



**UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL**

FACULTAD DE EDUCACION TÉCNICA PARA EL DESARROLLO

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

TEMA

**Evaluación del efecto de *Bacillus thuringiensis* sobre el
desarrollo de *Rhizoctonia* spp. en condiciones *in vitro***

AUTOR

Martínez Lino, Andrés Alfonso

Trabajo de Titulación previo a la obtención del título de

INGENIERO AGROPECUARIO

TUTOR

Ing. Ángel Llerena Hidalgo, Ph.D.

Guayaquil, Ecuador

Septiembre de 2019



**UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL**

FACULTAD DE EDUCACIÓN TÉCNICA PARA EL DESARROLLO

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

CERTIFICACIÓN

Certificamos que el presente Trabajo de Titulación fue realizado en su totalidad por **Martínez Lino, Andrés Alfonso**, como requerimiento para la obtención del Título de **Ingeniero Agropecuario**.

TUTOR

Ing. Ángel Llerena Hidalgo, Ph.D.

DIRECTOR DE LA CARRERA

Ing. Franco Rodríguez John Eloy, Ph.D.

Guayaquil, 9 de septiembre del 2019



**UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL**

FACULTAD DE EDUCACIÓN TÉCNICA PARA EL DESARROLLO

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Yo, **MARTÍNEZ LINO, ANDRÉS ALFONSO**

DECLARO QUE:

El Trabajo de Titulación: **Evaluación del efecto de *Bacillus thuringiensis* sobre el desarrollo de *Rhizoctonia spp.* en condiciones *in vitro***, previo a la obtención del Título de **Ingeniero Agropecuario**, ha sido desarrollado respetando derechos intelectuales de terceros conforme las citas que constan en el documento, cuyas fuentes se incorporan en las referencias o bibliografías. Consecuentemente este trabajo es de mi total autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance del Trabajo de Titulación referido.

Guayaquil, 9 de septiembre del 2019

AUTOR

Martínez Lino, Andrés Alfonso



**UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL**

FACULTAD DE EDUCACIÓN TÉCNICA PARA EL DESARROLLO

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

AUTORIZACIÓN

Yo, Martínez Lino, Andrés Alfonso

Autorizo a la Universidad Católica de Santiago de Guayaquil a la **publicación** en la biblioteca de la institución del Trabajo de Titulación: **Evaluación del efecto de *Bacillus thuringiensis* sobre el desarrollo de *Rhizoctonia* spp. en condiciones *in vitro*, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y total autoría.**

Guayaquil, 9 de septiembre del 2019

AUTOR

Martínez Lino, Andrés Alfonso



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL

FACULTAD DE EDUCACIÓN TÉCNICA PARA EL DESARROLLO

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

CERTIFICACIÓN URKUND

La Dirección de las Carreras Agropecuarias revisó el Trabajo de Titulación “Evaluación del efecto de *Bacillus thuringiensis* sobre el desarrollo de *Rhizoctonia* spp. en condiciones *in vitro*”, presentado por el estudiante **Andrés Alfonso Martínez Lino**, de la carrera de Ingeniería Agropecuaria, donde obtuvo del programa URKUND, el valor de 0 % de coincidencias, considerando ser aprobada por esta dirección.

URKUND	
Documento	Martinez Lino Andrés UTE A 2019 TT.docx (D54671630)
Presentado	2019-08-02 11:07 (-05:00)
Presentado por	ute.fetd@gmail.com
Recibido	noelia.caicedo.ucsg@analysis.orkund.com
	0% de estas 23 páginas, se componen de texto presente en 0 fuentes.

Fuente: URKUND-Usuario Caicedo Coello, 2019

Certifican,

Ing. John Franco Rodríguez, Ph.D.
Director Carreras Agropecuarias
UCSG-FETD

Ing. Noelia Caicedo Coello, M.Sc.
Revisora – URKUND

AGRADECIMIENTO

A Dios, por permitirme llegar hasta aquí, a mis padres, Alfonso y Amada, por su amor y apoyo incondicional, a mis hermanos, Alex y Luis, por cada palabra de aliento, a mi abuelita María, por su felicidad y orgullo frente a cada paso que doy, a mi familia y amigos por apoyarme constantemente. Y a mi Novia, por siempre creer en mí.

Agradezco a mis profesores: Ing. Ángel Llerena Hidalgo, Ph.D. por haberme apoyado en mi carrera y haber formado parte de su equipo de trabajo, al Ing. Cristóbal Aguirre Chaw, por haberme impartido sus conocimientos y más que todo por ser un amigo incondicional y haber confiado en mí y al Ing. Lenin Paz Carrasco, Ph.D. porque me ayudó en la realización de éste proyecto ampliando mis conocimientos en el área de la microbiología.

DEDICATORIA

Éste Trabajo de Titulación se lo dedico en primer lugar a Dios, por permitir vivir día a día y darme la fortaleza de ser mejor cada día. Con eterno amor a mis padres, a mis hermanos, y a mi abuela, por la esencia y la guía fundamental para que cada día me convierta en un mejor ser humano y sobre todo el motor para romper con fuerzas cada obstáculo.



**UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL**

FACULTAD DE EDUCACIÓN TÉCNICA PARA EL DESARROLLO

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN

Ing. Ángel Llerena Hidalgo, Ph.D.

TUTOR

Ing. Franco Rodríguez, John Eloy, Ph.D.

DIRECTOR DE CARRERA

Ing. Noelia Carolina Caicedo Coello, M.Sc.

COORDINADORA UTE



**UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL**

FACULTAD DE EDUCACIÓN TÉCNICA PARA EL DESARROLLO

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

CALIFICACIÓN

Ing. Ángel Llerena Hidalgo, Ph.D.

TUTOR

ÍNDICE GENERAL

1	INTRODUCCIÓN	2
1.1	Objetivos	3
1.1.1	Objetivo general.	3
1.1.2	Objetivos específicos	3
1.2	Hipótesis	3
2	MARCO TEÓRICO	4
2.1	<i>Rhizoctonia solani</i>	4
2.1.1	Descripción	4
2.1.2	Síntomas.	5
2.1.3	Epidemiología	6
2.1.4	Control	7
2.2	<i>Bacillus Thuringiensis</i>	8
2.2.1	Clasificación Taxonómica de <i>B. thuringiensis</i> .	8
2.2.2	Caracterización del <i>B. thuringiensis</i> .	8
2.2.3	Propiedades Biológicas de <i>B. thuringiensis</i>	9
2.2.4	Control Biológico con <i>B. thuringiensis</i> .	9
3	MARCO METODOLÓGICO	12
3.1	Ubicación del ensayo	12
3.2	Variables de Estudio	12
3.3	Tipo de investigación	12
3.4	Análisis estadístico	12
3.5	Materiales	12
3.5.1	Material técnico.	12
3.5.2	Material tecnológico	13
3.6	Diseño del experimento	13
3.7	Desarrollo del experimento	14
3.7.1	Aislamiento de <i>Rhizoctonia</i> spp.	14
3.7.2	Siembra de <i>Rhizoctonia</i> spp. en un medio de cultivo	15
3.7.3	Repique del <i>Rhizoctonia</i> spp.	15
3.7.4	Activación de <i>B. thuringiensis</i>	15
3.7.5	Dispersión de <i>B. thuringiensis</i> sobre el medio de cultivo semisólido de PDA.	16
3.7.6	Aspersión de <i>B. thuringiensis</i> sobre el micelio de <i>Rhizoctonia</i>	

spp. reproducido en un medio de cultivo PDA.....	16
3.7.7 Dispersión de <i>B. thuringiensis</i> y siembra de <i>Rhizoctonia</i> spp. en el mismo medio de cultivo PDA.....	17
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	23
5.1 Conclusiones	23
5.2 Recomendaciones	23
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos de estudio	14
Tabla 2. Interpretación del global de datos finales por tratamiento	18
Tabla 3. Prueba T para muestras independientes.....	20

RESUMEN

El presente estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Análisis de Suelos, Aguas y Plantas de la Facultad de Educación Técnica para el Desarrollo de la Universidad Católica de Santiago de Guayaquil, donde se analizó la reacción de diferentes aplicaciones de *B. thuringiensis* sobre varios cortes de tejidos afectados por *Rhizoctonia* spp. La metodología constó de tres aplicaciones de *B. thuringiensis* sobre *Rhizoctonia* spp., la primera aplicación se basó en la dispersión de *B. thuringiensis* previo a la inserción de *Rhizoctonia* spp. en el medio de cultivo, la segunda aplicación fue la aspersion de *B. thuringiensis* sobre el micelio de *Rhizoctonia* spp. en el medio de cultivo y la tercera aplicación constó de una división el medio de cultivo en donde la primera mitad fue la dispersión de *B. thuringiensis* y en la otra mitad fue la inserción de *Rhizoctonia* spp. Las variables estudiadas fueron el diámetro en cm del micelio de *Rhizoctonia* spp. y el número total de esclerocios formados por *Rhizoctonia* spp., estas variables fueron analizadas mediante la prueba de T para muestras independientes en donde los resultados evidenciaron que las distintas aplicaciones de *B. thuringiensis* inhibieron el crecimiento micelial de *Rhizoctonia* spp. y la formación de esclerocios, sin embargo la aplicación en donde se asperjo *B. thuringiensis* sobre el micelio de *Rhizoctonia* spp. impidió completamente el crecimiento del micelio de *Rhizoctonia* spp. y a su vez la formación de esclerocios, siendo esta una alternativa como agente de biocontrol de *Rhizoctonia* spp.

