



**Aislamiento y evaluación de dos bacterias entomopatógenas como potenciales agentes de biocontrol
para *Tetranychus urticae* en cultivos de rosas *Rosa* spp. de una florícola, Ecuador**

Utreras Vinuesa, Camila Belén

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Lic. Koch Kaiser, Alma Rosel, Mgs.

Jueves 26 de Agosto de 2021

Hoja de resultados de la herramienta Urkund



Document Information

Analyzed document	ESCRITO TESIS URKUND UTRERAS CAMILA.docx (D111154338)
Submitted	8/11/2021 1:51:00 AM
Submitted by	
Submitter email	fjflores2@espe.edu.ec
Similarity	1%
Analysis address	fjflores2.espe@analysis.arkund.com

Sources included in the report

W	URL: https://repositorio.uide.edu.ec/bitstream/37000/410/1/T-UIDE-0389.pdf Fetched: 7/6/2020 8:33:55 PM	 1
SA	Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE / URKUND_Castillo_Jhosep_Trabajo_Titulación.docx Document URKUND_Castillo_Jhosep_Trabajo_Titulación.docx (D111154339) Submitted by: fjflores2@espe.edu.ec Receiver: fjflores2.espe@analysis.arkund.com	 1

ALMA
ROSEL
KOCH
KAISE
R

Firmado digitalmente
por ALMA ROSEL
KOCH KAISER
DN: cn=ALMA
ROSEL KOCH
KAISER, o=EC
S.A., ou=ENTIDAD
DE CERTIFICACION
DE INFORMACION
Motivo: Estoy
aprobando este
documento
Ubicación:
Fecha: 2021-09-01
10:53:05:00

.....
Lic. Koch Kaiser, Alma Rosel, Mgs.

C. C.: 1708880792



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “**Aislamiento y evaluación de dos bacterias entomopatógenas como potenciales agentes de biocontrol para *Tetranychus urticae* en cultivos de rosas *Rosa* spp. de una florícola, Ecuador**” fue realizado por la señorita **Utreras Vinuesa, Camila Belén** el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 6 de agosto de 2021

ALMA
ROSEL
KOCH
KAISE
R

Firmado digitalmente
por ALMA ROSEL
KOCH KAISER
DN: cn=ALMA ROSEL
KOCH KAISER c=EC
o=SECURITY DATA
S.A. 2 ou=ENTIDAD
DE CERTIFICACION
DE INFORMACION
Motivo: Estoy
aprobando este
documento
Ubicación:
Fecha: 2021-09-01
19:54:05:00

.....

Lic. Koch Kaiser, Alma Rosel, Mgs.

C. C.: 1708880792



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, **Utreras Vinueza, Camila Belén**, con cédula de ciudadanía n°1726065970, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“Aislamiento y evaluación de dos bacterias entomopatógenas como potenciales agentes de biocontrol para *Tetranychus urticae* en cultivos de rosas *Rosa* spp. de una florícola, Ecuador”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 6 de Agosto de 2021.

Utreras Vinueza, Camila Belén

C.C.: 1726065970



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo **Utreras Vinueza, Camila Belén**, con cédula de ciudadanía n°1726065970, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **“Aislamiento y evaluación de dos bacterias entomopatógenas como potenciales agentes de biocontrol para *Tetranychus urticae* en cultivos de rosas *Rosa* spp. de una florícola, Ecuador”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 6 de Agosto de 2021.

Utreras Vinueza, Camila Belén

C.C.: 1726065970

Dedicatoria

La presente investigación la dedico a mi padre celestial, quien me acompaña, cuida, protege y ama incondicionalmente, quien me da la fortaleza diaria para seguir adelante a pesar de las adversidades, quien guía mi camino en cada paso que doy.

Agradecimiento

Quiero agradecer sobre todo a Dios por acompañarme y ser mi guía en cada decisión que he tomado.

A la Universidad de las Fuerzas Armadas, por haberme dado la oportunidad de desarrollarme profesionalmente y de conocer personas importantes como maestros y amigos.

A mi novio, Jhosep Castillo, quien me brinda su amor y apoyo incondicional, junto con su familia quienes se han convertido en la mía también.

A mi tutora y admirable persona Lic. Alma Koch, Mgs., quien me ha guiado y apoyado a lo largo de este proyecto.

A la Mgs. María Esther Cortez por haberme dado la oportunidad de trabajar en su laboratorio, Microbiolab.

Al Ing. Fabricio Rivadeneira por haberme permitido consolidar este proyecto en su florícola, AlpaRoses.

Al Mgs. Francisco Flores por haberme permitido realizar parte del trabajo en su laboratorio, IDgen.

Índice de Contenidos

Carátula	1
Hoja de resultados de la herramienta Urkund	2
Certificación.....	3
Responsabilidad de autoría.....	4
Autorización de publicación.....	5
Dedicatoria	6
Agradecimiento	7
Índice de Contenidos.....	8
Índice de Tablas.....	10
Índice de Figuras.....	11
Resumen	12
Abstract	13
Capítulo I: Introducción.....	14
Formulación del problema	14
Justificación del problema	15
Objetivos	17
<i>Objetivo general</i>	17
<i>Objetivos específicos</i>	17
Hipótesis.....	17
Capítulo II: Marco teórico	18
Generalidades.....	18
Microorganismos entomopatógenos.....	19
Plaga del ácaro <i>Tetranychus urticae</i>	19
Bacterias entomopatógenas como agentes de biocontrol.....	21
Capítulo III: Materiales y métodos.....	23
Participantes del Proyecto	23
Zona de estudio	23
Condiciones generales.....	23
Recolección de muestras de suelo	24
Aislamiento de cepas bacterianas entomopatógenas.....	24

Identificación de posibles cepas bacterianas entomopatógenas	24
Análisis molecular	25
<i>Extracción y cuantificación de ADN genómico</i>	25
<i>Amplificación de ADN mediante PCR</i>	26
<i>Análisis bioinformático</i>	27
Bioensayos	27
<i>Confirmación de la especie de la plaga Tetranychus urticae</i>	27
<i>Reproducción de Tetranychus urticae</i>	28
<i>Dilución de los aislados bacterianos</i>	28
<i>Aplicación de los tratamientos a la plaga Tetranychus urticae</i>	29
Diseño experimental	30
Análisis estadístico	31
Capítulo IV: Resultados	32
Aislamiento e identificación de cepas bacterianas	32
Análisis molecular	38
<i>Extracción y cuantificación de ADN</i>	38
<i>Amplificación de ADN mediante PCR</i>	39
<i>Análisis bioinformático</i>	40
Bioensayos	42
<i>Confirmación de la especie de la plaga Tetranychus urticae</i>	42
<i>Reproducción de Tetranychus urticae</i>	44
<i>Dilución de los aislados bacterianos</i>	45
<i>Aplicación de los tratamientos a la plaga Tetranychus urticae</i>	47
Análisis estadístico	48
Capítulo V: Discusión	52
Capítulo VI: Conclusiones	57
Capítulo VII: Recomendaciones	58
Referencias	59

Índice de Tablas

Tabla 1 <i>Secuencia de los primers 27F y 1492R de la región 16S</i>	26
Tabla 2 <i>Programa de termociclador correspondiente para amplificar región 16S</i>	27
Tabla 3 <i>Descripción del diseño experimental</i>	30
Tabla 4 <i>Características morfológicas de los aislados bacterianos</i>	32
Tabla 5 <i>Tinciones y prueba bioquímica de la catalasa de los aislados bacterianos</i>	35
Tabla 6 <i>Concentraciones y absorbancias obtenidas en el espectrofotómetro Nanodrop de los aislados</i>	39
Tabla 7 <i>Secuencias con alta similitud a la del aislado 2R1-3B</i>	41
Tabla 8 <i>Secuencias con alta similitud a la del aislado 1R2-4B</i>	41
Tabla 9 <i>Absorbancias y concentraciones de los aislados en caldo LB</i>	45
Tabla 10 <i>Concentraciones de los aislados bacterianos</i>	46
Tabla 11 <i>Porcentajes promedio de mortalidad de la plaga T. urticae</i>	48

Índice de Figuras

Figura 1 <i>Ciclo de vida de Tetranychus urticae</i>	20
Figura 2 <i>Aislado bacteriano como posible bacteria entomopat6gena (Pseudomonas)</i>	33
Figura 3 <i>Aislado bacteriano como posible bacteria entomopat6gena (Bacillus)</i>	34
Figura 4 <i>Bacterias 2R1-3B teñidas con colorantes Gram y de esporas</i>	36
Figura 5 <i>Bacterias 1R2-4B teñidas con colorantes Gram y de esporas</i>	37
Figura 6 <i>Prueba de la catalasa en los aislados</i>	37
Figura 7 <i>Bandas del producto de extracci3n de ADN de los dos aislados</i>	38
Figura 8 <i>Bandas del producto de amplificaci3n de ADN de los aislados</i>	39
Figura 9 <i>Ácaro plaga hembra</i>	42
Figura 10 <i>Ácaro plaga macho</i>	43
Figura 11 <i>Edeago del ácaro macho</i>	44
Figura 12 <i>Frascos de almacenamiento de los ácaros plaga</i>	45
Figura 13 <i>Ácaros en hojas de rosas en unidades de cría</i>	47
Figura 14 <i>Porcentaje de mortalidad del ácaro por concentraci3n</i>	49
Figura 15 <i>Porcentaje de mortalidad del ácaro por tipo de bacteria</i>	50
Figura 16 <i>Porcentaje de mortalidad del ácaro por tipo de bacteria y concentraci3n</i>	51

Resumen

El control biológico es un método de restricción de los efectos dañinos de organismos patógenos mediante el uso de microorganismos útiles que inhiben su crecimiento. Este método permite tomar ventaja de las interacciones biológicas entre organismos, como el parasitismo, patogenicidad y competencia, para eliminar plagas de cultivos. Por tanto, su uso en plantaciones de flores ornamentales a condiciones de invernadero es una opción viable tomando en consideración las fuertes pérdidas económicas que causan las plagas. En el presente estudio, se tuvo como objetivo aislar y evaluar dos bacterias entomopatógenas como potenciales agentes de biocontrol para la plaga del ácaro *Tetranychus urticae* de cultivos de rosas de una florícola en Ecuador. Para el aislamiento, se realizaron diluciones con muestras de suelo de donde se obtuvieron colonias puras empleando cultivos microbiológicos. Se seleccionaron dos posibles bacterias entomopatógenas mediante su caracterización morfológica y bioquímica. Después, para el análisis molecular, se realizó su extracción, amplificación y secuenciación de ADN de donde se identificaron a las bacterias como *Pseudomonas* spp. del grupo fluorescente y *Bacillus thuringiensis*. Para los bioensayos, se transfirieron los ácaros plaga, una vez confirmada la especie *T. urticae*, a unidades de cría donde se aplicaron tres diferentes concentraciones de cada cepa bacteriana y se mantuvo durante siete días registrando el número de población. Por último, se evaluó la efectividad de los tratamientos mediante el porcentaje de mortalidad de la plaga donde se determinó que ambas cepas tienen actividad acaricida frente a *T. urticae*, a nivel de laboratorio.

Palabras clave:

- **BIOCONTROL**
- **ENTOMOPATÓGENO**
- **PLAGA**

Abstract

Biological control is a method that consists of restricting the harmful effects of pathogenic organisms using beneficial microorganisms that inhibit their growth. This method allows taking advantage of biological interactions between organisms, such as parasitism, pathogenicity, and competition, to eliminate crop pests. Therefore, its use in ornamental flower plantations under greenhouse conditions is a viable option taking into consideration the strong economic losses caused by pests. In the present study, the objective was to isolate and evaluate two entomopathogenic bacteria as potential biocontrol agents for the *Tetranychus urticae* mite plague of rose crops from a floriculture in Ecuador. For isolation, dilutions were made with soil samples from which pure colonies were obtained using microbiological cultures. Two possible entomopathogenic bacteria were selected by their morphological and biochemical characterization. Afterwards, for molecular analysis, DNA extraction, amplification and sequencing were carried out, from which the bacteria were identified as *Pseudomonas* spp. belonging to the fluorescent group and *Bacillus thuringiensis*. For bioassays, the pest mites were transferred, once the *T. urticae* specie had been confirmed, to rearing units where three different concentrations of each bacterial strain were applied and kept for seven days, recording the population number. Finally, the effectiveness of the treatments was evaluated by the percentage of mortality of the plague where it was determined that both strains have acaricidal activity against *T. urticae*, at laboratory level.

Keywords:

- BIOCONTROL
- ENTOMOPATHOGEN
- PLAGUE

Capítulo I: Introducción

Formulación del problema

Las plagas son un problema común dentro del sector agrícola alrededor de todo el mundo. Estas tienen un diverso origen biótico, pueden ser: virus, bacterias, hongos, nemátodos, artrópodos, entre algunos otros (Franquesa, 2016). Se destacan por su carácter fitófago y rápida propagación. Ocasionalmente ocasionan la disminución de la producción de las plantaciones, reducen el valor de la cosecha y pueden llegar a causar la pérdida total de los cultivos (MICEX, 2015).

En el Ecuador, el cultivo de flores ornamentales para su exportación es una de las fuentes económicas más importantes. Considerando que la floricultura genera empleo para miles de personas y además representa un porcentaje considerable para el Producto Interno Bruto del país (Gobierno del Encuentro, 2020). Sin embargo, existen también numerosas plagas que afectan severamente a los cultivos causando pérdidas graves en el aspecto financiero (Mundo Flores, 2021; Gordón, 2020).

