UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS





CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

"CONTROL DE ÁCAROSMEDIANTE LA APLICACIÓN DE Bacillus subtilis EN EL CULTIVO DE FRESA (Fragaria vesca)"

DOCUMENTO FINAL DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE INGENIERO AGRÓNOMO

DAVID ISRAEL MENDOZA LEÓN

TUTOR:

Ing. Jorge Dobronski

Cevallos - 2016

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

El suscrito, DAVID ISRAEL MENDOZA LEÓN, portador de cédula de identidad número: 180480134-6, libre y voluntariamente declaro que el Informe Final del Proyecto de investigación titulado: "CONTROL DE ÁCAROSMEDIANTE LA APLICACIÓN DE "Bacillus subtilis" EN EL CULTIVO DE FRESA (Fragaria vesca) es original, auténtico y personal. En tal virtud, declaro que el contenido es de mí sola responsabilidad legal y académica, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas.

DAVID ISRAEL MENDOZA LEÓN

DERECHO DE AUTOR

Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación titulado "CONTROL DE ÁCAROSMEDIANTE LA APLICACIÓN DE "Bacillus subtilis" EN EL CULTIVO DE FRESA (Fragaria vesca) como uno de los requisitos previos para la obtención del título de grado de Ingeniero Agrónomo en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, autorizo a la Biblioteca de la Facultad, para que este documento esté disponible para su lectura, según las normas de la Universidad.

Estoy de acuerdo en que se realice cualquier copia de este Informe Final, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica potencial.

Sin perjuicio de ejercer mi derecho de autor, autorizo a la Universidad Técnica de Ambato la publicación de este Informe Final, o de parte de él.

DAVID ISRAEL MENDOZA LEÓN

"CONTROL DE ÁCAROS MEDIANTE LA APLICACIÓN DE Bacillus subtilis EN EL CULTIVO DE FRESA (Fragaria vesca)"

REVISADO POR:	
Ing. Mg. Jorge Dobronski ASESOR DE DISE	Ing. Mg. Luis Villacís TUTOR E ÑO EXPERIMENTAL
APROBADO POR LOS MIEMI	BROS DEL TRIBUNAL DE GRADO: FECHA
	FECHA
Ing. Mg. Hernán Zurita Vásquez PRESIDENTE	
Ing. Mg. Giovanny Velástegui	
Ing. Mg. Eduardo Cruz Tobar	

AGRADECIMIENTOS

Siempre agradeceré primero a Dios por haberme bendecido con salud, brindarme la sabiduría para culminar con mis estudios de pregrado. A mis padres que me han llenado de amor, consejos, buenos valores y su apoyo permanente para continuar con mis estudios.

De manera profunda a la Universidad Técnica de Ambato, en especial a la Facultad de Ciencias Agropecuarias, por acogerme en sus aulas, donde la formación académica y profesional fortalecieron mis principios y valores, brindándome conocimientos para llegar a ser un profesional útil para la sociedad.

Un agradecimiento sincero y profundo a todos los profesores de la Carrera de Ingeniería Agronómica, especialmente al tutor de tesis, Ing. Mg. Jorge Dobronski, a quien con sus acertados consejos, tiempo y voluntad ha permitido culminar con éxito la presente investigación.

Agradezco infinitamente aDr. Carlos Vásquez, por orientarme con sus conocimientos y capacidades desde el inicio del desarrollo y culminación de mi tesis, la cual ha finalizado llenando nuestras expectativas.

Agradezco a la Ing. Mg. Juan Carlos Aldás, Asesor de Redacción Técnica, por su valiosa colaboración durante el desarrollo de la tesis y sobre todo por su paciencia para que este trabajo pudiera llegar a culminarse.

Agradezco al Ing. Mg. Luis Villacís, biometrista, por el tiempo dedicado y su aporte para que este trabajo investigación sea terminado.

Por último, agradezco al Ing. Mg. Eduardo Cruz T. por su valiosa amistad y los innumerables consejos que me han servido para hoy estar aquí.

DEDICATORIA

Sin duda a Dios, por bendecirme en cada paso que he dado en mi vida estudiantil. Se lo debo todo.

A mis padres, pilares fundamentales en mi vida, sinónimo de lucha, esfuerzo y esmero, que con infinito amor y dedicación me enseñaron lo que significa la responsabilidad en el diario vivir, para hacer de mí un profesional con valores éticos, morales y de honestidad.

A mi hermana Dayana, por darme su aliento y estar en cada momento.

A mis tíos paternos Mónica, Lucy y Javier, han sido muy importantes en mi formación como persona, gracias por todo.

Por último dedico este trabajo a todos mis compañeros que no desmayen, continúen con sus estudios y culminen con esta noble profesión.

ÍNDICE DE CONTENIDO

CAPÍTU	LO I	1
INTRO	DUCCIÓN	1
CAPÍTU	LO II	3
REVIS	IÓN DE LITERATURA O MARCO TEÓRICO	3
2.1.	ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS	3
2.2.	CATEGORÍAS FUNDAMENTALES O MARCO CONCEPTUAL	
2.2.1	. Variable Independiente (Ácaros)	9
	. Variable dependiente: Bacillus subtilis	
2.2.3	. Unidad de análisis CULTIVO DE FRESA	22
CAPÍTUL	LO III	31
HIPÓT	ESIS Y OBJETIVOS	31
3.1. 1	HIPÓTESIS	31
3.2.	OBJETIVOS	31
CAPÍTUL	LO IV	32
MATE	RIALES Y MÉTODOS	32
4.1.	UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO	32
4.2.	CARACTERIZACIÓN DEL LUGAR	32
4.3.	EQUIPOS Y MATERIALES	32
4.4.	FACTORES EN ESTUDIO	33
4.5.	TRATAMIENTOS	33
4.6.	DISEÑO EXPERIMENTAL	34
4.7.	VARIABLES RESPUESTA	34
4.8.	MANEJO DEL EXPERIMENTO	35
4.9.	PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN	39
CAPÍTUL	_O V	40
RESULT	ADOS Y DISCUSIÓN	40
CAPÍTUL	_O VI	49
6.1. CO	ONCLUSIONES	49
62 BII	BLIOGRAFÍA	50

6.3.	ANEXOS	56
CAPÍTU	ULO VII	59
PROP	UESTA	59
7.1.	DATOS INFORMATIVOS	59
7.2.	ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA	59
7.3.	JUSTIFICACIÓN	59
7.4.	OBJETIVOS	60
7.4.	ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD	60
7.5.	FUNDAMENTACIÓN	60
7.7.	METODOLOGÍA, MODELO OPERATIVO	60
7.8.	ADMINISTRACIÓN	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación Taxonómica de T. urticae 10
Tabla 2. Clasificación taxonómica de B. subtillis 17
Tabla 3. Clasificación taxonómica de fresa Fragaria vesca
Tabla 4. Elementos esenciales 27
Tabla 5. Elementos no esenciales 28
Tabla 6. Tratamientos32
Tabla 7. Contenido de Ingredientes activos de Subtilin
Tabla 8. Porcentaje de mortalidad en hembras de Tetranychus urticae por la aplicación
de diferentes dosis de <i>Bacillus subtilis</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ácaro, hembra en estado adulto con huevos en hoja de fresa9
Figura 2. Ciclo de vida <i>Tetranychus urticae</i>
Figura 3. Presencia de huevos en la hoja del cultivo de fresa
Figura 4. Larva de <i>T. urticae</i> en el foliolo del cultivo de fresa
Figura 5. Protoninfa y Deutoninfa, estados inmóviles
Figura 6. <i>T. uricae</i> , hembra en estado adulto
Figura 7. <i>T. urticae</i> , macho en estado adulto
Figura 8. Bacillus subtilis en medio de cultivo
Figura9 . Identificación de <i>B. subtilis</i> , con el método de tinción de Gram
Figura 10. Foliolos de fresa variedad Monterrey35
Figura 11. Arenas de espuma de poliuretano humedecido con agua destilada35
Figura 12. Inoculación de <i>T. urticae</i> en una hoja del cultivo de fresa
Figura 13. Inoculación de 5 adultos de <i>T. urticae</i> en un foliolo
Figura 14. Tinción de Gram para la identificación de <i>Bacillus subtilis</i> 37
Figura 15. <i>Bacillus subtilis</i> observado en el microscopio
Figura 16. Relación entre la dosis aplicada de <i>B. subtilis</i> y la tasa de mortalidad de hembras de <i>T. urticae</i>

Figura	17 .	Nún	nero	pron	nedi	io de	e hu	evo	s p	rodı	icido	o po	r he	emł	oras	de	<i>T</i> .	urt	icae	trata	ıdas
		con	dife	rente	s d	osis	de	В.	sul	btili.	s ap	lica	dos	a	los	7,	14	y	21	días	del
		ensa	ıyo													· · · ·				4	44
Figura	18.	Hen	nbra	de T	. ur	ticae	e mi	ıert	aob	serv	ada	des _l	pués	s de	e 7	días	de	ha	ber	aplic	ado
el tratar	nier	nto	. .																		45
Figura	19.	Tinci	ión d	e Gra	am a	aplic	ada	a u	n áo	caro	cole	ectac	do v	ivo)						.46

RESUMEN

El cultivo de fresa en el Ecuador, es uno de los que presenta mayor presencia de ácaros, los cuales han ocasionado graves pérdidas, generando así un riesgo para su producción, ya que atacan principalmente a las hojas y llegan a reducir entre el 60% y 80% de la producción de una cosecha. La aplicación permanente de plaguicidas ha provocado una resistencia de la plaga en el cultivo; es por esto que obtener una producción libre de contaminantes químicos se ha convertido en prioridad para el productor y consumidor. El objetivo de esta investigación es reducir el uso de plaguicidas e incentivar en el agricultor una producción limpia, preservando el ambiente, mediante el uso de tecnologías innovadoras con una visión interdisciplinaria como es el control biológico mediante la aplicación de microorganismos benéficos, reduciendo elevados costos económicos con las aplicaciones de agroquímicos en las diferentes etapas del cultivo de fresa. Este ensayo consistió en la preparación unidades de crianza en una placa Petri conteniendo una espuma de poliuretano de 1,0 cm de espesura, humedecido con agua destilada: En cada placa Petri se encontraba un foliolo de fresa con 5 ácaros adultos de edad homogénea. Se realizaron aplicaciones de Bacillus subtilis a los 7, 14 y 21 días con dosis de 1, 2,3 cc/L de H₂0. No se observó interacción entre el tiempo de aplicación y dosis de B. subtilis sobre la mortalidad de T. urticae, Sin embargo con la aplicación de 3 cc/L a los 14 días produjo una mortalidad de 17,23% y 49,17% respectivamente.

Palabras claves:

Ácaros, plaguicidas, producción limpia, microorganismos benéficos, control biológico, *Bacillus subtilis*, mortalidad.

SUMMARY

In Ecuador Strawberry crop has a lot of mites. This plague has been occasioned serious losses and actually is a risk from population because attack leaves and will reduce 60% 80% between and harvest production. The continue application of pesticides caused resistof the plaguein the crop; this is why that get a production free of chemical contaminants are priority toproducer and consumer. The objective of this investigation is reduce the use of plaguicides and encourage in farmers about clean production, preserving the environment, by using innovative technologies with an interdisciplinary approach such as biological control byapplication of debeneficial microorganisms, reducing expensives production costs with the applications of agrochemicals in differents stage of Strawberry crop. This testconsisted in preparing breeding units in Petri dish containing a polyure than foam 1.0 cm thick, humedified wiht water. Each petri dish has a leave of strawberry with five mite adults of homogene age.

Applications were made of *Bacillus subtilis* at 7, 14 and 21 days with 1, 2, 3 cc/L of H_2O . No interaction was observed between time of application and dose of *B. subtilis* on the mortality of *T. urticae*, but nevertheless with the application of 3 cc/L at 14 days causes a mortality of 17,23% y 49,17%.

Keywords:

Mites, plaguicides, clean production, beneficial microorganisms, biologic control, *Bacillus subtilis*, and mortality.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Branzanti (1985) menciona que la fresa en los últimos años y en muchos países ha alcanzado un notable desarrollo, mayor que las demás especies de frutos pequeños con los que tradicionalmente se asocia: frambuesa, mora, entre otros. El hecho de que pueda madurar prácticamente durante todo el año, de su alto contenido en vitamina C casi análogo al de los agrios y su posibilidad de utilización industrial en la obtención de diferentes productos, hace explicar su rápida difusión a nivel mundial. Por otra parte dicho autor asegura que son muchos los factores que influyen sobre las variaciones que a nivel mundial ha sufrido la producción de fresa, pero fundamentalmente aquellos que inciden sobre un mejor manejo del producto y que permiten su transporte, conservando la calidad, a grandes distancias de donde se produjo.