Palabras clave: *B. thuringiensis*, esclerocios, micelio, *Rhizoctonia* spp.

ABSTRACT

The present study was carried out in the Laboratory of Analysis of Soils, Water and Plants of the Faculty of Technical Education for Development of the Catholic University of Santiago de Guayaquil, where the effect of different applications of *B. thuringiensis* on selected tissues infected with *Rhizoctonia* spp was analyzed. The methodology consists of three applications of *B. thuringiensis* on *Rhizoctonia* spp., the first application was based on the dispersion of *B. thuringiensis* prior to the insertion of *Rhizoctonia* spp. in the culture medium, the second application was the spraying of *B. thuringiensis* on the mycelium of *Rhizoctonia* spp. in the culture medium and the third application consisted in a division of the culture medium in which the first half *B. thuringiensis* was dispersed and in the other half *Rhizoctonia* spp. was inserted. The variables studied in this paper were the diameter of *Rhizoctonia* spp mycelium. and the total number of sclerotia formed by *Rhizoctonia* spp., these variables were analyzed using the T test for independent samples where the results demonstrated that the different applications of *B. thuringiensis* inhibited the mycelial growth of *Rhizoctonia* spp. and the formation of sclerotia, however the application where *B. thuringiensis* was dispersed on the mycelium of *Rhizoctonia* spp., completely impeded the growth of *Rhizoctonia* spp mycelium and in turn the formation of sclerotia, being this an alternative of biocontrol of *Rhizoctonia* spp.

Key words: *B. thuringiensis*, sclerotia, mycelium, *Rhizoctonia* spp.

1 INTRODUCCIÓN

El aumento de la población del mundo, el deterioro del medio ambiente y calidad de vida del hombre, son algunos de los factores que han motivado al ser humano a buscar nuevos procesos de producción agrícola que permitan cubrir la demanda, cada vez más creciente de alimento y materia prima a través de procesos donde se aprovechen los recursos naturales de manera sostenible. No obstante las actividades agrícolas extensivas y ampliación de sus fronteras han traído consigo problemas fitosanitarios en los sistemas naturales, especialmente en el suelo, que está considerado como soporte principal de la agricultura.

Unos de los aspectos más importantes en la producción agrícola es el control de plagas y enfermedades; precauciones fitosanitarias que reduzcan las pérdidas económicas producidas por múltiples efectos como son los agentes químicos y biológicos.

En nuestro medio el manejo de este patógeno causante de varias enfermedades se encuentra dirigido hacia la aplicación de fungicidas mediante aspersiones y algunas prácticas culturales de prevención. Sin embargo, nuevas técnicas de control biológico sugieren el uso de agentes microbiológicos entomopatógenos y antagonicos para reducir el daño causado por *Rhizoctonia* spp. (Suquilanda, 2013, p. 13).

Una de las bacterias de mayor aprovechamiento, en estas nuevas técnicas de control aplicadas a diversos cultivos, ha sido el *Bacillus thuringiensis*, aquel que está dirigido a insectos; Este organismo que será agente de investigación sobre su capacidad de acción en el efecto de *Rhizoctonia* spp. en condiciones de laboratorio.

Por lo expuesto, el presente Trabajo de Titulación tuvo los siguientes objetivos:

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo general.

- Evaluar los efectos de *Bacillus thuringiensis* sobre el desarrollo *Rhizoctonia* spp., en condiciones *in vitro*.

1.1.2 Objetivos específicos.

- Estimar la habilidad inhibidora de la aspersión *B. thuringiensis* sobre el micelio de *Rhizoctonia* spp. en un medio de cultivo semisólido.
- Establecer la capacidad anti fúngica de *B. thuringiensis*, aplicado a un medio de cultivo semisólido, previa a la inserción de *Rhizoctonia* spp.
- Evaluar el competencia de *Rhizoctonia* spp. frente a la dispersión de *B. thuringiensis* dentro del mismo medio de cultivo.

1.2 Hipótesis

El uso de *B. thuringiensis*, como medida de control biológico, tendrá un efecto inhibitor sobre el desarrollo *Rhizoctonia* spp.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 *Rhizoctonia solani*

2.1.1 Descripción.

Rhizoctonia solani es un hongo, descubierto en 1858 por Kühn, que ha ganado fama por ser un fitopatógeno ampliamente extendido, dañino y muy versátil. Este hongo tiene un extenso rango de plantas hospederas a quienes puede atacar y causar daños como el decaimiento de las semillas, *damping-off*, pudrición de la raíz y algunas enfermedades foliares (Ajayi y Bradley, 2017, p.3).

El género *Rhizoctonia* pertenece a la familia de los Adelomicetos y al orden de los Agonomycetales. La especie más reconocida es *Rhizoctonia solani*, un hongo que se encuentra naturalmente en el suelo, que no genera conidias y ocasionalmente basidiosporas. Pueden vivir años en el suelo e infectar el tejido gracias a que produce una estructura dura de color marrón conocida como esclerocio (Lawson, 2018).

Rhizoctonia solani es conocido como *Thanatephorus cucumeris* en su estadio teleomorfo, durante mucho tiempo se pensó que era asexual; pero, recientemente, se halló que este organismo produce basidiosporas (las cuales no juegan un papel fundamental en la dispersión del hongo, a diferencia del micelio). La enfermedad del tizón de la vaina en arroz es producida por *R. solani*; aunque *T. cucumeris* ha sido hallado en algunos cultivos (Zheng, et al., 2013).

La caracterización inicial de *R. solani* se realizó con base en aislamientos extraídos de papa (*Solanum tuberosum L.*), y se infirió que este hongo posee los siguientes atributos: a) pigmentación de las hifas en varios tonos marrones; b) constricción de la hifa y conformación del septum a poca distancia del punto de ramificación micelial; c) células multinucleadas en hifas vegetativas jóvenes (González, 2008).

Ceresini (1999) explica cómo el micelio vegetativo de *R. solani* y otras especies de hongos *Rhizoctonia*, no presenta coloración en etapas iniciales, pero toma un tono café a medida que crece y madura, mientras que el poro septal es quien le permite moverse.

La capacidad de infección de *Rhizoctonia solani* Kühn está determinada por las condiciones de temperatura y humedad (González-Hernández, 2002) y es uno de los hongos fitopatógeno de mayor incidencia en un extenso grupo de plantas de diferentes especies de importancia económica (Gour, 2012) en las que produce lesiones oscuras en raíces y semillas, pudrición de tallos y de las partes de la planta que están en contacto con el suelo (González-García, 2008).

2.1.2 Síntomas.

Enfocándonos en la enfermedad del tizón de la vaina del arroz se caracteriza, según Lawson (2018), por lesiones que comienzan en la base de la hoja y se forman un poco por encima de la línea de flotación en las cañas infectadas, extendiéndose desde la vaina de la hoja o desde el punto de infección en la hoja. Las lesiones consisten en bandas anchas alternas de aproximadamente 0.5 a 1 cm de ancho y 1 a 3 cm de longitud que se vuelven ovales, blancas o de color pajizo en el centro con borde de color marrón rojizo. Las infecciones usualmente comienzan durante las etapas tardías de crecimiento de la elongación de la articulación, terminando con las cañas infectadas debilitadas que, eventualmente, llegan a caerse.

El micelio de este hongo se desarrolla en la vaina de la hoja, formando estructuras de infección que se propagan y causan lesiones nuevas, pudiendo propagarse a las láminas foliares. A medida que las lesiones se unen en la vaina, las cuchillas se vuelven de color amarillo anaranjado y eventualmente mueren. Después de que la panícula emerge, la enfermedad avanza rápidamente a la hoja de la bandera en variedades susceptibles (LSU Ag Center, 2015).

El desarrollo del proceso de infección en los tejidos de la vaina, La afección de esta enfermedad, usualmente, comienza durante el macollamiento de la planta, debilitándola y produciendo acame, incrementando la cantidad de granos estériles y disminuyendo sus pesos (Espinosa, 2010). El rendimiento del arroz durante la enfermedad, decrece entre un 20 % a 50 % (Pabón, 1994).

El hongo también crece al tocar partes de la planta, por ejemplo, de hoja a hoja, causando infecciones en las plantas cercanas. Los esclerocios (masas estrechamente tejidas de micelio fúngico cubiertas por un revestimiento impermeable hidrofóbico secretado por el hongo) sobreviven entre los cultivos y estas se forman en la superficie de las lesiones en el arroz y otras hierbas. Las plantas infectadas generalmente se encuentran en un patrón circular en el campo porque el hongo no produce esporas y debe crecer de una planta a otra (LSU Ag Center, 2015).

2.1.3 Epidemiología.

Los esclerocios de *R. solani* puede sobrevivir durante muchos años en el suelo, infectando plantas y superficies de agua próximas al cultivo inicial mediante la producción de micelios (Taheri y Tarighi, 2011). A medida que aumentan las áreas en el campo con plantas y plantas muertas, pueden unirse con otras áreas afectadas para causar grandes áreas de plantas alojadas, muertas y moribundas. Por lo general, el daño es más común cuando los residuos flotan por el viento y se acumulan en las esquinas de los cortes cuando se preparan semilleros en el agua.