La plaga del ácaro *Tetranychus urticae* (araña roja) es considerada una de las causantes de los daños más graves en cultivos bajo condiciones de invernadero, como las rosas (Brust & Gotoh, 2018). Esta plaga se ha tratado con varios pesticidas disponibles en el mercado con lo cual se ha conseguido eliminarla temporalmente. No obstante, el uso de los insecticidas tiene aspectos negativos como la resistencia de la plaga a los componentes químicos y además el peligro que representan para la salud. La dosis y porcentaje de compuesto activo aumenta en función del tiempo generando problemas cada vez más graves (Bielza, 2005).

El uso de enemigos naturales como agentes para el control biológico de plagas ha crecido exponencialmente. Teniendo entre los agentes controladores a microorganismos entomopatógenos como bacterias, hongos, virus, etc. Actúan mediante diversos mecanismos para eliminar plagas objetivo sin crear resistencia y sin ser perjudiciales para el ser humano.

Tomando en cuenta estas características, su uso para el control de la plaga del ácaro *T. urticae* en plantaciones de rosas es una opción prometedora (SENASA, 2017; CABI, 2016).

Justificación del problema

Dentro de la agroindustria ecuatoriana, la producción y exportación de rosas es una de las actividades económicas más importantes aportando significativamente al Producto Interno Bruto del país, por lo que, los cultivos afectados con plagas representan una pérdida económica relevante. Una de las plagas más conocidas por su amplia distribución en una variedad de especies vegetales, destacando la rosa, es la del ácaro *Tetranychus urticae*. Este artrópodo minúsculo se caracteriza por su agresividad y capacidad de infestación debido a su corto ciclo de vida y alta tasa de reproducción llegando a causar el colapso de los cultivos (Silva, 2020).

Los bioplaguicidas son productos a base de compuestos activos provenientes de un microorganismo. Las bacterias entomopatógenas más empleadas en la agroindustria son las del género *Bacillus* que se caracterizan por ser formadoras de esporas lo cual les permite ingresar al sistema de la plaga donde deposita sus toxinas. También en los últimos años se han realizado varias investigaciones sobre *Pseudomonas* del grupo fluorescente como agente de biocontrol pues tienen la capacidad de producir una variedad de metabolitos los cuales actúan estimulando el crecimiento de las plantas y, a la vez, de forma antagónica contra plagas. Dichas características convierten a ambos géneros en una alternativa segura y eficaz para su uso como control biológico. Entre las especies más usadas como acaricidas se encuentra *B. thuringiensis* cuyas formulaciones ya se venden en el mercado (Arthurs & Bruck, 2017).

El uso de bacterias entomopatógenas permite eliminar plagas, como la del ácaro *T. urticae*, con eficacia sin ser nocivo para otras especies ni para la salud humana. Al optar por el control biológico se evita el uso de agroquímicos reduciéndose así la contaminación ambiental.

También se logra reducir la adquisición de resistencia a los pesticidas causada por su uso indiscriminado (Onstad, 2014).

El interés de las florícolas y de los sectores productores de plantas ornamentales en aislar microorganismos entomopatógenos se debe a los beneficios de la microbiología aplicada a la agricultura. Los hongos y bacterias pueden favorecer el crecimiento de las plantas, ayudar a su nutrición, pero sobre todo pueden ser usados para el control de plagas. La capacidad de adaptación de los microorganismos entomopatógenos a diferentes condiciones ambientales puede variar ampliamente por lo que la efectividad del biocontrol se puede ver afectada significativamente (Montaño, Sandoval, Camargo, & Sánchez, 2010). Las florícolas optan por la implementación de sus propios laboratorios de microbiología para realizar el aislamiento y reproducción de microorganismos de interés para emplearlos en las mismas plantaciones de donde fueron obtenidos asegurando su eficacia (Valcárcel Calderón, 2013).

Objetivos

Objetivo general

Aislar y evaluar dos bacterias entomopatógenas como potenciales agentes de biocontrol para *Tetranychus urticae* en cultivos de rosas *Rosa* spp. de una florícola, Ecuador.

Objetivos específicos

- Aislar cepas bacterianas entomopatógenas en medios de cultivos microbiológicos a partir de cultivos de rosas con la plaga *T. urticae*, del cantón Quito.
- Identificar dos cepas entomopatógenas de los aislados mediante pruebas bioquímicas y análisis molecular.
- Reproducir el ácaro *T. urticae* en unidades de cría para los bioensayos, a nivel de laboratorio.
- Comprobar la eficacia de las bacterias entomopatógenas aisladas como agentes biocontroladores de *T. urticae* en rosas mediante bioensayos duales, a nivel de laboratorio.

Hipótesis

Las dos cepas entomopatógenas aisladas e identificadas actúan como agentes de biocontrol para *Tetranychus urticae* en cultivos de rosas *Rosa* spp. de una florícola, a nivel de laboratorio.

Capítulo II: Marco teórico

Generalidades

Los cultivos comerciales constituyen una fuente importante de la economía mundial, ya que parte de la base alimentaria de la población, así como actividades económicas dependen de la producción agrícola (Kang, 2019). Se debe prestar especial atención al control de insectos plaga y enfermedades de las plantas, puesto que estos causan la destrucción del 18% de la producción agrícola anual a nivel mundial, suponiendo una pérdida económica de miles de millones de dólares (Nicholson, 2007).

Ecuador es un país que depende del desarrollo de actividades agrícolas, donde uno de los productos mayormente comercializados son las flores. El área de cosecha de flores ornamentales, especialmente la de rosas, incrementa cada año. Expoflores anunció que el Ecuador tiene una capacidad de cultivo de rosas representando aproximadamente novecientos millones de dólares, siendo una cifra considerable para el aporte económico al país (Silva, 2020). Sin embargo, las plagas causan pérdidas considerables de cultivos desembocando en pérdidas económicas de igual forma.

Para luchar contra las plagas, se ha recurrido al empleo de pesticidas químicos (Mnif & Ghribi, 2015). El uso de insecticidas está ampliamente extendido por su facilidad de obtención y rapidez de acción, haciéndolos muy efectivos. También se ven favorecidos por su bajo costo y disminución de la prevalencia de enfermedades humanas al eliminar los insectos vectores (Sarwar, 2015). A pesar de sus beneficios, su uso origina problemas como su acumulación y permanencia en el ambiente, causando la contaminación de suelos y aguas subterráneas, y representando un peligro para los seres vivos que se encuentran expuestos a los químicos tóxicos (Mishra, Tewari, Singh, & Arora, 2015). Aunque se han podido controlar ciertas plagas con insecticidas químicos, otras han desarrollado resistencia a dichos productos causando un

mayor problema (Shea, Possingham, & Murdoch, 2002). Como alternativa existen otras estrategias de control de plagas efectivas y amigables con el medio ambiente, como el biocontrol (Dhaliwal, Jindal, & Dhawan, 2010). Se conforma de organismos vivos y sustancias derivadas entre los cuales se incluyen los microorganismos, extractos de plantas y pesticidas (Kachhawa, 2017). Entre las ventajas del biocontrol con respecto a los plaguicidas convencionales se encuentran: su bajo nivel de contaminación de los ecosistemas, su acción contra especies plaga específicas, es decir, no representan patogenicidad para el resto de los organismos vivos no relacionados con la plaga, su biodegradabilidad y su efectividad (Mehrotra, Kumar, Zahid, & Garg, 2017; Grijalba, Hurst, Ibarra, & Jurat, 2018).

Microorganismos entomopatógenos

Las bacterias, hongos y virus son los microorganismos más comúnmente empleados como control de insectos y ácaros plaga. En el caso de las bacterias, son las más usadas para control de plagas de polillas, moscas, mosquitos, mariposas, escarabajos y ácaros ya que producen toxinas específicas cuya acción causa su mortalidad al ser ingerido por el insecto (Kachhawa, 2017).

Plaga del ácaro *Tetranychus urticae*

Los ácaros son arácnidos considerados plaga con mayor afectación en cultivos ornamentales debido a su alta tasa de reproducción, corto ciclo de vida, tamaño microscópico, fácil adaptación y resistencia a pesticidas (Guzmán, 2006). *Tetranychus urticae* es la especie más representativa de los ácaros plaga en cultivos debido a su amplia distribución, incluida la rosa.

La clasificación taxonómica de *Tetranychus urticae* es la siguiente (Lozada, 2011):

Reino: Animalia

Filo: Arthropoda

Clase: Arachnida

Subclase: Acari

Orden: Prostigmata

Familia: Tetranychidae

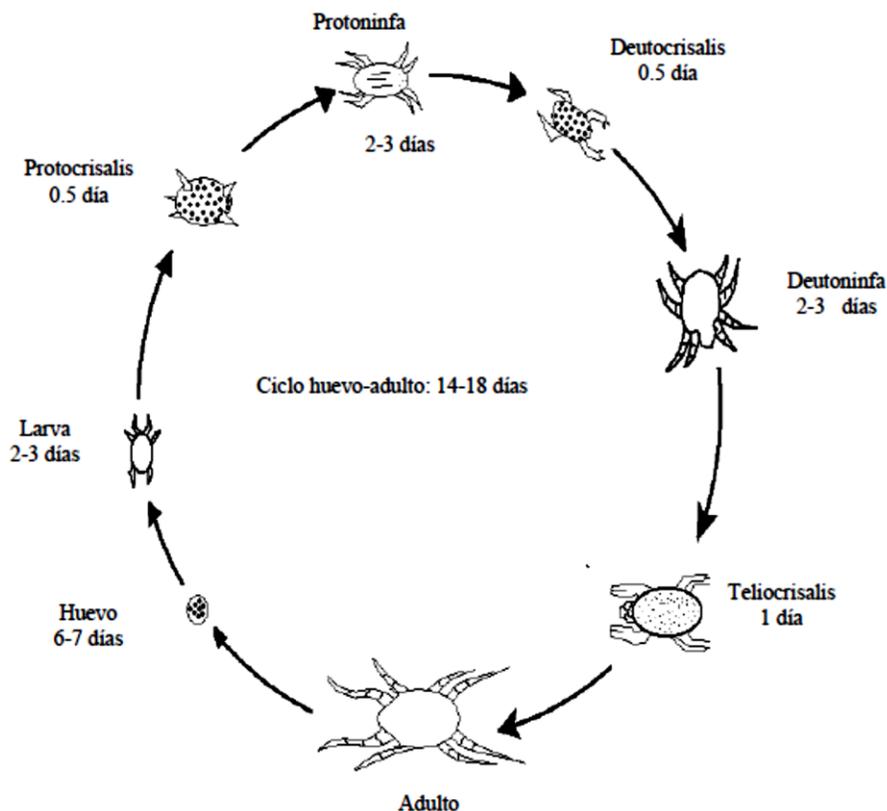
Género: *Tetranychus*

Especie: *T. urticae* Koch (1836)

El ácaro presenta cinco estadios en su ciclo vital: huevo, larva, primer estadio ninfal, segundo estadio ninfal y ácaro adulto como se muestra en la Figura 1. En el estadio de larva y ninfales se puede distinguir un período activo y uno pasivo (Malais & Ravensberg, 1991). En el estado adulto se da la diferenciación del sexo. La hembra se caracteriza por su forma redondeada de dimensiones de 0.5 por 0.3 milímetros. Mientras que el macho tiene un menor tamaño y forma prolongada que termina en punta con las patas alargadas (Lozada, 2011).

Figura 1

Ciclo de vida de Tetranychus urticae



Nota. El gráfico representa el ciclo de vida de *Tetranychus urticae* con una temperatura promedio de 20 °C y una humedad relativa de 65 %. Tomado de *Evaluación de productos orgánicos para el control de araña roja (Tetranychus urticae Koch) en el cultivo de fresa (Fragaria vesca)* (p. 37), por A. Lozada, 2011, Universidad Técnica de Ambato.

El ácaro puede perjudicar a la planta en todos sus estados, siendo que se ubican en el reverso de las hojas para absorber el contenido de las células vegetales. Estas áreas afectadas se tornan amarillentas a simple vista como puntos descoloridos en las hojas, donde han sido afectadas las zonas fotosintéticas. Dependiendo del nivel de infección, el cultivo puede llegar a sucumbir (Malais & Ravensberg, 1991; Lozada, 2011).

Bacterias entomopatógenas como agentes de biocontrol

Se han estudiado varias bacterias entomopatógenas capaces de controlar plagas y enfermedades vegetales gracias a su actividad patogénica, pero inocua para el ser humano. Dentro de los géneros con más aplicaciones en biocontrol se encuentran las *Pseudomonas*, específicamente miembros del grupo fluorescente (Yang & Lijuan, 2016). Las cepas aisladas de la rizosfera se caracterizan por su capacidad entomopatógena de producir metabolitos tóxicos para hongos fitófagos, insectos, nemátodos e incluso ácaros. Entre los compuestos activos que producen se encuentran los sideróforos, antibióticos de tipo fenazina o cianuro de hidrógeno y principalmente el metabolito secundario 2,4-diacetilfloroglucinol (2,4-DAPG) el cual es responsable de las propiedades antifitopatogénicas y de control biológico (Krieg, Holt, & Döring, 2021). Se ha demostrado en numerosas investigaciones la actividad insecticida de ciertas cepas como *P. cedrina* y *P. xylostella* para control de Lepidóptera, *P. azotoformans* para control de enfermedades fúngicas como *Fusarium*, *P. protegens* y *P. chlororaphis* para control de insectos en estado de larvas, *P. putida* para control de ácaros (*T. urticae*), etc (Fang-Hua, Xiao-Li, & Zhi Wei, 2019).