En los últimos años la superficie plantada de fresa se ha incrementado de 125 ha (2003) a 250 ha (2007), lo que representa un crecimiento anual de entre 20 y 30 %. Aun así, en el país no existen plantaciones extensivas para la exportación; sin embargo, el 60% se destina al consumo nacional y el resto se exporta, en almíbar o fruta fresca a USA, España y los Países Bajos. Las fresas en almíbar son las que más acogida tienen en el mercado americano. (Agronegocios, 2015)

Granja (2010) citado por Guanolisa (2015) menciona que en la actualidad el cultivo de fresa en el Ecuador, es uno de los que presenta mayor presencia de ácaros, los cuales han ocasionado graves pérdidas, generando así un riesgo para su producción, ya que atacan principalmente a las hojas y llegan a reducir entre el 60% y 80% de la producción de una cosecha.

En la provincia de Tungurahua el cultivo de fresa ha crecido constantemente, la manera cómo se la produce ha cambiado, ya que obtener una producción libre de contaminantes químicos se ha convertido en prioridad para el consumidor. Se estima que la producción cuenta con una extensión de 240 hectáreas de fresas, localizadas en los cantones de Ambato y Tisaleo, sumándose 50 productores de Píllaro, Baños, Cevallos y Quero. (Ortega, 2014)

Los esfuerzos por incentivar en el agricultor una producción limpia, preservando el ambiente, requieren de tecnologías innovadoras con una visión interdisciplinaria como es el control biológico mediante la aplicación de microorganismos benéficos, reduciendo elevados costos económicos con las aplicaciones de agroquímicos en las diferentes etapas del cultivo de fresa.

Mediante la aplicación de la bacteria *Bacillus subtilis*se puede controlar la población de ácaros *Tetranychus urticae*en el cultivo de fresa, con esta alternativa de control bilógico se reduce el uso y aplicación de acaricidas químicos, ya que estos al ser biodegradables son favorables y compatibles para el adecuado desarrollo del cultivo, minimizando recursos económicos en el agricultor y mejorando la calidad del fruto cosechado.

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA O MARCO TEÓRICO

2.1.ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

Cory y Franklin(2012), aseguran que el control biológico de plagas requiere una comprensión de la dinámica de poblaciones e interacciones hospedero - parásito. El uso de microorganismos causantes de alteraciones fisiológicas, funcionales, anatómicas y enfermedades en general, originadas en artrópodos es una manera de control biológico o de regulación de poblaciones, ya que bacterias, virus, protozoos u hongos denominados entomopatógenos, son una alternativa para el manejo integrado de plagas importantes en agricultura. A diferencia de los plaguicidas químicos convencionales el control biológico tiene un menor impacto ecológico, siendo las bacterias los organismos más utilizados y dentro de este grupo el uso de Bacillus considerado como el principal agente de control biológico de lepidópteros, dípteros, coleópteros y arácnidos. Este bacilo es un patógeno de invertebrados muy versátil, posee una amplia gama de mecanismos de acción. Está comprobado que ciertas variedades de Bacillus no tienen efecto sobre otros insectos benéficos, animales domésticos o plantas Una de las familias de bacterias con mayor actividad bioquímica es la familia Bacillaceae, a la cual pertenece el género Bacillus, estos pueden ser aerobios estrictos o anaerobios facultativos, son gram positivos, presentan flagelos laterales los cuales les ayuda a su movilidad. Los Bacillus son encontrados fácilmente en el suelo, aire, agua, plantas, etc., algunas variedades presentan cristales con propiedades insecticidas y nematicidas.

Gallardo *et al.* (2005), en un artículo titulado biología y enemigos naturales de *T. urticae* en pimiento menciona que: "Los ácaros fitófagos de dos manchas, *T.*

urticae, es una plaga de amplia distribución a nivel mundial, asociada a un gran número de plantas hospedantes, como hortalizas, ornamentales, frutales y malezas, en las cuales causa daños de importancia económica. El daño causado por éste ácaro es producido en el sitio de alimentación al romper la superficie de las hojas y destruir las células del mesófilo, afectando la transpiración, fotosíntesis y el crecimiento de las plantas y sus frutos"

En cuanto a la bilogía del ácaro, Herbert (1981) determinó que el tiempo de desarrollo promedio para las hembras criadas en hojas de manzana fue de 19 y 12,7 días a 18 y 21°C, respectivamente. Sin embargo las hembras de ésta especie se desarrollaron en 16,5 y 15 días, a las mismas temperaturas, cuando fueron criadas en hojas de algodón. La progenie y la longevidad de *T. urticae* fueron afectadas negativamente cuando la temperatura se incrementó desde 18 hasta 29,4°C. Sus estudios también indicaron que la temperatura y humedad relativa afectan el desarrollo biológico del ácaro.

Otras investigaciones han reportado que en los cultivos hortícolas, además de los ácaros fitófagos, se encuentran también ácaros depredadores pertenecientes principalmente a Phytoseiidae, los cuales ejercen un control natural sobre las poblaciones de los ácaros plaga como *T. urticae*. Los ácaros Phytoseiidae han sido objeto de intensos estudios taxonómicos, bilógicos y ecológicos, lográndose éxitos en el manejo integrado de ácaros fitófagos en cultivos agrícolas. (Gallardo et al., 2005)

Rivero y Vásquez (2009), en un ensayo titulado "Biología y tablas de vida en *Tetranychus desertorum* en el cultivo de frejol cultivar Tacarigua", determinaron que "el tiempo total del desarrollo de *T. desertorum* del huevo a adulto fue estimado en 6,8 días (con un mínimo de 6 y máximo de 7 días). La fase de huevo duro alrededor de 3,3 días y las fases inmaduras (larva, protoninfa y deutoninfa) fueron de 1,4 - 1,0 y 0,7 días, respectivamente. Resultados similares fueron obtenidos por Praslicka y Huszár (2004), los cuales determinaron un tiempo de

desenvolvimiento de 6,90 días para *T. urticae* criado sobre hojas de *Phaseolus vulgaris* a una temperatura de 30 °C. Posiblemente las semejanzas entre esos estudios son debidos a los efectos causados tanto por la planta hospedera como por la temperatura, pues estudios previos han indicado, por un lado, que las hojas de frejol constituyen el mejor sustrato para la crianza de tetraniquidos, por disminuir el tiempo requerido para completar el ciclo biológico".

Por otro lado, temperaturas superiores a 25°C producen disminución del tiempo de desenvolvimiento e incremento de la fecundidad de estos ácaros. De igual manera Vasconcelos *et al.* (2004), demostraron que el tiempo de desarrollo de *T. abacae*disminuyó en 33,3%, cuando la temperatura de crianza incremento de 25 a 30° C. Del mismo modo otras especies de *Tetranychus* necesitaron de mayor tiempo para completar el ciclo de vida a medida que las temperaturas del ensayo disminuían. El tiempo requerido para *T. ludeni* para completar el ciclo de vida fue de 9,98 días para las hembras cuando estas fueron criadas sobre hojas de frejol a temperaturas de 26 a 34 °C. En cuanto que *T. marinae McGregor* completó el ciclo de vida en 10,73 días, sobre hojas de maracuyá a temperatura de 25°C.

Rivero y Vásquez (2009), demostraron que "el ciclo biológico de T. desertorum fue estudiado en laboratorio ($28 \pm 2^{\circ}$ C, $70 \pm 10\%$ HR y 12:12 h de fotofase), usando unidades de cría. El estudio fue iniciado con 30 unidades de cría, cada una de ellas contenían tres discos de hojas de frejol (3cm de diámetro) con la superficie adaxial de los discos volteada para arriba; los discos fueron bordeados con una lámina húmeda de algodón para evitar el escape de los ácaros y mantener la turgencia de las hojas. Sobre cada disco de hoja fueron colocados una hembra y un macho con un día de edad proveniente de la cría mantenida en el laboratorio.Las unidades de cría fueron observadas cada hora, en el microscopio estereoscópico, para la observación al momento de la postura, después lo cual las hembras fueron removidas. Para saber determinar el tiempo

de incubación de los huevos y la duración de las fases inmaduras (larva, protoninfa y deutoninfa), las observaciones fueron realizadas cada 12 horas.

Larrea(2015), en su trabajo de tesis titulado: Bacillusspp. en T. urticae en rosas (Rosa spp.) bajo invernadero y sus eventos de patogenicidad, pudo determinar que "las bacterias tipo Bacillus spp., están asociadas con la plaga T. urticae, donde este tipo de asociación puede traducirse en sistemas patológicos de relevancia para la implementación de programas de control biológico."El trabajo consistió en determinar 16 cepas con características de Bacillus spp., bordes irregulares, aplanados, de color blanco mate, aspecto harinoso, ceroso, seco o cremoso al igual que las cepas de Bacillus aisladas a partir de suelo (Carrera, 2009) citado por Larrea (2015). Las pruebas bioquímicas realizadas en otras investigaciones (Cuervo, 2010 y Flores et al., 2011a) para la identificación de Bacillus Gram+ corroboran los resultados obtenidos por Larrea (2015), a excepción de la cepa PSL 103 que se puede atribuir al aislamiento de una bacteria tipo Pseudomona, las cuales morfológicamente presentan bordes ligeramente irregulares, aspecto mucoide y con características de pigmentos fluorescentes (Todar, 2012) citado por el mismo autor. Los estadios menos móviles de la plaga son donde se reporta la mayor cantidad de aislados bacterianos. De las 15 cepas de *Bacillus* spp. encontradas, las PSL 104, PSL 113 y PSL 114 fueron las que mejor control presentaron frente a hembras adultas, sin ser estas las de mayor número de UFC/mL a excepción de la PSL 104 que se encontró entre las tres cepas con mayor presencia de UFC. De acuerdo con el autor, las cepas más eficientes presentan una actividad controladora muy parecida a la del Biosan, que por su contenido de substancias activas, tanto bacterias como metabolitos, el efecto de control se produce por bioacumulación lo cual origina el colapso de centros nerviosos, digestivos y reproductivos provocando drásticamente una reducción de la actividad biológica de la plaga.

Torsten (2005), afirma quela rhizobacteria *Bacillus subtilis* ha sido utilizada para estudios genéticos y bioquímicos por varias décadas, y es considerada como paradigma debacteria Gram-positiva formadora de endosporas. Varios tipos de especies de *B. subtilis* han sido recolectados, con el potencial para producir más de dos millones de antibióticos con una grandiosa variedad de estructuras. Todos los genes especifican biosíntesis antibiotica combinada para 350 kb (kilo – base); sin embargo, como no poseemos todas esas especies, un grado de alrededor de 4 - 5% de un genoma de *B. subtilis* está envuelta para la producción de antibióticos.

Larrea, Falconi, y Andrade (2015), en un artículo titulado Aislamiento y caracterización de cepas de Bacillusspp. con actividad contra T. urticae en cultivos comerciales de rosas, mencionan que "Una de las especies de ácaros que producen considerables pérdidas cualitativas y cuantitativas en el cultivo de rosas bajo invernadero en Ecuador es T. urticae, donde el control con agroquímicos convencionales no es efectivo; por lo cual se busca identificar cepas de Bacillusspp. aisladas a partir deT. urticaey determinar sus escenarios anatómopatogénicos para un futuro control con bacterias. La fase de campo se realizó en Latacunga en un cultivo de rosas bajo condiciones orgánicas, en donde se recolectaron hojas de cada tercio de seis plantas con presencia de T. urticae. Las muestras fueron trasladadas para ser procesadas en Plantsphere Laboratories (PSL), en Quito. Se identificaron y cuantificaron los diferentes estadios de la plaga y se aislaron algunos individuos para determinar la presencia de cepas patogénicas de Bacillusspp., las cuales fueron aisladas, purificadas e identificadas. Los tratamientos de verificación patogénica fueron las cepas, agua destilada (testigo) y Bacillus thuringiensis biovar acari(testigo positivo). Los eventos patogénicos se evaluaron en hembras adultas de T. urticae mediante citohistoquímica, por medio de la cual se reportó ruptura de paredes externas, precipitación de contenido celular y malformaciones cuticulares. Se determinó que el mayor número de individuos plaga se localizan en el tercio bajo (59,4%) con mayor presencia de huevos (63,3%). Mediante análisis de componentes principales (ACP) de los tratamientos, se determinó las cepas más eficientes como Efectores Biocatalíticos (EB©) siendo estas la PSL 104, 113, 114 y B. thuringiensisbiovar acari". Este estudio reporta a 15 cepas de Bacillus spp. mediante caracterización morfológica y reconfirmación por tinción de Gram y cuatro pruebas bioquímicas (Prueba de la catalasa, Hidrólisis de almidón, Prueba TSI y Voges Proskauer) en la cuales se obtuvieron resultados positivos para determinar el género Bacillus. Estos autores recomiendanla tinción de endosporas para la detección de este grupo de bacterias, puesto que este es un carácter diagnóstico para Bacillus. Igualmente Falconi (2015) citado por estos mismos autores, asegura que mediante la técnica de citohistoquímica se pudo evaluar escenarios anatomo-patogénicos de Bacillus spp. causados en hembras de T. urticae, en los cuales se observó ruptura de las paredes externas y precipitación de contenido celular, entre otras; siendo las cepas PSL 104, 113 y 114 las mejores, ya que actuaron de igual manera que el tratamiento de control positivo con B. thuringiensis biovar acari, señalando de esta forma la existencia de reguladores naturales bajo condiciones de alta intensidad agronómica del cultivo de rosas, lo cual demuestra ser eficiente para irrumpir sitios vitales de la plaga, reduciendo el daño que este produce al cultivo. Es importante establecer estudios similares en función de la búsqueda de escenarios de la variabilidad bacteriana del género Bacillus para ampliar el espectro de mecanismos y modos de acción destinado al control de importantes plagas agrícolas y en función del ciclo. Se recomienda hacer pruebas en campo de las cepas que se evidenciaron como las más letales en laboratorio y determinar su efectividad en programas de manejo de fincas de flores en control biológico.