Los esclerocios presentes en el sustrato o en el tejido vegetal, germinan para formar hilos vegetativos (hifas) que atacan a una diversidad de cultivos de alimentos (Ceserini, 1999). Conforme el hongo extermina las células de las plantas, las hijas siguen creciendo, forman nuevos inoculo y el ciclo de vida del hongo se repite cada vez que el material vegetativo fresco retorna (Pegg y Manners, 2014).

Según Ajayi y Bradley (2017) este patógeno ataca con alta incidencia a los cultivos de arroz al momento que comienzan a brotar los macollos. El hongo es atraído hacia la planta por estimulantes químicos liberados por células de plantas en crecimiento activo. A medida que avanza el proceso de atracción, la hifa fúngica entrará en contacto con la planta, adhiriéndose a la superficie externa. Después de la fijación, el hongo continúa creciendo en la superficie externa de la planta y causará enfermedades al producir una estructura de infección especializada (ya sea un apósito de infección o apelmazamiento) que penetra en la célula de la planta y libera nutrientes para el crecimiento y desarrollo continuos de los hongos.

Varias variedades de grano largo recientemente lanzadas son más resistentes al tizón de la vaina que las variedades de grano largo más antiguas. Los fungicidas están disponibles para reducir el deterioro de la vaina (LSU Ag Center, 2014).

2.1.4 Control.

2.1.4.1 Principios.

Los campos deben ser explorados por la presencia de síntomas de tizón de la vaina al menos una vez a la semana. Lawson (2018) recomienda aumentar el espacio de la planta para permitir que la humedad escape de la cobertura foliar de la planta e intente mantener niveles de humedad inferiores a 93 %. Cuando alrededor del 5 % al 10 % de los cultivos de una variedad susceptible o del 10 al 15 % en variedades moderadamente susceptible se encuentran infectados, se justifica una aplicación de fungicida.

Las masas densas y el uso excesivo de fertilizante tienden a aumentar el daño causado por esta enfermedad.

2.1.4.2 Métodos de control.

- Evitar densidades altas de cultivo y el uso excesivo de N como fertilizante (LSU Ag Center, 2014).

- El tizón de la vaina es una enfermedad que se transmite por contacto y por aire, por lo cual se recomienda evitar la utilización de sustratos donde previamente se encontraba el *Rhizoctonia solani* (Lawson, 2018).
- El agente de control biológico *Trichoderma*, es bastante conocido por tener acción antagonista contra diferentes hongos fitopatógenos (Grondona, et al., 1997).
- Uso de semillas certificadas libres del patógeno junto con la preferencia por la utilización de variedades de grano medio (mayormente resistentes al ataque de *Rhizoctonia solani*), las cuales presentan una ventaja frente a las de grano largo.
- La preparación profunda del suelo, seguida por una inundación de varios días, más un manejo adecuado de los residuos de la cosecha, reducen la presencia de “esclerocios” que son el medio de propagación.

2.2 *Bacillus thuringiensis*

2.2.1 Clasificación Taxonómica de *B. thuringiensis*.

Según la descripción de Nakamura (1998), *B. thuringiensis* pertenece a la familia Bacillaceae y se ubica dentro del primer grupo del género *Bacillus*; siendo parte del grupo *B. cereus* capaz de producir cuerpos de inclusión cristalina.

2.2.2 Caracterización del *B. thuringiensis*.

Bacillus thuringiensis es una bacteria Gram positivo, anaerobio facultativo, esporulado, de flagelación períttrica, quimiorganotrofo y con actividad de catalasa, que mide de 3 a 5 µm de largo por 1 a 1.2 µm de ancho (Portela, Chaparro y López, 2013; Gordon y Pang, 1973; Sneath, 1986).

Una de sus singularidades, según Schnepf, et al. (1998) es que, durante el proceso de esporulación, elabora una inclusión parasporal

conformada por uno o más elementos cristalinos, de origen proteico, que resultan nocivos para algunos invertebrados (primordialmente larvas de insectos). Dichas proteínas se nombran *Cry* (cristal en inglés) y *Cyt* (citolíticas) establecen la base de algunos insectidas (Castañet y Moreno, 2015).

2.2.3 Propiedades Biológicas de *B. thuringiensis*.

El estudio de las proteínas *Cry* fue el determinante para el interés de *B. thuringiensis* como agente de control biológico, ya que estas actúan contra una gran pluralidad de insectos plagas; aunque, aún existe cierto porcentaje de ellos que no poseen este tipo de proteínas o son poco sensibles a estas, lo que ha provocado que se sigan aislando y distinguiendo cepas de *B. thuringiensis* (Barboza y Escudero, 2002).

B. thuringiensis sintetiza uno o varios cristales parasporales a partir de la capsulización de la pre-espora hasta la maduración de esta; dichos cristales (que presentan distintas morfologías) pueden abarcar hasta el 30 % del peso seco del esporangio (Bulla, et al., 2001). Los microorganismos del suelo tienen la capacidad de degradar los cristales producidos por *B. thuringiensis* (West, Burges, White y Wyborn, 1984), además del efecto que tiene la luz ultravioleta para cesar su acción (Liu, et al., 1991).

2.2.4 Control Biológico con *B. thuringiensis*.

La capacidad de mantenerse viables, pese a largos tiempos de almacenamiento, ha convertido a las bacterias del género *Bacillus* en parte esencial del mundo de controladores biológicos (Alves, 1998). *Bacillus thuringiensis* tiene gran capacidad de adaptación y es un patógeno eficiente de invertebrados que produce unos cristales parasporales fuertemente nocivos y específicos (Herrero, Oppert y Ferre, 2001; Siegel, 2001; Raymond, Johnston, Nielsen-Leroux, Lereclus y Crickmore, 2010). Estas toxinas se hallan codificadas por genes *cry*, y su peligrosidad está unida a la sección terminal C de las cadenas polipeptídicas (Li, Carrn el y Ellar, 1991).

Su mecanismo de acción en los insectos comienza cuando los cristales son ingeridos por estos y se solubilizan en el intestino medio, las toxinas se activan gracias a las proteasas del intestino medio y se fusionan con receptores específicos en la membrana celular del insecto, lo que lleva a la ruptura celular y la muerte de este (Schnepf, et al., 1998; Bravo y Gill, 2007).

Hace algunos años, Barboza-Corona, et al. (1999) seleccionaron algunas encimas de *B. thuringiensis* ya que algunos autores (Mavingui y Heulin, 1994) habían mostrado un efecto inhibitor, que actuaba sobre la pared celular de algunos hongos fitopatógenos y concluyeron que la acción sinérgica entre quitinasas y proteínas *Cry* eran aplicables a la hipótesis de control biológicos sobre ciertos hongos.

Bettiol y Kimati (1989) también informaron sobre la eficacia del género *Bacillus* como organismo antagónico a la *Pyricularia oryzae cavana*, un hongo fitopatógeno. Otras bacterias también han mostrado ser agentes de control biológico, como las *Pseudomonas* (bacterias endofíticas), que han sido de eficacia contra hongos como *R. solani* en cultivos de algodón (Siegel, 2001).

En 1997, Bettiol y Lazaretti, pusieron a prueba los metabolitos de *B. subtilis* en semillas de fréjol y evidenciaron la capacidad de este para disminuir la incidencia de *R. solani*. En el mismo año, Arras y Arru nos explicaban como las bacterias, en especial las *B. subtilis*, actúan antagonísticamente a través de la simbiosis, parasitismo y competencia.

En un estudio por Knaak, Rohr y Fiuza, (2007) se evaluó la acción de las cepas y proteínas *Cry1Ab* y *Cry1Ac* sintetizadas por *B. thuringiensis thuringiensis* y *B. thuringiensis kurstaki* con respecto a 4 cepas de hongos fitopatógenos asociados con arroz, y se comprobó la inhibición del desarrollo micelial de estos hongos.

Mojica-Marin, et al. (2009) mostraron que *B. thuringiensis* era eficiente en el control de *R. solani* de cultivos de chile en ensayos *in vitro*, entregando resultados parecidos a los que obtuvieron otros autores utilizando principalmente bacterias y hongos (Ahmed, et al., 1999). La antibiosis representa el modo de acción principal, y algunas líneas de evidencia (Lee, Remfert, Gelembiuk, 2003) se alinean en esa dirección. Se necesitan estudios adicionales para comprobar la acción antagonista de *B. thuringiensis* en hongos fitopatógenos en diversos cultivos, como el arroz.

3 MARCO METODOLÓGICO

3.1 Ubicación del ensayo

El Trabajo de Titulación se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Análisis de Suelos, Aguas y Plantas de la Facultad de Educación Técnica para el Desarrollo, en la Universidad Católica de Santiago de Guayaquil, ubicado en la Av. Carlos Julio Arosemena km 1 1/2.

3.2 Variables de Estudio

Las variables evaluadas en este trabajo de investigación fueron las siguientes:

- Diámetro del micelio en cm del hongo
- Número de esclerocios

3.3 Tipo de investigación

La investigación tiene un enfoque cuantitativo, un alcance descriptivo y correlacional mediante un experimento de laboratorio.