Otro de los géneros más empleados en la agricultura como controlador biológico de plagas, al actuar como un potente insecticida, es el género *Bacillus*. Estudios realizados han demostrado la eficacia de estas bacterias para eliminar la plaga del ácaro mediante sus proteínas tóxicas. Como, por ejemplo, una de las mejores estudiadas: *Bacillus thuringiensis* que durante su etapa de esporulación produce una inclusión proteica denominada *Cry* la cual es tóxica. Actúa paralizando el tracto digestivo del insecto después de ser ingerido dando como resultado su muerte (Porcar & Juárez-Pérez, 2004). Entre las especies utilizadas con mayor frecuencia por su alta actividad biológica se encuentran *B. thuringiensis*, *B. popilliae*, *B. sphaericus* y *B. moritai*. Estas bacterias son empleadas para controlar plagas Díptera (moscas y mosquitos) en estado larval, y otras como la del ácaro (Torres Cabra & Hernández Fernández, 2015; Flury, Aelle, & Ruffner, 2016; Aksoy, Ozman-Sullivan, & Ocal, 2008; Olayo Paredes, 1999).

La identificación de género y especie de bacterias, en la actualidad, se lleva a cabo no solo con características fisiológicas y ensayos bioquímicos sino con análisis molecular el cual se basa en extraer ADN, amplificar una región específica como la 16S ribosomal (en el caso de bacterias) y compararla con una base de datos. Con esto se obtiene una identificación a nivel molecular. La asociación de todas las técnicas mencionadas se emplea como estrategia para la identificación en el área de microbiología (Merck KGaA, 2021).

Capítulo III: Materiales y métodos

Participantes del Proyecto

El proyecto de tesis fue desarrollado por Camila Belén Utreras Vinueza, con la colaboración de Alma Koch Mgs. Directora del proyecto, Francisco Flores Ph,D. Docente, María Esther Cortez, Mgs. y Fabricio Rivadeneira, Ing. Se contó con la participación de las empresas: florícola AlpaRoses, laboratorio Microbiolab y laboratorio IDgen.

Zona de estudio

Las muestras de plantas y suelo fueron recolectadas de la florícola AlpaRoses ubicada en Conocoto, cantón Quito, provincia de Pichincha con coordenadas Latitud: -0.306507478512033, Longitud: -78.50183995843771.

Los experimentos de aislamiento de las bacterias entomopatógenas se realizaron en el laboratorio de microbiología aplicada Microbiolab, cantón Quito, provincia de Pichincha con coordenadas Latitud: -0.18370403790599452, Longitud: -78.48727334636905.

Mientras que el análisis molecular se realizó en el laboratorio IDgen en cantón Quito, provincia de Pichincha con coordenadas Latitud: -0.165566743726392, Longitud: -78.46855797732745.

Condiciones generales

Los experimentos de aislamiento de las cepas entomopatógenas se llevaron a cabo bajo condiciones de temperatura (25 ± 1 °C), fotoperiodo 16 horas luz: 8 horas oscuridad (16L:8O) y humedad relativa (55% h.r.) en el laboratorio de microbiología aplicada Microbiolab, cantón Quito, provincia de Pichincha. Mientras que el análisis molecular se realizó bajo condiciones de 20 ± 1 °C, L16:O8 y 45% h.r. en el Laboratorio IDgen, cantón Quito. Las observaciones se realizaron con un microscopio óptico regular.

Recolección de muestras de suelo

Se recolectó muestras de suelo de plantas que presentaban muestras visibles de daños causados por la plaga del ácaro, *T. urticae*, en recipientes estériles de la florícola AlpaRoses ubicada en Conocoto, cantón Quito, provincia de Pichincha. Estas muestras fueron llevadas al laboratorio de microbiología aplicada Microbiolab, cantón Quito, provincia de Pichincha.

Aislamiento de cepas bacterianas entomopatógenas

Se realizó una solución con la muestra de suelo y medio Agar Nutritivo (AN) de 1:10. A partir de la solución madre se realizaron diluciones (10^{-2} a 10^{-4}) con dos repeticiones por dilución y se inoculó 100 μ L de cada una en cajas Petri.

Transcurridas las 48 horas de incubación, se seleccionaron las colonias que presentaban la forma, tamaño, textura, color y aspecto característico de cepas entomopatógenas (género *Bacillus* y *Pseudomonas* del grupo fluorescente) según el Manual Sistemático Bacteriológico de Bergey. Se obtuvieron aislados puros subcultivando, por estriado, una colonia por caja en AN. Se realizaron dos repeticiones y se tomaron dos diferentes colonias de cada caja rotulando los nuevos aislados como A y B. Se dejó incubar durante 48 horas y se mantuvieron las cajas Petri en una funda estéril bien sellada en refrigeración a 3 °C.

Identificación de posibles cepas bacterianas entomopatógenas

Se realizaron las tinciones *Gram* y de esporas con verde malaquita para los posibles aislados de *Bacillus* spp. Se observó al microscopio bajo el objetivo 100X con aceite de inmersión para comprobar si las bacterias eran *Gram* positivas o negativas y si eran formadoras de esporas.

Se realizó la prueba de la catalasa a las posibles cepas entomopatógenas, fijando las muestras a portaobjetos y añadiendo una gota de peróxido de hidrógeno. Se observó al microscopio bajo el objetivo 40X para comprobar la presencia de burbujas indicando que las

bacterias interactúan con el oxígeno del reactivo. Se seleccionaron dos colonias como potenciales bacterias entomopatógenas para su respectivo análisis molecular.

Análisis molecular

Extracción y cuantificación de ADN genómico

Se extrajo el ADN de las dos cepas bacterianas seleccionadas mediante métodos convencionales y se realizaron dos repeticiones. Se tomó aproximadamente 100 mg de pellet celular bacteriano de los cultivos puros con un asa bacteriológica en un tubo de 1 mL al cual se le añadió 500 μ L de buffer de extracción y 2 μ L de β -mercaptoetanol. Se agitó vigorosamente para romper las paredes celulares y liberar el ADN. Se añadió 500 μ L de cloroformo y se homogeneizó seguido de centrifugación a 14,500 xg por 10 min. Se tomó únicamente el sobrenadante, aproximadamente 400 μ L, y se colocó en un tubo nuevo estéril. Se le añadió 400 μ L de etanol absoluto, 150 μ L de acetato de sodio 3M y 300 μ L de etanol al 70% filtrado para precipitar el ADN, se mantuvo durante toda la noche a -20 °C. Al día siguiente se centrifugaron las muestras a 14,500 xg por 17 min. En cámara, se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet con 200 μ L de etanol al 70% dejando secar durante 20 min. Se resuspendió el pellet en 25 μ L de agua DEPC, se le añadió 1 μ L de RNAsa y se incubó por 30 min a 37 °C. Se almacenaron las muestras a -20 °C hasta su posterior uso. Para determinar que el ADN no se encuentre degradado, se corrieron 3 μ L de las muestras con 2 μ L de Bluejuice en un gel de agarosa al 1% a 90V por 35 min. Posteriormente, se visualizaron las bandas bajo luz UV. También se midió la calidad del ADN extraído empleando el espectrofotómetro NanoDrop, donde se calibró el equipo con 2 μ L de agua estéril destilada y se realizó la lectura con 2 μ L de cada muestra. Los resultados de la concentración de ADN y las razones de las absorbancias a 260/230 y 260/280 de las muestras fue reportado por el programa.

Amplificación de ADN mediante PCR

Se diluyeron las muestras anteriormente almacenadas hasta obtener aproximadamente 300 ng/ μ L para evitar que la reacción se inhibiera por exceso de sustrato. Dentro de cámara se preparó el máster mix en un tubo estéril donde se añadió 25,5 μ L de agua, 37,5 μ L de polimerasa Taq, 3 μ L de cada primer: forward 27F y reverse 1492R, para amplificar la región 16S, los primers se encuentran descritos en la Tabla 1 (Chen, Lee, & Lin, 2015). Se repartió en 3 tubos: el blanco, la muestra 1 (Bacteria 1) y la muestra 2 (Bacteria 2). Se añadieron 2 μ L de ADN o agua para el blanco respectivamente a cada tubo y se homogeneizó. Se amplificaron las muestras en un termociclador de acuerdo con el programa correspondiente a la amplificación de la región 16S con 35 ciclos, protocolo mostrado en la Tabla 2. Por último, se corrieron las muestras con el marcador molecular 100pb Opti-DNA (rango 50 bp - 1.5 kb) en un gel de agarosa al 1% a 90V por 35 min donde se visualizaron las bandas bajo luz UV. Las muestras fueron enviadas al laboratorio Macrogen, Inc. en Corea del Sur donde fueron secuenciadas por el método SANGER.

Tabla 1

Secuencia de los primers 27F y 1492R de la región 16S

Gen	Primer	Secuencia (5'→ 3')
16S	27F (Forward)	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
	1492R (Reverse)	GGTACCTTGTTACGACTT

Nota. En la tabla se muestran las secuencias de 5'a 3' de los primers 27F (forward) y 1492R (reverse) de la región 16S. Tomado de *Obtaining long 16S rDNA sequences using multiple primers and its application on dioxin-containing samples* (p. 4), por Y. Chen, C. Lee & Y. Lin, 2015, BMC Bioinformatics.

Tabla 2

Programa de termociclador correspondiente para amplificar región 16S

Protocolo	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
Desnaturalización inicial	95	300
Desnaturalización	95	30
Annealing	54.5	40
Extensión	72	90
Extensión final	72	420

Nota. En la tabla se describe el proceso de amplificación que se da por ciclo para amplificar la región 16S de ADN ribosomal de bacterias. Tomado de *Mini16 thermal cyclers* (p. 10), Amplyus LLC, 2018, Amplyus.

Análisis bioinformático

Las secuencias génicas obtenidas de la Bacteria 1 y Bacteria 2 fueron editadas y alineadas con el software bioinformático Geneious para tener una buena calidad. Se generó un archivo con las secuencias editadas en formato *fasta*. Se subieron las secuencias al programa BLAST de nucleótidos del NCBI limitando la búsqueda a secuencias del material tipo. El algoritmo comparó las secuencias subidas con las de la base de datos del GenBank para obtener el organismo con el que compartió mayor similitud logrando su identificación molecular.

Bioensayos

Confirmación de la especie de la plaga Tetranychus urticae

Se recolectó muestras de hoja de rosas de la florícola AlpaRoses, con síntomas de ataque del ácaro, en frascos de vidrio con tapa hermética y se llevó al laboratorio. Con la ayuda de un pincel se transfirieron varios especímenes en un tubo con etanol para preservarlos. Se

prepararon placas donde se colocaron los especímenes más una gota de glicerina y se cubrieron con láminas cubreobjetos para su observación al microscopio. Se observó la morfología general del arácnido bajo el objetivo 10X y del edeago (órgano copulador intromitente del ácaro macho, característico de *T. urticae*) bajo el lente 40X en un microscopio óptico. Se analizó la estructura morfológica de la plaga basándose en claves taxonómicas de los ácaros del género *Tetranychus*.

Reproducción de Tetranychus urticae

Se probaron dos diferentes metodologías de reproducción del ácaro. A partir de las muestras de hojas de rosas recolectadas con síntomas de ataque del ácaro de la florícola AlpaRoses, se tomaron los ácaros con la ayuda de un pincel fino y se colocaron en frascos de vidrio (8cm de diámetro y 6cm de alto) con una hoja de papel absorbente en la base para mantener la humedad. Además, se añadió una hoja de las rosas sin ningún tipo de infección para que sirviera como alimento. Los frascos se sellaron con film plástico y se realizó perforaciones con una aguja para que fluyera el aire. Para el primer método se mantuvieron los frascos en el laboratorio a condiciones de 23 ± 1 °C, L16:O8 y 45% h.r. durante un periodo de 20 días. Mientras que para el otro método se trasladaron los ácaros recién recolectados, mantenidos bajo las mismas condiciones, directamente a las unidades de cría un par de horas antes de la aplicación de las diluciones en los bioensayos. Se empleó la metodología con los mejores resultados midiendo la cantidad de ácaros vivos mediante la reacción ante el sutil toque con un pincel fino.

Dilución de los aislados bacterianos

Se inoculó cada bacteria, a partir de los cultivos en cajas Petri con medio Agar Nutriente, en 15 mL de caldo Luria Bertrani (LB), se realizó por repetición en 13 tubos (6 tubos para la muestra 1 y 6 tubos para la muestra 2, tomando en cuenta tres concentraciones y dos

repeticiones cada uno, más un tubo de blanco). Se dejó incubar toda la noche a 150 rpm y a 21 °C.

Al día siguiente se midió la absorbancia del blanco y de las muestras a una longitud de onda de 600nm para relacionar el OD600 (densidad óptica a 600nm) con concentración bacteriana UFC/mL (unidades formadoras de colonias por mililitro) asegurándose de la obtención de un rango de detección. Para calcular las concentraciones celulares, se correlacionaron los coeficientes de extinción para cultivos bacterianos (*E. coli*) con los obtenidos mediante un espectrofotómetro. Se verificó que las suspensiones tengan una concentración aproximada dentro del rango de 1×10^8 a 1×10^9 UFC/mL. Una vez ajustadas las concentraciones, se pasaron 10 mL de las muestras a tubos plásticos para centrifugar a 4000 rpm durante 5 min en centrífuga con refrigeración. A partir de aquí, se obtuvo el sedimento con las bacterias vivas, se eliminó el sobrenadante y se añadió 10 mL de solución tampón de fosfato estéril (PBS) 1X a cada tubo. Ya que se realizó por repetición, se seleccionaron únicamente tres diferentes concentraciones por cada bacteria para ser usadas en los bioensayos. Se mantuvieron las diluciones en refrigeración a 3 °C hasta su aplicación.