Guanolisa (2015), en su trabajo de tesis titulado: Evaluación de la eficiencia de *Bacillus thuringiensis*en el control biológico de la araña roja en el cultivo de fresa determinó que la mejor dosis de aplicación de *B. thuringiensis* para disminuir el ataque de ácaros es de 3 cc/l cada 7 días, debido a que con esta dosis disminuyó la presencia de adultos, ninfas y larvas en el cultivo.

Adicional al uso en el control de ácaros plaga, estudios recientes han evaluado la efectividad para el control de hongos fitopatógenos. La efectividad de B. subtillis CPA-8 en el control de las podredumbres causadas por *Penicillium.digitatum* y Penicillium italicum en naranja; Botrytis cinerea y Penicillium expansumen manzana; y Monilinia laxa y oniliniaFrutícolaen fruta de hueso fue investigada mediante tratamientos de la fruta con células de 10° UFC mL⁻¹, en endosporas de 10UFC mL-1, en sobrenadantes libres de células puros y diluciones 1:10 de todos estos tratamientos. Después de la aplicación los tratamientos de la cepa CPA-8 a base de células, endosporas y sobrenadantes libres de células demostraron diferentes niveles de efectividad en la reducción de la incidencia de los principales patógenos de postcosecha de naranja, manzana y fruta de hueso; teniendo como mejor efectividad de la cepa CPA-8 en fruta de hueso contra M. laxa y M. frutícola donde la mayoría de los tratamientos de células, endosporas y sobrenadantes libres de células controlaron la podredumbre causada por ambos patógenos con reducción de la incidencia de hasta el 100 % en comparación con el tratamiento control (70% - 90 % de incidencia de podredumbre).(Yánez, 2012).

2.2. CATEGORÍAS FUNDAMENTALES O MARCO CONCEPTUAL

2.2.1. Variable Dependiente (Ácaros Tetranychus uticae)



Figura1. Ácaro, hembra en estado adulto con huevos en hoja de fresa.

Tabla 1. Clasificación Taxonómica de *T. urticae*.

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA						
Reino:	Animalia					
Filo:	Arthropoda					
Clase:	Arachnida					
Subclase:	Acari					
Orden:	Prostigmata					
Familia:	Tetranychidae					
Género:	Tetranychus					
Especie:	T. urticae Koch					

Elaborado por: Mendoza, 2015.

Fuente: Argolo, 2012.

Ciclo de vida



Figura 2. Ciclo de vida Tetranychus urticae. **Fuente:**Molina, 2014.

La plaga*T. urticae* es un fitófago, presenta un alto potencial reproductivo, su ciclo de vida es corto (puede completarlo en 10 días), su tasa de desarrollo es rápido alcanzando niveles perjudiciales, presentan una rápida capacidad de dispersión causando graves daños a la planta hospedera. Se desarrolla principalmente en temperaturas elevadas y humedad baja, su reproducción es mediante partenogénesis de tipo arrenotoca, es decir, los machos se desarrollan a partir de huevos no fecundados (haploides) y a partir de huevos fecundados (diploides) se desarrollan las hembras. Esta especie tiene una relación entre sexos de 2:1 y 9:1 a favor de las hembras, es ovípara y pasa por cinco

fases de desarrollo: huevo, larva, protoninfa, deutoninfa y adulto, entre cada una de estas hay un período quiescente (fase inactiva) los cuales son conocidos como protocrisalis, deutocrisalis y teliocrisalis; en cada una de estas fases se da el desprendimiento del exoesqueleto quitinoso para así aumentar de tamaño hasta alcanzar el estadio adulto, producen hilos de ceda en donde vive la colonia. (Argolo, 2012)

• Huevo:

La temperatura ideal para que el huevo eclosione es de 18 °C en la noche y de 22 a 27 °C en el día. El huevo es redondo liso de aproximadamente 0,14mm, al inicio es incoloro y una vez maduro se torna amarillento transparente en el cual se puede ver con facilidad los ojos rojos de la larva. Los huevos eclosionan en menos de 3 días.(Almaguel, 2015)



Figura 3. Presencia de huevos en la hoja del cultivo de fresa. **Fuente:** Investigación de laboratorio.

• Larva: Presenta tres pares de patas y dos ojos oscuros, es amarillenta y redondeada. (Helle y Overmeer, 1985).



Figura4.Larva de *T. urticae* en el foliolo del cultivo de fresa. (Helle y Overmeer, 1985). **Fuente:** Investigación de laboratorio.

• **Protoninfa y Deutoninfa:** Son amarillentas con dos manchas oscuras laterales, presentan cuatro pares de patas. (Helle y Overmeer, 1985)



Figura 5.Presencia de Protoninfa y Deutoninfa, estados inmóviles del patógeno.(Helle y Overmeer, 1985).

Fuente: Investigación de laboratorio.

Adulto:

Hembra: Molina (2013), menciona que el cuerpo es globoso poco ovalado ymide aproximadamente 0,5mm, según la edad y el huésped pueden ser de color amarillento, rojo o anaranjado,en los laterales presentan dos manchas oscuras. Cada hembra puede ovipositar un total de 100 a 120 huevos, ovipositando de 3 a 5 huevos por día. Pero la cantidad de huevospuede variar según el alimento o las condiciones ambientales.



Figura 6.*T. urticae*, hembra en estado adulto. **Fuente:** Investigación de laboratorio.

Macho: Es más pequeño que la hembra, su idiosoma tiene forma de pera, más ancho en la parte anterior. Presenta dos manchas obscuras en los laterales del idiosoma, el color de todo su cuerpo es amarillento, sus patas son más largas que las de las hembras. (Bayer CropScience, 2008)



Figura 7.*T. urticae*, macho en estado adulto. **Fuente:** Investigación de laboratorio.

Alimentación

T. urticaese alimentan de la savia de todo tipo de planta o cultivo. Insertan su estilete en el

tejido de la hoja y succionan el contenido de las células epidérmicas y parenquimatosas, esto

produce el colapso y muerte de las células. También pueden raspar la superficie de la hoja

para alimentarse. (Argolo, 2002)

Características morfológicas

Morfología externa

Helle y Overmeer (1985), mencionan que esta especie de ácaro puede presentar diferentes

características morfológicas, sobre todo su color puede variar en respuesta a su régimen

alimenticio, factores ambientales, planta huésped y estado de desarrollo. Presenta simetría

bilateral y apéndices articulados, también exhiben estigmas los cuales permiten que su

respiración sea traqueal. Los quelíceros les ayudan a alimentarse. Su cuerpo está dividido en

dos partes, gnathosoma (parte anterior) e idiosoma (parte posterior).

Gnathosoma: Son los quelíceros o el estilete bucal y los palpos.

Idiosoma: Conformado por cuatro pares de patas, tiene aspecto globoso con la presencia

de quetas (pelos) y aquí se encuentra la mayoría del sistema alimenticio, respiratorio y

todo el sistema reproductor. En la parte anterior se encuentran los ojos de color rojo.

Morfología interna

Su aparato digestivo está formado por un tubo simple, en el que se encuentra el intestino

anterior (estomodeo) formado por la boca, faringe y el esófago, los cuales tienen como

función succionar el alimento. Posteriormente el intestino medio (ventrículo), lugar en

donde se da la asimilación de las sustancias nutritivas, aquí se encuentran los ciegos

gástricos que son los encargados de aumentar la superficie para la absorción de los

nutrientes. Finalmente el intestino posterior (proctodeo) está compuesto por el recto y el ano,

14

por aquí se da la eliminación de sustancias no digeribles, internamente se encuentran los tubos de Malpighi los cuales recogen las sustancias de desecho del organismo y son eliminadas por el ano. Internamente el gnathosoma está cubierto por glándulas salivales las cuales tienen funciones específicas como producir sustancias lubricantes para la lisis de los cloroplastos, esto es específico de *Tetranychus urticae*. Los ácaros en general tienen músculos estriados los cuales son los responsables de la movilidad del aparato bucal, gnathosoma, apéndices locomotores y abertura genital y anal. (Almaguel, 2002)

En los ácaros el sistema circulatorio es lagunar, está formado por la hemolinfa (líquido claro que contiene hemocitos: amebocitos y leucocitos) tienen varias funciones como el transporte de nutrientes, mensajeros químicos como hormonas, soporte de los tejidos y transmisión de energía en forma de presión hidrostática. (Almaguel, 2002)

El sistema nervioso central de los ácaros está fusionado en una masa ganglionar circunesofágica que presenta nervios periféricos extendidos hacia varios lugares del cuerpo. Las estructuras sensoriales se encuentran en el idiosoma el cual tiene una gran variedad de receptores sensoriales de la cutícula y de setas o cerdas (pelos), con funciones táctiles y quimiorreceptoras. (Almaguel, 2002)

Entre los receptores sensoriales se encuentran: Mecano-receptor (pelo ordinario que coordina el movimiento al caminar, percibe la gravedad, el sustrato y la vibración del aire); Quimio-receptor (presentan dos o más neuronas que penetran en el lumen); Termo-receptor; Higro-receptor y Foto-receptor. En *T. urticae* el ojo anterior actúa como un scanner pero este no forma imágenes, únicamente tiene receptores para el verde y el UV, el segundo ojo es receptor no direccional y únicamente capta el UV. Los receptores de olfato se encuentran generalmente en el dorso del tarso. El sistema respiratorio es mediante tráqueas que se abren en un par de estigmas.

Daños

Según Molina (2014), *T. urticae* succiona la savia en el envés de las hojas (mesófilo) disminuyendo la resistencia estomática y la tasa respiratoria (disminución de la tasa de

transpiración); además provoca efectos negativos en la tasa de absorción energética de la planta (disminución de la actividad fotosintética) y como consecuencia daños en la planta por alimentación ocasionando decoloraciones, deformaciones y defoliaciones en los cultivos; por ende también son capaces de afectar dramáticamente el crecimiento, rendimiento y calidad de la fibra de la planta. En rosas es la plaga más abundante causando oscurecimiento y debilitamiento en la producción de los botones y pérdida en la calidad de la flor.De igual maneraBranzanti (1989) menciona que el daño es ocasionado por las ninfas y adultos del ácaro, el aparato bucal está conformado por quelíceros estelitetiformes que le permitenperforar y succionar la savia del envés de las hojas, cambiando la tonalidad del follaje, de verde natural a verde amarillento y posteriormente a café.

El mayor daño causado por la araña de dos manchas, es la reducción del rendimiento y la reducción del tamaño de la fruta, el daño coincide con la formación de reservas que serán usadas en la producción de los frutos. La mayor incidencia de los ácaros en esta etapa, puede reducir los rendimientos sin ocasionar síntomas visibles en la planta. Si la araña causa daños en etapas tempranas, su efecto en el rendimiento es perceptible a través de todo el ciclo. El número de ácaros que puede ser tolerado sin reducción significante del rendimiento depende del cultivar, área de cultivo y de la etapa de cultivo.

Si los ácaros no son controlados, se forman grandes colonias que pueden causar manchas amarillas en las hojas superiores. Las fuertes infestaciones provocan una coloración rojiza en las hojas, el follaje distorsionado se torna café y después se seca y con ello puede ocurrir estrés en la planta. Las plantas vigorosas son menos dañadas por las araña.