3.4 Análisis estadístico

Por medio del programa INFOSTAT, el análisis estadístico utilizado para este trabajo de investigación fue una Prueba de T para muestras independientes.

3.5 Materiales

Los materiales utilizados para este trabajo de investigación se detallan a continuación:

3.5.1 Material técnico.

- Agar nutritivo
- Agua Destilada
- Alcohol

- Ansa de argolla
- Ansa de punta
- Atomizador
- Balanza gramera
- Cajas Petri
- Cloro
- Cuaderno
- Erlenmeyer
- Hisopos
- Mechero
- Papa Dextrosa Agar (PDA)
- Pinzas
- Plantas de arroz afectadas por *Rhizoctonia* spp.
- Regla
- Saca bocado
- Tubo de ensayo

3.5.2 Material tecnológico.

- Agitador magnético
- Autoclave
- Cámara de flujo laminar
- Computadora
- Esterilizador
- Teléfono móvil

3.6 Diseño del experimento

El experimento se basó en la aplicación de *B. thuringiensis* previa, posteriormente y a la par de la inserción de *Rhizoctonia* spp. en un medio de cultivo. El número total de cajas Petri fue de 80, divididas en: 20 repeticiones para el análisis previo a la introducción de *Rhizoctonia* spp., 20 para la examinación posterior a su introducción en el medio, 20 para la competencia

de *Rhizoctonia* spp y *B. thuringiensis* en el medio de cultivo ingresados al mismo tiempo, y 20 para el testigo absoluto.

Diferentes pruebas T para muestras independientes fueron aplicadas por medio del programa informático INFOSTAT para la realización del análisis de datos obtenidos, donde se pudo observar las diferencias estadísticamente significativas entre los Tratamientos versus testigos.

Tabla 1 Tratamientos de estudio

TRATAMIENTOS
T1 (BACTERIA SOBRE HONGO)
T2 (HONGO SOBRE BACTERIA)
T3 (HONGO VS BACTERIA)
T4 (TESTIGO ABSOLUTO)

Elaborado por: El Autor

3.7 Desarrollo del experimento

3.7.1 Aislamiento de *Rhizoctonia* spp.

Se colectaron plantas de arroz afectadas con síntomas de *Rhizoctonia* spp., procedentes de la provincia de Los Ríos, que fueron almacenadas en saquillos para su posterior traslado al laboratorio. Se observaron los daños ocasionados por la enfermedad y se realizaron cortes, de 1 cm², de tejido afectado por *Rhizoctonia* spp., los cuales pasaron a ser desinfectados con cloro al 0.7 % y trasferidos a agua destilada estéril para realizar tres lavados consecutivos de manera independiente. Luego, estas secciones de tejidos, fueron transportadas a papel toalla esterilizado (proceso de secado) con el apoyo de una pinza microbiológica estéril, se llevaron estos cortes esterilizados al medio de cultivo Papa Dextrosa Agar.

El medio de cultivo se lo preparó de acuerdo a contenidos estándares, como se detalla a continuación: 200 g de Papa, 20 g de Dextrosa y 15 g de Agar. Estos componentes descritos fueron homogenizados en un litro de agua sometido a un calentamiento constante hasta la disolución de los mismos. El medio de cultivo así preparado se lo distribuyó en frascos Erlenmeyer en volúmenes de 250 ml para su posterior esterilización en un Autoclave. El

medio así preparado se le colocó ácido láctico de acuerdo a un estándar como se menciona a continuación; una gota por cada 10 ml de medio de cultivo. El medio de cultivo preparado pasó a ser distribuido en cajas Petri hasta su uso.

3.7.2 Siembra de *Rhizoctonia* spp. en un medio de cultivo.

Se requirió el uso de un mechero, alcohol al 70 % y al 99 %, un asa de punta, cajas Petri, toallas de papel y los aislados de *Rhizoctonia* spp. El trabajo se realizó dentro de una cámara de flujo laminar expuesta 15 minutos a luz ultravioleta, más alcohol al 70 % y con la respectiva limpieza de los materiales previo a su ingreso y superficie del área de trabajo, para cumplir con los procesos de asepsia; Haciendo uso del alcohol al 70 % como desinfectante de manos, se colocó el PDA en las cajas Petri para la polimerización del medio de cultivo; luego, con un asa de punta esterilizada con alcohol al 99 % y exposición al fuego, se fueron colocando los aislados de *Rhizoctonia* spp. para el proceso de siembra. Los medios de cultivo con el hongo sembrado se mantuvieron dentro de la cámara de flujo laminar, cubiertos con tela negra para proporcionar al hongo la oscuridad necesaria para su crecimiento durante 30 días.

3.7.3 Repique del *Rhizoctonia* spp.

Se hizo uso de cajas Petri para el repique de *Rhizoctonia* spp., obtenido de plantas afectadas por el tizón de la vaina; proceso que se desarrolló en el Laboratorio de Análisis de Suelos, Aguas y Plantas de la UCSG. Con un sacabocado de 5 mm se realizaron discos de hongos, los cuales pasaron a ser sembrados en las nuevas cajas Petri, que contenían el medio de cultivo polimerizado.

3.7.4 Activación de *B. thuringiensis*.

Producto comercial de *B. thuringiensis*, se sometió a una dilución seriada, en el que el solvente fue una solución de NaCl al 0.85 % en la que en cada dilución se tomó una muestra de 0.1 ml para su dispersión con una espátula de Drigasly. Posteriormente, estas placas se guardaron en una

incubadora a 37° C. Finalmente se determinaron las Unidades Formadoras de Colonias expresada de esta manera: $1695 * 10^4$ UFC/ml.

$$UFC = \frac{\text{N}^\circ \text{ de colonias por placa} * \text{el factor de dilución}}{\text{ml de la muestra sembrada}}$$

$$UFC = \frac{169.5 * 10^{-4}}{1 \text{ ml}}$$

$$\frac{UFC}{\text{ml}} = 1695 * 10^4$$

3.7.5 Dispersión de *B. thuringiensis* sobre el medio de cultivo semisólido de PDA.

La dilución UFC $1 * 10^{-4}$ ml se seleccionó conforme a los procedimientos de selección de rango de colonias del criterio microbiológico. Las colonias que se desarrollaron en esta dilución se re suspendieron con un homogenizado de solución salina al 0.85 %, el mismo que fue embebido con un hisopo de algodón para rayar todas la superficies y contorno del medio de cultivo, donde posteriormente se depositaron discos de *Rhizoctonia* spp. Las placas Petri con los discos de *Rhizoctonia* spp. sin la dispersión de la bacteria sirvieron como testigo absoluto.

3.7.6 Aspersión de *B. thuringiensis* sobre el micelio de *Rhizoctonia* spp. reproducido en un medio de cultivo PDA.

Para cada tratamiento se designaron 20 cajas Petri y la dilución de UFC fue de $1 * 10^{-4}$ ml en agua. Las colonias que se desarrollaron en esta dilución se re suspendieron con un homogenizado de una solución salina al 0.85 % y con la espátula de Drigalsky se raspó suavemente la superficie del medio de cultivo para luego ser depositado en un vaso de precipitación de 100 ml. A la caja se le agregó agua salina (cantidad que se considere conveniente) para raspar con la espátula todas las colonias. Una vez hecho esto, se depositó de vuelta en el vaso de precipitación de 100 ml, proceso que fue repetido con las

14 cajas hasta que el vaso se llene. Dicho vaso de precipitación se depositó en un atomizador esterilizado, con el cual se asperjó la bacteria en las cajas Petri con el hongo desarrollado.

Se realizó evaluaciones cada 2 días debido a que el crecimiento de las bacterias es acelerado.

3.7.7 Dispersión de *B. thuringiensis* y siembra de *Rhizoctonia* spp. en el mismo medio de cultivo PDA.

Se midió el diámetro de las cajas Petri usadas para la evaluación de ésta variable y se dividió en mitades para llevar a cabo el estudio. Las colonias que se desarrollaron en la dilución UFC 1×10^{-4} ml se re suspendieron con un homogenizado de solución salina al 0.85 %, el mismo que fue embebido con un hisopo de algodón para rayar la mitad de la superficies y contorno del medio de cultivo. Posteriormente, con un sacabocado de 5 mm se realizaran discos de hongos, los cuales fueron sembrados en las mismas cajas Petri, con el medio de cultivo polimerizado.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los datos que se muestran a continuación fueron considerados para emitir las conclusiones del experimento; podemos observar el comportamiento *Rhizoctonia* spp., frente a la aplicación de *Bacillus thuringiensis*.

