, C. (2012). *Lupinus mutabilis* in Ecuador with special emphasis on anthracnose resistanc. 150.
- Falconí, C., Visser, R., & Heusden, S. (2015). Influence of plant growth stage on resistance to anthracnose in Andean lupin (*Lupinus mutabilis*). *Crop and Pasture Science*.
- Fontarani, G., Batistuti, J., Da Cruz, R., Nascimento, P., & Gomes, J. (2011). Cholesterol-lowering effect of whole lupin (*Lupinus albus*) seed and its protein insolate. *Food Chemistry*(132), 1521-1526.
- Fornasini, M., Castro, J., Villacrés, E., Narváez, L., Villamar, M., & Baldeón, M. (n.d.). Hypoglycemic effect of *Lupinus mutabilis* in healthy volunteers and subjects with dysglycemia.
- Fox, S. L., & Bala, G. A. (2000). Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. *Bioresourse Technology*, 75(3), 235-240.
- Fravel, D. (2005). Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*(43), 337-359.
- González Enei, G. (Ed.). (2011). *Controladores Biológicos: Bacillus subtilis y B. thutigiensis*. Retrieved julio 13, 2015, from Fundación para la Innovación Agraria: http://experiencias.fia.cl/portadas/20150402154149_83_Libro_Bacillus.pdf?ie=UTF-8&oe=UTF-8&q=prettyphoto&iframe=true&width=90%&height=90%
- Guzmán, M. (2006). Cultivo de Tarwi o Chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet).

- Hardy, A., & Huyghe, C. (1997). Physiological bases of the poor adaptation of current *Lupinus mutabilis* genotypes to European condition. *Grain Legumes*, 9-10.
- Hondelmann, W. (1984). The Lupine- An ancient and modern crop plant. (68), 1-9. *Theor. Appl. Genet.*
- Ibarra, J., Del Rincón Castro, M., Galindo, E., Patiño, M., Serrano, L., García, R., et al. (2006). Los microorganismos en el control biológico de insectos y fitopatógenos. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 48(2), 113-120.
- INIAP. (2001). Poscosecha y Mercado de chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) en Ecuador, Programa de Leguminosas y Granos Andinos. *Miscelánea*, 105, 55. Quito, Ecuador: Estacion Experimental Santa Catalina.
- INIAP. (2010). INIAP 450 Andino, Variedad de chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet). In C. Caicedo, E. Peralta, A. Murillo, M. Rivera, & J. Pinzón. Quito.
- Insuati, M. (2001). Enfermedades foliares: El cultivo del chocho *Lupinus mutabilis* Sweet fitonutrición, enfermedades y plagas en Ecuador. (E. Peralta, & C. Caicedo, Eds.) *Boletín Técnico*(103), 24-25.
- Jacobsen, S.-E., & Sherwood, S. (2002). *Cultivo de granos andinos en Ecuador. Informe sobre los rubros quinua, chocho y amaranto*. Quito, Ecuador: Abya-Yala.
- Jacques, P., Hbid, C., Destain, J., Razafindralambo, H., Paquot, M., De Pauw, E., et al. (1999). Optimizarion of Biosurfactant Lipopeptide Production from *Bacillus subtilis* S499 by Plackett-Bruman Design. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 77(77), 223-233.
- Krieg, Noel R.; Staley, James T.; Brown, Daniel R.; Hedlund, Brian P.; Pater, Bruce J.; Ward, Naomi L.; Ludwing, Wolfgang; Whitman, William B.; (2005). *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology* (2nd ed., Vol. IV). USA: Springer.
- Kurlovich, B., & Kartuzova, L. (2002). Lupine breeding. (B. S. Kurlovich, Ed.) *Lupines: Geography, Classification, Genetic Resources and Breeding*, 351-374.

- Lara, K., Peralta, E., & Villacres, E. (2000). Mejor alimentación, mejor nutrición, recetas con leguminosas. *Programa Nacional de Leguminosas*, 135.
- Lindhout, P., Danial, D., & Parlevliet, J. (2007). Introduction: focusing on breeding for durable disease resistance of the Andean highland food crops. (153), 283-285.
- Melnick, R., Suarez, 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), 236-245.
- Moreira, R., Nunes, C., & May De Mio, L. (2014). *Bacillus* spp. and *Pseudomonas* as inhibitors of the *Colletotrichum acutatum* group and potential to control *Glomerella* leaf spot. *Biological Control*(72), 30-37.
- 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. *Memorias del XII Congreso Internacional de cultivos andinos*, 26.
- Obregón Gómez, M. (2002). *Asesoramiento Fitosanitario*. Retrieved junio 20, 2014, from Laboratorios Doctor Obregón: <http://www.doctor-obregon.com/Pages/Bacillussubtilis.aspx>
- Obregón, M. (2009). *Asesoramiento Fitosanitario* . Retrieved Junio 20, 2014, from Laboratorios Doctor Obregón: <http://www.doctor-obregon.com/Pages/Bacillussubtilis.aspx>
- Olivain, C., Alabouvette, C., & Steinberg, C. (2004). Production of a mixed inoculum of *Fusarium oxysporum* Fo47 and *Pseudomonas fluorescens* C7 to control *Fusarium* diseases. *Biocontrol Science and Technology*, XIV(3), 227-238.
- Ongena, M., Henry, G., & Thonart, P. (2009). The Roles of Cyclic Lipopeptides in the Biocontrol Activity of *Bacillus subtilis*. (U. Gisi, L. Chet, & M. Gullino, Eds.) *Recent Developments in Management of Plant Diseases, Plant Pathology in the 21st Century Springer Verlag*, 59-69.
- Peralta, E. (2007). Evaluación de cinco productos para desinfección de semillas de chocho. *Programa nacional de Leguminosas Informe Técnico Anual*.