2.2.2. Variable Independiente: Bacillus subtilis

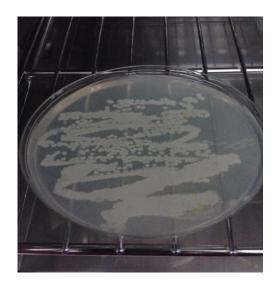


Figura8: Bacillus subtilis en medio de cultivo.

Fuente: Investigación de laboratorio.

Control bilógico (2015), indica que el género *Bacillus subtilis* pertenece a la familia Bacillaceae y es una de las que mayor actividad bioquímica presenta entre los microorganismo debido a su capacidad cosmopolita (presente en muchos habitas), el *B. subtilis* son bacterias gram positiva, aerobias y anaerobias facultativas, son muy móviles, catalasa positiva, su reproducción se da por fisión binaria y producen diferentes tipos de enzimas hidrolíticas como quitinasas, celulasas, amilasas, proteasas y glucanasas. *B. subtilis* presenta una de las particularidades más importantes existentes en este género, producen endosporas que les permiten vivir condiciones adversas entrando en un periodo de latencia o criptobiosis (descenso del metabolismo). Estas endosporas pueden propagarse por el aire y llegar a distintos sitios lo que las hace ubicuas en el ambiente, no deben confundirse con un medio reproductivo si no una forma de conservación de especie. *B. subtilis* son resistentes a temperaturas altas, cambios osmóticos fuertes y a concentraciones bajas de humedad, finalmente cuando encuentran un medio idóneo comienza nuevamente su ciclo, germinando y sacando una célula madre que empezara a reproducirse una vez más por fisión binaria.

Tabla2.Clasificación taxonómica de *B. subtillis*.

Reino: Bacteria

Filo: Firmicutes

Clase: Bacilli

Orden: Bacillales

Familia: Bacillaceae

Género: Bacillus

Especie: B. subtilis

Elaborado por: Mendoza, 2015

Fuente: Control biológico, 2015

Características de B. subtillis:

B. subtilis pertenece a las bacterias grampositivas, mesófilas, producen esporas ovales o cilíndricas; son fermentativas, usualmente hidrolizan caseína y almidón; los esporangios no son hinchados; la pared de la espora es delgada.

Varias especies de bacterias Gram positivas (incluído el género *Bacillus*), disponen de una serie de estrategias adaptativas cuando se ven sometidas a privación de nutrientes en su medio ambiente. (Control biológico, 2015)

- Bacterias gram positivas.
- Son mesófilas.
- Producen esporas ovales o cilíndricas.
- Son fermentativas, usualmente hidrolizan caseína y almidón.
- Los esporangios no son hinchados.
- La pared de la espora es delgada.
- Catalasa positiva (Bioland).

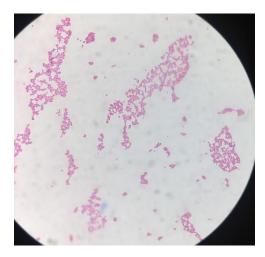


Figura9. Identificación de *B. subtilis*, con el método de tinción de Gram.

Fuente: Investigación de laboratorio.

Bacillus subtilis como Biocontrolador de fitopatógenos

B. subtilises una de las bacterias más estudiadas a nivel mundial por su acción biocontroladora de fitopatógenos, debido a que éste en su información genética expresa unos genes que codifican la síntesis de metabolitos peptídicos antibióticos que inhiben la expresión de ciertos microorganismos patógenos a través de antibiosis. Estos pueden ser sintetizados durante el crecimiento activo de la bacteria o cuando ya se ha desarrollado, su producción está estrechamente relacionada con la capacidad de unión que tiene a través de los exudados de las raíces y también está asociada a un estímulo en su expresión genética por la presencia de fitopatógenos u otro tipo de género que inducen su producción progresiva. Entre los antibióticos sintetizados más importantes están gramicidina, surfactin, iturin, y fengycin.

El mecanismo de acción de estos antibióticos se basa en la interacción con la membrana de la célula blanco cambiando su permeabilidad generando pequeñas vesículas y alterando la composición de lípidos por el flujo de moléculas e interacción con estas, ya sean de origen orgánico e inorgánico entre los cuales están como ejemplo ácido y cationes respectivamente.

Aunque la antibiosis es el mecanismo empleado por el *Bacillus subtilis*, existen otros métodos por el cual ejerce su antagonismo volviéndolo de alto espectro como biocontrolador.

Cuando se habla de microorganismos benéficos en agricultura se debe tener en cuenta que estos son endógenos, es decir nativos de los suelos, que están en constante equilibrio con la microflora, ya sea benéfica o patógena. Empieza una competencia por espacio (mayor área poblada), competencia por nutrientes (microorganismo en mayor proporción toma un requerimiento en común con otra especie) y contacto directo con hongos y en algunos casos bacterias alimentándose de estos, debido a la secreción de enzimas digestivas degradando sus estructuras, como se mencionó antes estas son por lo general quitinasas, celulasas, proteasas y glucanasas. (Márquez, 2007)

Márquez(2007), indica que varias especies de Bacillus tienen la capacidad de producir enzimas que por hidrólisis degradan los compuestos disponibles del suelo y plantas como fuente de carbono, entre las enzimas más comunes que secretan los Bacillus se encuentra la amilasa que degrada el almidón y lo convierte en dextrina. Las colonias de Bacillus presentan una superficie rugosa o plana, de color claro y blanco, ocasionalmente son planas ligeramente convexas, sus bordes son redondos irregulares y de consistencia espesa, cerosa o babosa. Las especies del género Bacillus forman esporas o endosporas, que son estructuras que pueden sobrevivir independientemente de la célula madre, son especializadas para resistir condiciones adversas del ambiente como calor, sequedad, congelación, radiación y químicos tóxicos. Las endosporas se forman debido a una serie de cambios controlados genéticamente, estas estructuras son consideradas una forma primitiva de diferenciación celular Generalmente las endosporas de los Bacillus está formada por proteínas deshidratadas que usan el ácido poli-βhidroxibutírico en aerobios y polisacáridos en los anaerobios. Se ha reportado que algunas endosporas llegan a vivir de 200 a 400 años, pero el grado de resistencia de la endospora depende ampliamente de las condiciones del entorno bajo las cuales fueron formadas.

Existen especies de *Bacillus* que son patógenas para el hombre, como *Bacillus anthracis* la cual puede afectar el tracto gastrointestinal, cutáneo y aparato respiratorio, esta especie fue utilizada como arma terrorista llegando a causar la muerte de miles de personas, otra especie patógena es *B. cereus* la cual se desarrolla fácilmente en los alimentos produciendo una enfermedad emética, comúnmente diarrea y vómito. (Castellanos *et al.*, 2005)

Fravel (2005), citado por Yánez (2012), menciona que *B. subtillis* se ha utilizado durante décadas para la elaboración de suplementos alimenticios (probióticos) para animales y humanos así como de medicinas. En la actualidad una gran cantidad de *B. subtilis* y sus metabolitos como enzimas son utilizadas en la elaboración de productos biológicos de uso agrícola y biorremediación. En la agricultura esta bacteria y otras especies representan aproximadamente la mitad de los bioplaguicidas disponibles comercialmente en el mercado mundial. En USA *B. subtilis* se encuentra dentro del grupo de sustancias GRAS(Generally Recongnized As Safe) y diferentes productos que son utilizados para el control de enfermedades fúngicas en vegetales, frutas, frutos secos y cultivos vitícolas.

Entre las especies frecuentemente empleadas en actividades agrícolas se encuentra *Bacillus subtilis*y se ha convertido en un microorganismo muy importante para diferentes usos ya que ayuda a descomponer residuos vegetales, produce enzimas para la elaboración de productos químicos, elaboración de fertilizantes, controla bacterias y hongos patógenos, además que no es considerado patógeno para el hombre; sin embargo, puede contaminar alimentos. Es manejable para la manipulación genética por lo cual es un organismo modelo para estudios en laboratorio.(Realpe *et al.* 2002). Estos mismos autores señalan que cuando es cultivada en Agar-Sangre de cordero,las colonias tienen de dos a cuatro mm de diámetro, beta hemolíticas con hemólisis completa, que pueden presentar aspecto liso, mucoide o rugoso; sus bordes pueden ser ondulados o extendidos en el medio y ocasionalmente dan la apariencia de cultivos mixtos.

2.2.3. Unidad de análisis: Cultivo de fresa

Taxonomía

Tabla3. Clasificación taxonómica de fresa *Fragaria vesca*.

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Rosales

Familia: Rosaceae

Género: Fragaria

Especie: F. vesca L.

Elaborador por: (Mendoza, 2015)

Fuente: (Patiño et al, 2014).

Patiño, et al. (2014) mencionan que la fresa es de amplia distribución en el mundo, siendo los principales países productores: Estados Unidos, Turquía, España, Egipto y Colombia, en menor escala. España es el mayor exportador de la fruta en fresco y congelada. Otros países productores y exportadores de fruta fresca son: Países Bajos, Bélgica y México. En cuanto a países importadores de fruta fresca y congelada, se destacan: Francia, Alemania, Estados Unidos y Reino Unido.

Descripción Botánica

• Sistema radicular

El sistema radicular es fasciculado, se compone de raíces y raicillas, las primeras presentan cambium vascular y suberoso, mientras que las segundas carecen de este, las raicillas sufren un proceso de renovación fisiológico. La profundidad del sistema radicular es en promedio de 40 cm, encontrándose el 90% en los primeros 25 cm. (Patiño *et al.* 2014)

Tallo

El tallo que sale del suelo o corona es un tallo acortado que contiene los tejidos vasculares del cual salen los pecíolos, que son largos y los cuales sostienen las hojas. (Angulo, 2009)

Estolón

Dinamarca (2005),dice que los estolones tienen dos entre nudos largos, seguidos por una serie de entrenudos cortos, que forman la corona de la futura planta.

Hoja

Angulo, (2009) menciona que las hojas son pinnadas, trifoliadas, con estípulas en su base, de color verde oscuro, con muchos estomas para poder realizar una intensa transpiración. En las axilas se forman yemas vegetativas o productivas, dando origen las primeras a estolones y las segundas a las inflorescencias que van a producir los frutos.

Flor

Las flores pueden ser perfectas y hermafroditas o imperfectas y unisexuales. La mayor parte de las fresas cultivadas comercialmente poseen flores perfectas y hermafroditas, agrupándose en inflorescencias las cuales poseen un eje primario. Las flores de la fresa se agrupan en inflorescencias que son un conjunto de flores que salen del mismo brote. La inflorescencia típica posee un eje primario, dos secundarios, cuatro terciarios y ocho cuaternarios, llevando cada eje en su extremo una flor, pero cada variedad puede presentar diferentes tipos de inflorescencias (Angulo, 2009).

Fruto

Dinamarca (2005) y Angulo (2009) concuerdan con que el fruto es un agregado, lo que quiere decir, que proviene de una sola flor que tiene los carpelos separados y de cada ovario sale un pequeño fruto, en el caso de la fresa el fruto está formado por varios aquenios dispuestos sobre un receptáculo carnoso. El aquenio es un fruto monocárpico, indehiscente, seco y de una sola semilla. Después de realizada la fecundación, los óvulos al transformarse en aquenios estimulan el engrosamiento del receptáculo, el cual al transformarse en carnoso forma el fruto. Se pueden presentar frutos con corazón lleno o corazón vacío.

Suelo

Fonseca, (20015) menciona que la fresa see desarrolla en suelos ligeramente ácidos, sueltos, aireados y bien drenados, ya que los suelos pesados limitan el desarrollo radicular. La raíz es altamente sensible a la salinidad generando reducciones de hasta el 50% en el rendimiento de la planta. Se deben evitar suelos donde se haya cultivado antes papa, tomate, pimentón, melón, sandía y calabaza, con el fin de prevenir la propagación de enfermedades que comparten con estos cultivos. Actualmente se está aumentando el área cultivada en sistemas de hidroponía y de agricultura protegida; aun cuando las inversiones son mayores para este tipo de cultivo los beneficios en productividad, calidad y operatividad hacen que el sistema sea atractivo para el agricultor.

• Temperatura

Dinamarca (2005) asegura que el fotoperiodo impone su influencia sobre la formación de yemas florales, elongación de estolones y racimos, tamaño de la hoja y longitud del pecíolo; que junto a la temperaturas diurnas entre 18° y 25° C y nocturnas de 8° a 13° C condicionan el desarrollo vegetativo y la floración, mientras que la revista El Agro (2012) afirma que la temperatura óptima para el cultivo es de 15 a 20°C en el día y de 15

a 16°C en la noche, temperaturas por debajo de 12°C durante el cuajado dan lugar a frutos deformados por el frío, en tanto que un clima muy caluroso puede originar una maduración y una coloración del fruto muy rápida, lo cual le impide adquirir un tamaño adecuado para su comercialización.