Tabla 2. Interpretación del global de datos finales por tratamiento

Tratamientos														
Nº	Hongo sobre Bacteria		Hongo sobre Bacteria		Bacteria sobre Hongo		Bacteria sobre Hongo		Hongo vs Bacteria		Hongo vs Bacteria		Testigo	
	(primera evaluación)		(última evaluación)		(primera evaluación)		(última evaluación)		(primera evaluación)		(última evaluación)		(H)	
	Diámetro del micelio (cm)	Nº de esclerocios	Diámetro del micelio (cm)	Nº de esclerocios	Diámetro del micelio (cm)	Nº de esclerocios	Diámetro del micelio (cm)	Nº de esclerocios	Diámetro del micelio (cm)	Nº de esclerocios	Diámetro del micelio (cm)	Nº de esclerocios	Diámetro del micelio (cm)	Nº de esclerocios
1	0.20	0	1.40	0	6.50	0	6.50	0	4.15	0	5.50	40	8.50	120
2	0.45	0	2.80	0	6.50	0	6.50	0	4.15	0	5.50	13	8.50	115
3	0.10	0	1.30	0	6.00	0	6.00	0	4.25	0	5.45	36	8.50	117
4	0.10	0	0.50	0	5.80	0	5.80	0	4.15	0	5.50	24	8.50	130
5	0.45	0	3.30	0	6.20	0	6.20	0	4.15	0	5.50	45	8.50	110
6	0.10	0	1.95	0	6.50	0	6.50	0	4.15	0	5.50	41	8.50	112
7	0.40	0	2.30	0	6.00	0	6.00	0	4.20	0	5.50	15	8.50	64
8	0.05	0	0.45	0	7.00	0	7.00	0	4.35	0	5.75	11	8.50	95
9	0.10	0	1.00	0	5.65	0	5.65	0	4.15	0	5.50	58	8.50	103
10	0.50	0	4.00	0	6.60	0	6.60	0	4.50	0	5.50	30	8.50	118
11	0.50	0	1.00	0	6.40	0	6.40	0	4.15	0	5.70	33	8.50	100
12	1.00	0	3.50	0	6.00	0	6.00	0	5.35	0	5.75	19	8.50	150
13	0.50	0	1.75	0	7.00	0	7.00	0	5.50	0	5.60	17	8.50	145
14	0.15	0	1.50	0	6.75	0	6.75	0	4.15	0	5.50	10	8.50	123
15	0.20	0	1.25	0	6.50	0	6.50	0	4.75	0	5.60	22	8.50	111
16	0.85	0	3.75	0	5.95	0	5.95	0	4.85	0	6.00	43	8.50	129
17	0.20	0	1.25	0	6.30	0	6.30	0	5.05	0	5.50	29	8.50	161
18	0.60	0	3.00	0	7.00	0	7.00	0	4.90	0	5.80	21	8.50	147
19	0.30	0	2.40	0	6.25	0	6.25	0	5.20	0	5.75	45	8.50	98
20	0.50	0	1.90	0	6.45	0	6.45	0	4.75	0	5.50	29	8.50	105
Pr o m	0.36	0	2.01	0	6.36	0	6.36	0	4.54	0	5.59	29.05	8.5	117.6
S	0.26	0	1.07	0	0.39	0	0.39	0	0.46	0	0.14	13.57	0	22.30
C V	0.23		0.53		0.06		0.06		0.10		0.02	0.46		0.18

Elaborado por: El Autor

En la discusión de ambos ensayos se puede observar el efecto de *Bacillus thuringiensis* frente a la formación de esclerocios de *Rhizoctonia* spp.,

existiendo una diferencia neta de 117.65 esclerocios presentes en el testigo frente a los medios de cultivo con *B. thuringiensis* en el mismo periodo de tiempo. Éstos resultados son de importancia para nuestro estudio, ya que al detener la formación de esclerocios se corta el ciclo de infección de *Rhizoctonia* spp., previniendo la difusión de enfermedades causadas por este patógeno.

Con base en estos datos podemos deducir que el comportamiento de *B. thuringiensis* originó una reducción de 6.5 cm en el crecimiento del micelio de *Rhizoctonia* spp., tomando en cuenta la última medición de micelio (luego de un periodo de tres semanas) en el primer tratamiento del hongo sobre la bacteria presente en el medio de cultivo con los valores obtenidos del testigo en el mismo periodo de tiempo. Lo que equivale a una reducción del 76.29 % en el crecimiento del micelio, número significativamente importante en el propósito de disminuir los efectos de *Rhizoctonia* spp., en diferentes cultivos.

Mientras que en los resultados del tratamiento Bacteria sobre Hongo (*B. thuringiensis* aplicado al medio de cultivo, luego de que *Rhizoctonia* spp. hubiera tomado dominio del espacio) se aprecia una inhibición total del micelio del hongo a partir de la aplicación de la bacteria manteniéndose en 6.45 cm a lo largo del experimento.

Para la variable de *Rhizoctonia* spp., más *B. thuringiensis* adicionados al mismo tiempo se pudieron observar diversas características de competencia *Rhizoctonia* spp., limitó su crecimiento al espacio donde no se encontraba *B. thuringiensis* con un crecimiento vertical de las hifas y un desarrollo promedio de 29.05 esclerocios frente a los 117.6 del testigo.

Mediante un análisis comparativo del global de datos conseguidas en los muestreos podemos observar las diferencias en el crecimiento de micelios entre distintos Tratamientos; en donde el Tratamiento Hongo sobre Bacteria el de mejores resultados al presentar un tamaño promedio considerablemente

menor a otros Tratamientos en el mismo periodo de tiempo transformándose en el medio ideal de prevención del ataque de *Rhizoctonia* spp., mientras que el tratamiento Bacteria sobre Hongo pudo frenar desde el inicio el crecimiento de micelios al tener una variación nula en su desarrollo entre la primera y última semana convirtiéndose así en el tratamiento ideal frente a infecciones presentes de *Rhizoctonia* spp. para lograr detener a la enfermedad tanto de su expansión como de sus efectos al contagio.

Tabla 3. Prueba T para muestras independientes

Prueba T	Tratamientos		
	B/H	H/B	H vs B
Valor T micelios	15.43*	27.05*	88.49*
Valor T esclerocios	23.58*	23.58*	15.43*

* = valores significativos

ns = valores no significativos

B/H = Tratamiento bacteria sobre hongo

H/B = Tratamiento hongo sobre bacteria

H vs B = Tratamiento bacteria más hongo

Elaborado por: El Autor

Los valores de T para muestras Independientes nos muestran una T calculada mayor a la T tabular al 5 % y 1 %; presentando diferencias altamente significativas entre el tratamiento testigo y los tratamientos de control con una Valor T para esclerocios de -23.58 para ambos tratamientos al presentarse nulidad de crecimiento y desarrollo de las estructuras de contagio del hongo también en la aplicación de *B. thuringiensis* antes o después de la presencia de *Rhizoctonia* spp.

El valor T para micelios varía de -15.43 en el primer tratamiento de control con la bacteria asperjada sobre el hongo a 27.05 cuando *B. thuringiensis* es introducido posterior a *Rhizoctonia* spp. la diferencia de valores T radica en la variación de resultados (Tabla 1) donde en el primer tratamiento sí podemos ver cierto desarrollo del micelio aunque muchísimo

menor en comparación con el testigo. El segundo tratamiento, sin embargo presenta resultados de inhibición total en el desarrollo de micelios, esta nulidad de incrementación provoca diferencias estadísticas altamente significativas entre ambos tratamientos y además frente al testigo.

Los valores T tanto para el desarrollo de micelios como de esclerocios en nuestra variable de Hongo más Bacteria adicionados al medio de cultivo al mismo tiempo son considerablemente diferente a los valores de los dos tratamientos anteriores. El valor T para micelios es considerablemente superior debido a que sí se dio un crecimiento del hongo al estar separado de *B. thuringiensis* en el mismo medio al momento del adicionamiento de ambos.

Bacillus thuringiensis ha demostrado efectos de inhibición en algunos organismos del reino Fungi en estudios anteriores como es el caso de Knaak et al. (2007), donde se analizó el efecto de algunas cepas de *B. thuringiensis* y las proteínas *Cry* en hongos fitopatogénicos en cultivos de arroz en Rio Grande do Sul, Brasil y cuyos resultados concuerdan con los obtenidos en el experimento actual comprobando un efecto fungicida de *B. thuringiensis* sobre *Rhizoctonia* spp., después de un periodo de incubación de 14 días. Knaak et al., atribuían este efecto a los metabolitos producidos por el género *Bacillus*.

Mojica-Marín, et al. (2009) evaluaron 64 cepas de *B. thuringiensis* de las cuales, 34 mostraron diferentes capacidades de inhibición frente a *R. solani*, *P. capsici* y *F. oxysporum* en granos de chile afectados por estos hongos. Con énfasis en *Rhizoctonia* spp., concluyeron que la cepa HD-974 de *B. thuringiensis* ocasionó un porcentaje de germinación alrededor del 62 % en los granos inoculados con la bacteria además de la inhibición en el crecimiento de esclerocios.

Se puede deducir gracias a estos estudios que *Bacillus thuringiensis* presenta una nueva alternativa como controlador biológico de *Rhizoctonia* spp., no sólo en arroz sino extendiendo su efecto a otros tipos de cultivos. La

significación de las capacidades anti fúngicas de esta bacteria ha sido considerablemente alta, no sólo en experimentos *in vitro* sino también en su aplicación en plantas afectadas proyectándose como alternativa a ser efectuada en campos extensos.

5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

De acuerdo con los resultados, *in vitro* podemos concluir que:

- *Bacillus thuringiensis* presenta un efecto antagónico frente a *Rhizoctonia* spp., teniendo resultados visibles en laboratorio luego de 20 días después de su aplicación en el hongo.
- El mejor resultado se lo obtuvo con la aspersion de la bacteria sobre el hongo, ya que detuvo el crecimiento de hifas; mientras que en el tratamiento de aplicación Hongo sobre Bacteria sólo se logró inhibir el desarrollo de esclerocios pero se observaron hifas.
- *Rhizoctonia* spp. presenta comportamientos en su desarrollo significativamente diferente cuando se encuentra en competencia directa con *B. thuringiensis* por la dominancia de un medio de cultivo.

5.4 Recomendaciones

Como recomendaciones, podemos sugerir las siguientes:

- Hacer uso de una dilución seriada adecuada a la bacteria para una correcta formación de colonias. consideración importante si se requiere una correcta reproducción de la bacteria.
- Se aconseja la realización de ensayos en condiciones controladas de campo con *B. thuringiensis* para comprobar el efecto económico que podría tener como agente de biocontrol.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed. A.. Sesti. F... Ilan. N.. M Shih. T.. L Sturley. L.. Goldstein. S..(1999).
A Molecular Target for Viral Killer Toxin: TOK1 Potassium Channels.
Recuperados de: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81659-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81659-1)
- Ajayi-Oyetunde. O. & C. A. Bradley (2017). *Rhizoctonia solani: Taxonomy Population Biology and Management of Rhizoctonia Seedling Disease of Soybean. Plant Pathology*. pp. 3-13. Recuperado de: [doi:10.1111/ppa.12733](https://doi.org/10.1111/ppa.12733)
- Alves. S.B. (1998). *Controle microbiano de insetos*. 2. ed. Piracicaba. FEALQ. 1163p
- Barboza-Corona. J. y Escudero. B. (2002). *Cómo usar una bacteria combatir plagas y hongos*. Disponible en: www.amc.edu.mx/revistaciencia/images/revista/53_3/como_usar_una_bacteria.pdf
- Barboza-Corona. J.E.; Contreras. J.C.; Velásquez-Robledo. R.; Bautista-Justo. M.; Gómez-Ramírez. M.; Cruz-Camarillo. R.; Ibarra. J.E. (1999). Selection of chitinolytic strains of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology Letters*. 21. 1125-1129.
- Bettiol. W.; Kimati. H. (1989). Seleção de microrganismos antagonicos a *Pyricularia oryzae* Cav. para o controle do Brusone do arroz (*Oryza sativa* L.). *Summa Phytopathologica*. 15. 257-266.
- Bettiol. W.; Lazzaretti. E. (1997). Tratamento de sementes de arroz, trigo, feijão e soja com um produto formulado à base de células e de metabólitos de *Bacillus subtilis*. *Scientia Agrícola*. 54. 89-96

- Bravo A. y Gill. S. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*. Disponible en: doi: 10.1016/j.toxicon.2006.11.022.
- Bulla. L.. Bechtel. D.. Kramer. K.. Shethna. Y.. Aronson. A.. FitzJames. P. (1980). Ultrastructure. physiology. and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*. *CRC Crit Rev Microbiol*; 8: 147-204.
- Castañet-Martínez. E.. Moreno-Reyes. S. (2015). *Bacillus thuringiensis: Características y uso en el control de Aedes aegypti*. Obtenido de: www.redalyc.org/html/2231/223152661006/
- Ceresini. P. (1999). NC State University. Obtenido de projects.ncsu.edu/cals/course/pp728/Rhizoctonia/Rhizoctonia.html
- Espinosa. A. T. (2010). *Evaluación del efecto biocontrolador de rhizoctonia de orquídea sobre rhizoctonia solani kühn patógeno del suelo en arroz*. Palmira. Colombia.
- González García. M. (2008). Reseña de "Aspectos de sistemática y biología del complejo *Rhizoctonia*". *Fitosanidad*. 12 (3). 147-159.
- González-García. M. (2008). *Aspectos sistemáticos y biología del complejo Rhizoctonia*. pp. 147-159.
- González-Hernández. D. (2002). Estado actual de la taxonomía de *Rhizoctonia solani* Kühn. *Rev. Mex. Fitopatol.* pp. 200-205.
- Gordon R. Haynes W. Pang C. (1973). The genus *Bacillus*. En: US Department of Agriculture handbook N° 427. Washington DC.. USDA. p. 109-26.

- Gour. R. (2012). Isolation and characterization of Actinomycetes against *Macrophomina phaseolina* and *Rhizoctonia solani*. pp. 31-30.
- Grondona. I.. Hermosa. R.. Tejada. M.. Gomis. M.. Mateos. P.. Bridge. P. y Monte. E.. (1997). Physiological and biochemical characterization of *Tricho-derma* harzianum. a biological control agent against soilborne fungal plantpathogens. *Appl Environ Microbiol* 63(8):3189–98.
- Herrero. S.; Oppert. B.; Ferre. J. (2001). Different mechanisms of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in the indianmeal moth. *App. Envir. Microbiol.* 67(3). 1085-1089.
- Khetan S. (2001). Bacterial Insecticide: *Bacillus thuringiensis*. En: Khetan editor. *Microbial Pest Control*. 2001. p. 14.
- Knaak. N.. Rohr. A.. y Fiuza. L. (2007). In vitro effect of *Bacillus thuringiensis* strains and Cry proteins in phytopathogenic fungi of paddy rice-field. *Brazilian Journal of Microbiology*. Obtenido de [dx.doi.org/10.1590/S1517-83822007000300027](https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000300027)
- Lawson. L. (2018). *Pthoticulture*. Obtenido de www.pthoticulture.com/es/centro-de-formacion/pudricion-de-la-raiz-por-rhizoctonia-los-sintomas-y-como-controlarlos
- Lee. C.E.. Remfert. J.L.. Gelembiuk. G.W (2003). Evolution of Physiological Tolerance and Performance During Freshwater Invasions. Disponible en https://www.reabic.net/publ/Lee_et%20al_2003_invasion.pdf

- Li. J.; Carrn el. J.; Ellar. D.J. (1991). Cristal structure of insecticide δ -endotoxina from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 A resolot. Nature. 353(7). 815-821.
- Liu. Y.. Sui. M.. Ji. D.. Wu. I.. Chou. C. y Chen. C. (1993). Protection from ultraviolet irradiation by melanin of mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis. J Invertebr Pathol; 62: 131-6.
- LSU Ag Center. (2014). *Rice Production Handbook*. Disease Management. Disponible en beaumont.tamu.edu/eLibrary/RiceResource/Rice_Production_Handbook.pdf
- LSU Ag Center. (2015). *Rice Production Handbook*. Disease Management. Disponible en www.lsuagcenter.com/~media/system/1/a/1/e/1a1e972d0509a6bb68d2637605c85038/pub2331riceproductionhandbook2014completebook.pdf
- Mavingui. P.; Heulin. T. (1994). In vitro chitinase and antifungal activity of a soil. rhizosphere and rhizoplane population of *Bacillus polymyxa*. Soil Biology e Biochemistry. 26. 801-803.
- Mojica-Marín. V. Luna-Olvera. HA. Sandoval-Coronado. CF. Pereyra-Alfárez. B. Morales-Ramos. LH. González-Aguilar. NA. Hernández-Luna. CE. & Alvarado-Gomez. OG. (2009). Control biológico de la marchitez del chile (*Capsicum annuum* L.) por *Bacillus thuringiensis*. *Phyton (Buenos Aires)*. 78(2). 105-110. Recuperado en 14 de febrero de 2019. de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-56572009000200004&lng=es&tlng=es.

- Nakamura L. (1998). *Bacillus pseudomycooides* sp. pp. 1031-1035.
- Pabón. F. 1994. *Pudrición de la Vaina del Arroz*. Manejo y Control. CORPOICA (Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria). Disponible en: www.corpoica.org.c/SitioWeb/Archivos/Publicaciones/pudriciondela vainadearrozmanejoycontrol.pdf
- Pegg y Manners. (2014) *Rhizoctonia*. A variable and versatile nursery pathogen. Obtenido de: www.ngia.com.au/Attachment?Action=Download&Attachment_id=1841
- Portela-Dussán. D., Chaparro-Giraldo. A., y López-Pazos. S. (2013). La biotecnología de *Bacillus thuringiensis* en la agricultura. Obtenido de: www.scielo.org.co/pdf/nova/v11n20/v11n20a09.pdf
- Raymond. B., Johnston. P., Nielsen-Leroux. C., Lereclus. D. y Crickmore. N. (2010) *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? Trends Microbiol 18:189–194
- Schnepf. E., Crickmore. N., Van Rie. J., Lereclus. D., Baum. J., Feitelson. J., Zeigler. D. R., Dean. D. H. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiol Mol Biol Rev. pp. 775-806
- Siegel. J.P. (2001). The mammalian safety *Bacillus thuringiensis* based insecticides. Journal of Invertebrate e Pathology. 77. 13-21.
- Sneath P. (1986). Spore forming gram-positive rods and cocci. En: Butler J. editor. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. p. 1104-207

Suquilanda. M. (2013). Manejo Integrado de Plagas en el Cultivo de Arroz. pp. 13.

Taheri. P. & Tarighi. S. Eur J Plant Pathol (2011) 129: 511. Obtenido de: doi.org/10.1007/s10658-010-9725-7

West. A.. Burges. H.. White. R. y Wyborn. C. (1984) Persistence of *Bacillus thuringiensis* parasporal crystal insecticidal activity in soil. J Invertebr Pathol; 44: 128-33

Zheng. A .. Lin. R.. Zhang. D.. Qin. P.. Xu. L.. Ai. P.. Ding. L.. Wang. Y.. Chen. Y.. Liu. Y.. Sun. Z.. Feng. H.. Liang. X.. Fu. R.. Tang. C.. Li. Q.. Zhang. J.. Xie. Z.. Deng. Q.. Li. S.. Wang. S.. Zhu. J.. Wang. L.. Liu. H. y Li. P. (2013). The evolution and pathogenic mechanisms of the rice sheath blight pathogen. *Nat. Commun.* 4 -1424 Obtenido de: doi: 10.1038/ncomms2427

ANEXOS

Anexo 1. Interpretación de datos finales de aplicación de *Rhizoctonia* spp. sobre *B. thuringiensis*

	Experimento		
	Medición Micelio (cm)		
N° de Cajas Petri	Hongo sobre Bacteria (H/B) (primera evaluación)	Hongo sobre Bacteria (H/B) (última evaluación)	Testigo Absoluto (H)
1	0.2	1.4	8.5
2	0.45	2.8	8.5
3	0.1	1.3	8.5
4	0.1	0.5	8.5
5	0.45	3.3	8.5
6	0.1	1.95	8.5
7	0.4	2.3	8.5
8	0	0.45	8.5
9	0.1	1	8.5
10	0.5	4	8.5
11	0.5	1	8.5
12	1	3.5	8.5
13	0.5	1.75	8.5
14	0.15	1.5	8.5
15	0.2	1.25	8.5
16	0.85	3.75	8.5
17	0.2	1.25	8.5
18	0.6	3	8.5
19	0.3	2.4	8.5
20	0.5	1.9	8.5
Prom.	0.3125	2.015	8.5
Dif. de crecimiento		1.7025	8.5

Elaborado por: El Autor

Anexo 2. Interpretación de datos finales de Bacteria sobre Hongo

N° de Cajas Petri	Experimento		
	Medición Micelio (cm)		
	Bacteria sobre Hongo (B/H) (primera evaluación)	Bacteria sobre Hongo (B/H) (última evaluación)	Testigo Absoluto (H)
1	6.5	6.5	8.5
2	6.5	6.5	8.5
3	6	6	8.5
4	5.8	5.8	8.5
5	6.2	6.2	8.5
6	6.5	6.5	8.5
7	6	6	8.5
8	7	7	8.5
9	5.65	5.65	8.5
10	6.6	6.6	8.5
11	6.4	6.4	8.5
12	6	6	8.5
13	7	7	8.5
14	6.75	6.75	8.5
15	6.5	6.5	8.5
16	5.95	5.95	8.5
17	6.3	6.3	8.5
18	7	7	8.5
19	6.25	6.25	8.5
20	6.45	6.45	8.5
Prom.	6.3675	6.3675	8.5
Dif. de crecimiento		0	8.5

Elaborado por: El Autor

Anexo 3. Interpretación de datos finales bacteria más hongo.

Tratamiento					
Bacteria más Hongo		Bacteria más hongo		Testigo	
(primera evaluación)		(última evaluación)		(H)	
Diámetro de micelio (cm)	Nº de esclerocios	Diámetro de micelio (cm)	Nº de esclerocios	Diámetro del micelio (cm)	Nº de esclerocios
4.15	0	5.5	40	8.5	120
4.15	0	5.5	13	8.5	115
4.25	0	5.45	36	8.5	117
4.15	0	5.5	24	8.5	130
4.15	0	5.5	45	8.5	110
4.15	0	5.5	41	8.5	112
4.2	0	5.5	15	8.5	64
4.35	0	5.75	11	8.5	95
4.15	0	5.5	58	8.5	103
4.5	0	5.5	30	8.5	118
4.15	0	5.7	33	8.5	100
5.35	0	5.75	19	8.5	150
5.5	0	5.6	17	8.5	145
4.15	0	5.5	10	8.5	123
4.75	0	5.6	22	8.5	111
4.85	0	6	43	8.5	129
5.05	0	5.5	29	8.5	161
4.9	0	5.8	21	8.5	147
5.2	0	5.75	45	8.5	98
4.75	0	5.5	29	8.5	105
4.5425	0	5.595	29.05	8.5	117.65

Elaborado por: El Autor

Anexo 4. Prueba de T para muestras Independientes de hongo sobre bacteria vs. Testigo.

Clasif	Variable	Grupo 1	Grupo 2	n(1)	n(2)	Media(1)	Media(2)	T	gl	p-valor	prueba
placas	micelio(cm)	{B+H}	{H}	21	19	6,47	8,5	-15,43	20	<0,0001	bilateral

Elaborado por: El Autor

Anexo 5. Prueba de t para muestras independientes bacteria sobre hongo vs testigo hongo

Clasif	Variable	Grupo 1	Grupo 2	n(1)	n(2)	Media(1)	Media(2)	T	gl	p-valor	prueba
placas	micelio(cm)	{H}	{H+B}	20	20	8,5	2,02	27,05	19	<0,0001	bilateral

Elaborado por: El Autor

Anexo 6. Prueba de T para muestras Independientes de tratamientos Bacteria sobre Hongo y Hongo sobre Bacteria vs. Testigo en relación al número de esclerocios.

Clasif	Variable	Grupo 1	Grupo 2	n(1)	n(2)	Media(1)	Media(2)	T	gl	p-valor	prueba
placas	ESCLEROSIS	{B+H Y H/B}	{H}	20	20	0,00	117,65	-23,58	19	<0,0001	bilateral

Elaborado por: El Autor

Anexo 7. Prueba de T para muestras independientes de tratamiento Bacteria más Hongo en relación al diámetro del micelio en cm

Clasif	Variable	Grupo 1	Grupo 2	n(1)	n(2)	Media(1)	Media(2)	T	gl	p-valor	prueba
placas	micelio(cm)	{B+H}	{H}	20	20	5,6	8,5	-88,49	19	<0,0001	bilateral

Elaborado por: El Autor

Anexo 8. Prueba de T para muestras independientes de tratamiento Bacteria más Hongo en relación al número de esclerocios.

Clasif	Variable	Grupo 1	Grupo 2	n(1)	n(2)	Media(1)	Media(2)	T	gl	p-valor	prueba
placas	ESCLEROSIS	{B+H}	{H}	20	20	29,05	117,65	-15,23	32	<0,0001	bilateral

Elaborado por: El Autor

Anexo 9. Re suspensión de Bacterias.

Elaborado por: El



Autor

Anexo 10. Agitación de bacterias



Elaborado por: El Autor

Anexo 11. Cajas Petri con tratamiento Bacteria vs Hongo



Elaborado por: El Autor

Anexo 12. Diferentes tipos de comportamiento de *Rhizoctonia* spp. frente a *B. thuringiensis*.



Elaborado por: El Autor

Anexo 13. Tratamiento de *B. thuringiensis* sobre *Rhizoctonia* spp.



Elaborado por: El Autor

Anexo 14. *Rhizoctonia* spp. en competencia con *B. thuringiensis*



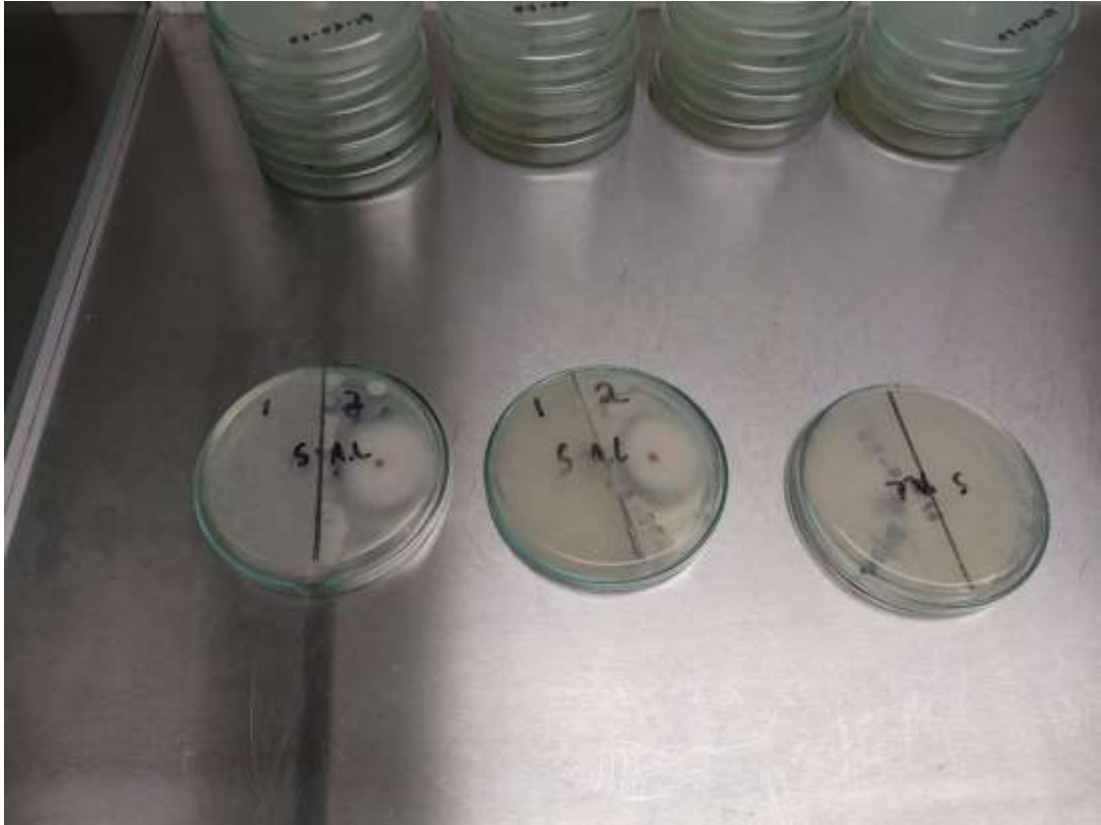
Elaborado por: El Autor

Anexo 15. Comparación de tratamientos frente al testigo.



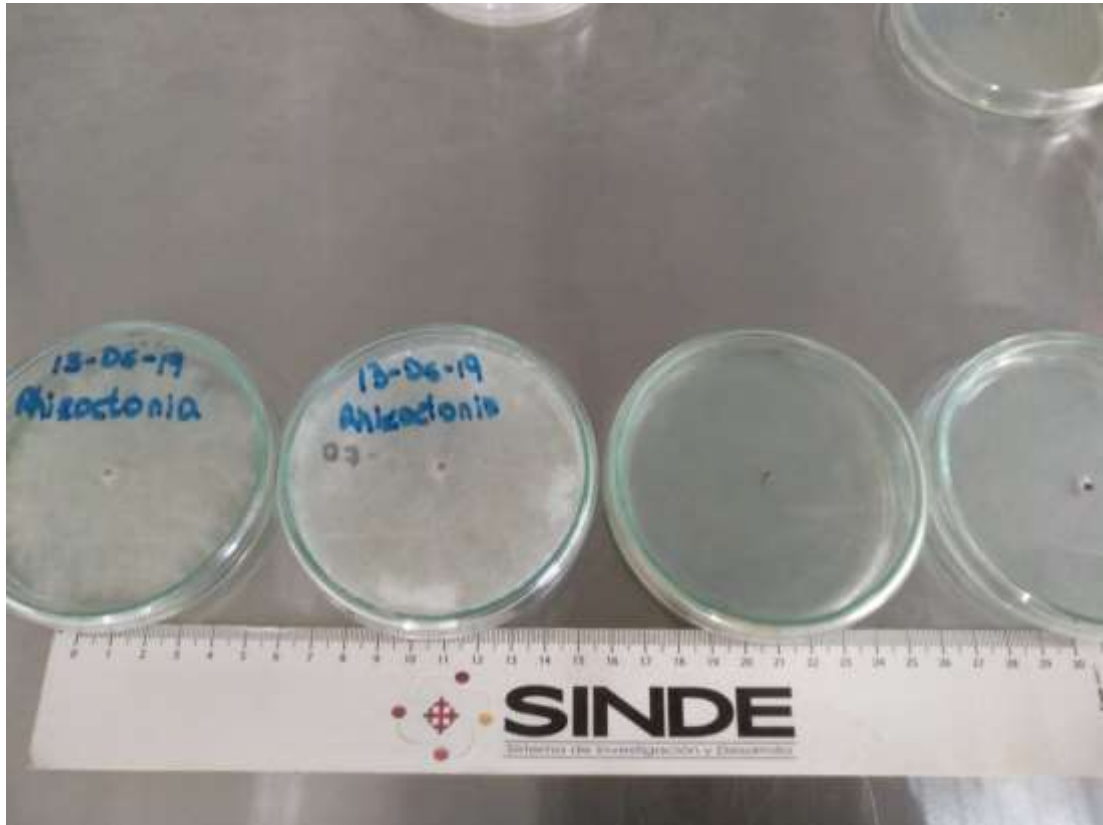
Elaborado por: El Autor

Anexo 16. Acción de *B. thuringiensis* frente a otros hongos. en competencia frente a *Fusarium* spp.



Elaborado por: El Autor

Anexo 17. Prueba realizada sobre aspersion de *B. thuringiensis* sobre esclerocios formados por *Rhizoctonia* spp.



Elaborado por: El Autor



**Presidencia
de la República
del Ecuador**



**Plan Nacional
de Ciencia, Tecnología,
Innovación y Saberes**



SENESCYT
Secretaría Nacional de Educación Superior,
Ciencia, Tecnología e Innovación

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, **Martínez Lino, Andrés Alfonso** con C.C: **#0922501440** autor del trabajo de titulación: **Evaluación del efecto de *Bacillus thuringiensis* sobre el desarrollo de *Rhizoctonia* spp. en condiciones *in vitro***, previo a la obtención del título de **Ingeniero Agropecuario** en la Universidad Católica de Santiago de Guayaquil.

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tienen las instituciones de educación superior, de conformidad con el Artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de titulación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la SENESCYT a tener una copia del referido trabajo de titulación, con el propósito de generar un repositorio que democratice la información, respetando las políticas de propiedad intelectual vigentes.

Guayaquil, **9 de Septiembre de 2019**

f. _____

Nombre: **Martínez Lino, Andrés Alfonso**

C.C: **0922501440**



Presidencia
de la República
del Ecuador



Plan Nacional
de Ciencia, Tecnología,
Innovación y Saberes



SENESCYT
Secretaría Nacional de Educación Superior,
Ciencia, Tecnología e Innovación

REPOSITORIO NACIONAL EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA

FICHA DE REGISTRO DE TESIS/TRABAJO DE TITULACIÓN

TEMA Y SUBTEMA:	Evaluación del efecto de <i>Bacillus thuringiensis</i> sobre el desarrollo de <i>Rhizoctonia</i> spp. en condiciones <i>in vitro</i> .		
AUTOR(ES)	Martínez Lino, Andrés Alfonso		
REVISOR(ES)/TUTOR(ES)	Ing. Ángel Llerena Hidalgo Ph.D.		
INSTITUCIÓN:	Universidad Católica de Santiago de Guayaquil		
FACULTAD:	Educación Técnica para el Desarrollo		
CARRERA:	Ingeniería Agropecuaria		
TÍTULO OBTENIDO:	Ingeniero Agropecuario		
FECHA DE PUBLICACIÓN:	9 de septiembre del 2019	No. DE PÁGINAS:	57
ÁREAS TEMÁTICAS:	Microbiología		
PALABRAS CLAVES/ KEYWORDS:	<i>B. thuringiensis</i> , esclerocios, micelio, <i>Rhizoctonia</i> spp.		
RESUMEN/ABSTRACT:	<p>El presente estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Análisis de Suelos. Aguas y Plantas de la Facultad de Educación Técnica para el Desarrollo de la Universidad Católica de Santiago de Guayaquil, donde se analizó la reacción de diferentes aplicaciones de <i>B. thuringiensis</i> sobre varios cortes de tejidos afectados por <i>Rhizoctonia</i> spp. La metodología constó de tres aplicaciones de <i>B. thuringiensis</i> sobre <i>Rhizoctonia</i> spp., la primera aplicación se basó en la dispersión de <i>B. thuringiensis</i> previo a la inserción de <i>Rhizoctonia</i> spp., en el medio de cultivo, la segunda aplicación fue la aspersion de <i>B. thuringiensis</i> sobre el micelio de <i>Rhizoctonia</i> spp., en el medio de cultivo y la tercera aplicación constó de una división del medio de cultivo en donde la primera mitad fue la dispersión de <i>B. thuringiensis</i> y en la otra mitad fue la inserción de <i>Rhizoctonia</i> spp. Las variables estudiadas fueron el diámetro en cm del micelio de <i>Rhizoctonia</i> spp., y el número total de esclerocios formados por <i>Rhizoctonia</i> spp., estas variables fueron analizadas mediante la prueba de T para muestras independientes en donde los resultados evidenciaron que las distintas aplicaciones de <i>B. thuringiensis</i> inhibieron el crecimiento micelial de <i>Rhizoctonia</i> spp., y la formación de esclerocios, sin embargo la aplicación en donde se asperjo <i>B. thuringiensis</i> sobre el micelio de <i>Rhizoctonia</i> spp., impidió completamente el crecimiento del micelio de <i>Rhizoctonia</i> spp., y a su vez la formación de esclerocios. siendo esta una alternativa como agente de biocontrol de <i>Rhizoctonia</i> spp.</p>		
ADJUNTO PDF:	<input checked="" type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO	
CONTACTO CON AUTOR/ES:	Teléfono: +593 984882151	E-mail: andresml_94@hotmail.com	
CONTACTO CON LA INSTITUCIÓN (COORDINADOR DEL PROCESO UTE)::	Nombre: Ing. Noelia Caicedo Coello, M.Sc.		
	Teléfono: +593 987361675		
	E-mail: noelia.caicedo@cu.ucsg.edu.ec		
SECCIÓN PARA USO DE BIBLIOTECA			
Nº. DE REGISTRO (en base a datos):			
Nº. DE CLASIFICACIÓN:			
DIRECCIÓN URL (tesis en la web):			