Aplicación de los tratamientos a la plaga *Tetranychus urticae*

Se montaron las unidades de cría que consistieron en colocar una hoja fresca circular de rosa (4 cm de diámetro) con el envés hacia arriba, rodeada con un anillo de vaselina, para prevenir el escape de los especímenes, en una caja Petri forrada con algodón (0.5 cm de ancho) en su base para mantener la turgencia de la hoja. Se realizó el procedimiento para 21 cajas Petri, donde se tuvieron nueve cajas para cada bacteria tomando en cuenta las tres diferentes concentraciones y tres repeticiones por cada una, más un control negativo por cada repetición.

Previo a colocar los ácaros, se añadieron 2 mL de agua destilada al algodón en la base de las cajas. Después, se trasladaron 10 ácaros a partir de la reproducción masiva, a cada unidad de

cría previamente preparada. Se añadió aproximadamente 0.3 mL de cada dilución por goteo, con una micropipeta, a las unidades, mientras que, para los controles negativos, se añadió el mismo volumen de PBS 1X. Se colocaron todas las cajas preparadas en una caja grande a condiciones de 30 ± 2 °C, $65 \pm 5\%$ h.r. y un fotoperiodo de 16L:8O. Se añadió agua a las cajas, en caso de ser necesario, para mantener la humedad. Se revisó la efectividad de los tratamientos a las 72, 120 y 168 horas después de la aplicación contando y registrando el número de individuos muertos.

Diseño experimental

Se aplicó en la investigación un diseño completamente al azar (DCA) con 21 unidades experimentales: seis tratamientos (tres concentraciones para cada formulación) con tres repeticiones cada uno más controles por cada repetición. Dentro de cada unidad experimental, se incluyeron 10 ácaros plaga y se realizó el conteo de los organismos vivos tres veces en el lapso de una semana. El diseño experimental se encuentra descrito en la Tabla 3.

Tabla 3

Descripción del diseño experimental

	Bacteria 1			Bacteria 2			Control
	C1	C2	C3	C1	C2	C3	
Repetición 1	R1F1C1	R1F1C2	R1F1C3	R1F2C1	R1F2C2	R1F2C3	R1
Repetición 2	R2F1C1	R2F1C2	R2F1C3	R2F2C1	R2F2C2	R2F2C3	R2
Repetición 3	R3F1C1	R3F1C2	R3F1C3	R3F2C1	R3F2C2	R3F2C3	R3

Nota. En la tabla se describen los elementos que conformar el diseño experimental del proyecto.

Análisis estadístico

Los porcentajes de reducción de la densidad poblacional de *T. urticae* se calcularon utilizando la ecuación propuesta por (Henderson & Tilton, 1955):

$$M = 1 - \left(\frac{n \text{ en C antes del tratamiento} \times n \text{ en T después del tratamiento}}{n \text{ en C después del tratamiento} \times n \text{ en T antes del tratamiento}} \right) \times 100$$

Donde:

M = porcentaje de mortalidad

n = población de ácaros plaga

T = tratado

C = control

Se probaron las hipótesis de las medias de los diferentes tratamientos aplicados mediante ANOVA. También se realizó la prueba de Tukey para determinar diferencias estadísticamente significativas entre promedios de las tasas de mortalidad de la plaga ($p \leq 0.05$).

Capítulo IV: Resultados

Aislamiento e identificación de cepas bacterianas

A partir de diluciones de muestras de suelo de la florícola, se eligió dos aislados bacterianos como posibles bacterias entomopatógenas basado en sus características morfológicas, tinciones y pruebas bioquímicas. Se caracterizó morfológicamente a todos los aislados como se indica en la Tabla 4. Se comparó la morfología de las colonias con los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* según el Manual Sistemático de Bergey.

Tabla 4

Características morfológicas de los aislados bacterianos

Cepa	Forma	Elevación	Margen	Superficie	Color
1R1-3A	Irregular	Elevada	Ondulado	Rugosa	Crema
1R1-3B	Puntiforme	Elevada	Ondulado	Lisa	Blanco hueso
1R2-3A	Irregular	Elevada	Filamentoso	Rugosa	Amarillo verdoso
1R2-3B	Irregular	Elevada	Ondulado	Rugosa	Amarillo pálido
1R1-4A	Circular	Convexa	Completo	Plegada	Crema
1R1-4B	Circular	Elevada	Filamentoso	Rugosa	Blanco hueso
1R2-4A	Irregular	Elevada	Ondulado	Plegada	Blanco hueso
1R2-4B	Irregular	Plana	Ondulado	Rugosa	Crema
2R1-3A	Irregular	Plana	Completo	Lisa	Amarillo verdoso
2R1-3B	Irregular	Convexa	Ondulado	Lisa	Amarillo pálido
2R2-3A	Circular	Convexa	Ondulado	Rugosa	Rosa
2R2-3B	Circular	Plana	Ondulado	Rugosa	Blanco hueso
2R1-4A	Irregular	Convexa	Filamentoso	Plegada	Blanco hueso
2R1-4B	Puntiforme	Convexa	Ondulado	Rugosa	Blanco hueso

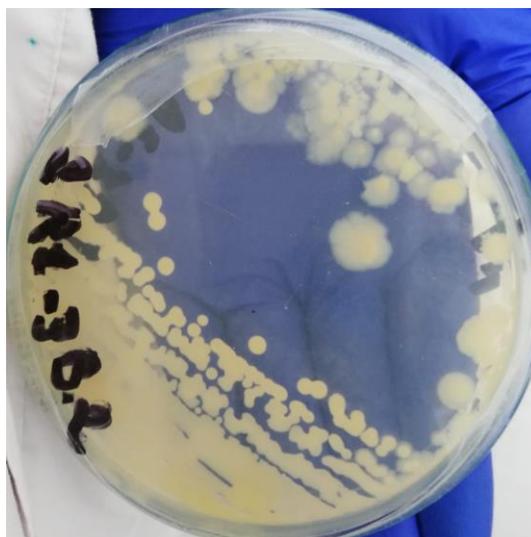
Cepa	Forma	Elevación	Margen	Superficie	Color
2R2-4A	Irregular	Elevada	Completo	Lisa	Amarillo intenso
2R2-4B	Irregular	Elevada	Ondulado	Rugosa	Amarillo pálido

Nota. En la tabla se describe la morfología de colonias aisladas, de muestras de suelo, en medio AN.

En base a la morfología de las colonias, el aislado 2R1-3B (Bacteria 1) presentó aspecto característico de *Pseudomonas* del grupo fluorescente donde las colonias eran irregulares y convexas, con bordes ondulados, de superficie lisa y color amarillento pálido como muestra la Figura 2. Mientras que el aislado 1R2-4B.1 (Bacteria 2), mostró características del género *Bacillus* siendo las colonias regulares y planas con márgenes ondulados, textura matizada y color blanco crema como se muestra en la Figura 3.

Figura 2

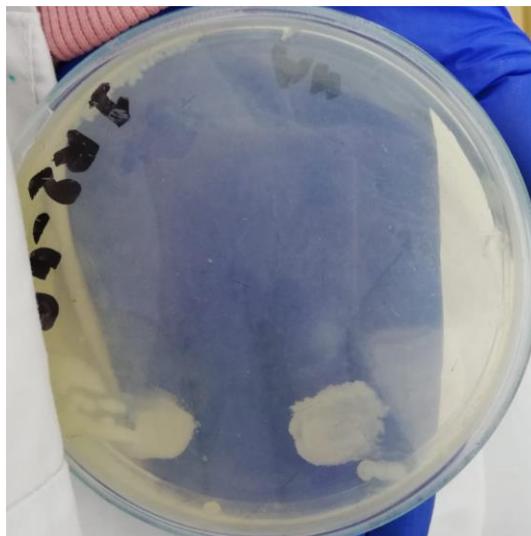
Aislado bacteriano como posible bacteria entomopatígena (Pseudomonas)



Nota. Colonias puras del aislado 2R1-3B como posibles *Pseudomonas* fluorescentes en medio AN.

Figura 3

Aislado bacteriano como posible bacteria entomopatógica (Bacillus)



Nota. Colonias puras del aislado 1R2-4B como posible *Bacillus* en medio AN.

En cuanto a las propiedades de composición de la pared celular y metabolismo de los aislados, se obtuvo la Tabla 5 de resultados. Las bacterias *Gram* positivas presentaron un color violeta o morado mientras que las *Gram* negativas tuvieron una coloración rosa como se muestra en las Figuras 4 y 5 (A). En cuanto a la tinción con verde malaquita y safranina, para las bacterias formadoras de esporas los bacilos se tiñeron de rosa y las esporas de color verde mientras que las no formadoras de esporas no presentaron estas inclusiones teñidas de color verde como se ve en las Figuras 4 y 5 (B). La prueba de la catalasa mostró resultados positivos al formarse burbujas una vez que se colocó una gota de peróxido de hidrogeno y se observó bajo el microscopio como se muestra en la Figura 6.

Tabla 5

Tinciones y prueba bioquímica de la catalasa de los aislados bacterianos

Cepa	Tinción Gram	Tinción de esporas	Prueba de la Catalasa
1R1-3A	+	-	+
1R1-3B	-	-	-
1R2-3A	+	+	-
1R2-3B	+	-	+
1R1-4A	-	-	+
1R1-4B	-	-	-
1R2-4A	-	+	+
1R2-4B	+	+	+
2R1-3A	-	+	+
2R1-3B	-	-	+
2R2-3A	-	-	+
2R2-3B	-	-	+
2R1-4A	-	+	+
2R1-4B	+	+	+
2R2-4A	-	-	+
2R2-4B	+	-	+

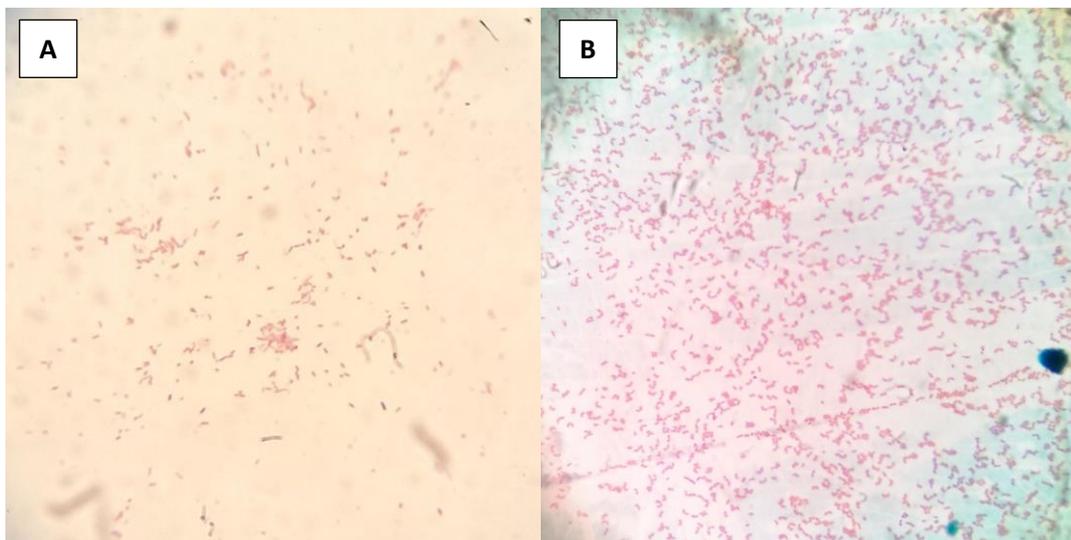
Nota. En la tabla se describen los resultados de la tinción *Gram*, de esporas y de la prueba bioquímica de la catalasa. Donde, (+) corresponde a bacterias: *Gram* positivas/formadoras de esporas/aerobias facultativas y (-) corresponde a *Gram* negativas/no formadoras de esporas/anaerobias.

El aislado 2R1-3B es un bacilo *Gram* negativo no productor de esporas por lo que es considerado como posible *Pseudomonas* del grupo fluorescente tomando en cuenta sus demás características morfológicas y bioquímicas. Mientras que el aislado 1R2-4B es un bacilo *Gram* positivo formador de esporas como posible *Bacillus*. Además, con las tinciones *Gram* y de verde

malaquita se observaron bajo el microscopio las esporas de las bacterias del aislado 1R2-4B (Figura 5 B). Se distinguió en las endosporas su posición en el centro y su tamaño regular que no deformó los bacilos. También se observó bajo el microscopio inclusiones proteicas, como posibles cristales de *B. thuringiensis*, junto con las esporas en los bacilos. Ambos microorganismos demostraron ser aerobios facultativos al ser positivos para la prueba de la catalasa.

Figura 4

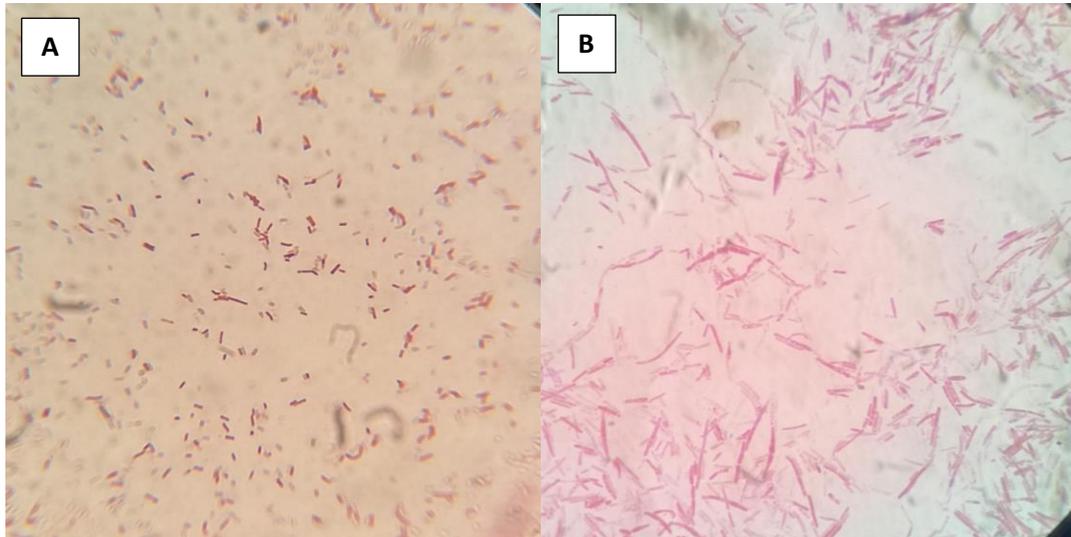
Bacterias 2R1-3B teñidas con colorantes Gram y de esporas



Nota. Bacterias del aislado 2R1-3B bajo el objetivo 100X con microscopio óptico. (A) tinción *Gram*. (B) tinción con verde malaquita y safranina.

Figura 5

Bacterias 1R2-4B teñidas con colorantes Gram y de esporas



Nota. Bacterias del aislado 1R2-4B bajo el objetivo 100X con microscopio óptico. (A) tinción Gram. (B) tinción con verde malaquita y safranina.

Figura 6

Prueba de la catalasa en los aislados



Nota. Prueba catalasa positiva, formación de burbujas, bajo el objetivo 40X con microscopio óptico.

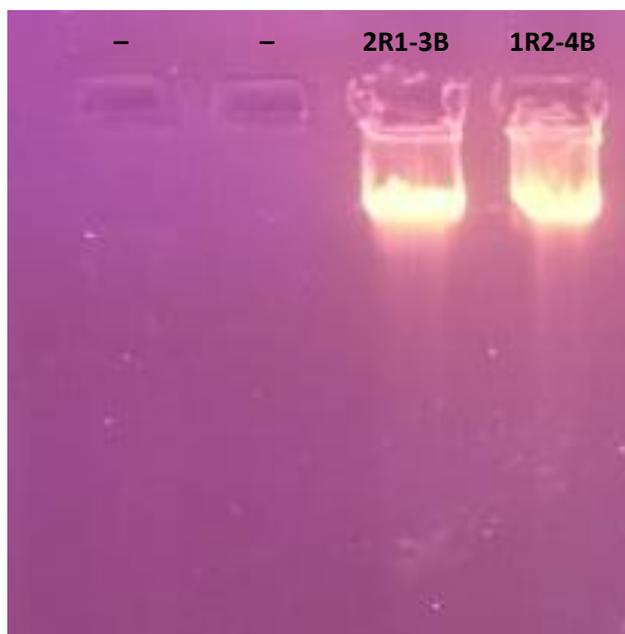
Análisis molecular

Extracción y cuantificación de ADN

Previo a la fase de amplificación del ADN extraído de los aislados 2R1-3B y 1R2-4B, se corrió un gel de agarosa para evaluar su integridad. La electroforesis dio como resultado bandas intensas, como se muestra en la Figura 7.

Figura 7

Bandas del producto de extracción de ADN de los dos aislados



Nota. Gel de agarosa al 1% bajo luz UV donde se visualizan bandas con las muestras (carriles 3 y 4) y controles negativos (carriles 1 y 2).

La cuantificación del ADN extraído mediante NanoDrop arrojó la Tabla 6 de resultados. Se indican los valores de absorbancia y concentración para la determinación de su calidad mediante el valor de contaminación.

Tabla 6

Concentraciones y absorbancias obtenidas en el espectrofotómetro Nanodrop de los aislados

ID de la Muestra	Fecha y Hora	Ácido Nucleico ng/ μ l	A260 (Abs)	A280 (Abs)	260/280	260/230	Tipo de Muestra
Bacteria 1.1	6/14/2021 10:44	3450	69.001	35.292	1.96	1.94	DNA
Bacteria 1.2	6/14/2021 10:45	6617.6	132.353	66.665	1.99	1.96	DNA
Bacteria 2.1	6/14/2021 10:47	1112	22.24	11.469	1.94	1.64	DNA
Bacteria 2.2	6/14/2021 10:48	1506.1	30.122	15.551	1.94	1.75	DNA

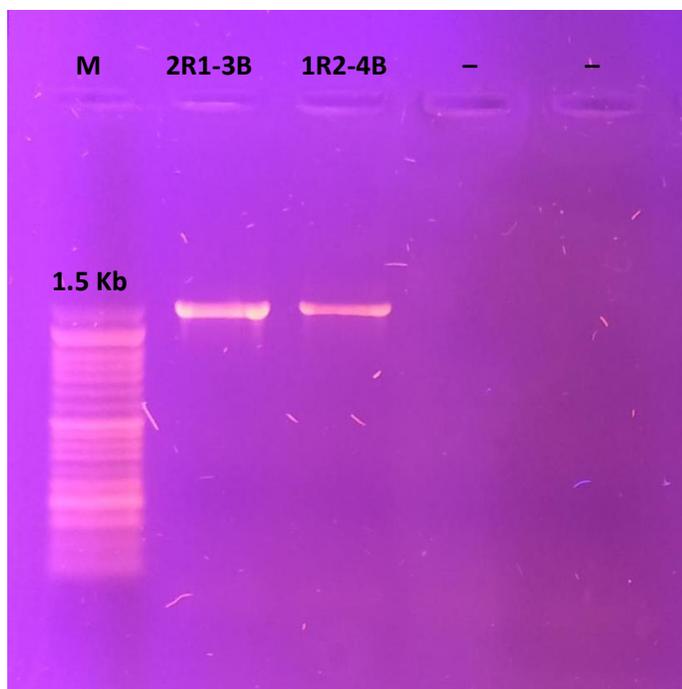
Nota. La tabla indica el nombre de la muestra: Bacteria 1.1 y Bacteria 1.2 para al aislado 2R1-3B, y Bacteria 2.1 y Bacteria 2.2 para al aislado 1R2-4B, ambas por repetición.

Amplificación de ADN mediante PCR

Después de la amplificación por PCR, se corrió la respectiva electroforesis en gel de agarosa de los aislados: 2R1-3B y 1R2-4B, lo que dio como resultado bandas bien definidas e intensas en los carriles 2 y 3, como se muestra en la Figura 8.

Figura 8

Bandas del producto de amplificación de ADN de los aislados



Nota. Gel de agarosa al 1% bajo luz UV donde se visualizan bandas después de la amplificación mediante PCR, carril 1 (M, marcador), carriles 2 y 3 (muestras), y carriles 4 y 5 (controles negativos).

Análisis bioinformático

Las secuencias génicas obtenidas fueron editadas y recortadas para obtener altos porcentajes de calidad, con lo que se obtuvo secuencias de 1060 pb para la Bacteria 1 (aislado 2R1-3B) y de 1269 pb para la Bacteria 2 (aislado 1R2-4B). El programa BLAST de ácidos nucleicos indicó que las Bacteria 1 pertenece al género *Pseudomonas* spp. con un porcentaje de identidad del 99.72%. También se obtuvo que la cepa aislada tiene un porcentaje de similitud del 99.53% al 99.62% con *Pseudomonas azotoformans*, cepa perteneciente al grupo fluorescente, como se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7

Secuencias con alta similitud a la del aislado 2R1-3B

Nombre Científico	Cobertura	Valor E	% de Ident.	Accesión
Query				
<i>Pseudomonas</i> spp.	100%	0.0	99.72%	KP756924.1
<i>Pseudomonas azotoformans</i>	100%	0.0	99.62%	LC130639.1
<i>Pseudomonas azotoformans</i>	100%	0.0	99.53%	KX186937.1
<i>Pseudomonas azotoformans</i>	100%	0.0	99.53%	LT629702.1
<i>Pseudomonas azotoformans</i>	100%	0.0	99.53%	LT629702.1

Nota. El nombre científico corresponde al organismo en la base de datos del GenBank con el cual comparte mayor similitud la secuencia.

Para la Bacteria 2 se obtuvo que la zona amplificada comparte un 99.84% de identidad con las secuencias génicas de *Bacillus thuringiensis* del GenBank con lo que se confirma el género y especie molecularmente de la Bacteria 2, como se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8

Secuencias con alta similitud a la del aislado 1R2-4B

Nombre Científico	Puntaje Max.	Puntaje Total	Cobertura Query	Valor E	% de Ident.	Accesión
<i>Bacillus thuringiensis</i>	2333	2333	100%	0.0	99.84%	MN396730.1
<i>Bacillus thuringiensis</i>	2333	2333	100%	0.0	99.84%	MK377087.1
<i>Bacillus thuringiensis</i>	2333	32573	100%	0.0	99.84%	CP020754.1

Nota. El nombre científico corresponde al organismo en la base de datos del GenBank con el cual la secuencia comparte mayor similitud.

Bioensayos

Confirmación de la especie de la plaga Tetranychus urticae

Mediante la observación al microscopio de los ácaros plaga se pudo confirmar la especie *T. urticae*. En la Figura 9 se aprecia un ácaro en estado adulto dado que su color es amarillento opaco, presenta manchas oscuras dorsales, cuenta con cuatro pares de patas y tiene sexo definido. El ácaro se clasificó como hembra por su mayor tamaño, cuerpo voluminoso y mayor redondez.

Figura 9

Ácaro plaga hembra



Nota. Ácaro plaga después de ser sumergido en etanol, vista lateral, bajo el objetivo 10X con microscopio óptico.

Se observó la morfología de un ácaro macho en estado adulto que presentó color pálido amarillento, manchas oscuras dorsales en el tórax y cuatro pares de patas, como se muestra en

la Figura 10. El género se diferenció por su tamaño pequeño y estrecho, abdomen puntiagudo y patas más largas.

Figura 10

Ácaro plaga macho



Nota. Ácaro plaga después de ser sumergido en etanol, vista ventral bajo el objetivo 10X con microscopio óptico.

La confirmación de la especie se realizó mediante la observación del edeago, aparato genital masculino distintivo de *T. urticae*. En la Figura 11 se puede apreciar la parte inferior del ácaro macho, donde se observa el edeago con un pomo de tamaño pequeño, margen dorsal convexo y dos proyecciones: la posterior aguda y la anterior redondeada.

Figura 11*Edeago del ácaro macho*

Nota. El círculo azul indica el edeago del ácaro macho después de ser sumergido en etanol, vista ventral bajo el objetivo 40X con microscopio óptico.

Reproducción de Tetranychus urticae

De las metodologías probadas la segunda dio los resultados más favorecedores considerando que se obtuvo la mayor cantidad de especímenes vivos, tras la reacción de los ácaros al toque con un pincel fino. Se verificó la especie observando que los ácaros presentaran su color amarillento o rojizo característico y sus manchas oscuras en el dorso. Se mantuvieron a los ácaros en frascos de vidrio estériles el mismo día de la aplicación de las diluciones en la etapa de los bioensayos. Estos especímenes fueron mantenidos a temperatura ambiente en frascos con flujo de aire, como se indica en la Figura 12, hasta su posterior transferencia a las unidades de cría.

Figura 12

Fascos de almacenamiento de los ácaros plaga



Dilución de los aislados bacterianos

Para preparar las diluciones a tres diferentes concentraciones se midieron las absorbancias de los aislados en caldo LB a una longitud de onda de 600nm, los resultados se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9

Absorbancias y concentraciones de los aislados en caldo LB

Muestra	DO600	UFC/mL
Bacteria 1 R1 C1	0.459	3.67×10^8
Bacteria 1 R2 C1	0.096	7.68×10^7
Bacteria 1 R1 C2	0.404	3.23×10^8
Bacteria 1 R2 C2	0.445	3.56×10^8

Muestra	DO600	UFC/mL
Bacteria 1 R1 C3	0.547	4.38×10^8
Bacteria 1 R2 C3	0.470	3.76×10^8
Bacteria 2 R1 C1	0.609	4.87×10^8
Bacteria 2 R2 C1	0.475	3.8×10^8
Bacteria 2 R1 C2	0.487	3.9×10^8
Bacteria 2 R2 C2	0.523	4.18×10^8
Bacteria 2 R1 C3	0.633	5.06×10^8
Bacteria 2 R2 C3	0.631	5.05×10^8

Nota. Los valores de concentración se calcularon tomando como referencia OD600 de $1.0 = 8 \times 10^8$ células/ml. (R) repetición y (C) concentración.

De las dos repeticiones realizadas por concentración, se escogió tres para cada bacteria, tomando en cuenta que las concentraciones ya se encontraban en el rango de 1×10^8 a 1×10^9 UFC/mL por lo que no se realizó ninguna dilución. Las tres diferentes concentraciones seleccionadas se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10

Concentraciones de los aislados bacterianos

	Bacteria 1	Bacteria 2
C1 UFC/mL	3.56×10^8	3.8×10^8
C2 UFC/mL	3.67×10^8	3.9×10^8
C3 UFC/mL	4.38×10^8	5.05×10^8

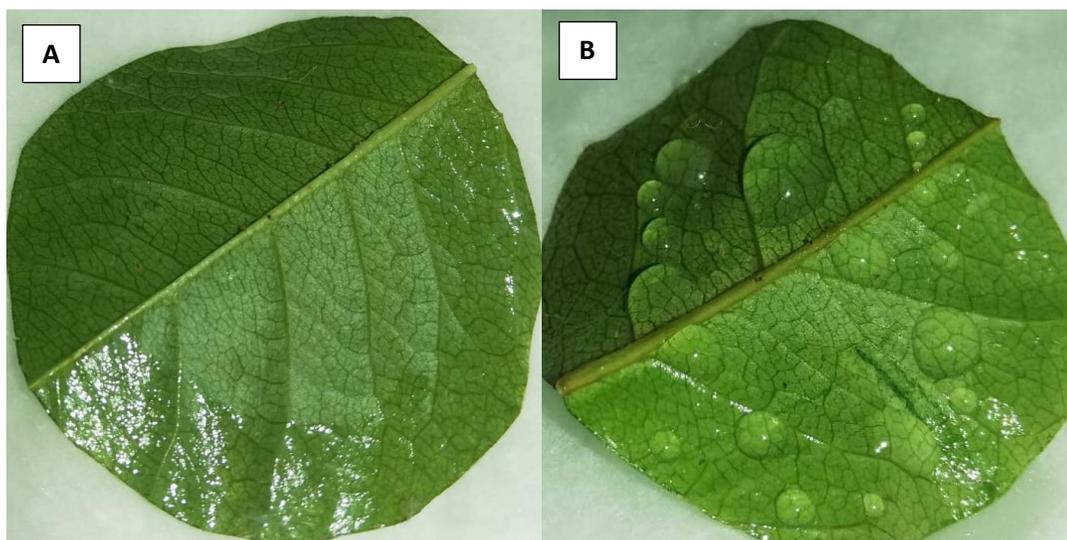
Nota. Tres diferentes concentraciones (C1, C2, C3) de menor a mayor seleccionadas para los bioensayos.

Aplicación de los tratamientos a la plaga *Tetranychus urticae*

Se montaron las unidades de cría y se colocaron 10 ácaros en las hojas frescas y desinfectadas en las cajas Petri, como se muestra en la Figura 13 A, después se aplicó el tratamiento, Figura 13 B.

Figura 13

Ácaros en hojas de rosas en unidades de cría



Nota. (A) Unidad de cría con 10 ácaros sin la aplicación del tratamiento. (B) Unidad de cría con 10 ácaros después de la aplicación del tratamiento.

Después de siete días de la aplicación de los tratamientos, se obtuvieron los porcentajes de mortalidad de los ácaros empleando la fórmula de Henderson y Tilton, los resultados se encuentran en la Tabla 11. Se puede observar el valor más alto de mortalidad del 81.48% el cual se obtuvo con la Bacteria 2 (*Bacillus thuringiensis*) a la concentración más alta de 5.05×10^8

UFC/mL. Mientras que el porcentaje más bajo de 29.63% se obtuvo con la Bacteria 1 (*Pseudomonas* del grupo fluorescente) a la menor concentración de 3.56×10^8 UFC/mL.

Tabla 11

Porcentajes promedio de mortalidad de la plaga T. urticae

Tiempo h	% de Mortalidad					
	Bacteria 1			Bacteria 2		
	C1	C2	C3	C1	C2	C3
72	29.63	40.74	51.85	48.15	59.26	62.96
120	29.63	40.74	59.26	62.96	62.96	77.78
168	29.63	40.74	59.26	74.07	62.96	81.48

Nota. Los valores tienen unidad de porcentaje, Bacteria 1 (*Pseudomonas* del grupo fluorescente), Bacteria 2 (*Pseudomonas* del grupo fluorescente) y (C) concentración.

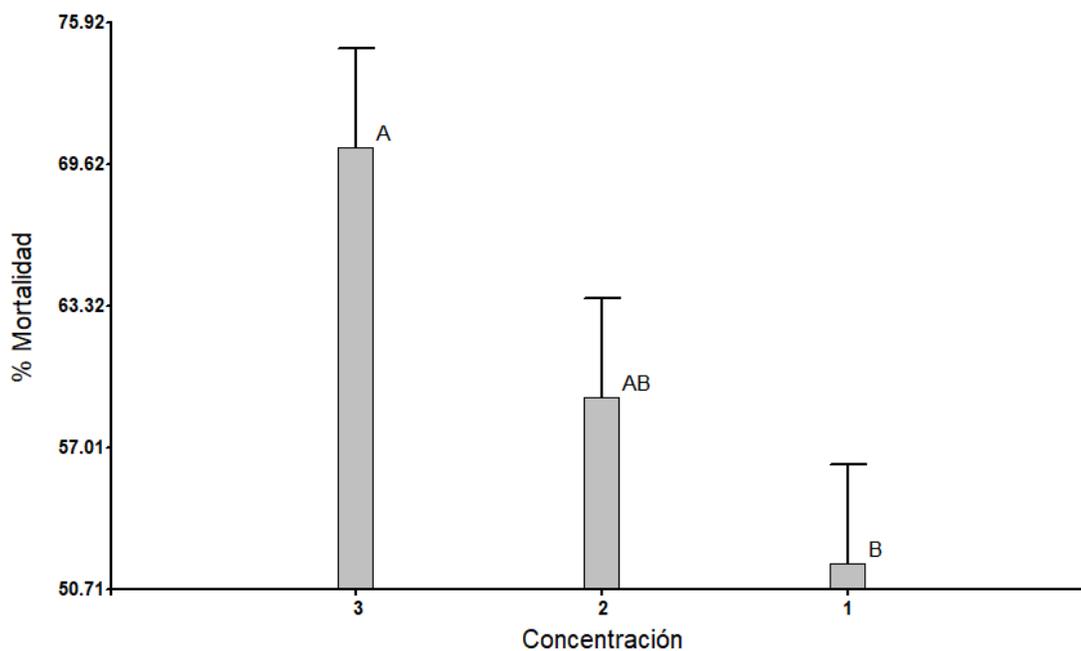
Análisis estadístico

Mediante el análisis de la varianza ANOVA se pudo comprobar diferentes hipótesis de los tratamientos, así como con la prueba de Tukey se pudo realizar un análisis comparativo entre las variables de concentración, tipo de bacteria y de su interacción.

En la Figura 14 podemos observar que el efecto de la concentración 3 y 2 es similar, ya que no presentan diferencia significativa, pero estas dos concentraciones sí tienen diferente resultado con respecto a la concentración 1 (la más baja). Por lo tanto, con un p-valor= 0.0354 se aceptó la hipótesis alterna de que la concentración sí influye en el % Mortalidad, con 95% de confiabilidad.

Figura 14

Porcentaje de mortalidad del ácaro por concentración

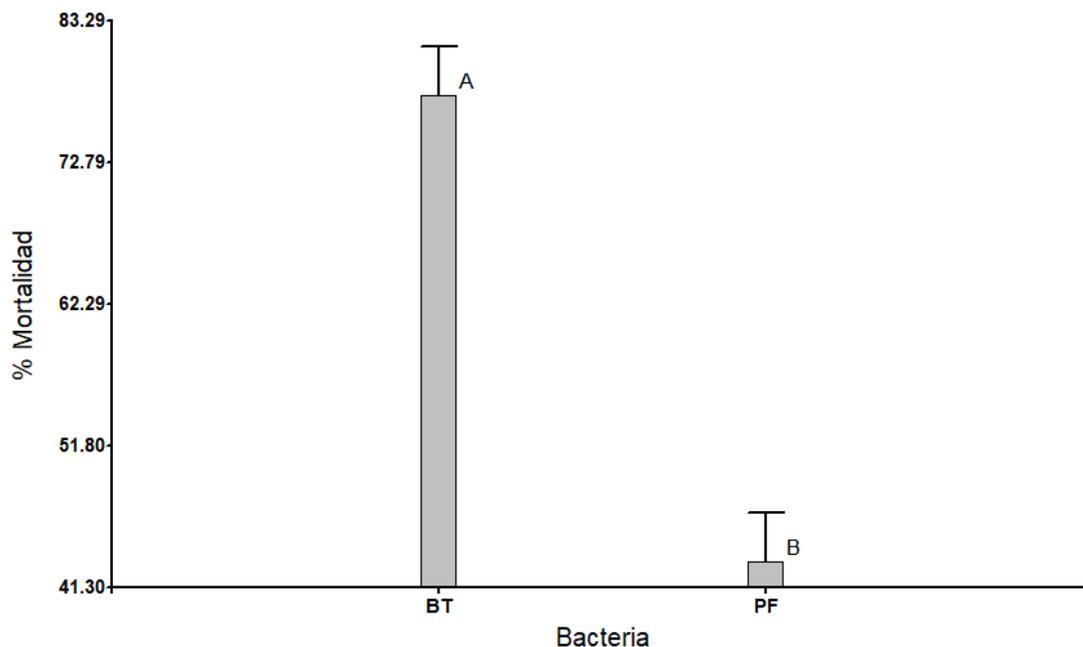


Nota. ^{A, B} Letras distintas representan medias significativamente diferentes según la prueba de Tukey (p -valor < 0.05).

En cuanto al tipo de bacteria, en la Figura 15 observamos que con *B. thuringiensis* se obtuvo la mayor efectividad para el biocontrol de ácaros con respecto a *Pseudomonas* del grupo fluorescente. Esta diferencia significativa queda corroborada aceptándose la hipótesis alterna de que el tipo de bacteria influye en el % Mortalidad, con un 95% de confiabilidad y un p -valor < 0.0001 .

Figura 15

Porcentaje de mortalidad del ácaro por tipo de bacteria



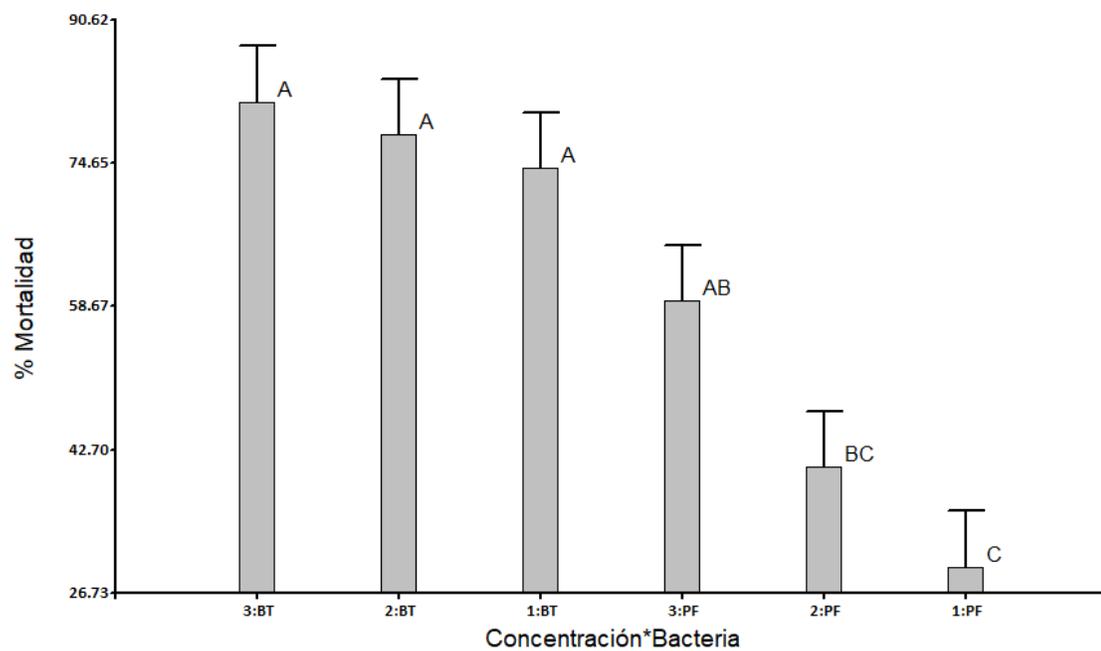
Nota. ^{A, B} Letras distintas representan medias significativamente diferentes según la prueba de Tukey (p -valor < 0.05).

Mediante del análisis de resultados de los seis tratamientos aplicados, se puede observar que existe una correlación positiva en cuanto al porcentaje de mortalidad y concentración siendo la mayor letalidad a la mayor concentración de las diluciones de las bacterias, como se muestra en la Figura 16. Además, mediante la prueba de Tukey se determinó que no existe diferencia significativa entre los tratamientos de BT a sus tres diferentes concentraciones y el tratamiento de PF a su mayor concentración, dado que los cuatro muestran similares resultados. En cuanto a los tratamientos de PF a sus concentraciones 2 y 3, estos dos tampoco presentan una diferencia significativa entre ambos. Al igual que los tratamientos PF, concentraciones 1 y 2 que tampoco son significativamente distintos. Por lo tanto, con un p -

valor= 0.2323 se rechaza la hipótesis alterna y se acepta la nula siendo que el tipo de bacteria y la concentración no influyen en el % Mortalidad, con 95% de confiabilidad.

Figura 16

Porcentaje de mortalidad del ácaro por tipo de bacteria y concentración



Nota. ^{A, B, C} Letras comunes representan medias no significativamente diferentes según la prueba de Tukey (p -valor > 0.05).

Capítulo V: Discusión

El tipo de muestra y el método de aislamiento de microorganismos son clave para obtener las bacterias entomopatógenas. El método de aislamiento por dilución de muestras de suelo resultó efectivo siendo que, en el país y en general Latino América, se tiene una alta variedad de zonas climáticas que favorecen las condiciones de crecimiento de estos microorganismos (Ibarra, Del Rincon, Orduz, & Noriega, 2003). También, en el suelo se encuentran los cadáveres de los insectos plaga de los cultivos en los cuales habitan los hongos o bacterias entomopatógenas (Sharma, Bohra, & Rajput, 2020). De 16 cepas aisladas, 12 fueron clasificadas como posibles bacterias entomopatógenas de acuerdo con sus características morfológicas. Existe una gran variedad de géneros y especies de bacterias con acción insecticida como lo son *B. thuringiensis*, especies de *Serratia* spp., *Yersinia entomophaga*, *Pseudomonas* spp., *Burkholderia* spp., *Streptomyces* spp., entre otras, que están siendo investigadas (Ruiu, 2015).