Manejo del cultivo

Labores pre-culturales

• Preparación del suelo

Se debe hacer dos pasadas en cruz con arado de cincel, posteriormente hacer las aplicaciones de los correctivos y hacer un pase con rastrillo en el sentido que van a ir las camas o eras, a continuación se pasa la surcadora para marcar las camas, se comienza a levantar las camas para que queden a 30 cm del nivel de los caminos y se emparejan. (Angulo, 2009)

• Descontaminación del suelo

Angulo (2009) asegura que la mejor forma de desinfectar el suelo es mediante la solarización, la cual consiste en la aplicación de gallinaza (40kilos por cama de 31 m), con el suelo bien húmedo y un hongo antagónico (Trichoderma harzianum o Trichoderma lingnorum), cubriéndolo con el acolchado o plástico negro, por espacio de un mes, tiempo suficiente para que se multipliquen los hongos antagónicos y cumplan con su misión de control de hongos, bacterias y artrópodos plaga presentes en el suelo. O con la aplicación de Propamocarb Hidrocloruro (Previcur), en dosis de 3 cc por litro de agua, asperjando toda la superficie de la cama.

Fertilización

Es muy difícil e incorrecto entregar una fórmula de fertilización de un frutillar, sin embargo distintas investigaciones han evidenciado que la proporción de N : P : K que se

requiere es 1 : 0,8 : 1,8. En general las dosis de fertilizantes sugeridas para las distintas situaciones son: 150-250 kg N/ha, 90-180 kg P₂O₅/ha y 270-400 kg K₂O/ha. El N en exceso es altamente tóxico en frutilla, por lo cual se debe evitar aplicar más de 30 kg/ha por aplicación. (Patiño *et al*, 2014)

Acolchado

Fonseca L., (2015) asegura que la cubierta plástica negra o mulch es muy importante porque no permite la germinación de malezas, no permite que los frutos estén en contacto con el suelo, retiene humedad en el suelo reduciendo los niveles de evaporación del agua, mantiene la temperatura de las raíces especialmente en los días muy fríos y es el ambiente especial para la propagación de los hongos antagónicos los cuales van a controlar algunos hongos, bacterias y artrópodos plaga habitantes del suelo

Labores Culturales

Deshierba

Dinamarca, (2005) asegura que en casi todas las fincas las malas hierbas se eliminan de forma manual mediante escardas que tiene como objetivo eliminar las malas hierbas que se desarrolla en el cultivo. Para realizarla se dispone de medios culturales y químicos.

Riego

Fonseca (2015) y Angulo (2009) coinciden en que El número o frecuencia de riegos así como su duración se determinará según cada caso y se debe considerar los recipientes, el sustrato y los factores ambientales. El riego se debe suministrar a la planta desde el primer momento en que se siembra. El sistema de riego más utilizado en el cultivo de la fresa es el de goteo, ya que podemos controlar totalmente las necesidades de la planta de agua y nutrientes necesaria para el desarrollo del cultivo, obteniendo bajos consumos de agua frente a otro sistemas de riego.

• Fertilización

MAGAP (2016), informa que existen resultados que indican que no hay respuesta a la aplicación de fertilizantes al suelo; sin embargo, dado que el cultivo de la fresa es muy intensivo y además es una planta de alta producción, los productores establecen un programa de fertilización para reponer la extracción de nutrimientos y mantener la fertilidad del suelo.

Fonseca, (20015) menciona que para plantas en etapa de floración/producción el contenido o rango de nutrientes adecuado en cultivo de fresa (muestra constituida por 25 hojas maduras) es el siguiente:

Tabla 4. Elementos esenciales.

MACRO	NUTRIENTES %	MICRONUTRIE	NTES ppm
N	2,00 - 4.0	Fe	50 - 250
P	0,25 - 1,00	$\mathbf{M}\mathbf{n}$	30 - 350
K	1,25 - 3,00	В	20 - 75
Ca	1,00 - 2,50	Cu	6 - 100
Mg	0,25 - 1,00	Zn	20 - 250
S	0,13 - 0,48	Mo	0,25 - 0,50
		Cl (/%)	0,10 - 0,50

Elaborado por: Mendoza, 2016.

Fuente: Magap, 2016

Tabla 5. Elementos no esenciales.

Elemento	Ppm
Na	00 – 2000
Al	00 - 250

Elaborado por: Mendoza, 2016.

Fuente: Magap, 2016

Poda

MAGAP (2016), menciona que por el tipo de crecimiento de la planta de fresa, la producción constante de tallos hace que la planta tome una forma de macolla en donde se acumula gran cantidad de hojas y ramas muertas, consecuencia también del calor producido por la cobertura de polietileno negro. Esta hojarasca retiene humedad que facilita el ataque de hongos a la fruta y además dificulta la aplicación de plaguicidas, por lo que es eliminada mediante podas periódicas de limpieza. Se realizan después de los ciclos fuertes de producción, quitando los racimos viejos, hojas secas y dañadas y restos de frutos que quedan en la base de la macolla. Teniendo cuidado de no maltratar la planta y no se poda antes de la primera producción. Al aumentar la penetración de luz a las hojas, así como la ventilación, se acelera la renovación de la planta, facilita la aplicación de plaguicidas y previene el ataque de hongos en la fruta.

Plagas

• Gallina ciega (*Phyllophaga sp.*)

Angulo, (2009), indica que las larvas de gallina ciega se alimentan de las raíces de las plantas, debilitándolas y causando un pobre desarrollo. Las plantas pueden también presentar síntomas de deficiencia de agua y nutrientes, son susceptibles al acame, no rinden bien y pueden morir. Por lo general estos ataques son realizados en manchones y

pueden eliminar una siembra o parte de ella. Los adultos son por lo general atraídos hacia los árboles de yuca, madreado y piñón sobre los cuales se alimentan.

• **Cortadores** (*Prodenia sp.*, *Spodoptera sp.*)

Los cortadores son una plaga que casi siempre aparece en la primera etapa de crecimiento, cuando las plantas están formando las primeras hojas. No se puede prevenir, pero se debe revisar constantemente el cultivo para detectar si hay hojas cortadas e inmediatamente, hacer aplicaciones de insecticidas. A veces aparecen en el momento de la cosecha, cortan racimos y muerden las frutas, que están en contacto con el suelo. Si el ataque ocurre en cosecha, hay que guardar las restricciones en el tiempo de espera y usar productos como Carbaril, *Bacillus thuringiensis* o bien cebos con algún insecticida. (Fonseca, 2015)

• Vaquitas (Diabrotica sp.)

Angul, (2009) indica que por lo general atacan el follaje en las etapas iniciales de desarrollo de la planta, sin embargo las larvas pueden dañar las raíces ocasionando la marchitez de la planta. Los adultos se comen la epidermis de los tallos y provocan un respaldo que interrumpe el paso de la savia y favorece la penetración de organismos patógenos. Se combate mediante atomizaciones al follaje a base de Carbaril (Sevín), Metomil (Lannate) o Clorpirifos (Lorsban).

• **Arañita roja** (*Tetranychus urticae*)

Fonseca, (20015) asegura que la araña roja es un ácaro cosmopolita y polífago que afecta a prácticamente todos los cultivos protegidos, al aire libre, ornamentales y plantas espontáneas. Los adultos tienen un tamaño de 0,5-0,6 mm de longitud y poseen una coloración variable en función de la planta que se estén alimentando, clima y edad, pudiendo adoptar coloraciones verdosas, amarillentas o rojas. Los síntomas más característicos son la presencia de punteaduras o pequeñas manchas de color amarillento

en el haz. Como medidas culturales se recomiendan la eliminación de cultivos anteriores y malas hierbas, así como el empleo de dosis de abonos equilibrado.

CAPÍTULO III

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. HIPÓTESIS

Con la aplicación de *Bacillus subtillis* la población de ácaros *Tetranychus urticae* disminuirá en un 40% en el cultivo de fresa (*Fragaria vesca*).

3.2. OBJETIVOS

3.2.1. Objetivo general

Evaluar la eficiencia de la aplicación de *Bacillus subtillis* sobre poblaciones de *Tetranychus urticae* en plantas de fresa (*Fragaria vesca*).

3.2.2. Objetivos específicos

Evaluar la mortalidad producida por diferentes dosis de *Bacillus subtilis* en el cultivo de fresa.

Evaluar el efecto subletal de diferentes dosis de *B. subtilis* sobre *T. urticae*.

Evaluar diferentes tiempos de aplicación de *B. subtillis* para el control de *T. urticae*.

Determinar la sintomatología de infección en T. urticae por B. subtillis.

Determinar la concentración letal media (CLM) de B. subtillis sobre T. urticae.

Proponer un tratamiento biológico, limpio para prevenir y controlar la incidencia de ácaros en el cultivo de fresa.

CAPÍTULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO

Esta investigación se realizó en la Granja Experimental Docente "Querochaca", de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, en el cantón Cevallos, provincia de Tungurahua.

4.2. CARACTERIZACIÓN DEL LUGAR

Para el experimento se utilizó el laboratorio de biotecnología que está situado a una altitud de 2855 msnm, a una latitud de 1° 25′ 0" S., longitud de 78° 35′ 22" O., con una temperatura máxima de 18° C., mínima de 12° C. y una humedad relativa del 53%.

4.3. EQUIPOS Y MATERIALES

4.3.1. Equipos

Estereoscopio

Incubadora

Microscopio

4.3.2. Materiales

Bacillus subtilis(21)

Pinceles 0,1

Bomba de aspersión capacidad 5 litros

Cajas Petri

Espuma de poliuretano

Agujas de disección

Alcohol antiséptico

Agua destilada

Materiales de escritorio

4.4. FACTORES EN ESTUDIO

4.4.1. Tiempos de aplicación de Bacillus subtilis

T1 = Primera aplicación a los 7 días de haber emergido el adulto

T2 = Aplicación a los 14 días de días de haber emergido el adulto

T3 = Aplicación a los 21 díasde haber emergido el adulto

4.4.2. Dosis de aplicación de Bacillus subtilis

D0 = Sin aplicación 0cc/l (control)

D1 = 100 cc Bacillus subtilis en 100 L H₂O

D2 = 200 cc Bacillus subtilis en 100 LH₂O

D3 = 300 cc Bacillus subtilis en 100 L H₂O

4.5. Tabla 6. TRATAMIENTOS

Los tratamientos constituyen la combinación de los factores en estudio:

N°	SÍMBOLO	TRATAMIENTO
1	$T_1 D_0$	Siete días + sin aplicación (control)
2	$T_1 D_1$	Siete días + 100 cc/100 L H ₂ 0
3	$T_1 D_2$	Siete días + 200 cc/100 L H ₂ 0
4	$T_1 D_3$	Siete días + 300 cc/100 L H ₂ 0
5	$T_2\mathbf{D_0}$	Catorce días + sin aplicación (control)
6	$T_2\mathbf{D_1}$	Catorce días + 100 cc/100 L H ₂ 0
7	$T_2 D_2$	Catorce días + 200 cc/100 L H ₂ 0
8	$T_2 D_3$	Catorce días + 300 cc/100 L H ₂ 0
9	$T_3 D_0$	Veintiuno días + sin aplicación (control)
10	$T_3\mathbf{D_1}$	Veintiuno días + 100 cc/100 L H ₂ 0
11	$T_3 D_2$	Veintiuno días + 200 cc/100 L H ₂ 0
12	$T_3 D_3$	Veintiuno días + 300 cc/100 L H ₂ 0

4.6. DISEÑO EXPERIMENTAL

Elensayo fue conducido en un diseño experimental completamente al azar con un arreglo de tratamientos en parcelas divididas, siendo la parcela principal representada por el tiempo de aplicación y la subparcela por las diferentes dosis de aplicación con tres repeticiones.

4.7. VARIABLES RESPUESTA

4.7.1. Porcentaje de mortalidad de *T. urticae* por efecto de la bacteria.

Para determinar el valor de esta variable se procedió a contar el número de individuos adultos vivos y muertos, después de cada aplicación.'

4.7.2. Sintomatología de la bacteria en el ácaro.

Para la descripción de los síntomas se realizó la tinción de Gram sobre ácaros muertos y vivos para determinar la presencia de endosporas de *Bacillus subtilis* en los individuos.