- Peralta, E., Mazón, N., Murillo, A., Rivera, M., Rodríguez, D., Lomas, L., et al. (2012). *Manual Agrícola de Granos Andinos: Chocho, Quínua, Amaranto y Ataco. Cultivos, variedades y costos de producción*. Retrieved febrero 25, 2015, from Manual Agrícola de Granos Andinos: <http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/documentos/MANUAL%20AGRICOLA%20GRANOS%20ANDINOS%202012.pdf>
- 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. *Progress report, Year 1*, 30.
- Pfeiffer, W., & McClafferty, M. (2007). HarvestPlus: breeding crops for better nutrition. *Crop Science* 47(S3).
- Popenoe, H., King, S., León, J., & Kalinowski, L. (1989). Lost crops of the Incas. (S. Flanagan, Ed.) *Handbook of food allergen detection and control*(264), 415.
- Razafindralambo, H., Paquiot, M., Hbid, C., Jacques , P., Destain, J., & Thonart, P. (1993). Purification of antifungal lipopeptides by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*(683), 81-85.
- Reyes, A., Cristobal, J., Ruiz, E., & Tun, J. (2012). Inhibición del crecimiento in vitro de Fusarium sp. aislado de chile habanero (*Capsicum chinensis*) con hongos antagonistas. *Fitosanidad*, XVII(3), 161-165.
- Rogg, D. W. (2000). *Manejo integrado y control biológico de plagas y enfermedades* (2nd ed.). Quito, Pichincha, Ecuador: ABYA-YALA.
- Rogg, H. W. (2000). *Manejo Integrado y control biológico de plagas y enfermedades*. Retrieved junio 1, 2015, from Books Google: https://books.google.com.ec/books?id=Gz2G8B_UjZ0C&pg=PA23&dq=control+biologico&hl=es&sa=X&ei=imqDVdmFloyANqDmgpAD&ved=0CDgQ6AEwBQ#v=onepage&q=control%20biologico&f=false
- Romero, D., de Vicente, A., Rakotoaly, R., Dufor, S., Veening, J., Arrebola, E., et al. (2004). The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podospaera fusca*. *Mol. Plant Microbe. Interact*(13), 430-440.

- Ruiz Escudero, I., Ibañez, I., Padilla, M., Carnero, A., & Caballero, P. (2004). Aislamiento y caracterización de nuevas cepas de *Bacillus thuringiensis* procedente de muestras de tierra de Canarias. 1-10.
- Schoeneberger, H., Gross, R., Cremer, H., & Elmadfa, I. (1982). Composition and Protein Quality of *Lupinus mutabilis*. *The Journal of Nutrition*(112), 70-76.
- Simmonds, J. (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, Mario. (2000). Cultivos andino subexplotados y su aporte a la alimentación. *Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación*, 20-30.
- Tejera, B., Heydrich, M., & Rojas, M. (2008). *Antagonismo de Bacillus spp frente a hongos fitopatógenos del cultivo del arroz (Oryza sativa)*. La Habana, Cuba: Departamento de Microbiología y Virología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana .
- Tejera, B., Heydrich, M., & Rojas, M. (2012). Antagonismo de *Bacillus spp.* frente a hongos fitopatógenos del cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.). *Rev. Protección Veg.*, xxvii(2), 117-122.
- Torés, A., & 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*.
- Vigdal-Filho, P., Goncalves-Vigdal, M., Kelly, J., & Kirk, W. (2007). Sources of resistance to anthracnose in traditional common bean cultivars from Parana- Brazil. *Journal Phytopathology*(155), 108-113.
- Yáñez Mendizábal, V. (2007). Validación de biopesticidas para el control de la moniliasis y manejo sostenible de palma de fino aroma en el Ecuador. (V. Yáñez Mendizabal, & C. Falconí, Eds.) *Control biológico y tecnología de biopesticidas microbianos*, 37-50.
- Yáñez, V. (2012, Enero). *Potencial de la cepa CPA-8 de Bacillus subtilis como agente de biocontrol de enfermedades de postcosecha de fruta*. Lleida, España: Universidad de Lleida.

- Yáñez-Mendizábal, V., Usall, J., Viñas, I., Casals, C., Marín, S., Sosona, C., et al. (2011, Febrero). Potential of a new strain of *Bacillus Subtilis* CPA-8 to control the major postharvest diseases of fruit. (IRTA, Ed.) *Biocontrol Science and Technology*, 21, 409-426.
- Yáñez-Mendizábal, V., Viñas, I., Usall, J., Cañamás, T., & Teixidó, N. (2012d). Endospore production allows using spray-drying as a possible formulation system of biocontrol agent *Bacillus subtilis*. *Biotechno. Lett*(34), 729-735.
- Yáñez-Mendizábal, V., Viñas, I., Usall, J., Solsona, C., Torres, R., & Teixidó, N. (2012a). Production of the postharvest biocontrol agent *Bacillus subtilis* CPA-8 using low cost commercial products and by-products. *Biological Control*(60), 281-289.
- Yáñez-Mendizábal, V., Viñas, I., Usall, J., Solsona, C., Torres, R., & Teixidó, N. (2012b). *Production of the postharvest biocontrol agent Bacillus subtilis CPA-8 using low cost commercial products and by-products*. Catalonia, España: IRTA.
- Yáñez-Mendizábal, V., Zerriouh, H., Viñas, I., Torres, R., Usall, J., de Vicente, A., et al. (2012c). Biological control of peach bron rot (*Monilinia* spp.) by *Bacillus subtilis* CPA-8 is based on production of fengycin-like lipopeptides. *European Journal of Plant Pathology*(132), 609-619.
- Yang, H., & Sweetingham, M. (1998). The taxonomy of *Colletotrichum* isolates associated with lupine anthracnose. *Aust. J. Agric.*(49), 1213-1223.

ANEXOS

Anexo 1

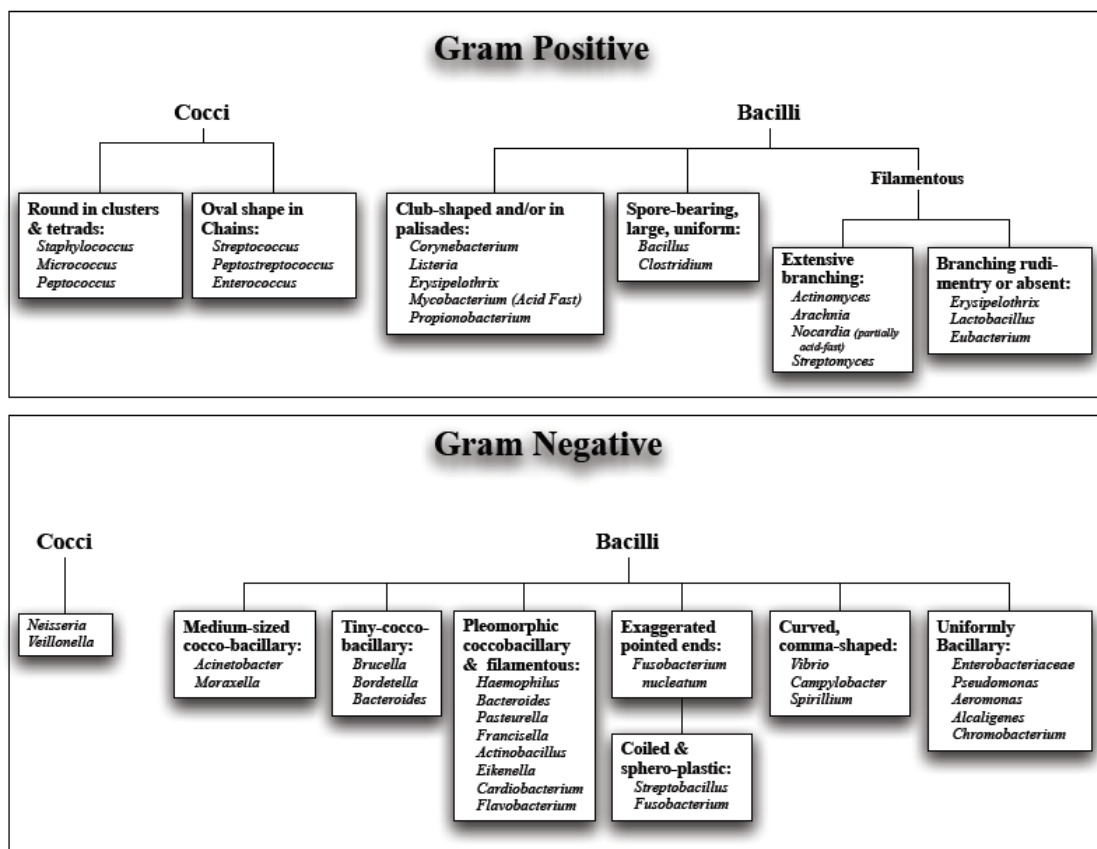
Resumen de las características sistemáticas en base a Bergey (2005).

Identification flow charts

Differentiation via Gram stains and cell morphology.

Gram Stain & Morphological Flowchart

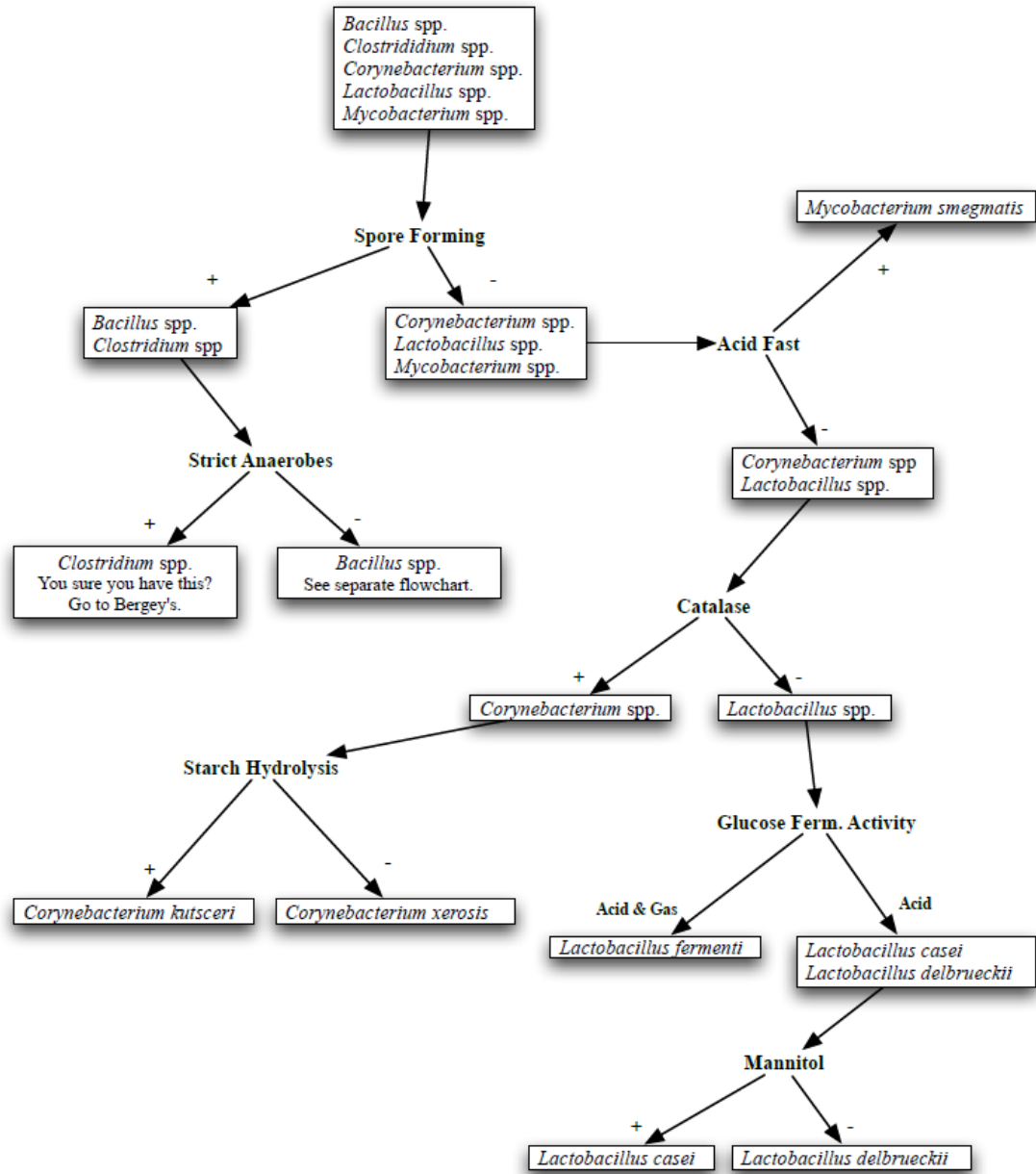
Some Examples



Identification flow charts

Gram Positive Rods ID Flowchart

Gram Positive Rods



Anexo 2

Criocultivos de microorganismos en congelación a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.



> HOW TO USE



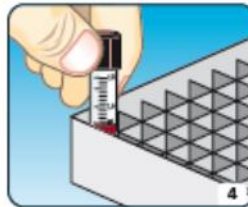
Using a permanent marker, label the code for the organism onto the white panel on the vial. Aseptically inoculate the CRYOBANK™ tube colonies from a fresh, pure culture to a density equivalent to MacFarland 3 or 4 standard.



Replace cap and mix carefully by inverting the tube to completely distribute the organism.



Remove as much of the cryopreservative fluid as possible with a sterile pipette and re-close the tube.



Store the inoculated CRYOBANK™ tube in a suitable freezer between -60°C and -80°C. Details of the tube contents may also be recorded on the grid printed on the lid of the storage box. Space is also available for recording the individual box identification if required.

> RECOVERY



Remove the CRYOBANK™ tube from the freezer. If several tubes are being removed at once, thawing should be prevented by use of a cryoblock. Open the vial and remove bead by inserting a sterile needle through the hole or by using sterile forceps.



The bead may be dropped into an appropriate liquid medium. Alternatively, streak the bead immediately over the surface of an appropriate medium and incubate under suitable conditions. Discard the bead safely in the manner for infected material. Close vial and return it to the freezer as soon as possible.

> ORDERING INFORMATION

CATALOG NO.	DESCRIPTION	PACKAGING
CRYQ/R	Red Beads	64 vials
CRYQ/G	Green Beads	64 vials
CRYQ/Y	Yellow Beads	64 vials
CRYQ/B Blue	Beads	64 vials
CRYQ/M	Color assortment	64 vials
CRYQ/Z	Cryoblock - 18 well	1 block

Copan Diagnostics Inc.
 26055 Jefferson Ave.
 Murrieta, California 92562 USA
 Toll Free: (800)216-4016 (US & Canada)
 Phone: (951) 696-6957 Fax: (951)600-1832
 E-Mail: info@copanusa.com
 www.copanusa.com

Anexo 3

Procedimiento de extracción de lipopéptidos utilizando columna *Mega Bond Elut C₁₈*

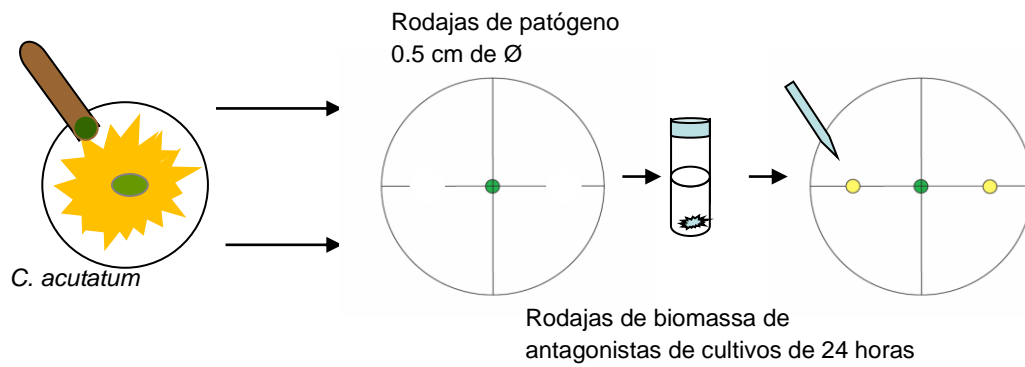


Anexo 4

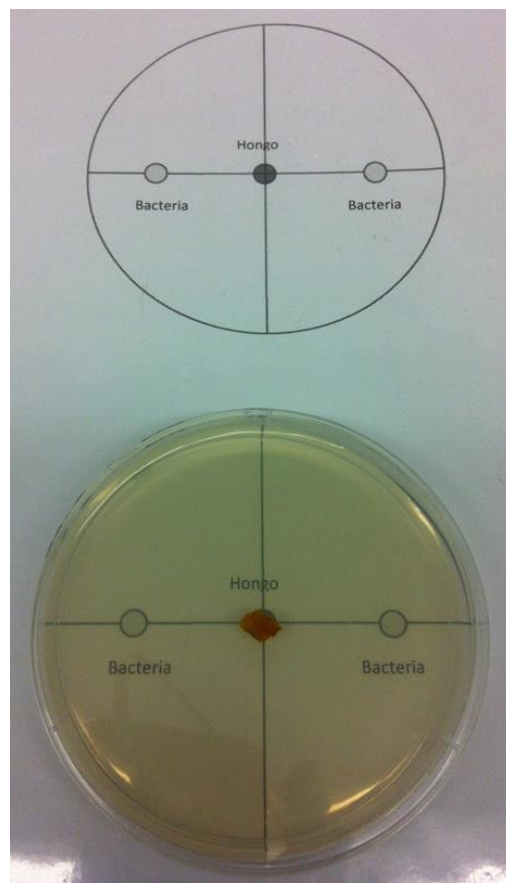
Preparación de pruebas duales de antagonismo *in vitro*



Esquema de pruebas duales para inoculación patógeno y bacteria en cajas Petri con medio de cultivo PDA.

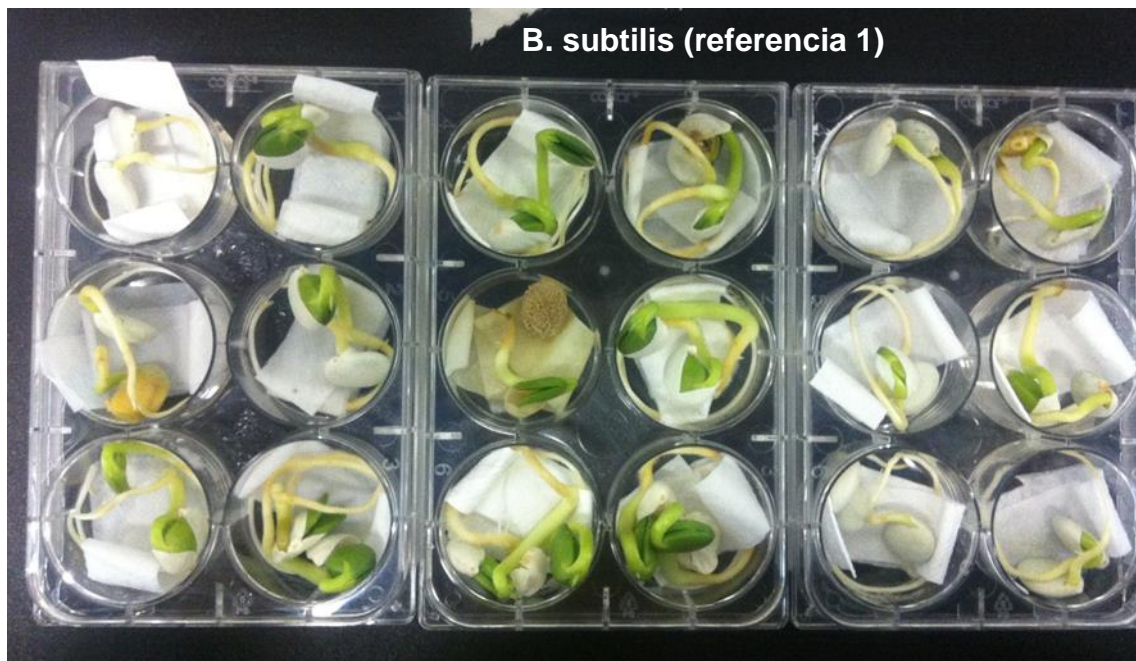


Plantilla de colocación de bacteria y patógeno para cajas petri.



Anexo 5

Ensayos de efectividad en *Bacillus subtilis*



Anexo 6

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 2×10^9 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 μ L PureLink® Genomic Digestion Buffer. Add 20 μ 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 μ 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 μ L PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer and mix well by vortexing to obtain a homogenous solution.
7. Add 200 μ 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 μ L Lysis/Binding Buffer and 200 μ 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 μ L Lysozyme Digestion Buffer/sample, add **fresh** Lysozyme to obtain a final Lysozyme concentration of 20 mg/mL.
 3. Harvest up to 2×10^9 Gram positive cells by centrifugation. If you are using a frozen cell pellet, proceed to Step 3.
 4. Resuspend the cell pellet in 180 μ 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 μ L Proteinase K (supplied with the kit). Mix well by brief vortexing.
 7. Add 200 μ L PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer and mix well by brief vortexing.
 8. Incubate at 55°C for 30 minutes.
 9. Add 200 μ 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 μL) 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 μ 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[®] collection tube supplied with the kit.
 4. Add 500 μ 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 μ L of PureLink[®] 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°C or use DNA for the desired downstream application.
 - For long-term storage, store the purified DNA in PureLink[®] Genomic Elution Buffer at -20°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°C for immediate use or aliquot the DNA and store at -20°C for long-term storage.
-

Anexo 7

Pruebas estadísticas SNK ($P < 0.5$) para pruebas duales de antagonismo *in vitro* en *Ovularia*.

The SAS System

15:26 Thursday, July 22, 2015 9

The GLM Procedure

Student-Newman-Keuls Test for Inhibicion

Note: This test controls the Type I experimentwise error rate under the complete null hypothesis but not under partial null hypotheses.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	32
Error Mean Square	131.261

Number of Means	2	3	4	5	6	7	8
Critical Range	14.759695	17.806097	19.632022	20.936552	21.949314	22.775435	23.471972

Means with the same letter are not significantly different.			
SNK Grouping	Mean	N	Tratamiento
	A	52.614	5 B12
	A		
B	A	49.535	5 S3-5
B	A		
B	A	47.459	5 CPA-8 Ov
B	A		
B	A	46.361	5 S2-1
B	A		
B	A	45.027	5 S1-1
B	A		
B	A	39.851	5 Z2
B			
B		29.590	5 Z3
	C	0.000	5 CK

Pruebas estadísticas SNK ($P < 0.5$) para pruebas duales de antagonismo in vitro en *Fusarium*.

The SAS System

15:31 Thursday, July 22, 2015 8

The GLM Procedure

Student-Newman-Keuls Test for Inhibition

Note: This test controls the Type I experimentwise error rate under the complete null hypothesis but not under partial null hypotheses.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	20
Error Mean Square	82.05833

Number of Means	2	3	4	5
Critical Range	11.950836	14.494686	16.035573	17.143815

Means with the same letter are not significantly different.			
SNK Grouping	Mean	N	Tratamiento
A	43.763	5	Z3 Fus
A			
A	36.952	5	S3-5 Fus
A			
A	35.424	5	S2-1 Fus
A			
A	32.742	5	CPA-8 Fus
B	0.000	5	CKFus

Anexo 8

Pruebas estadísticas SNK ($P < 0.05$) para ensayos de producción de endosporas (CtpxS2-1)

The SAS System

12:11 Thursday, July 22, 2015 8

The GLM Procedure

Student-Newman-Keuls Test for ENDO

Note: This test controls the Type I experimentwise error rate under the complete null hypothesis but not under partial null hypotheses.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	6
Error Mean Square	0.011111

Number of Means	2	3
Critical Range	0.2105967	0.2640642

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

Pruebas estadísticas SNK ($P < 0.05$) para ensayos de producción células vegetativas (CtpxS2-1)

The SAS System

10:57 Thursday, July 22, 2015 8

The GLM Procedure

Student-Newman-Keuls Test for VG

Note: This test controls the Type I experimentwise error rate under the complete null hypothesis but not under partial null hypotheses.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	6
Error Mean Square	0.014222

Number of Means	2	3
Critical Range	0.2382629	0.2987546

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

Pruebas estadísticas SNK ($P < 0.05$) para ensayos de producción de endosporas (CtpxS3-5).

The SAS System

12:14 Thursday, July 22, 2015 8

The GLM Procedure

Student-Newman-Keuls Test for ENDO

Note: This test controls the Type I experimentwise error rate under the complete null hypothesis but not under partial null hypotheses.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	6
Error Mean Square	0.013044

Number of Means	2	3
Critical Range	0.2281842	0.286117

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

Pruebas estadísticas SNK ($P < 0.05$) para ensayos de producción células vegetativas (CtpxS3-5).

The SAS System

11:20 Thursday, July 22, 2015 9

The GLM Procedure

Student-Newman-Keuls Test for VG

Note: This test controls the Type I experimentwise error rate under the complete null hypothesis but not under partial null hypotheses.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	6
Error Mean Square	0.003061

Number of Means	2	3
Critical Range	0.1105402	0.1386048

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

Pruebas estadísticas SNK ($P < 0.05$) para ensayos de producción de endosporas (Z2).

The SAS System

12:15 Thursday, July 22, 2015 8

The GLM Procedure

Student-Newman-Keuls Test for ENDO

Note: This test controls the Type I experimentwise error rate under the complete null hypothesis but not under partial null hypotheses.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	6
Error Mean Square	0.006944

Number of Means	2	3
Critical Range	0.1664913	0.2087611

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

Pruebas estadísticas SNK ($P < 0.05$) para ensayos de producción de células vegetativas (CtpxZ2).

The SAS System

11:43 Thursday, July 22, 2015 8

The GLM Procedure

Student-Newman-Keuls Test for VG

Note: This test controls the Type I experimentwise error rate under the complete null hypothesis but not under partial null hypotheses.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	6
Error Mean Square	0.005782

Number of Means	2	3
Critical Range	0.1519134	0.1904821

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

Pruebas estadísticas SNK ($P < 0.05$) para ensayos de producción de endosporas (Z3)

The SAS System

12:18 Thursday, July 22, 2015 8

The GLM Procedure

Student-Newman-Keuls Test for ENDO

Note: This test controls the Type I experimentwise error rate under the complete null hypothesis but not under partial null hypotheses.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	6
Error Mean Square	0.004421

Number of Means	2	3
Critical Range	0.1328338	0.1665585

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

Pruebas estadísticas SNK ($P < 0.05$) para ensayos de producción de células vegetativas (CtpxZ3)

The SAS System

11:54 Thursday, July 22, 2015 8

The GLM Procedure

Student-Newman-Keuls Test for VG

Note: This test controls the Type I experimentwise error rate under the complete null hypothesis but not under partial null hypotheses.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	6
Error Mean Square	0.001261

Number of Means	2	3
Critical Range	0.0709418	0.088953

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

Anexo 9

Pruebas estadísticas SNK ($P < 0.05$) para ensayos de efectividad in vivo.
Pruebas de inoculación artificial en *Ovularia*. Inoculaciones artificiales

The SAS System

15:50 Thursday, July 22, 2015 7

The GLM Procedure

Student-Newman-Keuls Test for Germinacion

Note: This test controls the Type I experimentwise error rate under the complete null hypothesis but not under partial null hypotheses.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	12
Error Mean Square	169.7531

Number of Means	2	3	4	5	6
Critical Range	23.178464	28.379808	31.58237	33.907346	35.731861

Means with the same letter are not significantly different.			
SNK Grouping	Mean	N	Tratamiento
A	100.00	3	S2-1
A			
A	100.00	3	Semilla inoculada
A			
A	100.00	3	CK: desinfectada
A			
A	94.44	3	Rapsody
A			
A	94.44	3	Z3
A			
A	83.33	3	CPA8

The GLM Procedure

Student-Newman-Keuls Test for Incidencia

Note: This test controls the Type I experimentwise error rate under the complete null hypothesis but not under partial null hypotheses.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	12
Error Mean Square	69.44444

Number of Means	2	3	4	5	6
Critical Range	14.824995	18.151786	20.200151	21.687211	22.854175

Means with the same letter are not significantly different.			
SNK Grouping	Mean	N	Tratamiento
A	58.333	3	Semilla inoculada
B	19.444	3	S2-1
B			
B	16.667	3	Rapsody
B			
B	13.889	3	Z3
B			
B	11.111	3	CPA8
B			
B	0.000	3	CK: desinfectada

Pruebas estadísticas SNK ($P < 0.05$) para ensayos de efectividad in vivo.
 Pruebas de inoculación artificial en *Fusarium*. Inoculaciones artificiales

The SAS System

15:54 Thursday, July 22, 2015 7

The GLM Procedure

Student-Newman-Keuls Test for Germinacion

Note: This test controls the Type I experimentwise error rate under the complete null hypothesis but not under partial null hypotheses.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	12
Error Mean Square	51.11111

Number of Means	2	3	4	5	6
Critical Range	12.718429	15.572498	17.329799	18.605555	19.606698

Means with the same letter are not significantly different.			
SNK Grouping	Mean	N	Tratamiento
A	91.000	3	CK: desinfectada
A			
A	88.000	3	Z3
A			
A	86.000	3	S2-1
A			
A	84.667	3	Rapsody
A			
A	84.667	3	CPA8
A			
A	80.000	3	S3-5

The GLM Procedure

Student-Newman-Keuls Test for Incidencia

Note: This test controls the Type I experimentwise error rate under the complete null hypothesis but not under partial null hypotheses.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	12
Error Mean Square	51.77778

Number of Means	2	3	4	5	6
Critical Range	12.801106	15.673728	17.442454	18.726502	19.734153

Means with the same letter are not significantly different.			
SNK Grouping	Mean	N	Tratamiento
A	73.333	3	S2-1
B	48.000	3	Z3
B			
B	40.000	3	CPA8
B			
B	36.000	3	S3-5
B			
B	32.667	3	Rapsody
C	12.500	3	CK: desinfectada

Anexo 10

Pruebas estadísticas SNK ($P < 0.05$) para ensayos de efectividad in vivo.
Pruebas en campo con cinco genotipos de semillas de chocho.

LOTE ECU-2658 (Germinación e Incidencia)

The SAS System

18:38 Thursday, August 16, 2015 8

The GLM Procedure

Student-Newman-Keuls Test for GerminEmer

Note: This test controls the Type I experimentwise error rate under the complete null hypothesis but not under partial null hypotheses.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	6
Error Mean Square	0.470988

Number of Means	2	3
Critical Range	1.3711273	1.7192377

Means with the same letter are not significantly different.			
SNK Grouping	Mean	N	Tratamiento
A	65.8947	3	Vitavax
B	60.7367	3	B. subtilis CtpxS2-1
C	53.6573	3	CK sin aplicación

The GLM Procedure

Student-Newman-Keuls Test for Incidencia

Note: This test controls the Type I experimentwise error rate under the complete null hypothesis but not under partial null hypotheses.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	6
Error Mean Square	0.819878

Number of Means	2	3
Critical Range	1.8090363	2.2683257

Means with the same letter are not significantly different.			
SNK Grouping	Mean	N	Tratamiento
A	59.9333	3	CK sin aplicación
B	52.1000	3	B. subtilis CtpxS2-1
C	36.4000	3	Vitavax

The GLM Procedure

Student-Newman-Keuls Test for GerminEmer

Note: This test controls the Type I experimentwise error rate under the complete null hypothesis but not under partial null hypotheses.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	6
Error Mean Square	0.709142

Number of Means	2	3
Critical Range	1.6824389	2.109587

Means with the same letter are not significantly different.			
SNK Grouping	Mean	N	Tratamiento
A	73.6283	3	B. subtilis CtpxS2-1
A			
A	73.4100	3	Vitavax
B	48.7635	3	CK sin aplicación

The GLM Procedure

Student-Newman-Keuls Test for Incidencia

Note: This test controls the Type I experimentwise error rate under the complete null hypothesis but not under partial null hypotheses.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	6
Error Mean Square	0.751404

Number of Means	2	3
Critical Range	1.7318473	2.1715395

Means with the same letter are not significantly different.			
SNK Grouping	Mean	N	Tratamiento
A	62.0900	3	CK sin aplicación
B	50.8670	3	B. subtilis CtpxS2-1
C	37.9443	3	Vitavax

The GLM Procedure

Student-Newman-Keuls Test for GerminEmer

Note: This test controls the Type I experimentwise error rate under the complete null hypothesis but not under partial null hypotheses.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	6
Error Mean Square	1.957881

Number of Means	2	3
Critical Range	2.7955407	3.50529

Means with the same letter are not significantly different.			
SNK Grouping	Mean	N	Tratamiento
A	64.597	3	Vitavax
A			
A	63.362	3	B. subtilis CtpxS2-1
B	48.450	3	CK sin aplicación

The GLM Procedure

Student-Newman-Keuls Test for Incidencia

Note: This test controls the Type I experimentwise error rate under the complete null hypothesis but not under partial null hypotheses.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	6
Error Mean Square	0.579593

Number of Means	2	3
Critical Range	1.5210181	1.9071837

Means with the same letter are not significantly different.			
SNK Grouping	Mean	N	Tratamiento
A	60.3780	3	CK sin aplicación
B	51.9084	3	B. subtilis CpxS2-1
C	40.4075	3	Vitavax

The GLM Procedure

Student-Newman-Keuls Test for GerminEmer

Note: This test controls the Type I experimentwise error rate under the complete null hypothesis but not under partial null hypotheses.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	6
Error Mean Square	1.320305

Number of Means	2	3
Critical Range	2.2956723	2.8785119

Means with the same letter are not significantly different.			
SNK Grouping	Mean	N	Tratamiento
A	77.8900	3	Vitavax
B	64.2867	3	B. subtilis CtpxS2-1
C	52.0487	3	CK sin aplicación

The GLM Procedure

Student-Newman-Keuls Test for Incidencia

Note: This test controls the Type I experimentwise error rate under the complete null hypothesis but not under partial null hypotheses.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	6
Error Mean Square	0.712477

Number of Means	2	3
Critical Range	1.6863908	2.1145423

Means with the same letter are not significantly different.			
SNK Grouping	Mean	N	Tratamiento
A	67.5100	3	CK sin aplicación
B	44.5994	3	B. subtilis CtpxS2-1
C	35.2000	3	Vitavax

The GLM Procedure

Student-Newman-Keuls Test for GerminEmer

Note: This test controls the Type I experimentwise error rate under the complete null hypothesis but not under partial null hypotheses.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	6
Error Mean Square	1.228601

Number of Means	2	3
Critical Range	2.2145126	2.7767469

Means with the same letter are not significantly different.			
SNK Grouping	Mean	N	Tratamiento
A	67.9623	3	Vitavax
B	61.7212	3	B. subtilis CtpxS2-1
C	51.0123	3	CK sin aplicación

The GLM Procedure

Student-Newman-Keuls Test for Incidencia

Note: This test controls the Type I experimentwise error rate under the complete null hypothesis but not under partial null hypotheses.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	6
Error Mean Square	0.658529

Number of Means	2	3
Critical Range	1.6212881	2.0329109

Means with the same letter are not significantly different.			
SNK Grouping	Mean	N	Tratamiento
A	59.7970	3	CK sin aplicación
B	48.8130	3	B. subtilis CtpxS2-1
C	39.6267	3	Vitavax

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico (inglés)
AN	Agar nutritivo
ANOVA	Análisis de varianza (inglés)
CIEDI	Centro de Investigación, Estudio y Desarrollo de Ingenierías
CK	Control
Ctpx	Cotopaxi
DMSO	Dimetilsulfóxido
ESPE	Universidad de las Fuerzas Armadas
ha	Hectárea
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (inglés)
INIAP	Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias
IRTA	Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (catalán)
mL ⁻¹	mililitros
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)
Ref	Cepa de referencia
R _f	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
UV	Ultra violeta
μL	Micro litros