Las bacterias entomopatógenas se pueden clasificar de diversas formas y se les atribuye su actividad para el control de plagas por su capacidad de producir metabolitos secundarios, enzimas extracelulares, proteínas o incluso hormonas nocivas para la plaga. Dentro de la clasificación de bacterias *Gram* positivas se encuentra la especie más estudiada *B. thuringiensis*, conocida por su capacidad de producir inclusiones cristalinas una vez que sus esporas han sido ingeridas por el insecto, perforando el sistema digestivo y causando su muerte. La tinción *Gram* y de esporas con verde malaquita y safranina permitió determinar si las cepas aisladas eran *Gram* positivas o negativas y si eran o no formadoras de esporas. El aislado 1R2-4B al ser un bacilo *Gram* positivo, formador de esporas y tener inclusiones cristalinas junto a las endosporas, fue considerado como posible *Bacillus thuringiensis*; mientras que el aislado 2R1-3B, bacilo

Gram negativo no productor de esporas, fue tomado como posible *Pseudomonas* por el resto de sus características morfológicas y bioquímicas (Grijalba & Hurst, 2008).

Tras la caracterización fenotípica de los aislados, el análisis molecular permite identificar los microorganismos de manera confiable y certera. Después de la extracción del ADN una electroforesis en gel de agarosa permitió determinar la calidad de las muestras. Las bandas visualizadas bajo luz UV fueron claras y no dispersas indicando que el ADN se encontraba íntegro. La cuantificación de las muestras de ADN mediante Nanodrop, indicó concentraciones altas que rondaron los 1000 ng/ μ L cantidades mayores a 20-100 ng/ μ L, que es la mínima concentración de ADN necesaria para la amplificación por PCR (Merck KGaA, 2021). Además, las razones de absorbancias 260/280 de aproximadamente 2 se encontraron dentro del rango 1.8-2.1 indicando pureza óptima, ya que no hubo contaminación por proteínas, ácidos nucleicos ni residuos químicos. Así como la razón 260/230 fue en promedio de 1.8 encontrándose dentro del rango ≥ 1.8 , siendo de pureza aceptable sin la presencia de sales ni compuestos orgánicos con lo que se determina que las muestras de ADN fueron de buena calidad y óptimas para la amplificación (BancoADN, 2020).

Para la valoración de la integridad del ADN después de la PCR, se llevó a cabo una electroforesis donde se obtuvieron bandas bien definidas en la parte superior del gel teniendo la puntuación máxima de 3, determinándose que el ADN se mantuvo íntegro para su posterior secuenciación (BancoADN, 2020).

La identificación molecular, las secuencias génicas editadas y comparadas con las del GenBank, determinaron que los aislados correspondieron a *Pseudomonas* del grupo fluorescente y *B. thuringiensis* con porcentajes de identidad superiores al 99.5%. Según estudios, alrededor del 15% de microorganismos aislados de muestras de más de 30 países fueron identificados como *B. thuringiensis* (Martin & Travers, 2021). Tanto *B. thuringiensis* como

Pseudomonas del grupo fluorescente son especies proveniente del suelo, altamente distribuidas y abundantes alrededor del mundo y conocidas por su actividad entomopatógena (Ogier, Pagès, & Frayssinet, 2020).

T. urticae es una de las plagas más comunes en cultivos a condiciones de invernadero siendo sensible a los cambios de condiciones ambientales. Su reproducción a nivel de laboratorio requiere equipos y métodos que permitan simular las condiciones a las cuales se encuentra en su hábitat natural (Lozada, 2011). Por lo tanto, una metodología adecuada para su crecimiento en condiciones de laboratorio, según García y Castillo, es mediante una incubadora a 26° C, 40% de h.r. con un fotoperiodo de 14L:10O y realizando tres observaciones diarias. Se obtuvo crecimiento poblacional a los 15 días, correspondiente a su ciclo de vida (Reséndiz García & Castillo Olivas, 2018). Debido al complejo proceso de cría muchos investigadores han empleado la técnica de Abou-setta & Childers (1987) que consiste en la transferencia directa de los ácaros con un pincel fino, después de su recolecta, a las unidades donde se realizan los bioensayos (Abou & Childers, 1987). Se han registrado varios artículos con resultados positivos (Ruiz Díaz & Herrera, 2018).

Para los bioensayos se escogieron tres diferentes concentraciones entre 1×10^8 a 1×10^9 UFC/mL debido a que dentro de este rango varios estudios han demostrado la efectividad de microorganismos entomopatógenos. Los resultados obtenidos de la aplicación de los tratamientos con respecto a la concentración vs % Mortalidad indican una diferencia significativa siendo que se obtuvo la mayor efectividad a la mayor concentración. Esto se ve de manera similar en un estudio por Senasica donde se evaluaron tres concentraciones de *Bacillus thuringiensis*: [2×10^7 , 2×10^8 y 2×10^9] UFC/mL para determinar a cuál se daba la mayor efectividad. Se obtuvo que la mayor concentración dio el efecto más significativo, concordando con los resultados obtenidos (Senasica, 2018). También en un estudio de *Pseudomonas Putida*,

perteneciente al grupo fluorescente, se probaron concentraciones dentro del rango 1×10^8 a 1×10^9 UFC/mL demostrándose la mayor eficacia en la mortalidad de *T. urticae* a la mayor concentración (Cazorla, et al., 2007; Murat Aksoy, Sebahat, & Ozman-Sullivan, 2008).

En cuanto al tipo de bacteria, como indican los resultados, *B. thuringiensis* es fuertemente más efectiva que *Pseudomonas* del grupo fluorescente. Desde hace décadas los investigadores se han concentrado en descubrir el potencial de *B. thuringiensis* siendo que ha sido altamente efectivo para el biocontrol de múltiples plagas incluyendo la del ácaro *T. urticae* (Liu, Ruan, Peng, & Li, 2014). Los primeros estudios revelaron que esta bacteria, mediante su mecanismo de acción de producción de proteínas *Cry*, tiene la capacidad de paralizar el sistema digestivo de los insectos causando su muerte por lo que resulta muy efectivo como biopesticida (Frankenhuyzen, 2009). En un experimento llevado a cabo, la aplicación de esta bacteria en *T. urticae* alcanzó un porcentaje de mortalidad del 100% en hembras y de un 95% en ninfas y machos en un periodo de seis días (Neal, Lindquist, Gott, & Casey, 1987), lo cual concuerda con el máximo porcentaje de efectividad del 81%, pudiendo la diferencia deberse a errores experimentales y estadísticos durante el estudio. También en otra investigación realizado en el Ecuador, al evaluar la efectividad del género *Bacillus* spp. para el control de ácaros *T. urticae* provenientes de rosas de invernaderos, se determinó que una de las cepas más eficientes como efector catalítico fue *B. thuringiensis* (Larrea, Falconí, & Arcos, 2015).

Aunque *Pseudomonas* del grupo fluorescente mostró un valor significativamente diferente comparado con *B. thuringiensis*, se obtuvieron porcentajes de mortalidad con ambas cepas revelando su actividad entomopatógena. Investigaciones del grupo de especies fluorescentes de *Pseudomonas* han demostrado su aplicación como biopesticidas en los últimos años (Kupferschmied, Maurhofer, & Keel, 2013). Se han reportado una variedad de especies dentro del grupo mencionado con capacidad de producir sustancias o metabolitos tóxicos para

plagas. Entre las especies más reconocidas se encuentran: *P. fluorescens*, *P. azotoformans*, *P. putida*, *P. protegens* y *P. syringae* (Garrido Sanz, Arrebola, & Martí, 2017). Considerando que el aislado fue identificado como una *Pseudomonas* perteneciente al grupo fluorescente y que no se conoce con certeza la especie, no se puede comparar estrictamente su nivel de efectividad siendo que se desconoce para qué tipo de plaga tiene mayor afinidad (Saati Santamaría, Rivas, Kolařík, & García Fraile, 2021). La mayoría de las especies mencionadas tienen estudios validando su actividad insecticida pero muy pocos se han realizado en cuanto a su actividad acaricida. Entre estas escasas investigaciones, se encuentra un estudio sobre la actividad acaricida de cepas pertenecientes a *Pseudomonas* fluorescentes donde se han obtenido resultados de alrededor de un 85% de efectividad (Al-Sohim & Fouly, 2015). Este valor comparado con el máximo porcentaje obtenido del 59% puede considerar relativamente similar en cuestión de eficacia, ya que ambos representan resultados positivos.

Capítulo VI: Conclusiones

Se aislaron cepas bacterianas entomopatógenas en medios de cultivo microbiológicos a partir de diluciones de muestras de suelo de las plantas de rosas infectadas con la plaga *T. urticae*.

Se seleccionaron dos cepas como potenciales bacterias entomopatógenas mediante características morfológicas de las colonias, tinciones microbiológicas, actividad bioquímica y análisis molecular con herramientas bioinformáticas. Las bacterias fueron identificadas como *Pseudomonas* del grupo fluorescente y *Bacillus thuringiensis*.

Se recolectó la especie *T. urticae* el mismo día de la aplicación de los tratamientos, manteniéndolos en frascos de vidrio estériles unas horas previo a los bioensayos, a nivel de laboratorio.

Se comprobó la eficacia de las bacterias entomopatógenas *Pseudomonas* del grupo fluorescente y *Bacillus thuringiensis* mediante su porcentaje de mortalidad donde ambas bacterias demostraron ser efectivas para el biocontrol de *T. urticae* en plantas de rosas, a nivel de laboratorio.

Se aceptó la hipótesis de investigación siendo que *Pseudomonas* del grupo fluorescente y *Bacillus thuringiensis*, aisladas e identificadas, actúan como agentes de biocontrol para *Tetranychus urticae* en cultivos de rosas *Rosa* spp. de una florícola, a nivel de laboratorio.

B. thuringiensis presentó la mayor efectividad, con un porcentaje de mortalidad del 81.48% y concentración de 4.5×10^8 , para el biocontrol de *T. urticae* en plantas de rosas, a nivel de laboratorio.

El rango de concentración donde se tiene la mayor efectividad para el biocontrol de *T. urticae*, es entre 3.5×10^8 y 4.5×10^8 .

Capítulo VII: Recomendaciones

Emplear el método alternativo de aislamiento de bacterias entomopatógenas a partir de cadáveres de insectos plaga tomando en cuenta que estas muestras se encuentran con mayor frecuencia en zonas más cálidas y húmedas.

Para la identificación de las bacterias, en la etapa de pruebas bioquímicas utilizar un kit API (Índice analítico de perfil) que corresponda al género determinado a aislar para mayor facilidad y certeza. También, en el análisis molecular usar primers más específicos o diseñarlos para obtener la identificación de la especie y no del género.

Para reproducir masivamente la plaga, utilizar los equipos y metodología adecuada probando diferentes métodos de manera que se logre definir cuál es el más efectivo para la supervivencia de la especie.

Realizar un diseño experimental con mayor número de unidades experimentales para obtener resultados más confiables con menos error. También, contabilizar y registrar el número de individuos vivos, tras la aplicación de los tratamientos, diariamente durante siete días para obtener mayor número de datos y robustez estadística.

Continuar con bioensayos en campo, en condiciones de invernadero, para extrapolar los resultados y comprobar la efectividad de las bacterias entomopatógenas. Realizarlo a corto y largo plazo para obtener mayor cantidad de datos. También, se puede implementar el tiempo como una variable que influya en la efectividad de los tratamientos.

Referencias

- Abou, S. M., & Childers, C. C. (1987). A modified leaf arena technique for rearing phytoseiid or tetranychid mite for biological studies. *Florida Entomol.*, *70*(2), 245-248.
- Aksoy, M., Ozman-Sullivan, S., & Ocal, H. (2008). The effects of *Pseudomonas putida* biotype B on *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Exp Appl Acarol*, *46*(223-30), 1-4. doi:10.1007/s10493-008-9155-9
- Al-Azzazy, M. M., & Alsohim, A. S. (2020, October). Biological effects of three bacterial species on *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) infesting eggplant under laboratory and greenhouse conditions. *Acarologia*, *30*(3), 587-594. doi:10.24349/acarologia/20204390
- Al-Sohim, A. S., & Fouly, A. F. (2015). Biological Effects of Two Bacterial Isolates and Mutants of *Pseudomonas fluorescens* on Date Palm Red Spider Mite, *Oligonychus afrasiaticus* (Acari: Tetranychidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, *25*(2), 513-518.
- Arthurs, S. P., & Bruck, D. J. (2017). *Bacillus thuringiensis* for Control of Defoliators. In S. P. Arthurs, D. J. Bruck, & L. A. Lacey (Ed.), *Microbial Control of Nursery Ornamental and Landscape Plant Pests* (pp. 355-366). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803527-6.00024-X>: Academic Press. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803527-6.00024-X>
- BancoADN. (2020). Programa de control de calidad de ácidos nucleicos. (U. d. Salamanca, Ed.) *Banco Nacional de ADN*. Retrieved from www.bancoadn.org
- Bielza, P. (2005, November). *La resistencia a insecticidas: de los mecanismos a las estrategias de manejo*. Retrieved from Phytohemeroteca: <https://www.phytoma.com/la-revista/phytohemeroteca/173-noviembre-2005/la-resistencia-a-insecticidas-de-los-mecanismos-a-las-estrategias-de-manejo>
- Brust, G. E., & Gotoh, T. (2018). Mites. In G. E. Waqas Wakil, *Sustainable Management of Arthropod Pests of Tomato* (p. 372). California, USA: Academic Press. doi:<https://doi.org/10.1016/C2014-0-02023-0>
- CABI. (2016). *Biocontrol*. Retrieved from The Association of International Research and Development Centers for Agriculture: <https://www.cabi.org/what-we-do/invasive-species/biocontrol/>
- Cazorla, F. M., Romero, D., Pérez-García, A., Lugtenberg, B. J., Vicente, A. D., & Bloemberg, G. (2007). Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizoplane displaying biocontrol activity. *J Appl Microbiol.*, *103*(5), 1950–1959. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03433.x

- Chen, Y. L., Lee, C. C., & Lin, Y. L. (2015). Obtaining long 16S rDNA sequences using multiple primers and its application on dioxin-containing samples. *BMC Bioinformatics*, *16*(18). doi:10.1186/1471-2105-16-S18-S13
- Dhaliwal, G. S., Jindal, V., & Dhawan, A. K. (2010). Insect Pest Problems and Crop Losses : Changing Trends. *Indian Journal of Ecology*, *37*(1), 1–7. doi:10.13140/RG.2.2.25753.47201
- Fang-Hua, L., Xiao-Li, L., & Zhi Wei, K. (2019). Isolation and characterization of *Pseudomonas cedrina* infecting *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Insect Biochem. Physiol.*, *102*(e21593). doi:https://doi.org/10.1002/arch.21593
- Flury, P., Aelle, N., & Ruffner, B. (2016). Insect pathogenicity in plant-beneficial pseudomonads: phylogenetic distribution and comparative genomics. *ISME J.*, *10*(10), 2527–2542.
- Frankenhuyzen, K. (2009). Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *J Invertebr Pathol*, *101*(1), 1-16. doi:10.1016/j.jip.2009.02.009
- Franquesa, M. (2016, September 03). *Tipos de plagas agrícolas: aprende a identificarlas*. Retrieved from Agroptima Blog: <https://www.agroptima.com/es/blog/tipos-de-plagas-en-la-agricultura/>
- Garrido Sanz, D., Arrebola, E., & Martí, F. (2017). Classification of Isolates from the *Pseudomonas fluorescens* Complex into Phylogenomic Groups Based in Group-Specific Markers. *Front Microbiol.*, *8*. doi:10.3389/fmicb.2017.00413
- Gobierno del Encuentro. (2020, September 30). *LA ECONOMÍA ECUATORIANA DECRECIÓ 12,4% EN EL SEGUNDO TRIMESTRE DE 2020*. Retrieved from Gobierno del la Republica del Ecuador: <https://www.bce.fin.ec/index.php/boletines-de-prensa-archivo/item/1383-la-economia-ecuatorial-decrecio-12-4-en-el-segundo-trimestre-de-2020>
- Gordón, D. (2020, December 04). *Ecuador se mantiene como tercer exportador de flores a nivel mundial pese a los estragos del COVID-19*. Retrieved from EL UNIVERSO: <https://www.eluniverso.com/noticias/2020/12/04/nota/8071792/flores-exportaciones-pandemia-crisis-economica-ecuador/>
- Grijalba, E., & Hurst, M. (2008). Bacterias entomopatógenas en el control biológico de insectos. In *Control biológico de insectos plagas* (pp. 300-332). España: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Agrosavia).
- Grijalba, E., Hurst, M., Ibarra, J., & Jurat, J. (2018). Bacterias entomopatógenas en el control biológico de insectos. In *Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros: agentes de control biológico*. (pp. 298–333). Bogotá: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria.

- Guzmán, B. (2006). Control de araña roja (*Tetranychus urticae*) con tres agentes biológicos, a. In B. Guzmán, *Trabajo de grado*. Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrícolas.
- Henderson, C. F., & Tilton, E. W. (1955, April). Tests with Acaricides against the Brown Wheat Mite. *Journal of Economic Entomology*, 48(2), 157–161.
doi:<https://doi.org/10.1093/jee/48.2.157>
- Ibarra, J., Del Rincon, M., Orduz, S., & Noriega, D. (2003). Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 5269–5274.
- Kachhawa, D. (2017). Microorganisms as a biopesticides. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5(3), 468–473.
- Kang, L. (2019). Overview: Biotic signalling for smart pest management. *Biological Sciences*, 374, 1–5. doi:10.1098/rstb.2018.0306
- Krieg, N. R., Holt, J. G., & Döring, M. (2021). *Pseudomonas fluorescens*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (pp. 141 – 199). Baltimore: The Williams and Wilkins Co.
doi:<https://doi.org/10.15468/c3kkgh>
- Kupferschmied, P., Maurhofer, M., & Keel, C. (2013). Promise for plant pest control: root-associated pseudomonads with insecticidal activities. *Front Plant Sci.*, 4.
doi:10.3389/fpls.2013.00287
- Larrea, I., Falconí, C., & Arcos, A. (2015). Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus* spp. con actividad contra *Tetranychus urticae* Koch en cultivos comerciales de rosas. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17(2), 140-148.
doi:10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.54291
- Liu, X., Ruan, L., Peng, D., & Li, L. (2014). Thuringiensin: A Thermostable Secondary Metabolite from *Bacillus thuringiensis* with Insecticidal Activity against a Wide Range of Insects. *Toxins (Basel)*, 6(8), 2229–2238. doi:10.3390/toxins6082229
- López Lucero, D. E. (2019). EVALUACIÓN IN VITRO DEL EFECTO ACARICIDA DE UN BIOPRODUCTO A BASE DE *Bacillus thuringiensis* var. Thuringiensis CONTRA *Tetranychus urticae* PRESENTE EN CULTIVOS DE ROSA EN EL CANTÓN RUMIÑAHUI, PROVINCIA DE PICHINCHA. Quito, Pichincha, Ecuador: UDLA. Retrieved from <http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/10654/1/UDLA-EC-TIB-2019-07.pdf>
- Lozada, A. (2011). Evaluación de productos orgánicos para el control de araña roja (*Tetranychus urticae* Koch) en el cultivo de fresa (*Fragaria vesca*). Ambato: Universidad Técnica de Ambato.

- Malais, M., & Ravensberg, W. (1991). La biología de las plagas de invernadero y sus enemigos naturales. Amsterdam: Koppert.
- Martin, P. A., & Travers, R. S. (2021). Worldwide Abundance and Distribution of *Bacillus thuringiensis* Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(10), 2437-2442. doi:<https://doi.org/10.1128/aem.55.10.2437-2442.1989>
- Mehrotra, S., Kumar, S., Zahid, M., & Garg, M. (2017). Biopesticides. En R. L. Singh (Ed.), Principles and Applications of Environmental Biotechnology for a Sustainable Future. *Springer*, 274–292. doi:0.1007/978-981-10-1866-4
- Mendoza-Léon, D., Dobronski-Arcos, J., Vásquez-Freytez, C., Frutos-Pinto, V., & Paredes-Carreño, S. (2019). CONTROL DE *Tetranychus urticae* KOCH (ACARI: TETRANYCHIDAE) CON *Bacillus subtilis* EN HOJAS DE FRESA (*Fragaria vesca*). *Agronomía Costarricense*, 43(1), 125-133. Retrieved from http://www.mag.go.cr/rev_agr/v43n01_125.pdf
- Merck KGaA. (2021). *Working with PCR*. (Sigma, Producer) doi:<https://www.sigmaaldrich.com/EC/es/technical-documents/technical-article/genomics/pcr/working-with-pcr>
- MICEX. (2015). *Plagas de los cultivos: clasificación, descripción y daños*. Retrieved from <https://www.micex.es/leccion/1-plagas-de-los-cultivos/>
- Mishra, j., Tewari, S., Singh, S., & Arora, N. (2015). Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets. (N. Arora, Ed.) *Springer*. doi:10.1007/978-81-322-2068-8
- Mnif, I., & Ghribi, D. (2015). Potential of bacterial derived biopesticides in pest management. *Crop Protection*, 77, 52–64. doi:10.1016/j.cropro.2015.07.017
- Montaño, N., Sandoval, A., Camargo, S., & Sánchez, J. (2010). Los microorganismos: pequeños gigantes. In *Elementos: Ciencia y cultura* (pp. 15-23). México: Redalyc. Retrieved from <https://www.redalyc.org/pdf/294/29411989003.pdf>
- Mundo Flores. (2021). *Las Rosas*. Retrieved from Mundo Flores: <https://www.mundoflores.net/h-las-rosas.html>
- Murat Aksoy, H., Sebahat, K., & Ozman-Sullivan, H. (2008). The effects of *Pseudomonas putida* biotype B on *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Exp Appl Acarol*, 46, 223–230. doi:10.1007/s10493-008-9155-9
- Neal, J. W., Lindquist, R. K., Gott, M., & Casey, M. L. (1987). Activity of the thermostable β -exotoxin of *Bacillus thuringiensis* Berliner on *Tetranychus urticae* and *T. Cinnabarinus*. *J. Agric. Entomol.*, 4(1), 33-40.

- Nicholson, G. M. (2007). Fighting the global pest problem: Preface to the special Toxicon issue on insecticidal toxins and their potential for insect pest control. *Toxicon*, *49*, 413–422. doi: doi:10.1016/j.toxicon.2006.11.028
- Ogier, J., Pagès, S., & Frayssinet, M. (2020). Entomopathogenic nematode-associated microbiota: from monoxenic paradigm to pathobiome. *Microbiome*, *8*(25). doi:https://doi.org/10.1186/s40168-020-00800-5
- Olayo Paredes, R. P. (1999). ENTOMOPATOGENOS UTILIZADOS EN CONTROL MICROBIAL DE INSECTOS PLAGA. *UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"*. Retrieved from <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/3670/T10967%20OLAYO%20PAREDES,%20RENE%20PORFIRIO%20%20%20TESIS.pdf?sequence=1>
- Onstad, D. W. (2014). IPM and Insect Resistance Management. In D. W. Onstad,, & Insect Resistance Management (Eds.), *Insect Resistance Management* (2 ed., pp. 515-532). Academic Press. doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396955-2.00016-3
- Porcar, M., & Juárez-Pérez, V. (2004). Aislamiento y establecimiento de una colección de *Bacillus thuringiensis*. In A. y. Bravo (Ed.), *Bacillus thuringiensis en el control biológico*. (pp. 69-100). Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- Reséndiz García, B., & Castillo Olivas, O. (2018). BIOLOGÍA DEL ÁCARO DE DOS MANCHAS *Tetranychus urticae* Koch. (ACARI: TETRANYCHIDAE) EN LABORATORIO EN CHAPINGO, ESTADO DE MÉXICO. *ACAROLOGÍA Y ARACNOLOGÍA*, *5*, 40-45.
- Ruiu, L. (2015). Insect Pathogenic Bacteria in Integrated Pest Management. *MDPI Insects*, *6*, 352-367. doi:doi:10.3390/insects6020352
- Ruiz Díaz, Á. A., & Herrera, I. (2018). Comportamiento poblacional de *Tetranychus urticae* Koch. (Acari: Tetranychidae) en variedades de tomate. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*. doi:https://doi.org/10.29312/remexca.v9i5.1505
- Saati Santamaría, Z., Rivas, R., Kolařík, M., & García Fraile, P. (2021). A New Perspective of *Pseudomonas*—Host Interactions: Distribution and Potential Ecological Functions of the Genus *Pseudomonas* within the Bark Beetle Holobiont. *Biology*, *10*(2). doi:https://doi.org/10.3390/biology10020164
- Sarwar, M. (2015). The Killer Chemicals as Controller of Agriculture Insect Pests: The Conventional Insecticides. *International Journal of Chemical and Biomolecular Science*, *1*(3), 141–147.
- SENASA. (2017, January 26). *Controladores biológicos alternativa ecológica para el manejo integrado de plagas en cultivo de Quinoa*. Retrieved from

<https://www.senasa.gob.pe/senasacontigo/controladores-biologicos-alternativa-ecologica-para-el-manejo-integrado-de-plagas-en-cultivo-de-quinua/>

- Senasica. (2018). Actividad biológica de *Bacillus thuringiensis* en larvas y adultos de *Anastrepha fraterculus*. *Journal of Economic Entomology*.
- Sharma, L., Bohra, N., & Rajput, V. D. (2020). Advances in Entomopathogen Isolation: A Case of Bacteria. *MDPI Microorganisms*, 9(1), 5-7.
doi:<https://doi.org/10.3390/microorganisms9010016>
- Shea, K., Possingham, H. P., & Murdoch, W. W. (2002). Active Adaptive Management in Insect Pest and Weed Control : Intervention With a Plan for Learning. *Ecological Applications*, 12(3), 927–936.
- Silva, M. V. (2020, Enero). La capacidad de cultivo de flores de Ecuador suma USD 900 millones. (E. C. DATA, Ed.) *El Comercio*. Retrieved from <https://www.elcomercio.com/actualidad/venta-local-flores-negocios-economia.html>
- Torres Cabra, E., & Hernández Fernández, J. (2015, Junio). CONTROL BIOLÓGICO DE ÁCAROS PLAGA A TRAVÉS DE *Bacillus Thuringiensis*. *CONEXAGRO JDC*, 5(1), 58 - 73. Retrieved from 523-Texto del artículo-1622-1-10-20181126.pdf
- Valcárcel Calderón, F. (2013). El control biológico de plagas en la floricultura colombiana. In M. S. Ferdy Alfonso Alvarado, *Plagas de las flores* (pp. 233-246). Retrieved from http://www.socolen.org.co/images/stories/pdf/40_Congreso.pdf#page=244
- Vargas, R., Chapman, B., & Penman, D. R. (2001). Toxicidad de thuringiensin en estados inmaduros y adultos de *Tetranychus urticae* Koch and *Panonychus ulmi* (Koch) (Acarina: Tetranychidae). In *Agricultura Técnica* (Vol. 61, pp. 3-14). La Cruz, Chile. Retrieved from <http://www.bioline.org.br/request?at01001>
- Yang, F., & Lijuan, W. (2016). Complete genome sequence of *Pseudomonas azotoformans* S4, a potential biocontrol bacterium. *J Biotechnology*, 227, 25–26.
doi:10.1016/j.jbiotec.2016.04.020