4.7.3. Determinación de efecto subletal de B. subtilis sobre T. urticae.

Después de cada aplicación de los tratamientos se contó el número de huevos, larvas y ninfas de *T. urticae* para determinar la afectación de la bacteria en el ácaro.

4.7.4. Determinación de la concentración letal media (CLM) de B. subtilis.

Este valor se determinó, una vez concluido el experimento con los datos totales de los tiempos y dosis aplicados, valorando los resultados obtenidos.

4.8. MANEJO DEL EXPERIMENTO

Para la obtención de individuos de edad homogénea, previamente al inicio del ensayo, se prepararon 20 unidades de crianza. Consistiendo en una placa Petri (9cm de diámetro) conteniendo una espuma de poliuretano de 1,0 cm de espesura, humedecido con agua destilada. Sobre cada unidad se acondicionó un disco de hoja de fresa cultivar "Monterrey" (3 cm de diámetro) sobre el cual fueron colocados 10 hembras y un macho para promover los emparejamientos y así posibilitar la producción de huevos. Después de 24 horas las hembras y los machos fueron descartados y el número de huevos fue registrado. Los huevos fueron dejados en esas unidades de crianza y observados hasta el surgimiento de los adultos, los cuales fueron utilizados en el estudio del ciclo biológico. (Rivero y Vásquez, 2009)



Figura 10. Foliolos de fresa variedad Monterrey.



Figura11.Arenas de espuma de poliuretano de 1,0 cm de espesura, humedecido con agua destilada.

Fuente: Investigación de laboratorio.

4.8.1. Inoculación de ácaros adultos en el cultivo de fresa

Bajo las condiciones de laboratorio, el ciclo biológico del ácaro fue de 21 días, tiempo en el cual todos los huevos pasaron por todas las etapas hasta llegar a ser adultos. La inoculación se la realizó con pinceles de 0,1 mm y con la ayuda de una lupa. Se identificó una hoja de fresa y se colocaron 5 ácaros adultos en un foliolo de la hoja identificada.



Figura 12. Inoculación de *T. urticae* en una hoja del cultivo de fresa.



Figura 13.Inoculación de 5 adultos de*T. urticae* en un foliolo de una hoja identificada en el cultivo de fresa.

Fuente: Investigación de laboratorio.

4.8.2. Identificación de Bacillus subtilis en el laboratorio

Las bacterias son incoloras y se observan con dificultad al microscopio óptico. Los cocos y los bacilos se pueden identificar por su forma, agrupación y por la afinidad a los colorantes utilizados en la tinción de Gram. Con éste antecedente se procedió a reconocer la bacteria mediante tinción de Gram en el microscopio con el lente de inmersión.

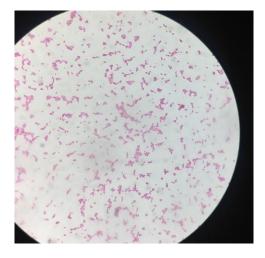


Figura 14. Bacillus subtilis observado en el microscopio en el lente de inmersión.

4.8.3. Obtención de la bacteria Bacillus subtilis

Para realizar esta investigación es necesario adquirir la bacteria totalmente pura libre de otros microorganismos y contaminantes. La bacteria *Bacillus subtilis*con el nombre comercial SUBTILIN, fue adquirida en la empresa BIOCONTROL.

Tabla 7. Contenido de ingredientes activos de *Bacillus subtilis*:

Mínimo 1X109 UFC/ml.

APARIENCIA			
COLOR	CAFÉ		
OLOR	FERMENTO FRESCO NO ÁCIDO		
CONSISTENCIA	LIGERAMENTE ESPESO		
SEDIMENTOS	5 A 8% APROXIMADAMENTE		

Elaborado por: MENDOZA, 2016.

Fuente:(Biocontrol, 2015)

4.8.4. Muestreo e Identificación de la plaga en el cultivo

Se realizaron infestaciones artificiales en el laboratorio de Sanidad vegetal de la Facultad de Ciencias Agropecuarias. El procedimiento está descrito enla metodología de éste ensayo.

4.8.5. Aplicación de la bacteria en el cultivo

Se realizaron las aplicaciones correspondientes con las diferentes dosis y tiempos previstos en los tratamientos.

4.8.5. Bomba de aspersión

Para realizar la aplicación de *B. subtilis* en las unidades de experimentación se utilizó una bomba manual con capacidad de 5 litros.

4.9. PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN

Los datos de mortalidad de ácaros fueron tabulados usando el programa Excel para graficar la evolución de este parámetro a lo largo del período de evaluación del estudio. Adicionalmente, los datos se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) para determinar el efecto de las diferentes dosis y tiempos de aplicación en la mortalidad de *Tetranychus urticae*. Para ello se utilizó el programa estadístico Statistix versión 9.0.

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Realizado el análisis estadístico, no se observó interacción entre el tiempo de aplicación y dosis de *B. subtilis* sobre la mortalidad de *T. urticae* (p<0,185; F= 1,54; gl=6), sin embargo se detectó efecto individual tanto de la dosis como del tiempo de aplicación (Tabla 6). Con relación al efecto de la dosis, se observó que todas las dosis produjeron niveles de mortalidad superiores al testigo, y estos fueron estadísticamente similares entre ellos. A pesar de no haberse detectado diferencias por efecto de las diferentes dosis, la aplicación de 3 cc/L de *B. subtilis* provocó un nivel de mortalidad 24,82 y 17,23% numéricamente superior que las dosis de 2 y 1 cc/l, respectivamente.

Tabla 8.Porcentaje de mortalidad en hembras de *Tetranychus urticae* por la aplicación de diferentes dosis de *Bacillus subtilis*.

Dosis	7	14	21	Media
Sin aplicación	13,33±10.328bc (0.00-20.00)	0,00±0.0000c (0.00-0.00)	0,00±0.0000c 0.00-0.00)	4,444 B
1 cc/l	20,00±30.984bc (0.00-60.00)	57,76±32.851ab (33.30-100.00)	55,00±35.496ab (25.00-100.00)	44,26± A
2 cc/l	20,00±0.0000abc (20.00-20.00)	61,10±31.044ab (33.30-100.00)	28,90±30.615abc (0.00-66.70)	36,67± A
3 cc/l	40,00±17.889abc (20.00-60.00)	77,80±17.196a (66.70-100.00)	66,67±51.640ab (0.00-100.00)	61,49± A
Media Tiempo	23,33± C	49,17± A	37,64± B	

Valores seguidos de la misma letra en una columna no mostraron diferencias significativas según Tukey (p<0,001)

Al considerar el efecto individual del tiempo de aplicación, se observó que la más alta tasa de mortalidad fue evidenciada cuando la bacteria fue aplicada a los 14 días en el

cual la mortalidad alcanzada fue de 49,17%, seguido de la aplicación a los 21 días donde la tasa de mortalidad disminuyó en 11,53% (Tabla 6).

Concentración letal media (CL₅₀)

La respuesta de mortalidad en función a la dosis mostró una respuesta cuadrática a los 7, 14 y 21 días, siendo que la mayor tasa de mortalidad fue alcanzada cuando se aplicó la dosis 1 cc/l a los 14 y 21 días, mientras que a los 7 días, el mayor porcentaje de mortalidad en hembras de *T. urticae*fue observado con la dosis 3 cc/l (Figura 16). Considerando el hecho de que la mortalidad mostró una respuesta cuadrática, se recurrió a la linearización de los datos mediante la aplicación de Log de la concentración para calcular la CL₅₀obteniéndose que esta variable se ubicó en 2,54 cc/l de la bacteria. De acuerdo a esto, se asume que 2,54 cc/l es capaz de provocar la mortalidad del 50% de la población bajo estudio. Sin embargo, debido a que estos representan valores obtenidos en laboratorio, es recomendable conducir estudios similares bajo condiciones de invernaderos en los cuales se ajuste esta dosis.

En términos generales, la CL50 depende de factores extrínsecos e intrínsecos de los agentes utilizados. Entre los factores extrínsecos se incluyen las condiciones ambientales del experimento, tales como la temperatura, humedad relativa y la especie de planta usada como substrato, mientras que entre los factores intrínsecos se pueden mencionar la calidad del producto utilizado, la concentración de esporas del producto, así como las características de la especie plaga usada. En tal sentido, Carreras-Solís et al. (2009) obtuvieron que la CL₅₀ de una cepa de*B. thuringiensis*(LBT-111) sobre larvas de *Heliothis virescens* Fabricius fue de 2,6 x 10⁷ esporas/ml, sugiriendo que esta cepa promisoria para el control de esta plaga en maíz. De manera similar, Pitre Ruiz et al. (2008) al evaluar la actividad tóxica específica de las proteínas recombinantes Cry1Aa, Cry1Ac, Cry1B y Cry1C de *B. thuringiensis* sobre larvas de primer instar de *Tecia solanivora* no observaron diferencias entre las delta-endotoxinas recombinantes Cry1Aa, Cry1Ac, Cry1B y Cry1C de Bt y la CL₅₀ de las cuatro toxinas fueron de , evaluándolas a concentraciones de 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25 y 0,3 μg/cm2 de proteína, obteniendo las CL50: Cry1Aa=0,103, Cry1Ac=0,107, Cry1B=0,085 y Cry1C=0,112 μg de

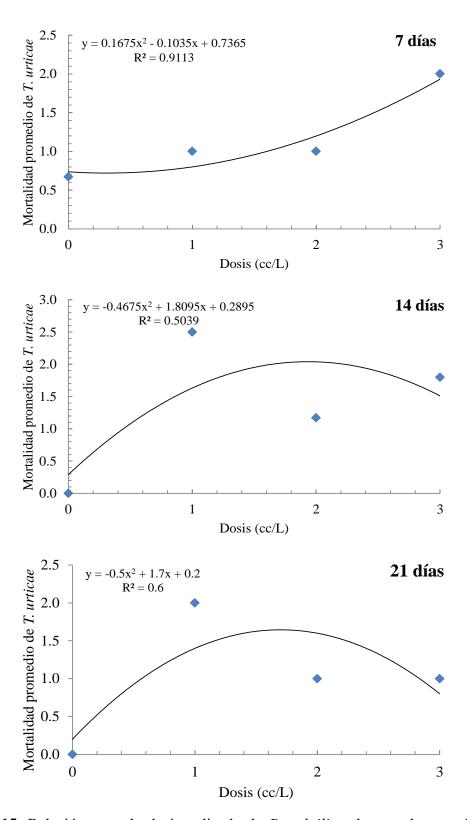


Figura 15: Relación entre la dosis aplicada de *B. subtilis* y la tasa de mortalidad de hembras de *T. urticae*.

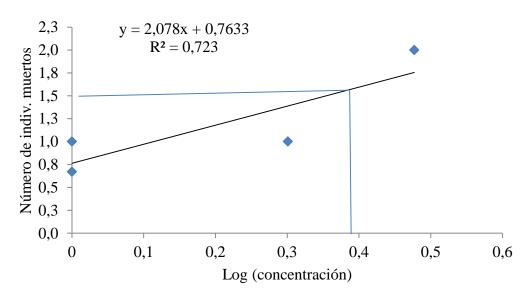


Figura 16. Concentración letal media (CL_{50}) provocada por diferentes dosis de B. *subtilis* sobre hembras adultas de T. *urticae*

proteína/cm². Estos autores demostraron que las δ -endotoxinas evaluadas poseen una alta toxicidad sobre larvas de *T. solanivora*, siendo levemente mayor la proteína Cry1B.

No existe información disponible sobre el efecto de *B. subtilis* en el control biológico de *T. urticae*, por lo que las comparaciones fueron hechas con investigaciones donde usaron *B. thuringiensis*. Guanolisa (2015) y se observaron porcentajes de control de adultos, ninfas y larvas de *T. urticae* de 90,9; 86,6 y 92,8 %, respectivamente con la aplicación de *B. thuringiensis* en dosis de 3 cc/l cada 7 días. De acuerdo con Alper *et al.* (2013), *B. thuringiensis* es capaz de mostrar efecto tóxico específico. En tal sentido, estos autores observaron que de 31 aislados nativos, solo 42% de ellos provocó mortalidad entre 16% y 30%; mientras que el 58% restante causó menos de 15% de mortalidad en ninfas de *T. urticae*. De manera similar, Larrea *et al.* (2015) evaluaron 16 cepas de *Bacillus* spp., siendo la cepa PSL114 la que produjo mayor impacto en *T. urticae*, afectando ruptura de paredes externas, precipitación de contenido celular y malformaciones cuticulares. Aparte del efecto de la especificidad entre la cepa de *Bacillus* y la especie de herbívoro que ataque, otros factores tales como la temperatura, especie de planta hospedera y edad de la larva pueden afectar la eficacia de control de la cepas de *Bacillus* spp. (Vargas,

Chapman y Penman, 2002). En tal sentido, estos autores observaron que las larvas más viejas de *T. urticae* fueron significativamente más susceptibles a *thuringiensis* a 13°C que a 28°C, así mismo encontraron diferencias cuando la *thuringiensina* fue aplicada en hojas de duraznero y manzano.

Basados en las observaciones de Vargas *et al.* (2002), las diferencias en el porcentaje de control observadas en el presente estudio y los resultados presentados por Guanoluisa (2015) podrían ser debidas, entre otras, a la especie de *Bacillus* usada y a la diferencia en la temperatura en la cual fueron conducidos los ensayos.

Efecto subletal de B. subtilis sobre T. urticae

Según el análisis estadístico no se observó efecto de las diferentes dosis de *B. subtilis* sobre la oviposición de *T. urticae*(Figura 18). En las aplicaciones hechas a los siete días, la oviposición varió de 17 huevos en el tratamiento control a 12 huevos en el tratamiento que recibió 2 cc/l de la bacteria. Aunque no se detectaron diferencias significativas en los tratamientos aplicados a los 14 y 21 días, se observó amplia variabilidad de los datos tal como es evidenciado por las barras de desviación estándar. Resultados similares fueron obtenidos por Tang *et al.* (1999),quienes no detectaron diferencias en la oviposición entre larvas resistentes y susceptibles al gen Cry1Ac. Los autores concluyeron que ambos grupos de larvas no fueron capaces de discriminar entre plantas de brócoli que expresa Cry1Ac y plantas convencionales, con oviposición entre 39-41 huevos por planta.

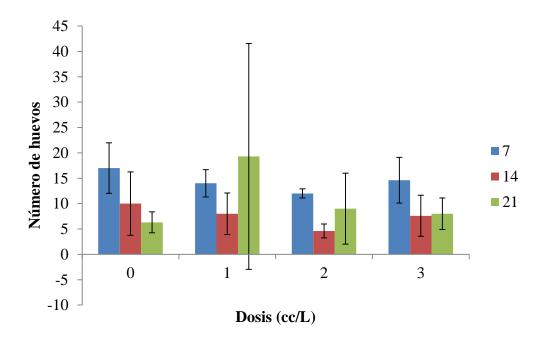


Figura 17. Número promedio de huevos producido por hembras de *T. urticae* tratadas con diferentes dosis de *B. subtilis* aplicados a los 7, 14 y 21 días del ensayo.

Araujo, (2002) en un Estudio en diferentes microorganismos usando *Bacillus* spp. para el control de la oviposición de *Heterodera glycines*no reportaron diferencias significativas entre tratamientos. Los autores concluyeron que la aplicación de *Bacillus* spp. después de 15 días disminuyó el número de huevos en los tratamientos Bti (*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*) y Aldicarb en comparación con el tratamiento Bs (*Bacillus sphaericus*) y esta tendencia se mantuvo a los 30 días del ensayo.

Reed *et al.* (1990), demostraron la existencia de una relación linear significativa entre el porcentaje de producción de huevos por hembras de *T. urticae* y la dosis de thuringiensis. Las dosis aplicadas de *Thuringiensis*(ABG) que reportaron mejores resultados fueron de1,10 ppm de ABG-6162A y 0,85 ppm of ABG-6266 produciendo una reducción del 25% de fecundidad. Los autores aseguran que estos resultados predicen que el tratamiento de ABG-6266 sobre *T. urticae* produjeron menor número de huevos que ácaros tratados con una tasa equivalente de ABG-6162A. Sin embargo los análisis de varianza no mostraron diferencias en el promedio de números de huevos

producidos. Por lo tanto los autores sugieren que las dos formulaciones probablemente afectarían la fecundidad de poblaciones de campo de manera similar.

Sintomatología de la infección de T. urticae por B. subtilis

Se evidenció infección de las hembras de *T. urticae* por la bacteria *B. subtillis* en todos los tratamientos aplicados (Figura 18). Basados en la técnica de tinción de Gram realizada posterior a la muerte del ácaro, se observaron áreas del idiosoma del ácaro con endosporas de la bacteria. Aunque en los ácaros con movilidad reducida se observó menor número de signos de la enfermedad, estos también respondieron a la tinción de Gram demostrando así la infección por la bacteria (Figura19). De acuerdo con Larrea et al. (2015), las bacterias tipo *Bacillus* spp., están asociadas con la plaga *T. urticae*, lo cual puede traducirse en sistemas patológicos de relevancia para la implementación de programas de control biológico. Estos autores demostraron que la patogenicidad producida por *Bacillus*spp. sobre *Tetranychus urticae* se caracterizan por daños anatómicos tales como ruptura de las paredes externas, precipitación de contenido celular, entre otras, y además concluyen que la intensidad de esta respuesta puede variar de acuerdo con la cepa usada. En su estudio, ellos encontraron que las cepas PSL 104, 113 y 114 fueron las mejores, con valores de patogenicidad similares al producto comercial Biosan.

De acuerdo con Bravo *et al.* (2007), el primer efecto de las proteínas *Cry*, una de las principales toxinas contenidas en las especies de *Bacillus*, es la producción de lisis de las células epiteliales del intestino medio de los artrópodos como consecuencia de la formación de poros de las membranas. Posterior a la disrupción, el epitelio intestinal libera su contenido proporcionando a las esporas un medio para germinación que conduce a una septicemia severa y consecuentemente la muerte del artrópodo.

Dado el efecto tóxico de las cepas de *Bacillus* se han elaborado cepas comerciales que presentan una actividad controladora. Tal es el caso del producto comercial denominado Biosan, que por su contenido de substancias activas (bacterias y metabolitos) produce el

control por bioacumulación lo cual origina el colapso de centros nerviosos, digestivos y reproductivos provocando drásticamente una reducción de la actividad biológica de la plaga (Biocontrol Science, 2009). Al igual que Bactomite, un producto a base de *Bacillus thuringiensis* biovar *acari* el cual inicia su efectividad en los estadios menos activos de la plaga y finalmente en estadios finales, donde los ingredientes activos son transportados por los sistemas de conducción de la célula epidérmica, hacia el flujo citoplasmático, disolviendo órganos, células y tejidos (Biocontrol Science, 2009); estas dos últimas reacciones fueron notables en los individuos tratados.



Figura 18. Hembra de *T. urticae* muertaobservada después de 7 días de haber aplicado el tratamiento evidenciado por la presencia de endosporas y la irregularidad en la pared externa del idiosoma por causa de la actividad de *B. subtilis*(a) y la tinción positiva en las patas I y II (b).



Figura19.Tinción de Gram aplicada a un ácaro colectado vivo mostrando síntomas de infección por *B. subtillis* evidenciado por la presencia de bacteria en el interior del idiosoma.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES, BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS

6.1. CONCLUSIONES

Concluida la investigación "Control de ácaros (*Tetranychus urticae*) mediante la aplicación de *Bacillus subtilis* en el cultivo de fresa (*Fragaria vesca*) "se establecen las siguientes conclusiones:

- La mejor dosis de aplicación de *Bacillus subtilis* para disminuir la población de *T. urticae* fue D3 (3cc/L). Debido a que con esta dosis se produjo una mortalidad de 24,82 y 17,23% numéricamente superior que las dosis de 2 y 1 cc/L.
- Se determinó que el mejor tiempo de aplicación de *B. subtilis* fue a los 14 días en el cual la mortalidad alcanzada fue de 49,17%, seguido de la aplicación a los 21 días donde la tasa de mortalidad disminuyó en 11,53%
- La presencia de *B. subtilis* sobre el acaro afectó directamente al sistema nervioso, presentando irregularidades en el idiosoma y patas por causa de la actividad de la bacteria.
- En el control de huevos, larvas y estados inmóviles del ácaro noexistió diferencia significativa, a pesar en los datos obtenidos se evidenció una disminución en la población.

6.2. BIBLIOGRAFÍA

- Agronegocios. (2015). Cultivo de fresa. Recuperado de: http://agronegociosecuador.ning.com/page/fresas-su-produccion-y
- Almaguel, L. (2002). Morfología, taxonomía y diagnóstico fitosanitario de ácaros de importancia agrícola. Curso introductorio a la acarología aplicada. Laboratorio de Acarología. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV). División de Biología. Cuba. 84 Pp.
- ➢ Alper M., Gunes H., Sungur H., Dursun O., Eskin A., Toxic effects of some native *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bacillales: Bacillaceae) isolates against *Tetranychus urticae Koch(Acarina: Tetranychidae), Ceroplastes rusci L.* (Homoptera: Coccidae) and Ceratitis capitata (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). Tubitak.(3).1 87
- Angulo, R. (2009). Cultivo de fresa. Bayer crop Science. Maria Luz Editorial. 43 pp.
- Araújo, F.; Veloso, J.; Ademir, S. y Araújo de F. (2002). Influência de *Bacillus subtilis* na eclosão, orientação e infecção de *Heterodera glycines* em soja. Ciência Rural, Santa Maria, v.32,(2), p.197-202
- Argolo, P. 2012. Gestión integrada de la araña roja *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae): optimización de su control biológico en clementinos. Departamento de Producción Vegetal, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agronómicos, Universidad Politécnica de Valencia. Valencia. 140 Pp.
- ➤ Biocontrol Science. 2009. Ficha técnica BACTOMITE®, acaricida de amplio espectro. Producto con la garantía del Departamento de Agricultura y Tecnología BIOSOFTWARE (Alemania). Distribuido por BioCiencia (BC) biociencia@biosoftware.de 2 Pp.

- Branzanti, E. (1989).Cultivo de fresa. España: Madrid. Ediciones Mundi Prensa.
- Branzanti, E. (1989).La fresa. Ácaros. En Primera Edición. España. pag: 206.
 Ediciones Mundi Prensa
- ➢ Bravo, A.; Sarabia, S.; Lopez, L.;Ontiveros, H.; Abarca, C.; Ortiz, A.; Ortiz, M.; Lina, L.; Villa-Lobos, F.j.; Guadalupe, P.; Nunez-Valdez, M.E.; Soberon, M.; Quintero, R. (1998). Chacterization of cry genes in Mexican Bacillus thuringiensis strain collection. Applied and Environmental Micorbiology. V.64, 4965-4972 p.
- ➤ Carreras-Solis, B.; Rodríguez, D.; Piedra, F. (2009). Evaluación de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* Berliner para el control de *Heliothis virescens* Fabricius en el cultivo del tabaco en Cuba. Fitosanidad, 13 (4): 277-280.
- Castellanos, J., Ortiz, L., Oliva, P., Dueñas, M., Fresneda, J., Fraga, S. y Meléndez, O. 2005. Estudios relacionados con el uso del *Bacillus subtilis* en el control de hongos fitopatógenos. Instituto de Investigación Fundamentales en Agricultura Tropical. La Habana Cuba. 10 Pp.
- ➤ Control biológico. (2015). *Bacillus subtillis*. Recuperado de: http://www.controlbiologico.com/ficha_tecnica_bacillus_subtilis_SUBTILIN.pdf
- Cory, J. y Franklin, M. (2012). Evolution and the microbial control of insects. Evolutionary aplications. Canadá. Blackwell Publishing Ltd 5 (2012), Pp. 455-463.
- Cuervo, J. 2010. Aislamiento y caracterización de *Bacillus* spp. como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas. Carreara de Microbiología Agrícola y Veterinaria. Bogotá Colombia. 28 Pp.

- ➤ Dinamarca P. 2005. Cultivo de Fresa. Recuperado de: http://www.indap.gob.cl/Docs/Documentos/Estrategias%20Regionales%20Com petitividad%20por%20Rubro/Estrategias%20Regionales%202005/REGION_05/11Frutillas-ExposicionEspecialista.pdf.
- ➤ Flores, A., Egúsquiza, R., Alcarraz, M., Woolcott, J., Benavides, E., Godoy, J., Huerta, D., Jesus, Y. y Patiño A. 2011. Biodiversidad de *Bacillus thuringiensis* aislados de agroecosistemas peruanos y evaluación del potencial bioinsecticida. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Ciencia e Investigación,14(1): 29-34.
- ➤ Fonseca, L. (2015). Manual de fresa, Programa de apoyo agrícola y agroindustrial, Vicepresidencia de Fortalecimiento empresarial. Cámara de comercio de Bogotá. Bogotá, Colombia. 61pp.
- Fravel, D.R. 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. Annual Review of Phytopathology, 43: 337-359.
- ➤ Gallardo, A.; Vásquez, C.; Morales J. y Gallardo J. (2005). Biología y enemigos naturales de *Tetranychus urticae* en pimiento. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología, 74: 34-40.
- ➤ Granja, C. (2010). Cultivo de fresa en el Ecuador. Recuperado de: http://www.lahora.com.ec/index.php/noticias/show/1101346980/1/%C3%81caro s_viven_m%C3%Als_en_fresas,_babacos,_moras_y_flores.html#.VMagS6YU
- ➤ Guanolisa, M. (2015). Evaluación de la eficiencia de *Bacillus subtilis* para el control bilógico de araña roja *Tetranychus urticae* Koch en cultivo de fresa. (Tesis de maestría inédita). Universidad Técnica de Ambato. Cevallos Ecuador.
- ➤ Helle, W. y Overmeer W.P.J,(1985). Rearing techiques pp 331-385. Spider mites Their biology, natural enemies and control.Helle w. y Sabela M.W. E (1^{ra} ed.). Elsevier. Amsterdam, The Netherlands.

- ➤ Herbert, H.J. (1981). Biology, life tables, and innate capacity for increase of the two spotted spider, *Tetranychus urticae* (Acarina: Tetranychidae). The Canadian Entomologist, 113: 371-378.
- Larrea I, Falconi C y Andrade A. (2015). Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus* spp. con actividad contra *Tetranychus urticae* Koch en cultivos comerciales de rosas. Revista Colombia Biotecnología, 17 (2): 9.
- Larrea, M. (2015). *Bacillus* spp. en *Tetranychus urticae* en rosas (*rosa* spp.) bajo invernadero y sus eventos de patogenicidad. (Trabajo de titulación para obtención del título de Biotecnologo). Universidad Internacional del Ecuador. Quito- Ecuador.
- Magap. (2015). El cultivo de Fresa en la provincia de Tungurahua. Recuperado de: http://www.agricultura.gob.ec/tungurahua-magap-promueve-produccion-decultivos-asociados/
- ➤ Márquez, F. 2007. Aislamiento y taxonomía de bacterias del género *Bacillus* recolectadas en suelos de un bosque de *Pinus radiata* y una pradera permanente en distintas épocas de muestreo. Universidad Austral de Chile. Facultad de ciencias. Escuela de ciencias. Valdivia Chile. 74 Pp.
- ➤ Molina J, (2014). Principales plagas en el cultivo de fresa. Seminario de cultivo de fresa. Ambato, Ecuador.
- Montagner, V. (2008). Selección de especies de *Bacillus thuringiensis* tóxicas en el pulgón de algodón. Tesis de maestría. Universidad de Brasilia. Facultad de Agronomía y medicina veterinaria. Brasil.
- ➤ Ortega, (2014). Manual del cultivo de fresa. Honorable gobierno provincial de Tungurahua. N°47, Pp 21–22.

- Patiño, D.; Garcia, F.; Barrera, E.; Quejada, O.; Rodriguez, H. y Arroyo, I. (2014). Manual técnico del cultivo de fresa bajo buenas prácticas agrícolas. Gobernación de Antioquia. Medellin, Colombia.
- Pitre Ruiz, L.; Hernández-Fernández, J.; Bernal Villegas, J. (2008). Toxicidad de δ-endotoxinas recombinantes de *Bacillus thuringiensis* sobre larvas de la polilla guatemalteca (*Tecia solanivora*) (Lepidóptera: Gelechiidae). Revista Colombiana de Biotecnología, 10 (2): 85-96.
- ➤ Praslicka, J., Huszar, J. 2004.Influence od temperature and host plants on the development and fecundity of the spider *mite Tetranychus urticae* (Acarina: Tetranychidae). Plant Protection Science, 40(4): 141-144.
- Realpe, M., Hernández. y Agudelo, C. 2002. Especies del género Bacillus: morfología macroscópica y microscópica. Instituto Nacional de Salud. Bogotá – Colombia. 4 pag.
- ➤ Reed, N.; Royalty, Y.; Franklin, R.; Hall M.; y Taylor, Dr.(1990). Effects of Thuringiensin on *Tetranychus urticae* (Acari: *Tetranychidae*) Mortality, Fecundity, and Feeding. Department of Entomology, Ohio State University, Ohio Agricultural Research and Development Center, Vol 83 (3). 7pp.
- ➤ Rivero E, Vásquez C. (2009). Biologia e tabela de vida de *Tetranychus desertorum* sobre folhas de feijão.Zoologia,26 (1): 38-42.
- Silva, I. (2010). Actividad de polvo, extractos y aceite esencial de *Peumus boldus* Molina solos y en mezcla con *Bacillus thurigiensis* Berliner contra *Spodoptera friiperda* (J.E. Smith) y *Helicoverpa zea* (Boddie). Tesis doctoral. Instituto de Enseñanzas e Investigación de Ciencias Agrícolas. Campus Montecillos. Postgrado de Fitosanidad. México México D.F.
- ➤ Tang J.; Collins H.; Roush R.; Metz T.; Earle E. y Shelton A.(1999).Survival, weight gain, and oviposition of resistant and susceptible *Plutella xylostella*

- (Lepidoptera: Plutellidae) on broccoli expressing Cry1Ac toxin of *Bacillus thuringiensis*. Journal of Economic Entomology, 92 (1): 47-55.
- ➤ Torsten, S. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. Molecular microbiology. 56 (4), 845-857.
- ➤ Vargas, R., Chapman B., Penman D.R. 2002. Factors influencing the responses of *Tetranychus urticae* Koch (Acarina: Tetranychidae) to thuringiensin. Agricultura Técnica, 62(1):3-14.
- ➤ Vasconcelos, G.; Da Silva, F.; Gondim, Jr.; y Oliveira, J. 2004. Efeito de diferentes temperaturas no desenvolvimento e reproducao de *Tetranychus urticae* Braker y Pritchard (Acari: Tatranychidae) em Bananeria musa. Neotropical Entomology. 33 (2); 149 154.
- ➤ Yanez, V. (2012). Potencial de la cepa CPA-8 de Bacillus subtilis como agente de biocontrol de enfermedades de postcosecha de fruta. Tesis doctoral. Universidad de Lleida Departamento de biotecnoligia. Malaga España.

6.3. ANEXOS

Datos de mortalidad de ácaros adultos

		REPETICIONES	
TRATAMIENTOS	I	II	II
T1D1	0	1	1
T1D2	3	0	0
T1D3	1	1	1
T1D4	3	2	1
T2D1	0	0	0
T2D2	1	2	4
T2D3	2	1	1
T2D4	1	2	2
T3D1	0	0	0
T3D2	3	0	3
T3D3	3	4	4
T3D4	0	1	0

Datos de control de huevos:

		REPETICIONES	
TRATAMIENTOS	1	11	II
T1D1	0	0	0
T1D2	0	0	0
T1D3	0	0	0
T1D4	0	0	0
T2D1	15	2	3
T2D2	7	4	13
T2D3	6	3	5
T2D4	12	8	3
T3D1	5	5	9
T3D2	7	3	48
T3D3	5	18	4
T3D4	10	4	10

Los datos fueron transformados por $y = \tan^{-1} \sqrt{\% mortalidad}$

Analysis of Variance Table for morttrans

Source	DF	SS	MS	F	P
Rep	2	0.09980	0.04990		
Tiempo	2	0.25855	0.12928	3.79	0.1195
Error Rep*Tiempo	4	0.13659	0.03415		
Dosis	3	3.77552	1.25851	20.97	0.0000
Tiempo*Dosis	6	2.37337	0.39556	6.59	0.0000
Error	54	3.24117	0.06002		
Total	71	9.88501			

Grand Mean 1.1711 CV(Rep*Tiempo) 15.78 CV(Error) 20.92

Statistix 9.0 11:22:38

Datos mortalidad, 07/10/2016,

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of Mortal for Dosis

Dosis	Mean	Homogeneous	Groups
3	61.489	A	
1	44.256	AB	
2	36.667	В	

2 36.667 B 0 4.444 C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 9.0379 Critical Q Value 3.749 Critical Value for Comparison 23.961 Error term used: Error, 54 DF There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of Mortal for Tiempo

Tiempo Mean Homogeneous Groups

2 49.167 A 3 37.642 AB 1 23.333 B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 6.2228 Critical Q Value 5.043 Critical Value for Comparison 22.188 Error term used: Rep*Tiempo, 4 DF There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of Mortal for Tiempo*Dosis

Tiempo Dosis Mean Homogeneous Groups

```
3 77.800 A
3
    3 66.667 AB
    2
        2 61.100 AB
         1 57.767 AB
    2
         1 55.000 ABC
    1
         3 40.000 ABCD
         2 28.900 ABCD
    3
1
    1 20.000 BCD
         2 20.000
    1
         0 13.333 BCD
    1
         0.0000
    2
                    CD
         0 0.0000
                      D
Comparisons of means for the same level of Tiempo
                  0.05 Standard Error for Comparison 15.654
 Alpha
 Critical Q Value 4.828 Critical Value for Comparison 53.441
 Error term used: Error, 54 DF
```

Comparisons of means for different levels of Tiempo

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 14.917 Critical Q Value 5.412 Critical Value for Comparison 57.086 Error terms used: Rep*Tiempo and Error

There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of morttrans for Dosis

Dosis Mean Homogeneous Groups 3 1.3489 A 2 1.3090 A 1 1.2469 A 0 0.7795 B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0817 Critical Q Value 3.749 Critical Value for Comparison 0.2165 Error term used: Error, 54 DF There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of morttrans for Tiempo

Tiempo Mean Homogeneous Groups 2 1.2339 A 1 1.1890 A 3 1.0904 A

CAPÍTULO VII

PROPUESTA

TITULO

Aplicación de Bacillus subtilispara el control de ácaros fitófagosen el cultivo de fresa.

7.1. DATOS INFORMATIVOS

Se localizara en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, conjuntamente con la asesoría técnica de profesionales del MAGAP y AGROCALIDAD.

7.2. ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA

De acuerdo a los registros de aplicaciones de acaricidas en el cultivo de fresa, es necesariofomentar el conocimiento acerca de nuevas alternativas de control biológico sobre *T. urticae* en pequeños y grandes productores. Para concientizar el uso excesivo de acaricidas que se han utilizado en los últimos años y como consecuencia se evidencialos elevados costos de producción y resistencia de la plaga.

7.3.JUSTIFICACIÓN

Con la aplicación de *B. subtilis* como agente controlador de ácaros en el cultivo de fresa, se pretende disminuir la utilización de pesticidas. Fomentando un control bilógico en el cual los beneficiados sean el productor disminuyendo la compra de acaricidas y por ende reducción en costos de producción, el consumidor asegurándose de obtener frutos sanos libres de químicos y el medio ambiente conservando su bioestructura y generando un equilibrio biológico.

7.4. OBJETIVOS

• Aplicar *Bacillus subtilis* en el cultivo de fresa en dosis de 3cc/ La los 14días para controlar poblaciones de ácaros.

7.4.ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD

Con la aplicación de esta propuesta se podrá disminuir poblaciones de ácaros en todos sus estados bilógicos, conservando las características del cultivo de fresa sin afectar a otros organismos presentes en el suelo y planta. Permitiendo a los productores obtener frutos sanos con dirección a un mejor mercado y elevar sus ganancias

7.5.FUNDAMENTACIÓN

Para obtener plantas y frutos inocuos, a la vez requeridos por consumidores, requiere consideraciones especiales en su manejo, control de plagas y enfermedades y recolección. Bajo el cumplimiento de normas acerca del control biológico. Se podrá obtener frutos sanos para el consumo humano, en donde se garantiza la seguridad y soberanía alimentaria,

7.7. METODOLOGÍA, MODELO OPERATIVO

• Observación de incidencia de ácaros en el cultivo de fresa

Visualizar la presencia de ácaros en el envés de las hojas. Los signos visibles se manifiestan en hojas adultas con coloración de color café y presencias de telarañas alrededor de los foliolos afectados.

• Preparación de Bacillus subtilis previo a la aplicación en campo

Una vez que se haya adquirido el producto comercial se procederá a preparar en una solución de 3 cc de *B. subtilis* en 1 litro de agua.

• Aplicación de B. subtilis en el cultivo

En el momento que la solución sea homogénea se procederá a aplicar la bacteria con la ayuda de una bomba mochila.

Se procurara cubrir al roció toda la planta, asegurándonos que el producto llegue a los foliolos en donde se encuentre la plaga.

7.8. ADMINISTRACIÓN

Se trabajará con los productores y proveedores de cada una de las empresas bajo el asesoramiento del investigador. Conjuntamente con la supervisión y asistencia técnica de profesionales de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato.