

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA  
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

EVALUACIÓN DEL CONTROL BIOLÓGICO QUE  
EJERCE LA SIMBIOSIS DEL HONGO  
ENTOMOPATÓGENO (*Paecilomyces fumosoroseus*)  
JUNTO CON EL ORGANISMO QUITINOLÍTICO  
AISLADO A PARTIR DE CASCARILLA DE CAMARÓN  
SOBRE EL ÁCARO (*Tetranychus urticae*)  
FITOPATÓGENO DE ROSAS, MEDIANTE APLICACIÓN  
FOLIAR EN UN CULTIVO DE ROSAS A NIVEL DE  
INVERNADERO EN LA FINCA “FLORYCAMPO”,  
CAYAMBE- ECUADOR.

Previa a la obtención de Grado Académico o Título de:

**INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

**ELABORADO POR**

**JEANETH ELIZABETH CASTRO ARTEAGA**

**SANGOLQUÍ, 24 de Junio del 2010**

# **HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS**

**ELABORADO POR**

JEANETH ELIZABETH CASTRO ARTEAGA

**COORDINADOR DE LA CARRERA**

Ing. Rafael Vargas.

**SECRETARIO ACADÉMICO**

Dra. Vanessa Andrade

Sangolquí 24 de junio del 2010

## CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Srta. JEANETH ELIZABETH CASTRO ARTEAGA como requerimiento parcial a la obtención del título de INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

Sangolquí 24 de Junio del 2010

-----  
Dr. Karina Ponce

-----  
Ing. Pedro Romero

REVISADO POR

-----  
Dra. Patricia Jiménez

## **DEDICATORIA**

La presente tesis se la dedico a mi madre por ser mi apoyo incondicional, por hacer de mí una mejor persona a través de sus consejos, sonrisas e ideas inadvertidas, por su sabiduría, por tener siempre, la palabra precisa de aliento y sobre todo por su amor incondicional.

A mi hermano por ser un ejemplo de esfuerzo, perseverancia y valentía, porque siempre estuvo en el lugar y momento indicado cuando necesité de su apoyo en las variadas circunstancias de mi vida.

A mi familia por ser parte de mi vida, por haberme brindado su apoyo, cariño, ánimo, y compañía, por haber creído en mi, por formar parte de mis más gratos recuerdos, y por estar aquí conmigo compartiendo la alegría de culminar una etapa más de mi vida.

**Jeaneth Elizabeth Castro Arteaga**

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a Dios por ser el pilar que me ha sostenido en los momentos más difíciles de mi vida, por ser fuente de amor, fe, y esperanza.

A mis padres porque me han enseñado a luchar día tras día y seguir adelante rompiendo todas aquellas barreras que se presentan en el largo camino de la vida.

A mi tío Ángel porque sin importar la circunstancia, siempre me brindó su apoyo y consejo incondicional.

A mis hermanos por haber compartido secretos y aventuras que solo entre hermanos se pueden vivir, porque los tres han sido ejemplo de tenacidad, fortaleza e integridad.

A mis primos porque fueron, son y espero sean parte de los más emotivos recuerdos que evoca mi mente.

A mis tíos por haberme acogido en la mayor parte de mi carrera estudiantil, brindándome calidez humana y fraternidad.

A mis compañeros que a lo largo de mi carrera universitaria la mayoría de veces compartieron y vivieron las mismas tristezas, alegrías, emociones, angustias y aventuras que yo viví, pero sobre todo a Vero, Gabi, Fer, Rosita, y Marce porque más allá de ser compañeras de estudio fueron compañeras de vida, sonrisas, lágrimas, de ilusiones y de sueños.

A mis maestros que me impartieron el conocimiento necesario para llegar hoy hasta aquí, porque fueron mentores no solo académicos sino de valores, de actitud, de tenacidad y de vida.

A la Dra. Karina Ponce mi Directora y al Ing. Pedro Romero mi Codirector por brindarme sus conocimientos y apoyo necesario para lograr concluir con mi tesis.

A la MSc. Alma Koch por apoyarme con los laboratorios de microbiología de Biotecnología.

A la Blga..María Laban por proveerme la cepa de *Paecilomyces*.

Al Dr. Abraham Oleas por instruirme en sus conocimientos de fitopatología.

A los Ceviches de la Rumiñahui por colaborar con los desechos de camarón.

A la empresa Florycampo por permitirme realizar la parte experimental en sus instalaciones, y al mismo tiempo a los Ing. Juan Carlos Gonzales, Fabian Miranda, Wilmer Narváez y Diego Freire por apoyarme en las diferentes necesidades y dificultades que se presentaron en la realización de mi investigación.

Finalmente quiero agradecer a todas aquellas personas especiales por haber compartido en las diferentes etapas de esta travesía, pero sobre todo porque cada una de ellas han puesto su grano de arena para enseñarme que la vida es actitud, cero excusas y que basta un corazón dispuesto, que permanezca firme ante la marea alta, con la mirada fija en el último escalón que lleva hacia la victoria.

**Jeaneth Elizabeth Castro Arteaga**

## INDICE

### CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1	Formulación del problema.....	1
1.2	Justificación del problema.....	1
1.3	Objetivos de la investigación.....	3
1.3.1	Objetivo general.....	3
1.3.2	Objetivos específicos.....	3
1.4	Marco Teórico.....	3
1.4.1	Producción de flores.....	3
1.4.1.1	Producción de flores a nivel mundial.....	3
1.4.1.2	Producción de flores a nivel del Ecuador.....	4
1.4.1.3	Producción de flores orgánicas.....	5
1.4.2	Florycampo.....	5
1.4.3	Rosas.....	5
1.4.3.1	Principales plagas que afectan las rosas .....	6
1.4.3.1.1	Pulgones o áfidos.....	6
1.4.3.1.2	Araña roja.....	6
1.4.3.1.3	Trips.....	6
1.4.3.1.4	Nemátodos.....	6
1.4.3.2	Principales enfermedades que afectan las rosas.....	7
1.4.3.2.1	Mildiu vellosa o tizón.....	7
1.4.3.2.2	Oídio.....	7
1.4.3.2.3	Roya.....	7
1.4.3.2.4	Moho gris.....	7
1.4.3.2.5	Agallas o tumores.....	7
1.4.3.2.6	Mosaicos foliares.....	7
1.4.3.3	Manejo de rosas a nivel de invernadero.....	8
1.4.3.4	Manejo integrado de rosas.....	9
1.4.3.4.1	Método cultural.....	9
1.4.3.4.2	Método genético.....	9
1.4.3.4.3	Método etológico.....	9
1.4.4	Quitina.....	9
1.4.5	Quitosano.....	10



1.4.6	Artrópodos.....	10
1.4.7	Crustáceos.....	11
1.4.7.1	Camarón.....	12
1.4.7.2	Producción de camarón en el Ecuador .....	12
1.4.7.3	Desechos del camarón.....	12
1.4.8	Ácaros.....	13
1.4.8.1	Araña roja.....	16
1.4.8.2	Daños que causa.....	16
1.4.8.3	Control químico de <i>Tetranychus urticae</i> .....	17
1.4.8.4	Control biológico de <i>Tetranychus urticae</i> .....	18
1.4.9	Hongos.....	19
1.4.9.1	Hongos entomopatógenos.....	20
1.4.9.2	Hongos antagonistas.....	21
1.4.9.3	Hongos fitopatógenos.....	21
1.4.9.4	<i>Paecilomyces fumosoroseus</i> .....	22
1.4.9.5	Cría masiva de hongos.....	23
1.4.10	Organismos quitinolíticos.....	24
1.4.10.1	Enzimas quitinolíticas.....	26
1.4.11	Aislamiento de microorganismos.....	27
1.4.11.1	Técnicas de aislamiento.....	27
1.4.11.1.1	Aislamiento en placa por estrías .....	27
1.4.11.1.2	Aislamiento por dilución.....	27
1.4.12	Medios de cultivo.....	27
1.4.13	Principales enfermedades de las plantas y suelo agrícola.....	28
1.4.14	Control químico.....	29
1.4.14.1	Ventajas.....	30
1.4.14.2	Desventajas.....	30
1.4.15	Control biológico.....	31
1.4.15.1	Ventajas .....	32
1.4.16	Desventajas .....	33
1.4.17	Control biológico en el Ecuador.....	34
1.5	Sistema de hipótesis de la investigación.....	34
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS.....		35
2.1	Participantes.....	35

2.2 Zona de estudio.....	35
2.3 Período de investigación.....	36
2.4 Diseño Experimental.....	36
2.4.1 Variables.....	36
2.4.1.1 Eficacia de los microorganismos.....	36
2.4.1.2 La población total de ácaros.....	37
2.5 Procedimiento.....	37
2.5.1 Preparación de quitina coloidal.....	37
2.5.2 Recolección y tratamiento de muestras.....	37
2.5.3 Preparación de los medios de cultivo.....	37
2.5.3.1 Agar de quitina coloidal y extracto de camarón.....	37
2.5.3.2 Agar de quitina coloidal Yeast Nitrogen Base (Sigma).....	37
2.5.3.3 Agar de quitina coloidal formulado.....	38
2.5.4 Preparación del inóculo y siembra.....	38
2.5.5 Aislamiento de los microorganismos quitinolíticos.....	38
2.5.6 Crioconservación de cepas.....	39
2.5.7 Pruebas de fitopatogenicidad.....	39
2.5.8 Pruebas de antagonismo.....	40
2.5.9 Pruebas de actividad quitinolítica.....	40
2.5.10 Pruebas de control de ácaros a nivel de laboratorio.....	41
2.5.11 Escalado de los inóculos de cada cepa.....	42
2.5.12 Pruebas de fitotoxicidad.....	42
2.5.13 Pruebas de control biológico a nivel de invernadero.....	43
CAPÍTULO 3: RESULTADOS.....	44
3.1 Preparación de quitina coloidal.....	44
3.2 Preparación de los medios de cultivo.....	44
3.3 Preparación del inóculo y siembra.....	44
3.4 Aislamiento de los microorganismos quitinolíticos.....	44
3.5 Crioconservación de cepas.....	46
3.6 Pruebas de fitopatogenicidad.....	46
3.7 Pruebas de antagonismo.....	46
3.7.1 Adaptación de medios de cultivo.....	46
3.7.2 <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> frente a la cepa B7.....	47
3.7.3 <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> frente a la cepa B8.....	47

3.7.4	<i>Paecilomyces fumosoroseus</i> frente a la cepa A2.....	47
3.8	Pruebas de actividad quitinolítica.....	48
3.9	Pruebas de control de ácaros a nivel de laboratorio.....	48
3.10	Escalado de los inóculos de cada cepa.....	49
3.11	Pruebas de fitotoxicidad.....	49
3.12	Pruebas de control biológico a nivel de invernadero.....	50
3.12.1	Eficacia de los microorganismos.....	50
3.12.2	Población total de ácaros.....	51
CAPÍTULO 4:	DISCUSIÓN.....	52
4.1	Preparación de quitina coloidal.....	52
4.2	Recolección y tratamiento de muestras.....	52
4.3	Preparación de los medios de cultivo.....	52
4.4	Aislamiento de los microorganismos quitinolíticos.....	54
4.5	Crioconservación de cepas.....	57
4.6	Pruebas de fitopatogenicidad.....	58
4.7	Pruebas de antagonismo.....	59
4.8	Pruebas de actividad quitinolítica.....	59
4.8.1	Curva de estandarización de N- acetilglucosamina.....	59
4.8.2	Determinación de azúcares reductores.....	60
4.9	Pruebas de control de ácaros a nivel de laboratorio.....	61
4.10	Escalado de las cepas.....	63
4.11	Pruebas de fitotoxicidad.....	63
4.12	Pruebas de control biológico a nivel de invernadero.....	64
4.12.1	Eficacia del control evaluada a los 3 días de la aplicación.....	64
4.12.2	Control de la población de una generación de ácaros.....	66
CAPÍTULO 5:	CONCLUSIONES.....	68
CAPÍTULO 6:	RECOMENDACIONES.....	70
CAPÍTULO 7:	BIBLIOGRAFÍA.....	72
ANEXOS.....		87

## LISTADO DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Pag.</b>
2.1. Tratamientos utilizados en la aplicación en invernaderos.....	36
2. 2. Tratamientos aplicados en las pruebas de fitotoxicidad.....	43
2.3. Indicadores de grados de toxicidad.....	43
3.2. Microorganismos obtenidos en la segunda siembra realizada para el aislamiento.....	46
3.3. Porcentajes de crecimiento de las 10 cepas en los tres medios de cultivo.....	46
3.4. Resultados de la tinción gram de las cepas aisladas.....	46
3.5. Descripción de las cepas con sus respectivos pH y medios de cultivo óptimos.....	47
3.12. Porcentaje de ácaros muertos a los 11 días de la aplicación de los tratamientos.....	50
3. 13. Concentraciones de las tres cepas aisladas en el escalado.....	50
3.14. Grado de fitotoxicidad de los 12 tratamientos frente a las plantas de rosas...	51
3.15. Porcentaje de la eficacia de los tratamientos evaluados con la prueba de Tukey al tercer día.....	51
3.16. ANOVA del porcentaje de eficacia, evaluada al tercer día, tomando en cuenta el nivel de folíolos, y los tratamientos.....	52
3.17. Porcentaje de la efectividad de los tratamientos evaluados con la prueba de Tukey al onceavo día.....	52
3.18. ANOVA del porcentaje de eficacia evaluada al onceavo día, tomando en cuenta la el nivel de folíolos, y los tratamientos.....	52
4.1. Descripción de los microorganismos que crecieron en los diferentes medios de cultivo (+) y microorganismos que no crecieron (-).....	54
4.2. Características de los microorganismos quitinolíticos aislados.....	55
4.3. Descripción microscópica de las 6 cepas seleccionadas.....	56
4.4. ANOVA de un factor para el nivel de foliolo.....	65
4.5. ANOVA de un factor para bloques .....	66
4.6. ANOVA de un factor para tratamientos.....	66

## LISTADO DE CUADROS

<b>Cuadro</b>		<b>Pag.</b>
1	Clasificación de la clase artrópoda .....	11

## LISTADO DE FIGURAS

Fig.		Pag.
1.1	Modelo de la degradación enzimática de la quitina hasta N-acetil glucosaina-D- glucosamina.....	25
1.2:	Proceso de degradación de la quitina por los microorganismos.....	26
3.1.	Quitina coloidal obtenida de las escamas de cangrejo con base en HCl.....	45
3.2.	Halos de inhibición de la cepa B7 frente a <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> , el halo superior mide 0,3 cm, y el inferior 0,5cm de diámetro.....	48
3.3	B8 frente a discos de <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> .....	48
3.4.	Cepa A2 frente a discos de <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> .....	48
3.5	Curva patrón de N- acetilglucosamina.....	49
3.6	Valores de N- acetilglucosamina en los 36 días de fermentación de las tres cepas quitinolíticas aisladas.....	49
4.1.	Características macroscópicas de la cepa B8 .....	58
4.2.	Valores de N- acetilglucosamina en los 36 días de fermentación de las tres cepas quitinolíticas aisladas.....	61
4.3	Rendimiento calculado en función de los ácaros muertos por cada tratamiento evaluado a nivel de laboratorio.....	63
4.4.	Medias marginales estimadas del porcentaje de eficacia de los tratamientos evaluado al tercer día, en comparación con el foliolo inferior y superior.....	67
4.5	Medias marginales estimadas del porcentaje de eficacia de los tratamientos evaluado al onceavo día, en comparación con el foliolo inferior y superior.....	68
4.6	Porcentaje de eficacia evaluado en los 11 días de seguimiento después de la aplicación de los tratamientos.....	68

## LISTADO DE ANEXOS

<b>Anexos</b>	<b>Pag.</b>
A	Número y combinaciones de tratamientos usados en el ensayo a nivel de laboratorio.....87
B	Ensayos con los cuales se partió para el aislamiento..... 88
C	Resultados de las hojas inoculadas con las 4 tipos de cepas aisladas disueltas en dos tipos de bases.....89
D	Resultados de los botones inoculados con las 4 tipos aisladas disueltas en dos tipos de bases .....90
E	Resultados de los tallos inoculados con las 4 tipos de cepas aisladas disueltas en dos tipos de bases .....90
F	Resultados de las raíces inoculados con las 4 tipos de cepas aisladas disueltas en dos tipos de bases .....91
G	Resultados de la adaptación de las cepas quitinolíticas A3, A2, B8, B7 y de <i>P. fumosoroseus</i> a 6 diferentes medios de cultivo.....91
H	Mediciones de la curva de estandarización de N-acetilglucosamina.....91
I	Porcentaje en cada tratamiento de ácaros vivos, muertos y perdidos en las pruebas de control de ácaros a nivel de laboratorio.....92
J	Valores de absorbancia (540nm) de las tres cepas en los 36 días de fermentación.....92
K	Formulación de Yeast Nitrogen Base .....93
L	Formulación de Brain Heart Infusion .....93
M	Porcentaje de eficiencia de los 8 tratamientos aplicados evaluados a las 48 hojas en la parte alta de la planta.....94
N	Porcentaje de eficiencia de los 8 tratamientos aplicados evaluados a las 48 horas en la parte alta de la planta.....94
O	Estadísticos descriptivos de la eficacia de los tratamientos evaluados al tercer día.....95
P	Estadísticos descriptivos de la eficacia de los tratamientos evaluados al onceavo día.....96
Q	ANOVA de un factor para el nivel de foliolo..... 97

R	ANOVA de un factor para bloques.....	97
S	ANOVA de un factor para tratamientos.....	97
T	Porcentaje de la efectividad de los tratamientos evaluados.....	98
	con la prueba de Tukey al tercer día.	
U	Porcentaje de la efectividad de los tratamientos evaluados	
	con la prueba de Tukey al onceavo día.....	98
V	Nomenclatura utilizada en las tablas de ANOVA.....	98



## RESUMEN

Las características que posee la rosa producida en el Ecuador han convertido a este país en el tercer exportador de flores a nivel mundial. Este sector genera más de 70,000 plazas de trabajo convirtiéndose en uno de los pilares fundamentales para la economía del país. Una de las principales limitantes para el desarrollo de esta industria, son las enfermedades y plagas que reducen la producción. En los últimos años, los ácaros se han constituido en una de las plagas más difíciles de controlar, debido a que su exoesqueleto está compuesto por quitina, la cual le sirve como escudo frente a los acaricidas; además estos organismos adquieren rápidamente resistencia a los productos químicos aplicados. Por estas razones las soluciones químicas empleadas para controlar esta plaga han resultado poco efectivas, no duraderas, costosas y contaminantes para el medio ambiente, por lo que es necesario una alternativa diferente como lo es el control biológico orientado a la eliminación del esqueleto externo formado por quitina, polisacárido que forma parte del exoesqueleto de los artrópodos, como crustáceos y arácnidos. Para ello se aisló a partir de cascarilla de camarón tres microorganismos quitinolíticos, los cuales se combinaron con el hongo entomopatógeno *Paecilomyces fumosoroseus*. Estas combinaciones se probaron primero a nivel de laboratorio y posteriormente en invernadero usando un Diseño de Bloques Completamente al Azar (DBCA) con cuatro repeticiones. Los resultados se analizaron con el programa estadístico SPSS, con tablas de ANOVA y pruebas de Tukey, observándose que todos los tratamientos fueron estadísticamente significativos frente al testigo. El tratamiento formado por la cepa B8 (*Actinomycetes*) junto con *P. fumosoroseus*, controló a *Tetranychus urticae* en un 76,4% a nivel de laboratorio y 41,2% a nivel de invernadero. Se recomienda que esta combinación de microorganismos sea elaborada a nivel comercial para que se convierta en una alternativa real en el control de esta plaga.

## ABSTRACT

The Ecuadorian flower's characteristics have transformed the country in its' third world exporter. This industry embraces more than 70,000 workers, becoming a fundamental item in Ecuadorian economy. Between the main obstacles for this industry's development are the diseases and insect plagues, that reduces the production. In last years, mites have been constituted in one of the more difficult plagues to control, because his mite's skin is compound by chitin, which serves it as a shield in front of the pesticides. These organisms also acquire quickly resistance to the chemical control, becoming ineffective the chemical solutions used to control this plague and not permanent, expensive and environmental polluted. For this reason it's necessary to develop an alternative, as the Biological Control, oriented to eliminate the mite's skeleton chitin, shield a polysaccharide a present in of arthropods as crustaceans and arachnids. In order to make this possible three stumps degrades chitin were isolated from shrimp's skins and were mixed with *Paecilomyces fumosoroseus* pathogenic fungus. These combinations were first tested in laboratory and lately in green houses using and RCBD with four repetitions in comparison with the control treatment. The results were analyzed in SPSS software, ANOVA charts and Tukey tests. All the treatments were statistically representative. The treatment formed by the B8 stump (*Actinomyce*) with *P. fumosoroseus* controlled *Tetranychus urticae* in 76, 4 % in laboratory and 41,2% in green houses. This microorganism combination should be elaborated at commercial level in order to become as a real alternative in mite's control.

## CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

### 1.6 Formulación del problema:

*Tetranychus urticae*, es una plaga a nivel nacional que afecta a cultivos hortícolas, frutales y florícolas, entre los más representativos. Es un problema muy difícil de controlar debido a que su caparazón está compuesto por quitina, la cual le sirve como protección frente a los acaricidas aplicados, impidiendo que el químico penetre en el ácaro y pueda matarlo. Además la “araña roja” como es conocido, adquiere rápidamente resistencia a los diferentes productos utilizados para su control, por lo que las soluciones químicas evaluadas resultan ser no duraderas, costosas, y amenazan a la productividad de los suelos.

### 1.7 Justificación del problema:

El Ecuador es el tercer exportador de rosas a nivel mundial, gracias a las características de la flor ecuatoriana: mayor tamaño de tallo, mejor follaje y color más intenso en los botones, que permiten proporcionar una alta calidad de flor, logrando ventas superiores a \$500 millones anuales (Cadena, 2008).

Las rosas constituyen el 73% de las exportaciones florícolas ecuatorianas (Banco Central del Ecuador, 2006), siendo su principal mercado EEUU, Rusia y Holanda. Este sector emplea más de 70 mil plazas de trabajo y el ingreso per cápita de los cantones florícolas es el 50% superior al del promedio nacional, lo que demuestra que la producción de flores en el Ecuador es una fuente de trabajo para un buen porcentaje de la población (Cadena, 2008). Sin embargo este tipo de cultivo se ve afectado por virus, bacterias, hongos y plagas como trips, y ácaros que en conjunto causan grandes pérdidas en la producción, representando un gasto a nivel económico.

A través del tiempo, los ácaros se han convertido en una plaga muy difícil de controlar, primero porque se encuentran en su mayor parte en el envés de la hoja, siendo difícil que el control llegue hasta allí; segundo porque están recubiertos por un exoesqueleto o caparazón compuesto por una capa de quitina, que es su protección frente a químicos y tercero porque adquieren rápida resistencia a los mismos, la cual se transfiere de generación en generación (Villalba, 2006).

En los diferentes cultivos comerciales los ácaros ocasionan anualmente pérdidas económicas del 18 al 20%. Con el afán de controlar esta plaga, en rosas se invierten 20 mil dólares mensualmente y se han venido aplicando a través de los años químicos como floramite, hexmite, dicarsol, sinosine, kanemite entre otros (INIAP, 2005), los cuales son nocivos para el suelo porque lo deterioran, tornándolo no apto para la producción; además contaminan las aguas subterráneas por infiltración, el aire y el entorno en general.

Tomando en cuenta los inconvenientes y pérdidas tanto en lo económico, como en la producción que han generado los tratamientos químicos aplicados, estos resultan poco efectivos y no duraderos. Frente a este problema, se necesitan alternativas, como el control biológico, orientado específicamente a ácaros, tomando en cuenta que están recubiertos por una capa de quitina en su caparazón, la cual le sirve como escudo frente a los controles aplicados, por lo que es necesario romper esta pared protectora por medio de organismos que tengan la característica de degradar la quitina (organismos quitinolíticos). Una vez eliminada la protección del ácaro, se complementa el control con un organismo capaz de matar a *Tetranychus urticae* como *Paecilomyces fumosoroseus*, el mismo que puede colonizarlo interiormente debido a su capacidad entomopatógena (Hipólito, 2008).

El control biológico hoy en día es una alternativa frente a los problemas fitosanitarios que enfrentan las diferentes áreas de producción agrícola y al mismo tiempo contribuye al no deterioro del medio ambiente que actualmente está muy afectado por causa del uso excesivo de agroquímicos y pesticidas. En el Ecuador apenas se está incursionando en el biocontrol, siendo de suma importancia desarrollar esta vía alterna, por las ventajas que acarrea: amigable con el medio ambiente, efectividad en su aplicación y ahorro económico (Hielén, 2007).

Específicamente el biocontrol de ácaros en nuestro país se ha probado en banano, babaco, tomate y en rosas, en las mismas que se ha logrado una reducción en la población de la plaga, usando ácaros benéficos; pero cabe recalcar que es interesante variar los organismos utilizados probando bacterias y hongos quitinolíticos para lograr analizar los resultados de la confrontación entre el arácnido y los microorganismos (Jara & Montesdioca, 2007).

## 1.8 Objetivos de la investigación:

### 1.8.1 Objetivo general

Evaluar el control biológico que ejerce la simbiosis del hongo entomopatógeno (*Paecilomyces fumosoroseus*) junto con el organismo quitinolítico aislado a partir de

cascarilla de camarón sobre el ácaro (*Tetranychus urticae*) fitopatógeno de rosas, mediante aplicación foliar en un cultivo de rosas a nivel de invernadero en la finca “FLORYCAMPO”, Cayambe- Ecuador.

### 1.8.2 Objetivos específicos

1.8.2.1 Aislar microorganismos quitinolíticos a partir de la cascarilla de camarón, en medios a base de quitina coloidal.

1.8.2.2 Realizar pruebas de fitopatogenicidad de los microorganismos quitinolíticos aislados frente a plantas de rosas a nivel de laboratorio.

1.8.2.3 Evaluar los posibles efectos de antagonismos que los organismos quitinolíticos pueden tener contra *P. fumosoroseus*.

1.8.2.4 Cuantificar el grado de actividad quitinolítica que tienen los organismos aislados.

1.8.2.5 Analizar el grado de control de los organismos quitinolíticos y *P. fumosoroseus* sobre las poblaciones de *Tetranychus urticae*, a nivel de laboratorio.

1.8.2.6 Valuar el grado de control que generen los organismos quitinolíticos y *P. fumosoroseus* sobre *Tetranychus urticae*, al ser aplicados en plantas de rosas infestadas a nivel de invernadero.

## 1.9 Marco Teórico:

### 1.9.1 Producción de flores

#### 1.9.1.1 Producción de flores a nivel mundial

El cultivo de flores se extiende a nivel de todo el mundo, ocupando una superficie de 190,000 ha; estadísticamente están involucrados 145 países, entre los más importantes como importadores están: EEUU, Reino Unido, Francia, Holanda, Japón, Italia, Suiza, Bélgica, Brasil, China, Países Bajos, Tailandia, México, Colombia, Costa Rica y Austria; como exportadores están: Holanda, Colombia, Ecuador, Kenia, Israel, España, Italia y Zimbabue (Braanker & Strijbosch, 2008).

El flujo de comercialización involucra cultivos de plantas con flores de corte, plantas ornamentales, follaje de corte y bulbos de flor destinadas a la decoración, siendo las principales flores de corte: rosas, claveles, orquídeas, gladiolos y crisantemos, que compiten en color y perfume. La rosa se desarrolla mejor en zonas templadas; el clavel crece

normalmente en invernaderos favorecido por su variedad de colores y aromas; las orquídeas poseen flores grandes y vistosas, procedentes de zonas tropicales; el gladiolo es símbolo de la victoria, se caracteriza por su inflorescencia en espiga, que se forma entre las 4 y 6 semanas después de plantado; el crisantemo símbolo de una vida larga, es una de las más cultivadas en todo el mundo (Ayudaproyecto, 2007).

En Holanda cada día se venden 19 millones de flores cortadas y 2 millones de plantas de macetas en menos de 5 horas; este es el principal productor, exportador y controlador de las tecnologías genéticas y del comercio mundial, tanto en flores de corte como de bulbos de flor (Estrada, 2010). Actualmente, el 20% de las flores y plantas que se subastan en Ámsterdam proviene del exterior, ya que los crecientes gastos de energía y costos salariales en Holanda, convierten al extranjero en un lugar de producción cada vez más atractivo (Braanker & Strijbosch, 2008).

#### 1.9.1.2 Producción de flores a nivel del Ecuador

De las 22 provincias existentes en nuestro país, las principales zonas productoras se encuentran en Pichincha y Cotopaxi; le siguen en importancia Azuay, Imbabura y Guayas; finalmente se incluyen Tungurahua, Carchi, Cañar y Chimborazo. En el país hay aproximadamente 4,729 ha dedicadas al cultivo de flores, de las cuales el 73,6% corresponde a cultivos permanentes y el resto (26,4%) a transitorios; el 59,6% se cultiva bajo invernadero y el 40,4% en campo abierto. Ecuador tiene una gran diversidad de especies de flores, pero la más significativa es la rosa de carácter permanente, que cubre el 53,3% de la superficie sembrada, le sigue la *Gypsophila spp.* flor transitoria que abarca el 13,7% (Araujo, 2001).

El Ecuador está ubicado geográficamente en la línea ecuatorial donde la luminosidad es de 10 a 12 horas al día y la altitud promedio donde se cultivan es de 2,800 m.s.n.m gracias a estos parámetros se logra una flor de alta calidad, por lo que actualmente es el tercer exportador de rosas a nivel mundial (Cadena, 2008).

#### 1.9.1.3 Producción de flores orgánicas

El creciente interés del mercado mundial y la presión de grupos ecologistas Europeos por “flores limpias”, limitan el uso de agroquímicos, especialmente plaguicidas; esto ha provocado que muchos floricultores, se orienten en la búsqueda de tecnologías de producción no contaminantes y en lo posible, no químicas, que lleven a establecer una estrategia válida

para propiciar una producción florícola de alta calidad y rentabilidad, utilizando tecnologías amigables con el ambiente (Suquilanda, 2001).

El mercado de flores cultivadas biológicamente ha crecido desde el año 2003 en un 52%, según datos de la Organic Trade Association (OTA), el importe de las ventas de flores en los EE.UU. asciende en total a 16,000 millones de dólares; sin embargo, se ve influenciado cada vez más por el cultivo sostenible de flores; a pesar de esto en países como España, Francia y Brasil, existe un alto consumo de flores orgánicas y una buena cantidad de viveros orgánicos dedicados a producirlas, mientras que en algunos países latinoamericanos como México apenas se está incursionando con la producción de flores orgánicas (Morán, 2004).

### 1.9.2 Florycampo

Esta empresa es una Unidad de Negocio productora de rosas y flores de verano perteneciente a Hilsea Investment LTD, ubicada en la vía Otavalo, Panamericana Norte Km 2.5. Tiene 32 ha de producción florícola con 9 variedades de flores de verano y 15 variedades de rosas. Dentro de los sistemas de manejo de esta finca se ha implementado el uso de bioles, compost, bocashi, ácaros benéficos (*Amblyseilus californicus*), hongos antagonistas y entomopatógenos (*Trichoderma spp.*, *Paecilomyces lilacinus*, *Verticillium lecanii* y *Gliocladium virens*), con el fin de mejorar el rendimiento en la producción y al mismo tiempo utilizar tecnologías amigables con el medio ambiente.

### 1.9.3 Rosas

Son un género de arbustos espinosos y floridos, representante principal de la familia de las rosáceas. Existen alrededor de 100 especies de rosales silvestres originarios de zonas templadas, la mayoría cultivadas como ornamentales por su flor (la rosa); pero también se las usa para la extracción de aceites esenciales (perfumería y cosmética), usos medicinales (fitoterapia) y gastronómicos (Asturnatura, 2010).

Esta flor, se caracteriza por su alto nivel de inversión y producción, con una vida útil de 6 a 7 años; sus variedades dependen del color, matización, tamaño de botón, largo y grosor de tallo, ausencia o presencia de espinas, tamaño de hoja entre lo más resaltante y dependiendo de los parámetros que establezcan los diferentes mercados, los productores se adaptan a estos establecimientos logrando calidad y volumen requerido (IFFIVE, 2001).

### 1.9.3.1 Principales plagas que afectan las rosas

1.9.3.1.1 Pulgones o áfidos (*Macrosiphum rosae*), son insectos pequeños en forma de pera, que miden alrededor de 3 mm de longitud; de color verdoso y atacan a los vástagos, hojas jóvenes o a las yemas florales. Estos insectos chupan la savia de las plantas y secretan una sustancia dulce y pegajosa llamada melaza, la cual con frecuencia se torna negra al infectarse con fumagina o negrilla, empeorando notablemente el aspecto de las rosas (Fava & Trumper, 2004).

1.9.3.1.2 Araña roja (*Tetranychus urticae*). Es la plaga más grave en el cultivo del rosal, ya que la infestación se produce muy rápidamente y puede producir daños considerables antes de que se reconozca. Los ácaros chupan la savia de la planta a través de las hojas y se desarrollan principalmente cuando las temperaturas son elevadas y la humedad ambiental es baja. Inicialmente las plantas afectadas presentan un punteado o manchas finas blanco-amarillentas en las hojas, posteriormente aparecen telarañas en el envés y finalmente se produce la caída de las hojas (Rosas, 2003).

1.9.3.1.3 Trips (*Frankliniella occidentalis*). Estos insectos se introducen en los botones florales cerrados y se desarrollan entre los pétalos y en los ápices de los vástagos, lo que da lugar a deformaciones en las flores que además muestran manchas generalmente de color blanco debido a daños en el tejido. Por la alimentación de los trips, las hojas se van curvando y a menudo las yemas no pueden abrirse completamente (Cabello, 1991).

1.9.3.1.4 Nemátodos (*Meloidogyne spp*, *Pratylenchus*, *Xiphinema*). Son pequeños gusanos microscópicos que se alimentan de las raíces, atacan la parte subterránea provocando frecuentemente agallas, que posteriormente se pudren; los síntomas se pueden confundir con otras deficiencias como sequía y carencia de hierro (Moreno, 2007).

### 1.9.3.2 Principales enfermedades que afectan las rosas

1.9.3.2.1 Mildiu vellosa o tizón (*Peronospora sparsa*). Provoca una rápida defoliación; si no se actúa a tiempo, puede resultar muy difícil recuperar la planta; éste se desarrolla favorablemente bajo condiciones de elevada humedad y temperatura, dando lugar a la aparición de manchas irregulares de color marrón o púrpura sobre el haz de las hojas, pecíolos y tallos, en las zonas de crecimiento activo, en el envés de las hojas pueden verse los cuerpos fructíferos del hongo, en forma de pequeñas áreas grisáceas (Schuster, 2008).



1.9.3.2.2 Oídio (*Sphaerotheca pannosa*). Los síntomas son manchas blancas y pulverulentas; se manifiestan sobre tejidos tiernos como: brotes, hojas, botón floral y base de las espinas, las hojas también se deforman apareciendo retorcidas o curvadas (Schuster, 2008).

1.9.3.2.3 Roya (*Phragmidium disciflorum*). Se caracteriza por la aparición de pústulas de color naranja en el envés de las hojas, suele aparecer en zonas donde se acumula la humedad.

1.9.3.2.4 Moho gris (*Botrytis cinerea*). Su desarrollo se ve favorecido por las bajas temperaturas y elevada humedad relativa, dando lugar a la aparición de un crecimiento fúngico gris sobre cualquier zona de crecimiento; asimismo hay que cuidar las posibles heridas originadas en las operaciones de poda, ya que son fácilmente conquistadas por el patógeno (Schuster, 2008).

1.9.3.2.5 Agallas (*Agrobacterium tumefaciens*). Las agallas o tumores se forman en el tallo hasta una altura de 50 cm sobre el suelo o en las raíces, penetrando por las heridas cuando la planta se desarrolla sobre suelo infectado (Schuster, 2008).

1.9.3.2.6 Mosaicos foliares. Esta denominación agrupa a diversas manifestaciones virales que afectan al follaje del rosal; el síntoma más común consiste en líneas cloróticas discontinuas en zig-zag generalmente dispuestas asimétricamente con relación al nervio medio. Las alteraciones cromáticas pueden venir acompañadas de crispamientos y deformaciones del limbo (Schuster, 2008).

### 1.9.3.3 Manejo de rosas a nivel de invernadero

El manejo de la rosa comienza por su multiplicación o propagación que se lleva a cabo por semillas, estacas, injertos de vareta e injertos de yema.

El cultivo de la rosa bajo invernadero permite producir flor en épocas y lugares en los que de otra forma no sería posible; para ello los invernaderos deben cumplir ciertas condiciones como la transmisión de luz, altura, ventilación y calefacción (Aguanao et al., 2006).

Para este cultivo el suelo debe ser analizado y desinfectado previamente, tener un tratamiento de fertilización, drenado y aireado para evitar encharcamientos. Las rosas toleran

un suelo ácido, aunque el pH debe mantenerse en torno a 6, no toleran elevados niveles de calcio ya que si se expone a esto desarrolla rápidamente clorosis debido al exceso de este elemento, tampoco soportan elevados niveles de sales solubles, recomendándose no superar el 0,15 % (Aguanao *et al.*, 2006).

**Iluminación:** Influye directamente en el crecimiento: con demasiada luz se produce una evaporación reducida y una cosecha menos activa, el control de este factor tiene como inconveniente el costo (Preesman, 2006).

**Temperatura:** Las temperaturas óptimas de crecimiento son de 17 °C a 25 °C, con una mínima de 15 °C durante la noche y una máxima de 28 °C durante el día, pueden mantenerse valores ligeramente inferiores o superiores en períodos relativamente cortos sin que se produzcan serios daños (Preesman, 2006).

**Agua:** Es el componente del 90% de la planta; este líquido está involucrado en el transporte de nutrientes y azúcares, además se sabe que permanece erguida por la regulación de la presión del agua por el sistema de osmosis; los estomas controlan la evaporación del agua, cuando el suministro es deficiente se cierran los estomas, no hay intercambio de gas y no se producen azúcares (no hay energía), por lo que es necesario mantener un equilibrio entre su captación y evaporación (Preesman, 2006).

**Sustrato:** Debe tener equilibrio entre agua y aire (capacidad de campo), buen sistema de lixiviación, pH neutro (6 el más óptimo), estructura estable, y una buena cantidad de materia orgánica (Preesman, 2006).

1.9.3.4 Manejo integrado de rosas: De acuerdo a la Normativa Ecuatoriana para el Manejo de Agricultura Orgánica se deben considerar los siguientes aspectos:

1.9.3.4.1 Creación de condiciones que favorezcan el desarrollo de un equilibrio ecológico, donde el combate de los enemigos naturales de los parásitos pueda funcionar.

1.9.3.4.2 Método cultural: Mejoramiento de la composición biótica y abiótica del suelo, con siembra de cultivos asociados, programación de rotación de cultivos, implementación de prácticas culturales que favorezcan controles recíprocos en las poblaciones de insectos nocivos para el cultivo.

1.9.3.4.3 Método genético: Selección de especies y variedades adecuadas.

1.9.3.4.4 Método etológico: Uso de trampas para el combate de insectos, y siembra de cultivos como repelentes. (MAG, 2007).

#### 1.9.4 Quitina

Es un polímero ( $C_8H_{13}O_5N$ ), de gran tamaño constituido esencialmente de azúcares (polisacárido) y oxígeno; sus moléculas son fibrosas, logran un material de gran resistencia química y mecánica, formado por unidades de 2-acetamido-2-desoxiglucosa enlazadas al modo 1,4-beta-glucosídico, sus moléculas adquieren formas rígidas o extendidas generando una disposición en forma de zig zag entre los puentes de oxígeno, los arreglos son altamente cristalino cuando las moléculas están fuertemente empaquetadas, y son amorfas cuando el empaquetamiento es menos fuerte, de acuerdo a este tipo de estructura cristalina adquiere naturalmente tres formas: alfa, beta y gamma, las cuales tienen cada una propiedades y funciones distintas (Ávila, 2006).

La forma alfa es la más abundante, sus cadenas son anti paralelas, cada una dispuesta en sentido contrario de la otra como en la estructura del ADN, tiene la característica de ser más rígida por lo que adquiere la función de soporte; la forma beta tiene las cadenas paralelas y la forma gama presenta por cada cadena dispuesta en una dirección, dos que se orientan en sentido contrario; estas dos formas son capaces de hidratarse desarrollando propiedades mecánicas semejantes a la del cartílago, las cadenas de quitina que tienen más de seis y siete monómeros son insolubles, cumplen con funciones de protección en animales inferiores y hongos (Sastoque, 2005).

**Aplicaciones:** Debido a sus características químicas, la quitina es capaz de sustituir materiales plásticos con la ventaja de ser biodegradable y por consiguiente no contamina el medio ambiente. Otro campo de aplicación es en la cosmetología por sus propiedades emulsificantes con un riesgo de alergia nulo. En la industria alimentaria se utiliza como fuente de fibra natural, en la dieta para absorber grasas, fijar pigmentos artificiales y evitar absorción en el intestino como emulsificantes. (Gonzales, 2006).

#### 1.9.5 Quitosano

Es un polímero marino derivado de la quitina, su fórmula es beta (1-4) -2 -amino-2 desoxi-D-glucosa, su producción es generalmente por desacetilación alcalina de la quitina a altas temperaturas. Debido a la presencia de grupos aminos, su cadena polimérica tiene la capacidad de protonarse y ser soluble en medio ácido, siendo así más reactivo, pero este compuesto es inocuo para la salud humana (Soro, 2007).

**Aplicaciones:** Se utiliza como película para purificar el agua por medio de ósmosis revertida, se ha sugerido su uso para proteger los alimentos ya que soporta altas temperaturas y al mismo tiempo es comestible. También sirve para concentrar material proteico que está presente en los líquidos de desechos de diversas industrias, lo cual es una doble ventaja ya que el material concentrado se puede utilizar como aditivo en la alimentación animal y el líquido purificado puede verterse al medio ambiente debido a sus propiedades floculantes. Este es un polisacárido catiónico que puede unirse electrostáticamente a moléculas de carga negativa como los lípidos, no es atacado por los jugos gástricos y como no es digerible es eliminado directamente por las heces, razón por la cual es usado en el ámbito de la salud para perder peso (Soro, 2007).

#### 1.9.6 Artrópodos

Su nombre proviene del griego *artros* = articulaciones y *podas* = pies; comprenden las dos terceras partes del total de especies animales descritas.

Su cuerpo está formado por metámeros o segmentos sucesivos separados por surcos donde la quitina es más blanda para permitirles moverse.

Los apéndices cefálicos, como antenas, mandíbulas, maxilas están adaptados para el soporte de órganos sensoriales y de aprehensión de alimentos; los apéndices abdominales son variables, rudimentarios, albergan los órganos sexuales. Las patas son apéndices torácicos locomotores, tienen sus artejos dispuestos en cuatro niveles sucesivos que reciben los nombres por analogía a los vertebrados de: cadera, muslo (formado por un artejo grande el fémur y otro pequeño el trocánter), pierna o tibia y pie.

La quitina constituyente del exoesqueleto impide su crecimiento, por lo que experimenta periódicamente el cambio completo de su cobertura externa, lo que se conoce como muda o ecdisis (Carrero & Planes, 2008).

Cuadro1: Clasificación de la clase artrópoda (Carrero & Planes, 2008).

<i>Phylum: Artopoda</i>		
	Subtipo	Clase
Queliceratos	Sin antenas	Arácnidos
Branquiceratos	2 pares de antenas	Crustáceos
Traqueados	1 par de antenas	Miriápodos Insectos (hexápodos)

### 1.9.7 Crustáceos

#### 1.9.7.1 Camarón

*Palaemon serratus*, del orden de los decápodos, está recubierto desde la cabeza hasta el abdomen por un esqueleto externo (exoesqueleto o carapacho), el cual cambia periódicamente conforme el animal crece, su exoesqueleto es grisáceo transparente y tiene la característica de engrosar más que en los demás crustáceos. Viven tanto en aguas dulces como saladas, así como en regiones templadas, tropicales, frías y gélidas; habita en aguas poco profundas, donde se alimenta de plantas y pequeños animales, ciertas especies viven en aguas abiertas, a veces a profundidades de hasta 5 kilómetros.

Los camarones tienen diversas formas y colores, verdes o castaños, algunos llegan a medir 23cm de largo, tienen la capacidad de nadar hacia delante por sus filamentos abdominales y hacia atrás por su cola en forma de abanico (Pedramol, 2006).

#### 1.9.7.2 Producción de camarón en el Ecuador

La industria camaronera después de superar la crisis de la mancha blanca, ha aportado de manera importante a la economía del país, manteniendo su crecimiento y conservando su prestigio y calidad en mercados internacionales como los Estados Unidos, Europa, Latinoamérica, Asia y África, aún cuando tiene a su mayor competidor en China. La calidad del camarón ecuatoriano está relacionado con las condiciones climáticas de nuestro país, ya que Ecuador es uno de los pocos países del mundo donde el número de cosechas varía desde 2.5 a 2.8 al año, además el estricto control en estándares de seguridad ha logrado que este sector brinde suficiente confianza a los compradores y consumidores extranjeros (Castro, 2007).

#### 1.9.7.3 Desechos del camarón

En el procesamiento de organismos marinos como peces y crustáceos se generan grandes cantidades de cabezas, colas, entrañas y órganos internos los cuales antes del procesamiento representan hasta un 60% del organismo marino; este residuo está formado aproximadamente por un 45% de proteínas, 35% de minerales, 15% de quitina y 5% de pigmentos y grasas, tienen una elevada demanda biológica de oxígeno (DBO) que puede descomponerse rápidamente si no se manejan de manera adecuada, generando problemas ecológico y de salud debido a los fuertes olores producto de su putrefacción, por lo que es esencial tomar en cuenta un almacenamiento adecuado y el tiempo que transcurrirá entre la producción y eliminación definitiva de estos (Sastoque, 2005).

La práctica común de desechar estos residuos en el mar, es un peligro al sobrecargar el ecosistema, provocando efectos nocivos en la calidad humana, el riesgo aumenta cuando los desechos son vertidos en cuencas hidrográficas poco profundas y semi cerradas, el problema se fundamenta en que anualmente solo la biósfera acuática con diferentes microorganismos genera cerca de 10<sup>11</sup> toneladas métricas de quitina, y estudios realizados muestran que en los océanos se podría agotar las fuentes de carbono y nitrógeno en un tiempo relativamente corto, si la quitina no es devuelta al ecosistema en una forma biológicamente utilizable, lo que demuestra que las bacterias marinas tienen un papel muy importante en la degradación de la quitina (Yu *et al.*, 1991).

Existen alternativas para el tratamiento de estos desechos como transformación en harinas para lo que el desecho debe ser fresco. Además se pueden utilizar en procesos de compostaje con una degradación natural generando subproductos de interés económico como fertilizantes orgánicos (POE, 2003).

#### 1.9.8 Ácaros

Es la única sub-clase Arachnida con interés agrícola, hasta hoy en día existen más de 1,700 géneros y 30,000 especies (Carrero & Planes, 2008).

##### Organización anatómico- morfológica:

Gnastostoma: Allí se encuentra el aparato bucal, compuesto por un par de apéndices situados delante de la boca llamados quelíceros, que ocupan el sitio de las antenas en los otros artrópodos, estos le sirven para la aprehensión por lo que suelen terminar en pinzas; el

segundo par (los palpos) son órganos sensoriales táctiles y olfativos utilizados para la localización del alimento (Carrero & Planes, 2008).

Opisthosoma: Parte posterior del cuerpo donde se encuentra la abertura anal.

Idiosoma: Involucra el cuerpo del ácaro excepto el Gnastostoma, se divide a su vez en otras dos regiones: la primera Propodosoma y el Histerosoma.

Podosoma: (*Podo* = patas y *soma* = cuerpo) porción del cuerpo donde se insertan los cuatro pares de patas (Carrero & Planes, 2008).

Histerosoma: Es la mitad posterior del cuerpo formada por el metapodosoma y opistosoma (Carrero & Planes, 2008).

Otra forma de describir el ácaro externamente es:

Pedipalpos: Formado por seis segmentos, el primero es fijo y el resto son móviles; pueden estar adaptados para conseguir alimento, reciben los nombres de coxa o cadera, trocánter, fémur, rodilla, tibia, tarso y ambulacro, este último está formado por un par de uñas y un epodio central (Carrero & Planes, 2008).

Quelíceros: Constituido por tres segmentos: la abertura bucal, dorsal, y ventral, a su vez formada esta última por la quela que hace la función de rasgar el tejido vegetal (Villalba, 2006).

Estilóforo: Aparato bucal propio de los fitopatógenos, donde se fusionan las porciones próximas a los quelíceros y pedipalpos para formar el aparato chupador.

Cavidad bucal: Formada por una hipofaringe, la faringe que hace una función de bomba de vacío.

Ojos: No siempre están presentes, son simples y no facetados, en número par (2), ubicados en la parte dorsal o dorsolateral del propodosoma.

Setas: Órganos sensoriales, terminaciones nerviosas, conectados al sistema nervioso que funcionan como quimiorreceptores.

Patas: Son tres pares en las larvas y cuatro en estados ninfales y adultos.

Cutícula: Integrada por varias capas, o placas bien definidas, contiene poros en la superficie conectados por canales a la epidermis, para hacer la función de secreción o sensibilidad (Villalba, 2006).

#### Morfología interna

La respiración es traqueal, presenta un número variable de desembocaduras o estigmas de gran valor taxonómico ya que los órdenes y subórdenes se basan en el número, disposición y características de estas estructuras. En los ácaros que no tienen estigmas, la respiración se efectúa a través del tegumento (Carrero & Planes, 2008).

La reproducción es sexual tónica, algunos casos de partenogénesis facultativa, tanto por la producción de machos a partir de huevos no fecundados (arrenotoquia) como de hembras fruto de la eclosión de óvulos no fertilizados (telitoquia) típico en los subórdenes Prostigmata (Carrero & Planes, 2008).

Los ácaros por su forma de vida pueden clasificarse en dos grupos principales, los libres y los parásitos.

Los ácaros libres pueden adoptar a su vez los siguientes hábitos alimenticios:

- Depredadores: Algunos viven en el suelo, humus, detritus vegetales y animales, se alimentan de pequeños artrópodos, de sus huevos, de nematodos e incluso de otros ácaros, por ejemplo las familias Macrochelidae, Parasitidae, Ascidae y Cheyleidae, también existen los depredadores de hábitat aéreo, estos presentan patas largas, cuerpo grueso coloreado de rojo, amarillo o verde, se alimentan de ácaros fitófagos y de sus huevos, por lo que son beneficiosos para la agricultura, los encontramos en las familias Phytoseiidae, Amystidae, Raphignathidae y Tydeidae; finalmente se pueden mencionar los ácaros libres depredadores acuáticos, que se alimentan de pequeños crustáceos, insectos, ácaros, prefiriendo las larvas de insectos, moluscos y peces, casi todos de la familia Halacaridae (Carrero & Planes, 2008).



- Fitófagos: Son ácaros de movimientos lentos, con el cuerpo muy esclerotizado de color rojo, amarillo, verde, blanco e incluso translúcido; en la actualidad este grupo incluye a varias de las plagas más graves de la agricultura. Se clasifican en las familias Tetranychidae, Eriphyidae, Tarsonemidae, y Tenuipalpidae; dentro de este grupo también están los ácaros de granero, de productos almacenados (bulbos y tubérculos), que suelen tener coloraciones blanca o marrón (Carrero & Planes, 2008).

- Saprófagos: A este grupo pertenecen varias familias que se alimentan de detritus vegetales y animales (Carrero & Planes, 2008).

Los ácaros parásitos se los puede dividir según su forma de vida en:

- Ectoparásitos o parásitos externos: Atacan a vertebrados e invertebrados, incluido el hombre y animales de sangre caliente; están en las familias Sarcoptidae responsables de las sarnas, conocidos como araña de los pollos y Psoroptidae que son los ácaros de las costras (Carrero & Planes, 2008).

- Endoparásitos: Los ácaros adaptados a este sistema de vida tienen el cuerpo poco esclerotizado, su aparato bucal y locomotor están reducidos, carecen de ojos y suelen vivir en el aparato bucal de su huésped; un ejemplo es el *Acarapis woodi* que invade el conducto traqueal de las abejas melíferas produciéndoles acariosis (Carrero & Planes, 2008).

#### 1.9.8.1 Araña roja

Su nombre científico es *Tetranychus urticae*, se encuentra en cultivos de diferentes variedades, herbáceas, frutales, cítricos y ornamentales en casi todo el mundo, presenta dos típicas manchas en el abdomen; el macho es más móvil, pequeño, delgado con cuerpo aplanado en comparación con la hembra que tiene un color rojizo, anaranjado de forma redondeada; en el envés de la hoja las hembras ovopositan de 40 a 100 huevos amarillentos de 14mm, lisos y esféricos, que al final del proceso se tornan rojos por el color de la próxima larva a eclosionar; las larvas con seis patas se desarrollan a protoninfa, deuteroninfa y finalmente adulto (Koch, 2006).

Producen hilos de seda en gran cantidad en donde se agrupan formando colonias; este entretreído crea un ambiente favorable con una humedad adecuada, que les protege de la sequedad, lluvia y agroquímicos. En cada período de transición pasan por una etapa de reposo, en la cual se fijan a la hoja, su tiempo de vida es de alrededor de 10 días (Koch, 2006).

#### 1.9.8.2 Daños que causa

Los daños producidos por los ácaros en todo tipo de cultivo se han incrementado en los últimos treinta a cuarenta años, pasando de ser plagas secundarias a ser plagas de principal importancia en todo el mundo. Los daños se incrementan en climas secos y calurosos, porque se elevan los niveles poblacionales, y como consecuencia de la alimentación de los fitoácaros, se produce una reducción considerable de la fotosíntesis, al mismo tiempo se incrementa la transpiración de las zonas dañadas, con lo que se altera el metabolismo de la planta, cuyos efectos generales influyen negativamente en el crecimiento, la floración y los rendimientos, provocando la caída de las hojas (defoliación) (Mirabal, 2003).

Económicamente en el caso del cultivo de rosas, las pérdidas por causa de la araña roja mensualmente en una florícola de 35 ha de producción haciende a 20,500 dólares, entre la inversión en los acaricidas aplicados y la poca efectividad de control que estos alcanzan.

#### 1.9.8.3 Control químico de *Tetranychus* spp.

- Floramite: Acaricida de contacto e ingestión, actúa sobre formas adultas y juveniles, recomendada para rosas, manzano y peral; posee una buena residualidad, se recomienda su aplicación en programas de control integrado de plagas alternando la aplicación con productos de diferente mecanismos de acción (Chemtura, 2010).

- Hexmite: Polvo hidratable al 10%, actúa como veneno estomacal de contacto, no permite la muda de las formas inmaduras, impide oviposición y eclosión de los huevos (T.A.E.S.A, 2009).

- Kenemite: Controla varias especies de ácaros, no causa daños al medio ambiente, su mecanismo de acción es por contacto inhibe el paso de electrones en la célula, atando el

citocromo en el centro de la mitocondria, actúa sobre todas las tapas del ácaro (Vademécum, 2008).

- **Acaristop:** Acaricida específico que controla huevos de *Tetranychus spp.* tiene acción residual y al ser combinado con un adulticida, reduce considerablemente la población; su acción es por medio de ingestión, afecta la reproducción al interferir en la formación de estructuras respiratorias del embrión (Vademécum, 2008).

- **Mite clean:** Es un acaricida-insecticida de amplio espectro de ácaros, su modo de acción es por contacto y envenenamiento estomacal; produce falta de coordinación en los movimientos de las patas, causando postración en las últimas etapas de vida (Vademécum, 2008).

- **Polo 250 SC:** Es un insecticida, su acción es translaminar, causando parálisis sobre los insectos, no pueden mover los órganos del aparato bucal por lo que dejan de alimentarse, también actúa sobre ácaros (Vademécum, 2008).

#### 1.9.8.4 Control biológico de *Tetranychus spp.*

*Phytoseiulus persimilis:* Posee huevos de forma oval, color naranja claro y tamaño grande. Sus estadíos son: larva, protoninfa, deuteroninfa y adulto, entre cada fase no hay un estado de reposo. En la etapa adulta tarda 2 días antes de poner los primeros huevos, su ciclo de desarrollo varía de acuerdo a la temperatura, tarda alrededor de 5 días a 30°C, 9 a 20°C, y 25 a 15°C. La hembra pone aproximadamente de 54 a 75 huevos durante 22 días a una temperatura de 20°C (Salazar, 2007).

La dieta de *Phytoseiulus persimilis* se compone casi exclusivamente de arañas rojas; solamente en escasez de estas se come a sus congéneres. Las ninfas solo comen huevos y protoninfas; un adulto al día puede comerse 20 huevos o larvas, 13 protoninfas o 5 adultos de *Tetranychus urticae*, de tal forma que puede exterminar completamente un foco de araña roja (Salazar, 2007).

Bajo condiciones normales se recomienda mantener en el invernadero de tres a seis *Phytoseiulus persimilis*/m<sup>2</sup> y en poblaciones altas de la plaga, aumentar a 18 ácaros por m<sup>2</sup> (Salazar, 2007).

*Amblyseilius californicus* posee cinco estadios diferentes que se pueden distinguir: huevo, larva, protoninfa, deutoninfa y adulto; el ciclo de vida se puede completar en 4 días, cuando la temperatura es alta; el ciclo de vida de la araña roja es dos veces más largo. El ácaro depredador adulto vive casi 20 días, oviposita durante 14 días (con un promedio de 3 huevos diarios) y es capaz de consumir diariamente 5 arañas rojas adultas, también algunos huevos y larvas (Salazar, 2007).

La actividad de *Amblyseilius californicus* es mejor que la de *Phytoseilus persimilis*, por las siguientes razones: puede ser introducido preventivamente, también se alimentan de polen, su desarrollo depende menos de la temperatura pues es activo a temperaturas de 8 °C a 35 °C y resisten algún tiempo sin alimentarse, por lo que una población siempre estará presente en el cultivo (Salazar, 2007).

Purín en fermentación de ortiga. 1 kg por 10L si se usa la planta fresca y 200g si se usa seca; se aplica con una dilución de: 1:50.

Alcohol de ajo: Se coloca 4 ó 5 dientes de ajo en medio litro de alcohol fino y medio litro de agua, esto se licúa durante 3 minutos, luego se cuela y se guarda en refrigeración; se utiliza ante el ataque de ácaros, pulgones y gusanos.

#### 1.9.9 Hongos

Organismos eucariotas, sus células tienen una pared celular de quitina, están ampliamente distribuidos especialmente en lugares húmedos, con abundante materia orgánica en descomposición y ocultos a la luz del sol, la mayoría son terrestres aunque también existen algunos de agua salada y agua dulce; resultan para el ser humano tanto beneficiosos como perjudiciales (Prescott, 2007).

Son filogenéticamente diversos, actualmente son clasificados en dos sub-reinos: Straminipila y Eumycota (hongos verdaderos). Los Straminipila incluyen a los patógenos de insectos en el grupo conocido como Oomycota mientras que los Eumycota incluyen entomopatógenos en los Phylum Zygomycota, Ascomycota y Deuteromycota.

Los hongos tienen alimentación heterótrofa, puesto que no pueden realizar la fotosíntesis porque no tienen clorofila, en su digestión secretan al exterior enzimas digestivas,

y sustancias proteicas que actúan sobre los alimentos, dividiéndolos en moléculas sencillas, las cuales son absorbidas (Bello *et al.*, 2000).

Los hongos pueden ser saprófitos, parásitos y simbioses; los saprófitos, como el champiñón se alimentan de sustancias en descomposición; los parásitos se alimentan de líquidos internos de otros seres vivos; y los simbioses se asocian con otros organismos beneficiándose mutuamente (Duiops, 2008).

La forma más común de reproducción es por esporas, que son unidades reproductivas especializadas, compuestas por una o varias células, aunque también pueden reproducirse por medio de estructuras vegetativas como células individuales, fragmentos de micelio o esclerocios; dentro de las estructuras reproductoras están: los esporangios que forman esporas asexuales y los gametangios que forman gametos sexuales (Bello *et al.*, 2000).

#### 1.9.9.1 Hongos entomopatógenos

Son microorganismos que viven a expensas de insectos de diferentes Órdenes; existen alrededor de 700 especies y 100 géneros; no causan daño al hombre, animales ni plantas; requieren una adecuada humedad, pH y temperatura para su natural dispersión e infección. Dependiendo de la especie de hongo, estos microorganismos actúan por contacto en los diferentes estadios de los insectos plaga; las conidias son las unidades infectivas que penetran el cuerpo del insecto, produciéndole disturbios a nivel digestivo, nervioso, muscular, respiratorio, excretorio, etc; es decir el insecto se enferma, deja de alimentarse y posteriormente muere, esto ocurre en un lapso de tres a cinco días (Senasa, 2010).

En el mecanismo de acción de los entomopatógenos intervienen unidades infectivas; en el caso de la reproducción sexual es la espora y en la reproducción asexual el conidio. La invasión al hospedero comienza por la adhesión del conidio a la cutícula del insecto se lleva a cabo al secretar lectinas, seguido por una adsorción electrostática de proteasa sobre la cutícula, posteriormente se produce un tubo germinativo y un apresorio, como producto de la dilatación de la hifa; la penetración del hongo en el insecto es debido a la presión de la hifa, la cual rompe las áreas membranosas esclerosadas, resultante de la acción enzimática (proteasas, lipasas y quitinasas); la infección continúa con el proceso de colonización, en el cual la hifa sufre un engrosamiento y se ramifica en la cavidad general del cuerpo, formando

pequeñas colonias del hongo y otros cuerpos hifales como blastosporos; la colonización empieza por los cuerpos grasosos, sistema digestivo, tubos de Malpighi, hipodermis, sistema nervioso, músculos y tráqueas (Giraldo, 2007).

La muerte del insecto ocurre debido a la producción de micotoxinas, cambios patológicos en el hemocele, acción histolítica y bloqueo mecánico del aparato digestivo. Después de 48 a 60 horas de la muerte del insecto, las hifas comienzan a emerger por los espiráculos, ano y boca, a través de las áreas más débiles (regiones intersegmentales) (Giraldo, 2007).

Dentro de los más importantes se mencionan: *Aschersonia* spp. *Entomophthora* spp. *Zoophthora* spp. *Erynia* spp *Eryniopsis* spp *Akanthomyces* spp. *Fusarium* spp *Hirsutella* spp *Hymenostilbe* spp *Paecilomyces* spp y *Verticillium* spp. pertenecientes a los Phylum Zygomycetes e Hyphomycetes (Giraldo, 2007). *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*: parasitan coleópteros, lepidópteros, homópteros, hemípteros y ortópteros. *Verticillium lecanii* ataca áfidos, coleópteros, dípteros y ácaros.

#### 1.9.9.2 Hongos antagonistas

Son microorganismos que tienen un mecanismo basado en actividad inhibitoria directa sobre otro organismo, para controlar su desarrollo, entre estos mecanismos están: antibiosis, competencia por espacio o nutrientes, inducción a resistencia e interacción directa con el parásito (micoparasitismo y lisis enzimática) (Cruz, 2007).

**Antibiosis:** Es el mecanismo por medio del cual se producen sustancias tóxicas para otros microorganismos, que pueden actuar en bajas concentraciones (menores a 10 ppm.), a su vez la antibiosis puede generar resistencia por parte de los patógenos (Méndez, 1999).

**Competencia:** Es el comportamiento desigual de dos o más microorganismos cuando hay escases o limitación de un requerimiento, mas no cuando está en exceso, de tal forma que reduce la cantidad disponible del recurso para los demás, las competencias más comunes son por nutrientes, oxígeno y espacio (Orrierta & Larea, 2001).

**Interacción directa con el patógeno:** Una interacción directa es el parasitismo, en donde el antagonista parasita al patógeno utilizándolo como alimento. Generalmente

intervienen enzimas extracelulares como quitinasas, celulasas, glucanasas y proteasa, las mismas que rompen las estructuras externas del parásito, los ejemplos más conocidos son *Trichoderma* spp. *Gliocladium virens* (Orrierta & Larea, 2001).

#### 1.9.9.3 Hongos fitopatógenos

Existen más de 15,000 especies de hongos que originan enfermedades en las plantas, constituyéndose en un grupo patógeno importante (Bello et al., 2000). En su fase vegetativa, forman micelios que están constituidos por hifas, las cuales tienen una pared tubular delgada, en cuyo interior se encuentra el protoplasma, con orgánulos, y uno o más núcleos, ciertos hongos como las levaduras y mohos mucilaginosos no forman micelio (Bello *et al.*, 2000).

#### 1.9.9.4 *Paecilomyces fumosoroseus*

Phylum: Eumycota

Subdivisión: Deuteromycotina

Clase: Deuteromycetes

Subclase: Hyfomycetidae

Orden: Moniliales

Familia: Moniliaceae

Este hongo se ha aislado de algunos insectos pertenecientes a los ordenes: Coleoptera, Hemiptera, Lepidoptera, Diptera, Hymenoptera, Isoptera y Araneida (Humber et al., 2009).

A nivel de laboratorio, el crecimiento, esporulación y virulencia de la cepa aislada puede disminuir o perderse debido a las repeticiones en la conservación y manejo, sin embargo puede recuperarse la cepa después del ataque, y colonización al insecto blanco. (Hernández, 1999).

Es importante tener en cuenta la viabilidad de las esporas y el crecimiento vegetativo que se ven afectados por la temperatura, humedad relativa, radiación solar y metabolitos secundarios como el ácido salicílico en la superficie de la hoja y en la cutícula del insecto. En condiciones óptimas de temperatura y humedad, una vez que la espora se adhiere a la cutícula del insecto germina en 12 h, penetra ya sea por la cutícula, boca, ano, u orificios de respiración entre 12 a 18 h, llega al hemocele en 24h logrando su esporulación a las 72 h después del inicio de la infección. En el insecto, los síntomas de infección pueden ser cambio

de coloración, presencia de hifas en el hemocele del insecto o crecimiento micelial ya sea parcial o en todo el cuerpo (Hernández, 1999).

Algunas cepas de *P. fumosoroseus*, son tolerantes a pesticidas, lo cual no es común en hongos entomopatógenos, de manera que puede ser incluido en programas de Manejo Integrado de Plagas (Hernández, 1999).

Los insectos poseen un sistema de defensa celular humoral, que consiste en acumulación de hemocitos, formación de nódulos, fagocitosis y lisis de las células invasoras (Hernández, 1999).

Los hemocitos participan como defensa frente a organismos invasores al reconocer cuando el insecto sufre algún tipo de daño o herida, estos comienzan a agregarse y acumularse dentro y alrededor de la herida encapsulando las esporas del hongo; los granulocitos fagocitan al hongo, posteriormente los plasmocitos forman un pseudotejido en capas concéntricas hasta originar un granuloma, el cual es melanizado por la fenoxidasa hasta llegar a la lisis de la espora (Hernández, 1999).

Sin embargo las células micóticas pueden superar el sistema de defensa del insecto mediante estrategias de tolerancia al sistema, neutralización o enmascaramiento de los hematocitos o mediante la producción de metabolitos secundarios, que impide la formación de los agregados (Hernández, 1999).

#### 1.9.9.5 Cría masiva de hongos

Se parte desde una pequeña escala en frascos de 250ml a 1L de capacidad, donde se mide la composición del medio de cultivo, pH, temperatura y otros parámetros utilizados para describir la velocidad del crecimiento y el rendimiento del producto (Doran, 1998).

Una vez conocidas las condiciones óptimas de crecimiento y producción se realiza un cambio de escala a un biorreactor de prueba o prototipo de 1 o 2 L de capacidad, equipado para medir pH, temperatura, concentración de oxígeno disuelto, formación de espuma, presión, velocidad de agitación y las limitaciones que se pueden presentar. Por ejemplo si el reactor puede proporcionar suficiente oxígeno disuelto, o si el agitador utilizado para mezclar el caldo para que los nutrientes lleguen a todas las células puede dañar las mismas. La



situación se complica si los parámetros medidos son coeficiente de transferencia de materia, tiempo de mezcla, concentración de gas, velocidad de oxígeno, número de potencia, velocidad de cizalla del rodete, entre otras. La información obtenida en este punto sobre la actividad de la célula es importante ya que permite calcular posteriormente la posibilidad económica del proceso (Doran, 1998).

La siguiente etapa en el proceso es un biorreactor a escala piloto con un volumen de 100 a 1,000 L, con las especificaciones obtenidas en la escala prototipo. El objetivo de esta etapa es evaluar las reacciones al cambio de tamaño de los equipos por parte de las células, ya que aunque las condiciones son similares, los cambios en la actividad de los microorganismos pueden ser grandes y causar pérdidas (Doran, 1998).

Finalmente se llega a la escala industrial, en donde se deben diseñar todos los servicios necesarios, como suministro de aire, equipo de esterilización, generador de vapor, suministro de agua, fermentación y la red del control del proceso (Doran, 1998).

#### 1.9.10 Organismos quitinolíticos

Son aquellos organismos que tienen la capacidad de degradar la quitina por un proceso enzimático de hidrólisis; inicialmente rompen al azar enlaces glucosídicos  $\beta$  1-4, produciendo oligómeros, que después son hidrolizados por oligosacaridasas específicas hasta monosacáridos (Nava, 2009).

La capacidad de degradar la quitina viene a ser un importante atributo de las bacterias marinas, debido a la gran cantidad de quitina que se acumula en el mar. Los organismos quitinolíticos se diferencian de acuerdo al tipo de quitina que pueden degradar:  $\alpha$ -quitina,  $\beta$ -quitina o  $\gamma$ -quitina, estos pueden ser detectados ya sea por el aclaramiento en agares que contienen quitina, lo cual requiere una excreción y difusión de la enzima en el medio circundante o por la hidrólisis de sustratos fluorogénicos análogos a la quitina lo cual refleja la capacidad de degradar oligómeros pequeños (Cottrell *et al.*, 1999).

Estos organismos están ampliamente distribuidos en varios grupos taxonómicos de procariotas como por ejemplo: *Vibrio* sp. *Vibrio harveyi*, *Vibrio furnisii*, *Photobacterium* sp. *Streptomyces lividans*, *Serratia marcescens*, *Serratia liquefaciens*, Clostridios, Enteobacterias, y Archeobacterias. (Lang & Ren, 2001).

*Serratia marcescens* es un microorganismo que tiene un sistema quitinolítico completo, transforma la quitina extracelularmente en N- acetilglucosamina; esta bacteria está presente en el suelo y en el intestino de las lombrices rojas californianas. *Serratia liquefaciens* también produce dos tipos de quitinasas (Nava, 2009).

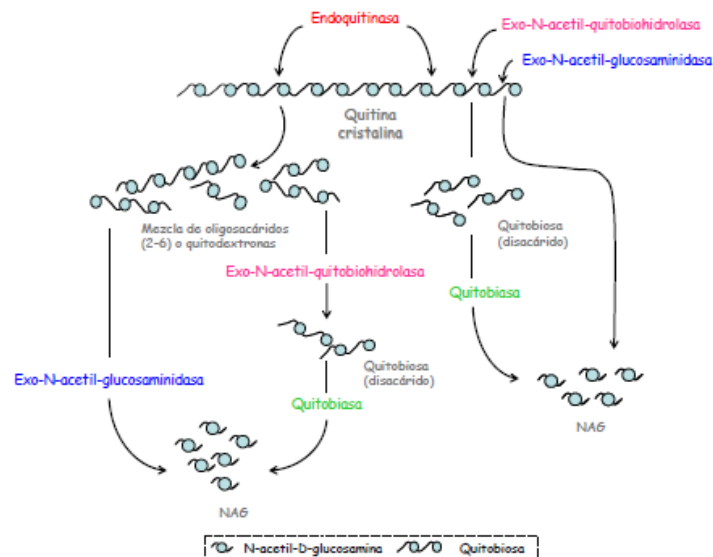


Figura 1.1. Modelo de la degradación enzimática de la quitina hasta N-acetil glucosamina- D-glucosamina (Cottrell et al., 1999).

En el grupo de los Actinomycetes existen varios microorganismos productores de enzimas quitinolíticas pertenecientes al grupo de *Streptomyces*, como *S. lividans* productora de tres enzimas quitinolíticas (Sastoque, 2005).

Otro género bacteriano productor de quitinasas es *Vibrio* como *Vibrio harveyi*, en el cual se identificaron dos genes involucrados en la degradación de la quitina, el primer gen secuenciado codifica para quitobiasa, la cual rompe el enlace que une dos unidades de N-acetilglucosamina; el segundo gen codifica una quitinasa. *V. furnissi* tiene dos enzimas de naturaleza quitodextrinasa y N- acetil-B-glucosamidasa, las cuales degradan quitina (Gevers et al., 2008).

Vía de la degradación bacteriana de la quitina: El microorganismo se une de forma aleatoria a la quitina por medio de quitinasas extracelulares y degrada el oligosacárido para entrar a la zona periplasmática; allí los oligosacáridos son degradados a residuos de N-acetilglucosamina y llevados al citoplasma mediante la vía del fosfoenol-pirubato, utilizando el sistema GlcNac fosfotransferasa. A partir de aquí, la GlcNac-6p sufre una conversión en

dos pasos, en el primero pierde el grupo acetil y en el segundo libera el grupo amonio para formar la fructosa-6p, la cual puede entrar en la glicolisis y seguir la ruta conocida (Yu *et al.*, 1991).

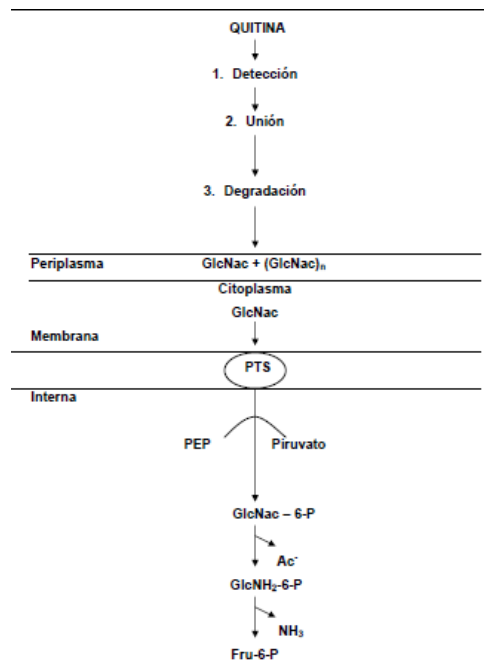


Figura 1.2. Proceso de degradación de la quitina por los microorganismos.

1.9.10.1 Enzimas quitinolíticas: Tienen una gran importancia por su amplia variedad, la cual radica en tres puntos:

1. Tipo de molécula que degraden ( $\alpha$ -quitina,  $\beta$ -quitina o  $\gamma$ -quitina).
2. Especie de microorganismo a la cual pertenecen.
3. Tipo de función que desempeñen dentro del complejo enzimático.

Por su modo de acción, las enzimas quitinolíticas se dividen en cuatro grupos:

a) **Endoquitinasas:** Rompen al azar enlaces internos de la molécula de quitina, dando como productos secundarios oligosacáridos formados de 2 a 6 unidades de N-acetilglucosamina.

b) **Exo-N-diacetil-quitobiohidrolasas:** Separan moléculas del disacárido quitobiosa a partir del extremo no reductor de la molécula de quitina, o de aquellos oligosacáridos mayores a 3 unidades de N-acetil-glucosamina.

c) Quitobiasas: Son enzimas que hidrolizan al disacárido quitobiosa, en dos moléculas de N- acetil-glucosamina (Nava, 2009).

#### 1.9.11 Aislamiento de microorganismos

El aislamiento de microorganismos es muy importante, desde el nivel de investigación hasta el industrial. Aislar microorganismos es una actividad interdisciplinaria incluyendo ramas como microbiología, química, bioquímica e ingenierías. El éxito de un aislamiento depende de la fuente utilizada para la obtención del microorganismo y del método utilizado; existe una gran variedad de fuentes primarias desde animales, plantas, seres humanos, pan, vino, suelo e incluso de ambientes con extrema sobrecarga de altitud, salinidad, temperatura, alcalinidad entre otros.

Aislar: Es separar un solo tipo de microorganismo a partir de una población que contiene varios tipos, ya que en hábitats naturales raramente encontramos a los microorganismos en cultivo puro (un solo tipo de microorganismo), por lo tanto es necesario elaborar un procedimiento para separar e identificar.

##### 1.9.11.1 Técnicas de aislamiento

###### 1.9.11.1.1 Aislamiento en placa por estrías

Con un asa estéril se pasa una porción de la muestra a la superficie del medio, este inóculo se va agotando por estrías de tal manera que las bacterias quedan separadas unas de otras.

###### 1.9.11.1.2 Aislamiento por dilución.

Se parte con 1ml de inóculo el que se añade a 9ml de agua estéril obteniendo la dilución de 0,1ml; estas diluciones se realizan en serie hasta llegar a  $1 \times 10^{-10}$ , se siembran en medio sólido, incuban y observan.

#### 1.9.12 Medios de cultivo

La fórmula elemental de un microorganismo es aproximadamente:  $C_4H_7O_2N$ , Siendo sus componentes celulares 50% carbono, 32% oxígeno, 14% nitrógeno,

3% fósforo, 1% azufre, y otros elementos en trazas (Fe, K, Mg, Mn, Co).

Un medio de cultivo requiere los elementos ya mencionados de tal manera que el microorganismo pueda asimilarlo, por ejemplo en forma orgánica para los heterótrofos y como CO<sub>2</sub> atmosférico para los autótrofos (microorganismos que foto sintetizan); el N en forma de NH<sub>4</sub>, NO<sup>3</sup>, NO<sup>2</sup>, o de aminoácidos; el P en forma de PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>, y en algunos casos aminoácidos y vitaminas que los organismos pueden sintetizar (Maldigan & Mirtino, 2004).

Los medios de cultivo se pueden clasificar en:

- Definidos: Cuando su composición química se conoce totalmente.
- Complejos: Están compuestos por mezclas de extractos de diversos materiales (extracto de levadura, extracto de carne, etc.).
- Sólidos: Se añade algún agente solidificante que no sea consumible por los microorganismos (normalmente agar).
- Selectivos: Favorecen el crecimiento de ciertos microorganismos, mientras suprimen el de otros.
- Diferenciales: Alguno de sus componentes permite identificar las colonias de un tipo de microorganismos (por ejemplo medios con hematiés para identificar colonias de microorganismos hemolíticos) (Maldigan & Martinko, 2004).

#### 1.9.13 Principales enfermedades de las plantas y suelo agrícola

Las enfermedades en las plantas las pueden ser causadas por:

1) Hongos: El 95% de las enfermedades son producidas por hongos, pueden actuar a nivel del suelo causando la pudrición de la raíz entre los que se encuentran: *Fusarium oxysporium*, *Rhizoctonia solani*, *Phythium* spp. y *Phytophthora* spp. A nivel exterior de la planta entre las enfermedades más importantes están: Moho gris, Oidio y Negrilla (*Fumagina* spp.) (Castillo, 2003).

2) Bacterias: Existen numerosas especies de bacterias que atacan a las plantas, la sintomatología que producen es diversa, incluyendo podredumbres húmedas que emiten mal olor y manchas.

Las enfermedades causadas por bacterias aún no son combatidas con productos eficaces y lo único que se puede hacer es prevenirlas, mediante variedades resistentes, sanidad en las podas, manejo de nutrientes y rotación de cultivos (Bashan *et al.*, 2003).

3) Virus: Todas las plantas ornamentales pueden sufrir infecciones de virus; sus síntomas son muy diversos y difíciles de diagnosticar, ya que se confunden con otras patologías y trastornos, por lo que la determinación precisa es realizada en laboratorio.

Los síntomas presentados son deformaciones y enrollamientos en sus hojas, punteados amarillos conocidos con el nombre de mosaicos y crecimiento anormal, quedando raquílicas con brotaciones axilares abundantes. Las virosis en vegetales no se pueden curar, sólo podemos prevenir (Morales, 2004).

4) Nematodos: Son gusanos diminutos, delgados y traslúcidos, su tamaño es aproximadamente de un milímetro, poseen un estilete para pinchar las células de la planta; la plaga se encuentra en el cultivo en forma localizada, diseminándose en el campo gradualmente. Provocan hipertrofia en raíces, formando tumores que dan la apariencia de morcilla; causan necrosis y más tarde la podredumbre de tejidos y raíces, las plantas muestran marchitez y debilitamiento. Sus agentes causales son: *Meloidogyne sp.* *Pratylenchus sp.* *Helicotylenchus sp.* *Heterodera rostochiensis* y *Radopholus similis* (Moreno, 2007).

#### 1.9.14 Control químico

El control químico es uno de los métodos más comunes, en donde se utilizan agentes químicos, sintéticos, como plaguicidas, fungicidas e insecticidas. (Bashan, *et al.*, 2003).

La FAO define plaguicida como " La sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo vectores de enfermedades humanas y animales, pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos".

Actualmente los plaguicidas que están prohibidos por ser nocivos para la salud son Aldrin, Dieldrin, Endrin, BHC, Campheclor (Toxafeno), Clordimeform, Chlordano, DDT, DBCP, Lindano, EDB, Amitrole, Compuestos mercuriales y de Plomo, Tetracloruro de Carbono, Leptophos, Heptachloro, Chlorobenzilato. Y por ser nocivos para el medio ambiente Methyl Parathion, Diethyl Parathion, Ethyl Parathion, Mirex, Dinoseb. (MAGAP, 2003).

Los fungicidas son sustancias químicas usadas para tratar o evitar las enfermedades (de plantas, animales, o humanas) causadas por hongos.

Un insecticida es un compuesto químico utilizado para matar insectos normalmente, mediante la inhibición de enzimas vitales (Devine *et al.*, 2008).

#### 1.9.14.1 Ventajas

- Tiene una mayor facilidad de uso.
- Abarca una menor cantidad de mano de obra para su aplicación.
- En las primeras aplicaciones tiene una alta efectividad frente a la plaga contrarrestada, debido a que sus principios activos son directos y específicos.
- Los resultados se ven en un menor tiempo. (Mendoza *et al.*, 2006).

#### 1.9.14.2 Desventajas

Muchos de los químicos utilizados para controlar fitopatógenos son potencialmente peligrosos para la salud humana. A corto plazo las patologías que se manifiestan son las intoxicaciones agudas, problemas de la piel, oculares, respiratorios, alergias, visión temporaria, mareos y dolores de cabeza; por otro lado, a largo plazo se manifiestan las intoxicaciones sub-agudas o crónicas como cirrosis hepática, problemas de hígado en general, cáncer, alteraciones cromosómicas o falta de fertilidad (Gutiérrez, 2007).

La Organización Mundial de la Salud ha calculado que alrededor de 20,000 personas mueren anualmente como consecuencia de la exposición a insecticidas (Devine *et al.*, 2008).

Los agroquímicos contienen elementos químicos que tienen un promedio de vida residual de 30 años, por consiguiente las plantas sólo aprovechan un poco y lo que queda en el

suelo comienza a filtrarse por efecto de la lluvia, hasta que llegan a los mantos acuíferos donde comienza, a acumularse y a formar parte del ciclo de agua.

Las acumulaciones generadas por el uso de fertilizantes, insecticidas, herbicidas, fungicidas y nematicidas causan alteraciones en ecosistemas naturales de la micro flora y micro fauna, lo cual puede llegar a producir el exterminio de los mismos volviendo infértil al suelo (Bashan *et al.*, 2003).

Ya que los productos usados son sustancias sintéticas fabricadas, el costo adquisitivo es bastante alto, por lo que la inversión mensual que se debe hacer es sumamente alta.

La mayoría de los patógenos especialmente insectos, después de unas cuantas aplicaciones del agroquímico adquieren resistencia al mismo, por lo que se debe cambiar constantemente de producto (Mendoza *et al.*, 2006).

#### 1.9.15 Control biológico

El control biológico es un fenómeno natural de regulación de plagas, manejado por el hombre a través de la utilización de organismos vivos, parasitoides, depredadores, antagonistas y poblaciones competidoras, o de sus productos (feromonas, hormonas juveniles), que mantienen las poblaciones de organismos nocivos a un nivel más bajo de lo que pudiera ocurrir en su ausencia, reduciendo las pérdidas y daños causados por los mismos (Ceballos, 2005).

Existen tres técnicas generales de Control biológico: importación o control biológico clásico, incremento y conservación.

- **Importación:** Implica importar los enemigos naturales deliberadamente de una región a otra, con el propósito de suprimir una plaga de origen exótico.

- **Incremento:** Involucra la producción masiva y colonización periódica de enemigos naturales (Ceballos, 2005).

- **Conservación:** Consiste proporcionar un ambiente favorable para la actividad, sobrevivencia y reproducción de los enemigos naturales de una plaga que habitan en una



región determinada, para lo cual es necesario conocer los factores que afectan sus poblaciones y a partir de ahí diseñar estrategias de manejo (Pérez, 2004).

#### 1.9.15.1 Ventajas

El beneficio del control biológico se puede valorar en términos de éxitos o fracasos, tomando como éxito completo cuando se utiliza el biocontrolador contra una plaga importante sobre un área extensa logrando resultados en los cuales las aplicaciones de insecticidas se vuelven raras. Mientras, el éxito parcial es donde el control químico permanece como necesario pero se reduce el número de aplicaciones (Ceballos, 2005).

- Es un método de mayor seguridad para las personas, flora, fauna y medio ambiente, porque tiene poco o ningún efecto colateral.
- El agente biocontrolador podría persistir por un largo período de tiempo y resurgir cuando la plaga aparezca nuevamente (Morales, 2006).
- Algunos productos biológicos ya vienen ajustados al tipo de parásito, por lo que son capaces de combatir una amplia gama de parásitos, sin producir daño a los insectos benignos (Heinlein, 2007).
- La resistencia que pueden adquirir las plagas frente a sus controladores biológicos es muy rara.
- Mejoramiento de las características físicas, químicas y biológicas del suelo, debido a la estructura y agregación de las partículas del mismo, reduciendo su compactación, incrementando los espacios porosos y como consecuencia, mejora la infiltración del agua (Flores & Jiménez, 2007).
- En términos económicos se ha calculado un retorno aproximado por cada dólar invertido de 30:1, mientras que para el control químico es 5:1 (Ceballos, 2005).

#### 1.9.16 Desventajas

- La viabilidad del organismo de control, pueden verse afectada por la forma de crecimiento y manera de aplicación (Bashan *et al.*, 2003).

- El control biológico requiere mucha paciencia y estudios a mayor profundidad.
- Muchos enemigos naturales son susceptibles a pesticidas, por lo que su manejo debe de ser muy cuidadoso.
- Los resultados del control biológico muchas veces no se obtienen con la rapidez esperada, ya que los enemigos naturales atacan a tipos específicos de insectos, contrario a los insecticidas que matan una amplia gama de ellos (Heinlein, 2007).
- La falta de conocimiento del tema hace que se pasen por alto ciertos principios del método y de igual forma que se dé menos apoyo económico.
- No existen muchos profesionales especializados en el tema de biocontrol.
- Aún no se producen de manera industrial en gran escala, por lo que la mayoría de los productos no están disponibles de forma inmediata.
- El incremento de los enemigos naturales es más retardado en comparación a las plagas que atacan, por lo cual no proveen una supresión inmediata.
- La mayoría de los fracasos de control biológico se han debido a errores por la carencia de planificación y pobre evaluación de los enemigos naturales antes de una introducción. En algunos casos los errores han sido tan funestos que se ha provocado la extinción de otras especies (Ceballos, 2005).

#### 1.9.17 Control biológico en el Ecuador

En el Ecuador la mayoría de los estudios publicados en control biológico se han realizado en el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) como “El control biológico de plagas en el cultivo del algodón”, “Control biológico del minador” entre otros estudios. (INIAP, 2009).

Por otra parte también se reportan estudio realizados en algunas empresas de importancia como la Finca “El Chivan” perteneciente a Hilsea Investment S. A. con el

“Estudio económico de la cría masal del ácaro benéfico *Amblyseius californicus* para el control de *Tetranychus urticae* en rosas” (Jara & Montesdioca, 2007).

Además, existen empresas que se dedican a la producción industrial de ciertos biocontroladores, como Equabiológica, agroindustria de control biológico del Ecuador C.A (Ledesma, E), CBA control Biológico S.A empresa que se dedica a la investigación biológica para la protección de especies vegetales y animales.

#### 1.10 Sistema de hipótesis de la investigación:

Hipótesis nula:

A nivel de invernadero en el cultivo de rosas la utilización de un microorganismo quitinolítico aislado a partir de cascarilla de camarón en conjunto con el hongo *Paecilomyces fumosoroseus*, no controlan en ninguna magnitud los ácaros *Tretranychus urticare* fitopatógeno de rosas.

Hipótesis alternativa:

A nivel de invernadero en el cultivo de rosas la utilización de un microorganismo quitinolítico aislado a partir de cascarilla de camarón en conjunto con el hongo *Paecilomyces fumosoroseus*, controlan en un nivel significativo la cantidad de ácaros *Tretranychus urticare* fitopatógeno de rosas.

## CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.6 Participantes:

En la presente investigación participaron: la unidad de negocio “Florycampo” , perteneciente a la empresa Hilsea Investment, del grupo Esmeralda Ecuador, al proporcionar los invernaderos para la aplicación del experimento y con el laboratorio de microorganismos antagonistas; a su vez colaboró la Escuela Politécnica del Ejército (E.S.P.E) al permitir que las primeras fases de la parte práctica se realicen en los laboratorios de microbiología del Departamento de Ciencias de la Vida-Ingeniería en Biotecnología; y las bodegas de mariscos de “Los ceviches de la Rumiñahui ” que facilitaron los desechos de camarón.

En la realización de esta tesis participaron: la Dra. Karina Ponce como Directora de la investigación, el Ing. Pedro Romero como Codirector, el Ing. Abraham Oleas guía en el área de fitopatología, MSc. Alma Koch, directora del laboratorio de microbiología de la E.S.P.E, la Blga. María Labán, directora del laboratorio de microbiología de la finca “El Chivan” quien proporcionó las cepas de *Paecilomyces fumosoroseus* y la Srta. Elizabeth Castro como tesista.

### 2.7 Zona de estudio: La presente investigación se realizó en dos sitios geográficos diferentes:

2.7.1 Los laboratorios de microbiología de la Carrera de Ciencias de la vida-Ingeniería en Biotecnología pertenecientes a la universidad “Escuela Politécnica del Ejército” (E.S.P.E), ubicada en la provincia de Pichincha, Cantón Rumiñahui, en la ciudad de Sangolquí, a una distancia de 22 kilómetros al Sur Este de Quito, capital de la República del Ecuador, a 2.510 m.s.n.m., con una temperatura promedio de aproximadamente 15°C.

2.7.2 Los invernaderos de la Finca “Florycampo” ubicados en la Panamericana Norte Km 2.5 vía Otavalo, cantón Cayambe, provincia de Pichincha, a 2850 m.s.n.m., con una temperatura que oscila entre los 6.3°C y 22°C.

### 2.8 Período de investigación:

- Inicio de la investigación: 01 de Junio del 2009.
- Terminación de la investigación: 30 de abril del 2010.

- Duración: 11 meses.

## 2.9 Diseño Experimental

El diseño experimental utilizado fue un DBCA (diseño de bloques completamente al azar), con 8 tratamientos descritos en la Tabla 2.1, y 4 repeticiones.

Tabla 2.1. Tratamientos utilizados en la aplicación en invernaderos.

Número	Tratamientos
1	B7 + <i>Paecilomyces</i> (5to día)
2	B7 + quitosano
3	Quitosano
4	B8 + <i>Paecilomyces</i>
5	B8 + quitosano
6	<i>Paecilomyces</i>
7	A2 + quitosano
8	A2 + <i>Paecilomyces</i>

(5to día) indica que *Paecilomyces* se aplicó al quinto día de haber sido aplicado el microorganismo quitinolítico.

### 2.9.1 Bloque experimental: una parcela de plantas de rosas

- Número de plantas por parcela: 7 plantas de rosas
- Superficie experimental de cada parcela: 0.3m x 1m
- Número total de plantas del ensayo: 252
- Unidad experimental: planta de rosa

### 2.9.2 Variables

2.9.2.1 Eficacia de los microorganismos: Está expresada en el porcentaje del control a las 72 horas de la aplicación, para lo cual se utilizó la siguiente fórmula (Villalba, 2006):

$$\%E = \left( \frac{PI - PF}{PI} \right) * 100$$

%E: porcentaje de eficacia

PI: Población inicial

PF: Población final

2.9.2.2 La población total de ácaros: Se expresó en el porcentaje de control logrado hasta el día 11, calculado con la fórmula ya mencionada (Casar, 2003).

## 2.10 Procedimiento

### 2.10.1 Preparación de quitina coloidal

Para la elaboración de quitina coloidal se emplearon 10g de escamas de cangrejo (Sigma), a las que se agregaron 175 ml de HCl 10 N, dejando reposar por una noche a 4 °C, y por 4 horas a temperatura ambiente; la solución obtenida se filtró en un embudo con fibra de vidrio tupida en un matraz que contenía 1L de etanol absoluto a -20 °C en agitación, y se dejó decantar toda la noche a 4 °C, al día siguiente se centrifugó por 10 minutos a 5,000 rpm, desechando el sobrenadante y lavando la parte sólida varias veces con agua destilada; por último se lavó con solución buffer fosfato 70 mM, pH 6 hasta obtener una pasta blanquecina que se conservó a 4 °C (Risal, 2008).

### 2.10.2 Recolección y tratamiento de muestras

Se tomaron 2 muestras de 300g de caparazones productos del pelado del camarón, de las bodegas Ceviches de la Rumiñahui, y se transportaron en un cooler a 5 °C, hacia los laboratorios de microbiología de la E.S.P.E; allí se limpiaron, lavaron, secaron, molieron y refrigeraron a 4°C las cascarillas de camarón (Sastoque, 2005).

### 2.10.3 Preparación de los medios de cultivo:

#### 2.10.3.1 Agar de quitina coloidal y extracto de camarón

A 1g. de extracto de caparazón de camarón molido, se le agregaron 2L de agua peptonada (0.1% p/v), se hirvió por 30 minutos para eliminar proteínas, luego se tomó el sobrenadante y por segunda vez se dejó en ebullición por 30 minutos; después se separó el sobrenadante al que se le añadió quitina coloidal (1.5% p/v), Na Cl (6% p/v), llevando la solución a un pH de 8.3 y agregándole agar (1.5%) (Sastoque, 2005).

#### 2.10.3.2 Agar de quitina coloidal con base de Yeast Nitrogen Base (Sigma).

- 1.5% de agar
- 1.5% de YNB
- 1% de quitina coloidal (D.P.V, 2003).

#### 2.10.3.3 Agar de quitina coloidal formulado

- 1L de agua destilada
- 0.5% p/v de quitina
- 0.7% p/v de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

- 0.1% p/v de  $K_2HPO_4$
- 6% p/v de NaCl
- 0.01% p/v  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
- 0.05% p/v de extracto de levadura
- 1% de extracto de camarón
- 1.5% de agar (Hidalgo *et al.*, 2007).

#### 2.10.4 Preparación del inóculo y siembra

Las muestras previamente tratadas se pesaron y dividieron en tres grupos de igual peso, al primero se lo licuó con agua destilada estéril, al segundo con agua peptonada estéril al 1%; se tomó 1ml de cada uno de los dos extractos formados y se colocó en 9ml de agua destilada y peptonada; el proceso continúa hasta llegar a una dilución de  $1 \times 10^{-3}$ ; al tercer grupo se molió y se tomó 1mg para colocar en 9ml de agua destilada estéril de la misma manera hasta llegar a una dilución de  $1 \times 10^{-3}$  (Martínez *et al.*, 2007), cada una de estas disoluciones se sembró, primero en YNB (Sigma) con pH 4.2; en días posteriores se realizó una nueva siembra con los mismos inóculos en los tres medios de cultivo preparados anteriormente a pH 9.2, y se incubó a 35 °C por 7 días (Cottrell *et al.*, 2000).

#### 2.10.5 Aislamiento de los microorganismos quitinolíticos

Se tomaron colonias diferenciando cada una de ellas por su crecimiento y morfología (color, tamaño). Estas colonias se purificaron con pases sucesivos en los tres medios de cultivo a base de quitina coloidal: en YNB (Sigma) se trabajó con pH de 6 y 10; en el formulado y en el medio de extracto de camarón se probó con pH 9, fueron sembrados por estriación e incubados a 35°C por siete días. Una vez purificadas las cepas se realizaron siembras masivas en los tres medios de cultivo e incubaron a 35°C por siete días (Mateos, 2006). A cada una de estas cepas se le realizó una tinción gram.

#### 2.10.6 Crioconservación de cepas

Se prepararon 100ml de medio líquido infusión cerebro corazón (BD Difco) con glicerol al 15%, esta solución fue dispensada en tubos de ensayo, aproximadamente 15ml por tubo; una vez frío el medio se procedió a poner el contenido de los tubos en las cajas petri que ya tenían las cepas previamente sembradas por masificación, se retiró la biomasa de las cepas

con una asa de vidrio en forma de triángulo previamente flameada con alcohol etílico (Sastoque, 2005).

Este líquido fue tomado con una pipeta estéril, pasándolo de una caja a otra de la misma cepa hasta obtener una solución densa que tenga suficiente biomasa; ésta se extrajo con una jeringa y se colocó en micro tubos para crioconservación de 1.5ml previamente esterilizados, los cuales se dejaron en el congelador a -20°C. Este proceso se realizó con cada una de las cepas por separado (Sastoque, 2005).

#### 2.10.7 Pruebas de fitopatogenicidad

Las cepas seleccionadas fueron sembradas en masificación e incubadas a 35°C por 7 días, para luego ser recuperadas cada una de ellas en agua destilada y peptonada estéril llegando cada cepa a una concentración de  $1 \times 10^8$ ; la cual fue medida por un recuento de la unidades formadoras de colonias en la cámara de Neubauer (Ciampi *et al.*, 2005).

Se tomaron muestras de hojas, tallos, botones, y raíces de rosas, las cuales se lavaron con jabón líquido (Axió) en agitación por 1 minuto y luego con agua corriente varias veces; a continuación se sumergieron en una solución de cloro al 0.5% por 2 minutos y en soluciones al 1% y 2 % por 1 minuto, después de cada inmersión se lavó con agua corriente varias veces (Roig, 2005).

Se prepararon soluciones de cada una de las cepas en una base de agua y extracto de camarón a una concentración de  $1 \times 10^8$ , a cada una de las muestras de raíces, tallos y hojas se dejó por un minuto en las diferentes soluciones de las cepas preparadas, mientras que los botones solo se los sumergió. Las hojas se colocaron en cajas petri y los tallos, raíces y botones en frascos de vidrio que contenían agar estéril; a estos se los selló con papel aluminio por un lapso de 20 días (Contreras *et al.*, 2006).

Posterior a esto se observaron los posibles cambios en las muestras vegetales, realizando pruebas microscópicas e identificando colonización y algún tipo de daño a nivel del tejido (Universidad de Tolima, 2006).

#### 2.10.8 Pruebas de antagonismo



Se trabajó con las cepas más aptas para la investigación B7, B8, A2, A3, y con *Paecilomyces fumosoroseus*, el primer paso fue adaptar las 4 cepas a un mismo medio de cultivo ya que B8 y B7 crecen en agar a base de extracto de camarón, A2 y A3 en agar formulado y *P. fumosoroseus* en Papa Dextrosa Agar o PDA (BD Difco). Se probó el crecimiento de los cuatro microorganismos en agar a base de extracto de camarón, en agar formulado, en agar YNB (Sigma), en PDA (BD Difco), en PDA más quitina, en PDA más extracto de camarón y en PDA más extracto de camarón y más quitina (Alvarado *et al.*, 2001).

Una vez obtenido el medio de cultivo adecuado para los 4 microorganismos, se realizaron siembras en PDA más extracto de camarón de las cepas B7, B8, A2 y *P. fumosoroseus* y se incubó por 6 días a 35°C (Candela *et al.*, 2004).

En cajas nuevas de PDA más extracto de camarón se sembraron las cepas B8, A2 y B7, cuatro cajas por cada cepa; en las dos primeras se colocaron discos equidistantes de papel filtro previamente esterilizado y humedecido en inóculo líquido de *P. fumosoroseus* y en las otras dos se colocaron discos de PDA más extracto de camarón con *P. fumosoroseus* sembrado 6 días antes (Benítez *et al.*, 2007).

De igual forma se realizaron siembras de *P. fumosoroseus* y se colocaron dos discos equidistantes humedecidos con inóculo líquido y dos discos con PDA más extracto de camarón con siembra previa de las cepas B8, A2 y B7 con dos repeticiones por cada ensayo es decir cuatro cajas por cada cepa quitinolítica, dejando incubar a 30°C. Al cabo de 5 días, se observaron halos de inhibición (Benítez *et al.*, 2007).

#### 2.10.9 Pruebas de actividad quitinolítica

Se sembraron en agar quitina a base de extracto de camarón, las cepas B8, A2, y B7, las cuales se incubaron a 35 °C por 15 días; después del tiempo requerido se pasaron los cultivos a una solución salina al 0.85% (p/v) (Hidalgo *et al.*, 2007).

A 5ml de esta solución madre obtenida de cada una de las tres cepas, se añadieron 45ml de medio líquido de quitina coloidal a base de extracto de camarón; esta solución se colocó en matraces de 100ml, se los selló con papel aluminio, y se los incubó en baño maría a 90 rpm, a 26 °C, por 36 días (Sastoque, 2005).

Adicional a esto se preparó el reactivo DNS, compuesto de:

- Ácido dinitrosalicílico (Sigma) al 1%
- Hidróxido de sodio al 1%
- Bisulfito al 0,05%
- Fenol al 0,2%
- Tartrato de sodio y potasio al 5,65% (Miller, 1959).

El reactivo se preparó diluyendo NaOH en 500ml (solución 1), en otro elenmeyer se diluyó el ácido dinitrosalicílico con agitación por 20 minutos más el tartrato de sodio (solución 2), adicionalmente y por separado se prepararon soluciones de fenol y bisulfito; finalmente se mezclaron las soluciones 1 y 2, añadiendo el fenol y el bisulfito (Miller, 1959).

Comenzando en el día 4 se tomaron 5ml de las diferentes soluciones de cada cepa, se centrifugaron por 15 minutos a 6,000rpm, se extrajeron 3ml del sobrenadante de cada cepa y añadieron 3ml del reactivo DNS, se calentaron a baño maría por 8 minutos, se dejaron enfriar y se midió la absorbancia a 575nm (Hidalgo *et al.*, 2007). Estas mediciones se realizaron cada 6 días, hasta llegar al día 36; el blanco utilizado fue agua destilada.

También se realizó una curva de estandarización con N-acetilglucosamina en un rango de concentración desde 0,05g hasta 2,5g (Sastoque, 2005).

#### 2.10.10 Pruebas de control de ácaros a nivel de laboratorio

Se sembraron las tres cepas en medio de quitina coloidal, incubándolas a 35 °C, a los 15 días se diluyeron en agua destilada estéril, obteniéndose concentraciones de:

- B7:  $1 \times 10^8$
- B8:  $1 \times 10^8$
- A2:  $1 \times 10^7$
- *Paecilomyces fumoroseus*:  $1 \times 10^9$

Se inoculó una planta de rosas con huevos de *Tetranychus urticae*, y se dejó por 18 días al cabo de los cuales se tomaron hojas infestadas de ácaros, se realizaron conteos para determinar cuántos ácaros tenía cada hoja y se inocularon con los tratamientos formados por los microorganismos quitinolíticos (Anexo A).

Las hojas inoculadas fueron colocadas en un vaso plástico pequeño que contenía en el fondo papel absorbente y una esponja húmeda; se sellaron con parafilm, realizando unos pequeños orificios.

A cada uno de estos 68 tratamientos se les realizó un seguimiento diario con observaciones en un estereoscopio, contando las poblaciones de ácaros vivos y muertos por cada hoja, durante 11 días (Alcalá *et al.*, 1999).

#### 2.10.11 Escalado de los inóculos de cada cepa

Se partió de 40 cajas por cada microorganismo, recuperándose 10ml por cepa quitinolítica; la concentración inicial de B7 y A2 fue de  $1 \times 10^8$  y de B8 de  $1 \times 10^7$ . Estos cultivos se diluyeron en 2L de medio líquido de extracto de camarón, NaCL (3%) y quitina coloidal (1.5%) dejándolos con aireación a  $25 \pm 3$  °C; al tercer día se diluyeron nuevamente en 4L de medio líquido de la misma composición y se dejaron por tres días; finalmente se disolvieron en 8L de medio de cultivo líquido nuevo, dejándolos por 8 días. En los tres escalados los envases fueron llenados con el líquido hasta la mitad de su capacidad volumétrica, para una mejor aireación (Cruz, 2007).

#### 2.10.12 Pruebas de fitotoxicidad

En los invernaderos de la Finca Florycampo en Cayambe, se tomó una cama de rosas, que se dividió en 13 parcelas de 42 plantas, se identificó cada parcela y se aplicaron en horas de la tarde 12 tratamientos (Tabla 2.2), uno por cada parcela más el blanco; se realizó un seguimiento por 12 días tomando 2 muestras diarias por cada tratamiento y evaluando el grado de toxicidad y el número de ácaros muertos. Esta cama estaba expuesta a químicos (fungicidas, bactericidas, dispersantes, adherentes).

Adicionalmente se realizó el mismo proceso en una cama de rosas sin aplicaciones de agroquímicos, para analizar los grados de fitotoxicidad, tomando como día 1 a las dos horas de la aplicación.

Tabla 2. 2. Tratamientos aplicados en las pruebas de fitotoxicidad.

Número	Tratamientos
1	B7
2	B7 + <i>Paecilomyces</i> (5to día)
3	B7 + quitosano
4	Quitosano
5	B8 + <i>Paecilomyces</i> (5to día)
6	B8 + <i>Paecilomyces</i>
7	B8 + quitosano
8	<i>Paecilomyces</i>
9	A2 + quitosano
10	A2 + <i>Paecilomyces</i>
11	A2 <i>Paecilomyces</i> (5to día)
12	B7 + B8 + A2

Los grados de toxicidad se midieron tomando en cuenta la siguiente tabla

Tala 2.3. Indicadores de grados de toxicidad (Geigy, 2006)

Grados	Características
0	Ausencia de daño en la hoja
1	Presencia de quemazón en los bordes de la hoja (10%)
2	Presencia de quemazón en el 20% de la hoja
3	Presencia de quemazón en el 40% de la hoja
4	Presencia de quemazón en el 60% de la hoja
5	Presencia de quemazón hasta la nervadura central (80%)
6	Presencia de quemazón en toda la hoja (100%)

#### 2.10.13 Pruebas de control biológico a nivel de invernadero

En el invernadero de rosas de la finca “Florycampo” se trabajó con la variedad *Opium*, seleccionando 2 camas de 1 x 82m<sup>2</sup>, marcando en cada una de éstas 14 parcelas de 7 plantas; el día anterior a la aplicación se contó el número promedio de ácaros por hoja tomando aleatoriamente de una planta por parcela, dos muestras por planta, una de la parte inferior y otra de la parte superior de la planta; al siguiente día se aplicaron en horas de la tarde con bomba de mochila los 8 tratamientos (Tabla 2.1), más un blanco.

Contando el día de la aplicación como día cero, se realizó una toma de datos en los días 1, 3, 5, 7, 9, y 11; las muestras se analizaron en un estereoscopio contando el número de formas móviles (adultos y ninfas) por cm<sup>2</sup> (Santamaría, 2007).

## CAPÍTULO 3: RESULTADOS

### 3.13 Preparación de quitina coloidal

Tomando en cuenta como referencia el valor inicial en peso de las escamas de cangrejo con las que se trabajó, al final del proceso se obtuvo el 50% en cuanto a peso de quitina coloidal, la misma que presentó color crema y consistencia blanda como se puede observar en la figura 3.1.

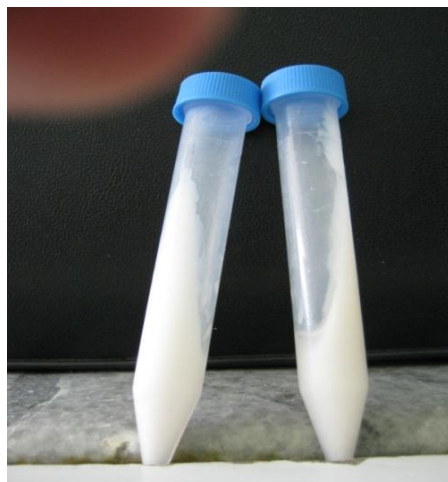


Figura 3.1. Quitina coloidal obtenida de las escamas de cangrejo con base en HCl.

### 3.14 Preparación del inóculo y siembra

De los 12 inóculos iniciales sembrados en los tres medios de cultivo se obtuvieron 39 ensayos para el aislamiento, descritos en el Anexo B.

### 3.15 Aislamiento de los microorganismos quitinolíticos

En la primera siembra en el medio YNB (Sigma) a pH 4.2 se observaron colonias de color amarillo y un hongo verde.

En la segunda siembra de las 39 cajas sembradas se obtuvo crecimiento en 27; 8 en el medio de extracto de camarón, 11 en el formulado, y 11 en YNB. Se observaron 10 tipos de microorganismos, 8 bacterias y 2 hongos, detallados en la Tabla 3.2.

Tabla 3.1. Microorganismos obtenidos en la segunda siembra realizada para el aislamiento.

	<b>Tipo</b>	<b>Color</b>	<b>Nomenclatura designada</b>
1	Bacteria	Marrón	B1
2	Bacteria	Lila	B2
3	Bacteria	Crema	B3
4	Bacteria	Tomate	B4
5	Bacteria	Blanca	B5
6	Bacteria	Amarillo	B6
7	Bacteria	Naranja	B7
8	Bacteria Filamentosa	Blanca	B8
9	Hongo	Verde	A2
10	Hongo	Caqui	A3

En la purificación de las 10 cepas se determinó que: B1, B2 y B4, tuvieron crecimiento bajo y B3 era propensa a la contaminación, (Tabla 3.3); por esta razón para seguir con el proceso de masificación se descartaron las 4 cepas.

Tabla 3.2. Porcentajes de crecimiento de las 10 cepas en los tres medios de cultivo.

Colonias	Ynb pH 6	Ynb pH 10	Formulado	Extracto
B1	0%	0%	40%	0%
B2	0%	0%	0%	0%
B3	70%	0%	40%	40%
B4	0%	0%	0%	30%
B5	0%	0%	0%	80%
B6	60%	85%	60%	9%
B7	70%	50%	80%	40%
B8	0%	70%	60%	80%
A2	0%	0%	60%	0%
A3	0%	0%	0%	60%

Tabla 3.3. Resultados de la tinción gram de las cepas aisladas.

<b>Cepa</b>	<b>Morfología</b>	<b>Tinción gran</b>
B5	Cocos	Gram positivos
B6	Cocos	Gram negativos
B7	Bacilos	Gram positivos
B8	Bacilos	Gram positivos
A2	Hongo	
A3	Hongo	

Mediante las siembras de las 6 cepas en los tres medios de cultivo a diferentes

pH, se estableció un medio de cultivo y pH óptimo para cada cepa (Tabla 3.5).

Tabla 3.4. Descripción de las cepas con sus respectivos pH y medios de cultivo óptimos.

Cepa	Agar	pH
B5	Extracto de camarón + quitina coloidal	7
B6	Extracto de camarón + quitina coloidal	7
B7	Extracto de camarón + quitina coloidal	9
B8	Extracto de camarón + quitina coloidal	9
A2	Medio formulado	9
A3	Yeast Nitrogen Base	6

3.16Crioconservación: Las cepas críoconservadas fueron: B5, B6, B7, B8, A2, y A3.

3.17Pruebas de fitopatogenicidad: En la etapa de desinfección, las hojas y botones tenían cierto grado de maltrato.

A los 20 días de la inoculación, se obtuvieron los siguientes resultados:

- Hojas: Las cepas B7 y B8 no colonizaron la muestra vegetal; A2 y A3 si lo hicieron de forma superficial (Anexo C).
- Botones: Ninguna cepa colonizó los botones, solo hubo contaminación por parte de microorganismos del ambiente y rasgos de maltrato (Anexo D).
- Tallos: Las cepas B7, B8 y A3 no colonizaron los tallos inoculados y la cepa A2 lo hizo superficialmente (Anexo E).
- Raíces: Ninguna de las cuatro cepas esporuló en las raíces inoculadas (Anexo F).
- Las cepas B7, B8, A2 y A3 no tuvieron reacciones patógenas en hojas, tallos, botones y raíces.

3.18Pruebas de antagonismo

#### 3.18.1 Adaptación de medios de cultivo

Los resultados de la adaptación de las cepas quitinolíticas y de *P. fumosoroseus* en 6 diferentes medios de cultivo se muestran en el Anexo G.

### 3.18.2 *Paecilomyces fumosoroseus* frente a la cepa B7

Estos dos microorganismos son antagonistas, ya que formaron halos de inhibición, como se puede ver en la figura 3.2

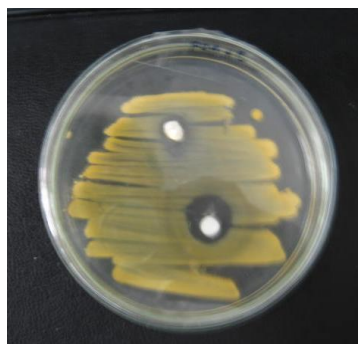


Figura 3.2. Halos de inhibición que formaron la cepa B7 frente a *Paecilomyces fumosoroseus*; el halo superior mide 0,3 cm, y el inferior 0,5 cm de diámetro.

### 3.18.3 *Paecilomyces fumosoroseus* frente a la cepa B8

Estos dos microorganismos no son antagonistas, no formaron halo de inhibición (figura 3.3).

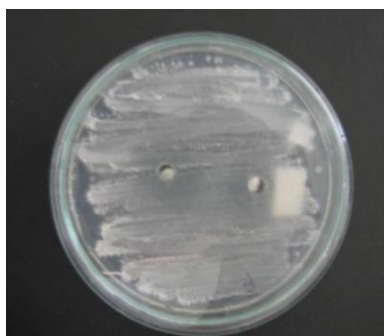


Figura 3. 3 B8 frente a discos de *Paecilomyces fumosoroseus*.

### 3.18.4 *Paecilomyces fumosoroseus* frente a la cepa A2

Estos dos microorganismos no son antagonistas, no formaron halo de inhibición (figura 3.4).

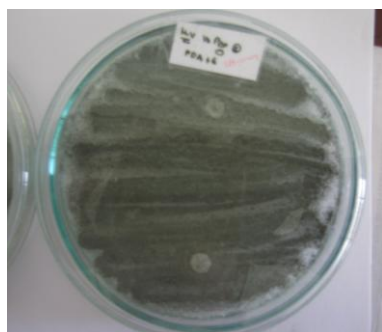


Figura 3.4. Cepa A2 frente a discos de *Paecilomyces fumosoroseus*.



### 3.19 Pruebas de actividad quitinolítica

Los resultados obtenidos mediante la técnica DNS, para la curva de calibración de N-acetilglucosamina, se muestran en la figura 3.5

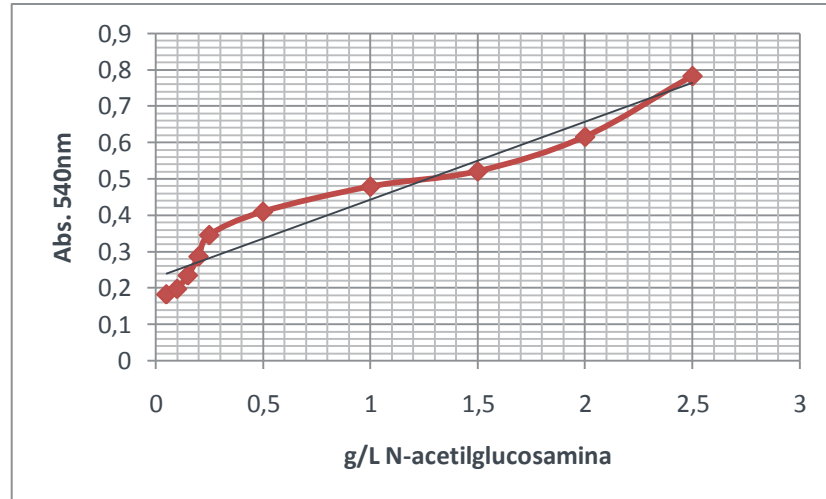


Figura 3.5 Curva patrón de N- acetilglucosamina

Los resultados obtenidos en las pruebas de actividad quitinolítica para las tres cepas aisladas se muestran en la figura 3.6

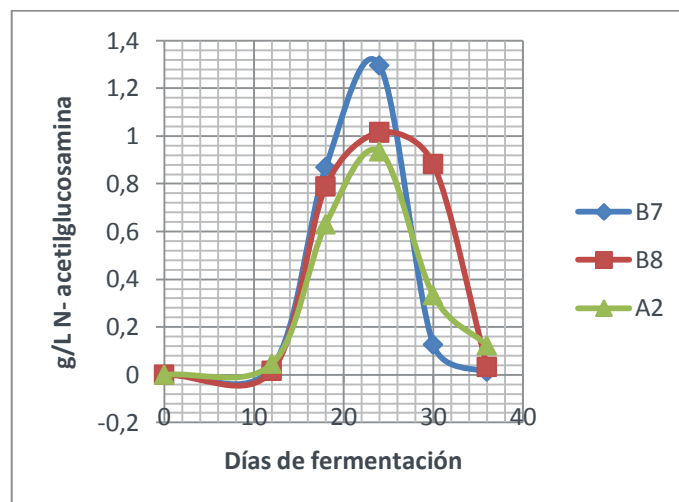


Figura 3.6 Valores de N- acetilglucosamina en los 36 días de fermentación de las tres cepas quitinolíticas aisladas.

### 3.20 Pruebas de control de ácaros a nivel de laboratorio

Cada uno de los tratamientos aplicados mostraron diferentes grados de incidencia sobre el ácaro (Tabla 3.12).

Tabla 3.5 Porcentaje de ácaros muertos a los 11 días de la aplicación de los tratamientos.

Tratamientos	% Muertos
1 B7	45,40
2 B8	53,73
3 A2	23,18
4 Quitosano	23,18
5 <i>Paecilomyces</i>	45,40
6 B7 + B8 + A2	57,46
7 B8 + Quitosano	53,73
8 B8+ <i>Paecilomyces</i>	76,41
9 A2 + Quitosano	32,58
10 B7 + Quitosano (5to día)	38,73
11 B8 + Quitosano(5to día)	53,73
12 A2 + Quitosano(5to día)	43,02
13 B7 + <i>Paecilomyces</i> (5to día)	0,96
14 B8 + <i>Paecilomyces</i> (5to día)	37,07
15 A2 + Quitosano + <i>Paecilomyces</i>	53,73

5toD: Aplicación de *Paecilomyces* al quinto día después de los microorganismos quitinolíticos.

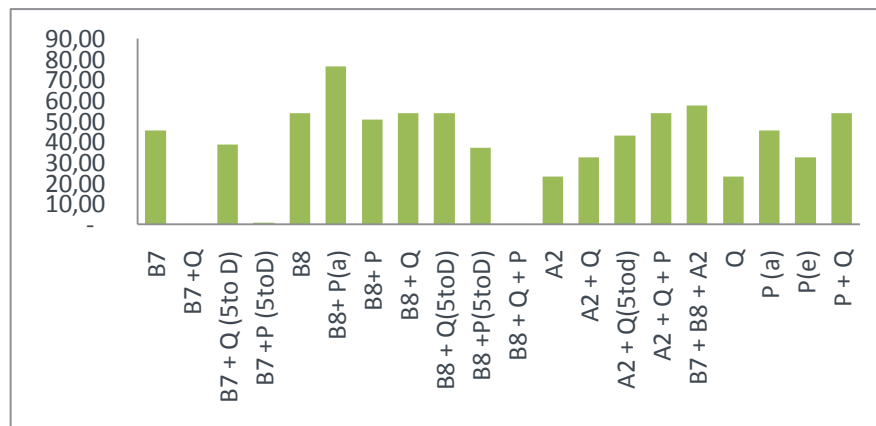


Figura 3.7 Porcentaje de ácaros muertos por cada tratamiento evaluado a nivel de laboratorio.

### 3.21 Escalado de los inóculos de cada cepa

En el escalado del volumen de los microorganismos se realizaron tres etapas, la primera de 1L, la segunda de 4 L y la última de 8L, en cada una de éstas se obtuvo una concentración diferente para las 3 cepas.

Tabla 3. 6. Concentraciones de las tres cepas aisladas en el escalado

Cepas	Concentración inicial	Concentración Primer escalado	Concentración Segundo escalado	Concentración Tercer escalado
B7	$1 \times 10^8$	$1 \times 10^7$	$1 \times 10^7$	$1 \times 10^7$
B8	$1 \times 10^7$	$1 \times 10^7$	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^6$
A2	$1 \times 10^8$	$1 \times 10^7$	$1 \times 10^7$	$1 \times 10^7$

### 3.22 Pruebas de fitotoxicidad

La fitotoxicidad se evaluó mediante una escala de grados que incluía 0 como ningún efecto y 6 como tóxico al 100%.

Tabla 3.7. Grado de fitotoxicidad de los 12 tratamientos frente a las plantas de rosas

Tratamientos	Aplicación de agroquímicos		Sin aplicación de agroquímicos	
	Día 1	Día 12	Día 1	Día 12
1 <i>Paecilomyces</i>	0	0	0	0
2 B7 + Quitosano	0	0	0	0
3 Quitosano	0	0	0	0
4 B7	0	1	0	1
5 A2 + Quitosano	0	1	0	1
6 B7 + <i>Paecilomyces</i> (5to día)	0	1	0	1
7 B8 + Quitosano	0	2	0	1
8 A2 + <i>Paecilomyces</i>	0	4	0	0
9 B8 + <i>Paecilomyces</i>	0	4	0	0
10 B8 + <i>Paecilomyces</i> (5to día)	0	4	0	2
11 A2 + <i>Paecilomyces</i> (5to día)	0	5	0	2
12 B7+B8+A2	0	5	0	2

### 3.23 Pruebas de control biológico a nivel de invernadero

#### 3.23.1 Eficacia de los microorganismos

Tabla 3.8. Porcentaje de la eficacia de los tratamientos evaluados con la prueba de Tukey al tercer día.

Tratamientos aplicados	N	Subconjunto	
	1	2	1
Blanco	8	8,3725	
<i>Paecilomyces</i>	8		76,5475
A2 + <i>Paecilomyces</i>	8		81,1625
B7 + <i>Paecilomyces</i> (5to día)	8		81,6075
Quitosano	8		85,3713
A2 + quitosano	8		85,5413
B7 + quitosano	8		87,3413
B8 + quitosano	8		89,2413
B8 + <i>Paecilomyces</i>	8		91,5350
Significación		1,000	,818

Tabla 3.9. ANOVA del porcentaje de eficacia, evaluada al tercer día, tomando en cuenta el nivel de foliolos, y los tratamientos.

FV	SC	GI	CM	F	P
Tratamientos	42841,589	8	5355,199	14,665	0
Foliolo	27,851	1	27,851	0,076	0,783
Error	22639,751	62	365,157		
Total	65509,191	71			

El significado de los enunciados de las columnas de la tabla están en el Anexo V

### 3.23.2 Población total de ácaros

Tabla 3.10. Porcentaje de la efectividad de los tratamientos evaluados con la prueba de Tukey al onceavo día.

Tratamientos aplicados	Subconjunto	
	2	1
Blanco	10,9793	
<i>Paecilomyces</i>		65,2217
B7 + quitosano		67,7419
B7 + <i>Paecilomyces</i> (5to día)		69,9369
B8 + quitosano		72,4597
Quitosano		74,5833
A2 + <i>Paecilomyces</i>		80,7768
A2 + quitosano		81,3616
8 + <i>Paecilomyces</i>		91,3621

Tabla 3.11. ANOVA del porcentaje de eficacia evaluada al onceavo día, tomando en cuenta la el nivel de foliolos, y los tratamientos.

<b>FV</b>	<b>SC</b>	<b>GI</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Tratamientos	33791,993	8	4223,999	9,797	0
Foliolo	649,357	1	649,357	1,506	0,224
Error	26730,892	62	431,143		
Total	398287,962	72			

Tabla 3.12. ANOVA de un factor para el nivel de foliolo.

	<b>SM</b>	<b>GL</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Inter-grupos	27,851	1	27,851	0,03	0,864
Intra-grupos	65481,34	70	935,448		
Total	65509,19	71			

Tabla 3.13. ANOVA de un factor para bloques

	<b>SM</b>	<b>GL</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Inter-grupos	2268,641	3	756,214	0,813	0,491
Intra-grupos	63240,549	68	930,008		
Total	65509,19	71			

Tabla 3.14. ANOVA de un factor para tratamientos

	<b>SC</b>	<b>GI</b>	<b>Cm</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Inter-grupos	42841,589	8	5355,199	14,884	0
Intra-grupos	22667,602	63	359,803		
Total	65509,19	71			

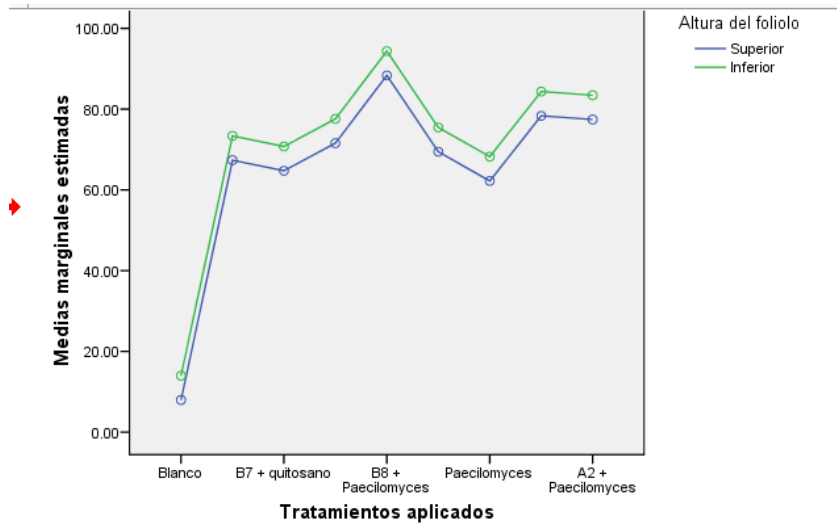


Figura 3.8 Medias marginales estimadas del porcentaje de eficacia de los tratamientos evaluado al onceavo día, en comparación con el foliolo inferior y superior.

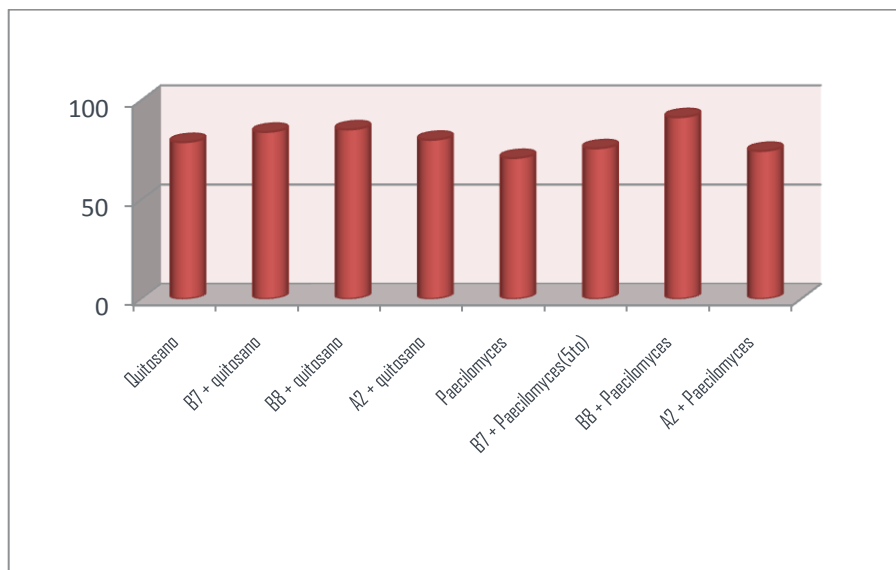


Figura 3.9 Porcentaje de eficiencia evaluado en los 11 días de seguimiento después de la aplicación de los tratamientos.

## CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

### 4.13 Preparación de quitina coloidal

Los desechos de los crustáceos como camarón, cangrejo y langosta están constituidos por una asociación de quitina, pigmentos, minerales y proteínas (Shirai, 2000), al utilizar el HCl en la quitina comercial (Sigma) se logró romper las proteínas y desmineralizar el polisacárido (Nava, 2009) ya que el exoesqueleto contiene una gran cantidad de calcio, el cual formó un complejo de cloruro de calcio, mediante una disociación del cloro y el hidrógeno, los cuales fueron removidos en los lavados posteriores; al final del proceso la estructura del exoesqueleto se modificó por la eliminación de proteínas y minerales, quedando libre la quitina (Soro, 2007).

### 4.14 Recolección y tratamiento de muestras

Las muestras tomadas de cascarilla necesitaron primeramente eliminar patas, cabezas y viseras del camarón para evitarse resultados falsos, es decir microorganismos que no estén orientados a trabajar directamente en la degradación del exoesqueleto del camarón y por el contrario su función este direccionada a la degradación muscular o visceral (Sastoque, 2005).

### 4.15 Preparación de los medios de cultivo

En la preparación de los medios de cultivo, se llevó el extracto de camarón a temperaturas de ebullición, con la finalidad de eliminar la alta cantidad de proteínas que este tipo de residuo contiene y posibles minerales que pudiesen interferir en el aislamiento (Sastoque, 2005).

Al igual que en estudios realizados con anterioridad por Hidalgo (2007), para el aislamiento de organismos productores de quitinasas extracelulares, en los tres medios de cultivo utilizados se usó quitina coloidal como un método de selección, debido a que en los océanos es uno de los componentes más abundantes y las bacterias quitinolíticas lo utilizan como fuente de carbono (Sastoque, 2005).

En el aislamiento de los microorganismos se trabajó con un rango de pH que varió desde 4.2 hasta 10, en donde el menor crecimiento fue a 4.2 con un 16% y el óptimo a un pH

de 9 con un 70%; esto se debe a que el hábitat de los microorganismos propios de la cascarilla de camarón está regulado por parámetros de alcalinidad (Hidalgo *et al.*, 2007); además en estudios realizados en el agua se ha comprobado un tipo de contaminación cáustica, ocasionada por la presencia de calcio y magnesio, que a su vez es consecuencia de la cal que utilizan en las piscinas para cultivo de camarón (Sastoque, 2005).

De los 10 tipos de microorganismos aislados, los más estrictos, crecieron solamente en un medio de cultivo, otros lograron crecer en dos y los más aptos crecieron en los tres, como se muestra en la Tabla 3.2.

En el agar Yeast Nitrogen Base (Sigma) crecieron un 30% del total de los microorganismos aislados, en el formulado un 60% y en el de quitina coloidal un 80%, siendo este medio de cultivo el más eficaz, puesto que favorece a la mayoría de los microorganismos.

Los microorganismos que se desarrollaron en el medio a base de quitina coloidal, son aquellos capaces de utilizar como única fuente de carbono la quitina; los organismos que no se desarrollaron en este medio de cultivo debieron tener carencia de ciertos microelementos que estuvieron presentes en la cascarilla del camarón, como carbonato de calcio, magnesio, sílice, fosfato y azufre, pero fueron eliminados en el tratamiento térmico que se aplicó (Sastoque, 2005).

El agar de quitina formulado, a pesar de los múltiples microelementos que contiene como:  $(\text{HN}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , alcanzó un rendimiento de tan solo el 60%, lo cual es consecuencia del bajo contenido en quitina coloidal (0.5%), ya que los microorganismos aislados toman como principal fuente de carbono la quitina, esto interfirió para que se desarrollen de la misma forma que en el agar de quitina coloidal que contenía 1,5% de la misma.

El agar Yeast Nitrogen Base (Sigma) está compuesto por nitrógeno, aminoácidos, minerales y vitaminas, pero sin ninguna fuente de carbono, esta se agregó al medio en forma de quitina coloidal a 1.5%, para tener la certeza que es la única sustancia que se va a consumir; sin embargo, la gran mayoría de los microorganismos aislados no crecieron en este



medio, debido a que alguno de sus múltiples elementos (Anexo J) que lo componen interfirieron en su desarrollo actuando como inhibidores (Difco, 2009).

#### 4.15.1 Aislamiento de los microorganismos quitinolíticos

Dentro del aislamiento de los microorganismos quitinolíticos se obtuvieron en primera instancia 8 bacterias y 2 hongos. Las bacterias (B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7 y B8) se diferenciaron de acuerdo al color, forma, tamaño de la colonia y por su olor característico. Los hongos (A2 y A3) se diferenciaron por el color, tamaño de las hifas y olor. Algunas características de las bacterias aisladas en esta investigación coincidieron con los caracteres de los microorganismos quitinolíticos aislados por Sastoque (2005), como los colores de las colonias (Tabla 3.1) marrón, amarillo, blanco, naranja, rosado, aspecto cremoso y formas redondas.

Las cepas B5, B6, B7, B8, A2 y A3 crecieron en un rango de 15 a 35°C, siendo su temperatura óptima de 25 a 30°C; a su vez cada una de estas tenía un pH óptimo en el que se desarrollaron de mejor manera, variando desde 6 hasta 9; estos valores de pH encajan en el rango descrito por Felse y Panda (1999), para organismos quitinolíticos.

En la caracterización microscópica (Tabla 3.3) de las cepas se observó un 33% de hongos, 16.5% de cocos gram negativos, 16.5% de cocos gram positivos y el 33% restante bacilos gram positivos, en este último grupo se observó macroscópicamente una bacteria filamentosa.

El 25% de los microorganismos aislados son gram negativos y 75% gram positivos, estos datos coinciden con lo reportado por Sastoque (2005) con un 68% de gram positivos frente a un 32% de gram negativos en sus aislamientos de microorganismos quitinolíticos, partiendo de cascarilla de camarón.

Los mecanismos fisiológicos de estos microorganismos pueden explicarse como una regulación citoplasmática ya que en su pared celular se encuentran ácidos como: galacturónico, glucónico, aspártico, glutámico y fosfórico, los cuales le dan una carga negativa y disminuyen los valores de pH en la superficie, de tal forma que la pared celular

tiene la capacidad de absorber iones de hidrógeno y sodio generando un rechazo a los iones hidroxilo, es así como pueden crecer en ambientes alcalinos (Hidalgo *et al.*, 2007).

Una de las bacterias aisladas fue un *Actinomycete* spp, bacteria filamentosa como se menciona en (Hidalgo *et al.*, 2007), la misma que en ésta investigación mostró un carácter estrictamente quitinolítico puesto que no creció en ningún otro medio de cultivo que no contuviese quitina en su composición; además los cocos, bacilos y actinomycetos han sido reportados en la literatura como organismos quitinolíticos (Hidalgo *et al.*, 2007).

De la mayoría de los *Actinomycetes* que han sido reportados como quitinolíticos los más mencionados son *Nocardia orientales* y *Streptomyces cinereoruber*, y aunque en algunos estudios estos han sido aislados de medios con pH neutro y bajas condiciones de salinidad en este estudio al igual que en el realizado por Hidalgo (2007), la cepa es considerada como alcalófila y halotolerante por tener un excelente crecimiento en medios de cultivo con pH mayor a 9 (9.2) y concentraciones altas de sales (Hidalgo *et al.*, 2007).

Se determinó que B8 fue un *Actinomycetes* spp por análisis macroscópicos como olor a tierra generado por geosminas, compuestos sesquiterpenoides, anillados no saturados de carbono, oxígeno e hidrógeno; coloración de las colonias jóvenes blancas (figura 4.1) y al madurar en el reverso de color café. Microscópicamente se identificó como bacilo gram positivo, lo cual concuerda con el estudio realizado por Hidalgo (2007).

#### 4.15.2 Crioconservación de cepas

Las cepas A2, A3, B5, B6, B7 y B8 fueron colocadas en un medio que contenía infusión de cerebro y corazón (BD Difco), más glicerol al 15%, para su Crioconservación; la función del glicerol es impedir que el agua del medio líquido forme cristales al congelarse, los que pueden destruir las células de los microorganismos.

La infusión de cerebro-corazón, es un medio rico en nutrientes, capaz de lograr un desarrollo microbiano adecuado; cada uno de sus elementos (Anexo K) tiene una función específica en la conservación de las cepas, así: la infusión de cerebro de ternera y corazón vacuno junto con la peptona, son fuente de carbono, nitrógeno y vitaminas; la glucosa es el hidrato de carbono fermentable; el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el fosfato disódico otorga capacidad buffer (Salinas, 2008).

Otros puntos a tomar en cuenta son: La temperatura, la cual es recomendable que se encuentre en un rango de -20 a -70 grados centígrados, para lograr un mayor tiempo de conservación sin alteraciones en las cepas; la concentración de los microorganismos debe ser mínimo de  $1 \times 10^8$ , para que sean viables en el momento de su descongelación; finalmente es importante tener cuidado para no contaminar las muestras (Belmonte *et al.*, 2008).

#### 4.15.3 Pruebas de fitopatogenicidad

Se analizó el grado de incidencia patógena que las cepas aisladas a una concentración alta ejercen frente a la planta de rosa, razón por la cual fue necesario partir de una concentración de  $1 \times 10^8$ , la cual alcanzaron 4 de las 6 cepas con las que se trabajó (B7, B8, A2, y A3).

En las recuperaciones de las cepas se utilizó agua destilada y extracto de camarón para determinar si el extracto de camarón podía funcionar como inductor o activador de patogenicidad en las cepas. En los resultados se determinó que no existió diferencia alguna en las muestras vegetales inoculadas con agua destilada, frente a las inoculadas con el extracto de camarón.

La desinfección de las partes de la planta con jabón (Axió) y cloro fue necesaria para eliminar bacterias y hongos propios de la planta y evitar resultados falsos; sin embargo esta desinfección dejó más sensibles las muestras vegetales e incluso con algo de maltrato y necrosamiento en el tejido vegetal.

Las muestras vegetales inoculadas con los microorganismos quitinolíticos se dejaron en condiciones asépticas a temperatura ambiente por un lapso de 20 días, tiempo necesario para que tanto las bacterias como hongos puedan desarrollarse, además se lograron evaluar efectos posteriores como colonización y necrosamiento del tejido vegetal, finalmente al concluir los 20 días no se observó ningún tipo de necrosamiento ni de colonización interna.

Las bacterias fitopatógenas más reconocidas generalmente penetran de forma pasiva a través de estomas y otras aperturas naturales hasta llegar al apoplasto, donde las células vegetales constituyen una gran fuente de alimento (Palacios, 2002). Tomando en cuenta que las muestras vegetales utilizadas tiene como principal componente estructural la celulosa y

que los organismos quitinolíticos usan como fuente de alimento la quitina; comparando estos dos oligo polímeros, su estructura química es diferente por lo cual ninguna de las cepas aisladas tuvo la capacidad de degradar la celulosa ya que su maquinaria interna no está diseñada para degradar celulosa si no quitina (Avila, 2006).

#### 4.15.4 Pruebas de antagonismo

En las pruebas de antagonismo se determinó que *Paecilomyces fumosoroseus* frente a B8 y A2 no presentó ninguna reacción antagónica, de manera que *Paecilomyces fumosoroseus* puede trabajar como complemento de B8 y A2 sin ningún tipo de alteración entre sí.

*Paecilomyces fumosoroseus* mostró ser antagónicos frente a B7; debido a que *P. fumosoroseus* es un hongo reconocido por su actividad entomopatógena mas no por ser un microorganismo antagonista (Hernández, 1999), esto mostró que la actividad inhibitoria fue por parte de la cepa B7, la misma que por medio del mecanismo de competencia no ejerció algún tipo de inhibición puesto que el hongo usa como fuente de carbono la dextrosa y la cepa aislada la quitina, lo que indica que el efecto de antagonismo se produjo mediante la generación de toxinas (Méndez, 1999).

#### 4.15.5 Pruebas de actividad quitinolítica

##### 4.15.5.1 Curva de estandarización de N- acetilglucosamina

La quitina es un polisacárido insoluble que al hidrolizarse genera como producto final N-acetilglucosamina; este azúcar, a pesar de ser un monosacárido, en su estructura química es diferente a los demás azúcares debido a que posee grupos hidroxilos, un amino y un aldehído altamente reactivo que le da un carácter de reductor, es decir que ceden electrones y se oxidan; es por esta razón que se necesitó usar la técnica del ácido dinitroslicílico (DNS).

Esta técnica se basa en la oxidación de la N-acetilglucosamina la cual no reacciona fácilmente debido a la estabilidad conferida por su forma cíclica, por esta razón se calentó la

muestra, logrando que el anillo se abra y deje expuesto al aldehído que dió lugar a la reacción (Sastoque, 2005).

#### 4.15.5.2 Determinación de azúcares reductores producidas por los microorganismos aislados

Se trabajó con 3 cepas para determinar cuantitativamente la actividad quitinolítica medida en gramos de N- acetilglucosamina por cada litro. La fermentación se realizó por 36 días y las mediciones a partir del día 4, puesto que en lo reportado por Sastoque (2005) en los primeros días la producción del azúcar es mínima y es en el día 16 donde empiezan los cambios.

Los 36 días de fermentación se necesitaron porque la quitina es un polisacárido complejo de lenta degradación; además el medio contenía una cantidad de quitina de 1.5% como es lo recomendado por Sastoque (2005), ya que esta funciona como inductor en la producción de enzimas quitinolíticas.

Conforme a los resultados, se determinó que las tres cepas analizadas son quitinolíticas puesto que los valores de la N-acetilglucosamina son considerables: 1,3 para B7; 1,01 para B8 y 0,94 para A2.

Cabe recalcar que la cepa B7 tuvo una diferencia significativa frente a las otras dos cepas, en cuanto a la cantidad de N acetilglucosamina liberada en el día 24, siendo esta cepa la de mayor actividad quitinolítica. En segundo lugar está la cepa B8 la cual alcanzó estabilidad en la producción de N-acetilglucosamina en el período del día 18 al día 30 (Figura 3.6). Finalmente la cepa A2 es la que tuvo menor producción del monosacárido pero no con una gran diferencia con respecto a B8 (*Actinomycetes* spp).

La mayor cantidad de N- acetilglucosamina fluctúa entre el día 18 y 24, puesto que en los primeros días la degradación de la quitina es compleja y lenta; en los últimos días ya no existe la suficiente cantidad para que se produzca N-acetilglucosamina, aunque por otro lado este subproducto no es el único de la degradación sino también la quitobiosa y la quitotriosa, las mismas que no se están tomando en cuenta para la determinación de la reducción de azúcares, de ahí puede radicar los valores bajos del monosacárido en ciertos días (May *et al.*, 2000).

#### 4.15.6 Pruebas de control de ácaros a nivel de laboratorio

En las pruebas de control los ácaros utilizados no tuvieron ningún contacto con agroquímicos a lo largo de su ciclo de vida, desde huevos hasta adultos, es decir que la población evaluada incluía, hembras, machos, estados juveniles y estados adultos; todos estos sin precedentes de sensibilidad por causa de acaricidas.

Los diferentes tratamientos aplicados consistieron en combinaciones entre los 3 microorganismos quitinolíticos, el hongo *P. fumosoroseus* y quitosano.

Los tratamientos con más alto rendimiento fueron: B8 (*Actinomyces* spp) más *Paecilomyces* con 76,4% y la mezcla de los tres microorganismos quitinolíticos aislados con 57,4% de ácaros muertos ya que estos, al trabajar juntos lograron aumentar el grado de afección en este arácnido por el hecho de ser organismos productores de quitinasas, las mismas que tienen la capacidad de romper la quitina que es componente de su exoesqueleto.

Los tratamientos en los que se uso B7 (bacilo gram positivo) fueron 4, uno de ellos consistió en aplicar *Paecilomyces* al quinto día posterior a la aplicación del microorganismo quitinolítico puesto que estos dos fueron determinados antagonistas, de esta manera se evitó una interacción de inhibición entre ellos, sin embargo este tratamiento al igual que el aplicado en conjunto con quitosano tuvieron rendimientos bajos. Los mejores tratamientos de este grupo fueron la aplicación de B7 solo y en combinación con quitosano al quinto día (Figura 3.7).

Seis de los 7 tratamientos con B8 (*Actinomyces* spp) lograron rendimientos sobre el 50% e incluso B8 más *Paecilomyces* fue el mejor tratamiento a nivel de laboratorio con un 76,4% de rendimiento en cuanto a porcentaje de ácaros muertos, esto se debe a que la cepa B8 tiene una actividad quitinolítica de alrededor de 0,8gr/L, estable en un rango de 15 días aproximadamente (Figura 3.6) además que fue reconocida como un *Actinomyces*, el cual en la literatura ya ha sido reportado como organismo quitinolítico y al ser una bacteria filamentosa secreta enzimas extracelulares como quitinasas y glucanasas que ocasionan la lisis en la pared celular causando debilitamiento y pérdida de estabilidad (Hidalgo, 2008) y finalmente su muerte. La función de *Paecilomyces* es parasitar el ácaro después de que este haya sido lisado por el microorganismo.

En el caso de la cepa A2 (*Aspergillus* spp), a pesar que las combinaciones con el hongo entomopatógeno y con el quitosano tuvieron buenas respuestas, ésta reaccionó mejor al trabajar con *Paecilomyces* antes que con el quitosano; tanto A2 como el *P. fumosoroseus* son hongos, por esta razón reaccionaron mejor trabajando juntos.

El quitosano tuvo rendimientos bajos ya que actúa solamente (Soro, 2007), como inductor de multiplicación de microorganismos quitinolíticos, mientras que *Paecilomyces* si obtuvo un rendimiento alto por el mismo que hecho de ser un hongo entomopatógeno, estudiado especialmente en el ataque de ácaros (Hernández, 1999).

#### 4.15.7 Escalado de las cepas

En el escalado se utilizó quitina al 1,5% ya que se ha visto que en concentraciones inferiores la multiplicación de microorganismos no es óptima, la cantidad de NaCl se bajó a un 3% puesto que el 6% solo se usó como mecanismo de selección y en concentraciones más bajas, el desarrollo de los organismos es mejor (Sastoque, 2007). En los envases de multiplicación el volumen ocupado llegó solo hasta la mitad de su capacidad ya que esto permite una mejor aireación y por ende una mayor multiplicación (Doran, 1998). Las concentraciones finales de los microorganismos bajaron un poco, esto puede deberse a que la multiplicación se realizó dentro del laboratorio ubicado en Cayambe en el cual la temperatura baja hasta 6 grados centígrados en las noches y con ayuda de un calefactor sube a 12 grados, lo que se convirtió en un factor de inhibición de crecimiento ya que la temperatura de crecimiento de estos está entre los 15 y 35°C.

#### 4.15.8 Pruebas de fitotoxicidad

Las pruebas de fitotoxicidad se realizaron tomando dos puntos de referencia, el primero dos horas después de la aplicación y el segundo al completar el día 12.

En las evaluaciones realizadas con la rotación de agroquímicos en las rosas, adicional a la aplicación de los microorganismos quitinolíticos en el proceso de los 12 días de evaluación, en los primeros 4 no hubo ningún efecto, sin embargo al quinto día la planta de rosa se intoxicó, los grados de daños más altos fueron causados por la combinación de las tres cepas quitinolíticas, B8 y A2 solos y también acompañados con *Paecilomyces*. Los

agroquímicos que se aplicaron fueron: Domak, Acido cítrico, Fix green, Protec K, Acido cítrico y Agrotín.

En la evaluación realizada sin rotación de agroquímicos, en el punto de evaluación 1 no hubo ningún tipo de reacción y en el día 12 el grado de afectación llegó hasta 2 por efecto de borde a causa de los plaguicidas aplicados a las camas aledañas.

La combinación de los tres microorganismos quitinolíticos, de B7 (bacilo gram positivo), B8 (*Actinomyces* spp) y A2 (*Aspergillus* spp) ocasionaron las reacciones más fuertes de fitotoxicidad en la planta por lo que fueron eliminados para la siguiente fase a pesar de tener buenos rendimientos a nivel de laboratorio; hay que tomar en cuenta que la reacción de la planta cuando se aplicó la mezcla con *Paecilomyces* se minimizó y al mezclar con quitosano el efecto tóxico se redujo aún más.

La fitotoxicidad en la planta podría deberse a que al aplicar los organismos quitinolíticos ajenos a la planta ésta se volvió sensible poniendo en alerta su sistema de fitoalexinas y al aplicar adicionalmente los agroquímicos, su sistema de defensa entró en un estado de autodestrucción; otra alternativa pudo ser que las quitinasas al ponerse en contacto con el agroquímico se alteraron, modificando su sistema de trabajo y comenzaron a romper los enlaces glucosídicos de la celulosa.

#### 4.15.9 Pruebas de control biológico a nivel de invernadero

##### 4.15.9.1 Eficacia del control evaluada a los 3 días de la aplicación

En la evaluación del control de los tratamientos a nivel de invernadero se tuvo como variable dependiente el porcentaje de eficacia, el mismo que se calculó mediante la población inicial y final de ácaros vivos, este porcentaje hace referencia al grado de control que lograron los diferentes tratamientos en la población móvil de ácaros, también se trabajó con tres variables fijas independientes: tratamientos, bloques (repeticiones), y altura del foliolo evaluado.

Se determinó la significancia de cada una de las variables independientes mediante ANOVA de un factor, como se puede ver a continuación.

La significancia de 0,86 (Tabla 3.12) es mayor a 0,05, lo que indica que al evaluar el porcentaje de eficacia obtenido en la parte superior e inferior de la planta al tercer día



posterior a la aplicación de los tratamientos, estos dos grupos no mostraron tener una diferencia de eficacia significativa.

El valor de significancia de 0,49% (Tabla 3.13) obtenido en la evaluación de los porcentajes de eficacia comparando entre los cuatro bloques o repeticiones es superior al valor de 0,05; por lo que se acepta la igualdad en la eficacia obtenida en los cuatro bloques.

En el caso de los tratamientos la significancia de cero (Tabla 3.14) indica que si hubo una diferencia entre los porcentajes de eficacia, específicamente entre el blanco y el resto de tratamientos (Figura 3.8).

De tal forma que se acepta la hipótesis alternativa consistente en que: “A nivel de invernadero en el cultivo de rosas la utilización de un microorganismo quitinolítico aislado a partir de cascarilla de camarón en conjunto con el hongo *Paecilomyces fumosoroseus*, controlan en un nivel alto la cantidad de ácaros *Tetranychus urticae* fitopatógeno de rosas”. Tomando en cuenta que los tratamientos involucran un microorganismo aislado más el hongo y cada uno de estos se evaluó en un invernadero de rosas.

#### 4.15.10 Control de la población de una generación de ácaros

El control de la población final de ácaros se evaluó en el lapso de 11 días, porque es el tiempo en el que una generación de ácaros cumple su ciclo de vida.

De igual forma que en la evaluación que se realizó al tercer día, no existe diferencia en la eficacia comparada entre la altura de la planta (Anexo Q) y tampoco entre las cuatro repeticiones (Anexo R).

En el control mostrado por los tratamientos, existe una diferencia entre las medias estimadas del blanco y el resto de los tratamientos evaluados (Anexo S). El blanco tiene un porcentaje de eficacia tanto en el día 3 (Anexo T) como en el día 11 (Anexo U) inferior al 10% y los 8 tratamientos aplicados muestran un porcentaje de eficacia superior al 50%.

Estadísticamente no existió diferencia alguna en el porcentaje de eficacia en la parte inferior y superior de la planta, sin embargo tanto al tercero (Figura 3.8) como al onceavo día posterior a la aplicación, que el control en la parte inferior de la planta es mayor en

comparación con el porcentaje de eficacia presentado en la parte superior; esta diferencia se acentúa más en el día 11.

Comparando el grado de control que han ejercido los ocho tratamientos a lo largo de los 11 días sobre la población móvil de ácaros, se ha determinado que la combinación de la cepa quitinolítica aislada (Koch, 2006), B8 junto con el hongo entomopatógeno *Paecilomyces fumosoroseus*, mostró el grado de control más alto y eficiente sobre todo desde el día 3 hasta el día 7 (Figura 3.9). Este resultado coincidió con el control más alto obtenido por el mismo tratamiento en la fase de laboratorio.

## CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

1. Los microorganismos quitinolíticos aislados a partir de cascarilla de camarón se desarrollaron mejor en medio alcalino, con altas concentraciones de sal, clasificándose como alcalófilos y halófilos.
2. Para aislamiento de microorganismos quitinolíticos, el medio de cultivo más eficiente fue a base de quitina coloidal (1.5%), NaCl (6%) y extracto de camarón.
3. Los microorganismos quitinolíticos se desarrollaron de mejor manera en concentraciones de quitina coloidal superior a 1.5%, la misma que se constituyó en un criterio de selección por ser la única fuente de carbono.
4. El 20% de los microorganismos quitinolíticos aislados fueron hongos, y el 80% bacterias, dentro de estas 25% fueron cocos gram positivos, 25% cocos gram negativos, y el 50% bacilos gram positivos.
5. Uno de los microorganismos aislados de mayor importancia fue un *Actinomycetes*, bacteria filamentosa, bacilo gram positivo, con carácter estrictamente quitinolítico, olor a tierra, una coloración de las colonias jóvenes blanca y al madurar color café.
6. Las cepas B7, B8, A2 y A3 a una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC, suspendidas en base de agua destilada y extracto de camarón, aplicadas sobre hojas, tallos, botones, y raíces de la planta de rosa, variedad *Opium*, no mostraron ningún efecto patógeno, o de infección en un período de 20 días.
7. *Paecilomyces fumosoroseus* en interacción con las cepas B8 (*Actinomycetes*) y A2 (*Aspergillus*) no generaron ningún tipo de actividad antagónica.
8. La cepa B7 (bacilo gram positivo) mostró ser es un microorganismo antagonista frente al hongo entomopatógeno *Paecilomyces fumosoroseus*.

9. Los tratamientos que a nivel de laboratorio tuvieron los mejores rendimientos matando a *Tetranychus urticae*, fueron B8 + *Paecilomyces* con 76,4%, y A2 (*Aspergillus*) + B7 (bacilo gram positivo) + B8 (*Actinomycetes*) con 57,4%.

10. En cultivos libres de agroquímicos las plantas de rosas no mostraron un grado de toxicidad significativo frente a los 12 tratamientos aplicados, pero al ser sometidas a una rotación de agroquímicos en los días posteriores a la aplicación de: A2 y B8 en solución líquida, A2 en conjunto con *P. fumosoroseus*, B8 en combinación con *P. fumosoroseus* y las tres cepas quitinolíticas unidas, mostraron un alto grado de fitotoxicidad.

11. Los agroquímicos frente a los cuales las plantas mostraron intoxicación fueron: Domark, Fix green, ácido cítrico, agrotin, Protec K.

12. La susceptibilidad en los diferentes estados larvarios del ácaro depende de la cantidad de quitina que contenga el mismo, la facilidad de contacto, el reconocimiento y el tiempo de acción de las enzimas sobre la cutícula, por lo que el efecto de los microorganismos quitinolíticos, que secretan quitinasas requiere de períodos de tiempo más prolongados al de los acaricidas clásicos.

13. A nivel de invernadero se obtuvo en general un control por parte de todos los tratamientos aplicados, sin una diferencia estadísticamente significativa de algún tratamiento que difiera del resto.

14. Estadísticamente, las cuatro repeticiones realizadas son grupos homogéneos en donde no hubo una diferencia significativa en cuanto al porcentaje de eficacia.

**15.** Se concluye que la cepa quitinolítica B8, aislada a partir de cascarilla de camarón en conjunto con el hongo entomopatógeno *Paecilomyces fumosoroseus* lograron un control sobre el ácaro fitopatógeno *Tetranychus urticae* tanto a nivel de laboratorio con un 76,4%, como a nivel de invernadero con un 41,2% de control.

## CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

1. El exoesqueleto de los insectos está compuesto de una mezcla de proteínas y cadenas de moléculas conocidas como acetilglucosamina (componente de la quitina); es por esta combinación de proteínas que el exoesqueleto de los insectos puede ser usado como fuente de carbono para los microorganismos quitinolíticos aislados, se debería analizar el grado de desarrollo de los mismos en un medio de cultivo a base de exoesqueleto de ácaros.
2. Las tres cepas aisladas fueron caracterizadas como microorganismos quitinolíticos, sería recomendable para tener una base de datos identificar la clase, orden, familia, género y especie de las tres cepas.
3. En un período de 5 semanas analizar el día de mayor actividad quitinolítica, variando las concentraciones de quitina coloidal y NaCl, para determinar el mejor medio de cultivo.
4. Debido a la necesidad de reemplazar los químicos por elementos biológicos, la producción de estos debe estar orientada a un nivel industrial, por lo que es necesario implementar sistemas de escalado para producción masiva de microorganismos quitinolíticos.
5. Evaluar el nivel de infestación de la población de la plaga en el cultivo, antes de la aplicación del producto biológico.
6. Comparar la compatibilidad de los microorganismos quitinolíticos frente a los agroquímicos utilizados para control de plagas y enfermedades en rosas o a su vez programar las aplicaciones de este producto biológico de tal forma que no coincidan con aplicaciones de agroquímicos.
7. Es recomendable realizar de 3 a 4 aplicaciones, determinando los intervalos de acuerdo a la biología de la plaga a tratar, para lograr un nivel de mortandad más alto en *Tetranychus urticae*.
8. La aplicación de los productos biológicos debe hacerse por la tarde cuando la radiación solar no es muy fuerte, para evitar la muerte de las colonias por incidencia de rayos solares o por desecación.

9. Se recomienda realizar pruebas con organismos quitinolíticos, en rotación o en conjunto con productos biológicos proteolíticos para el control de ácaros.

10. Parte del éxito de la aplicación y el control, depende también de la elección de los equipos de aspersión; no debe tener desgaste ni daños en el orificio de la boquilla, de tal manera que se obtenga una aplicación uniforme, deberán ser nuevos o limpios, libres de residuos químicos, los cuales inhiben la viabilidad de las colonias.

11. Trabajar con organismos vivos involucra un período más largo hasta lograr ver los resultados esperados, también es importante trabajar en etapas de adaptación para que la planta no reaccione con respuestas de estrés, marchitándose o intoxicándose.

12. Para lograr establecer una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos aplicados, mediante una variabilidad de datos más alta, se recomienda realizar el ensayo con 8 repeticiones como mínimo.

## **BIBLIOGRAFÍA**

### **Libros**

- Bello, A. López, G. Trapero, A. (2000). Patología Vegetal. Ed. Aedos S. A. España. ed segunda. p 1-2.
- Carrero. J. Planes. S. (2008). Plagas del campo. Ed. Aedos. México. ed 13ra.
- Doran, P. (1998). Principios de la ingeniería de los bioproceso. Ed. Acribia. S. A. Australia. 7 p.p.
- Geigy, C. (2006). Manual de ensayos de campo en protección Vegetal. Basilea, Suiza. 2da ed. 30, 34, 83 p.p.
- Herrera, T. (1998). El reino de los hongos micología básica y aplicada. Ed. Unam. México. ed 2da. 345p
- Madigan, M., Martinko, J. (2004). Brock. Biología de los microorganismos. Editorial. Pearson Educación. España. ed 10ma.
- Ministerio de Agricultura y Ganadería. (2007). Productos fitosanitarios permitidos para la agricultura orgánica. Acuerdo ministerial N 177. Ecuador.
- Santamaría, M. (2007). Control de la población de ácaros (*Tetranychus* sp) utilizando tres extractos botánicos en el cultivo de rosas (*Rosas* sp) variedad *Latin Beaut* en Machachi-Pichincha. Ecuador.
- Vademécum agrícola, (2004). Diccionario de productos plaguicidas. Ed. Ediform. México. ed tercera. 34, 56, p.p.

### **Artículos**

- Aguano, G., Del Castillo, J., Galdeano, J., Sadaba, Uribarri, A. (2006). Cultivos de verano. Universidad Politécnica de Cartagena. Colombia

- Alcala, D., Marcano, J., Morales, M. (1999). Patogenicidad de *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces fumosoroseus* sobre adultos del picudo de la batata *Cylas formicarius elegantulus* Summers (Curculionidae). Rev. Fac. Agron. (LUZ). 16: 52-63, Brasil.
- Álvaez, M., Bravo, T., González, M., Pérez, D., Marroquín, S. (2004). Aislamiento de *Aeromonas* sp. productoras de aerolisina y enterotoxina en muestras de la red de agua potable. Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica, AC. Volumen 29. México.
- Alvarado, D., Flores, I., Guerreo, A., Zuleyka, V. (2001). Estudio fenotípico comparativo de consorcios microbianos con actividad quitinolítica de sedimentos marinos y rizósfera. Biol. Vol. 8 • N° 1. Perú.
- Arias, F., Ríos, L. (2002). Inmovilización de pectinas y/o celulasas y determinación de algunos de sus efectos en el jugo de papaya. Universidad Nacional de Colombia.
- Avila, A., Costamagna, V., Strumia, M. (2006). Obtención de quitina y quitosano a partir de caparzones de langostinos y centollas. Universidad Nacional de la Patagonia. Argentina.
- Agamez, E., Barrera, J., Oviedo, L., Zapata, R. (2008). Evaluación de sustratos y procesos de fermentación sólida para la producción de esporas de *Trichoderma* sp. Revista colombiana de biotecnología. Colombia.
- Bashan, L., Bashan, Y., Glick, B., Holguin, G. (2003). Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. Universidad de Waterloo. Canadá.
- Belmonte, A., Noguera, M., Contigiani, M., Gandini, V., Sutich, E. (2008). Estudio de métodos por congelación para la conservación y mantenimiento de cepas de *Gardnerella vaginalis*. Revista de bioquímica y patología clínica vol 72 N° 2. México.



- Boschi, E., Petriella, A. (1997). Crecimiento en crustáceos decápodos: resultados de investigaciones realizadas en Argentina. Universidad Nacional de Mar del Plata. Invest. Mar. Valparaíso, 25: 135-157, 1997. Argentina.
- Cabello, T. (1991). Captura de *Frankliniella occidentalis* (pergande) (Thys: Thripidae) en trampas de distintos colores en cultivos en invernaderos. Bol. San. Verg. Plagas. Vol 17. Colombia.
- Candela. M., Ezziyyani, M., Pérez, C., Sid, A., Requena. M. (2004). *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annum L.*) Anales de Biología 26: 35-45. Perú.
- Cancino, J., Fidalgo, P., Liedo, P., Ovruski, S. (1999). Perspectivas para la aplicación del control biológico de moscas de la fruta en Argentina.
- Cañizález, L., Castillo, C., Guédez, C., Olivar, R. (2009). Efecto antagónico de *Trichoderma harzianum* sobre hongos patógenos en postcosecha de la fresa (*Fragaria spp.*) Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. Venezuela.
- Carrillo, L., Gomez, M. (1998). Producción de quitinasa por una cepa de *Streptomyces griseoruber* aislada de la rizosfera de caña de azúcar. Universidad Nacional de Jujuy. Argentina.
- Ciampi, I., Collado, I., Costa, M., Fuentes, R., Nissen. J., Schobitz, R., y Venegas. E. (2005). Aislamiento e identificación de bacterias nativas del género *Bacillus cohn* antagonistas de cepas patógenas de *Fusarium spp.* En cala. Agro sur v.33 n.2 Valdivia. Chile.
- Contreras, N., Escalona, Y., Jimenez, N., Rodriguez, D. (2006). Patógenos del suelo en el cultivo de pimentón en la zona baja del Municipio Jiménez, Estado Lara. Bioagro v.18 n.1 Barquisimeto. Venezuela.

- Cottrell, M., Moore, J., Kirchman, D. (1999). Chitinases from Uncultured Marine. Microorganisms. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 65. pp 2553-2557. Canadá.
- Cruz, C. (2007). Estandarización del proceso de producción masiva del hongo *Trichoderma koningii* Th003 mediante fermentación bifásica a escala piloto. Universidad Javeriana- Colombia.
- Devine, G., Eza, D., Ogusuku, E., Furlong, E. (2008). Uso de insecticidas: contexto y consecuencias ecológicas. Rev Perú Med Exp Salud Publica. Perú.
- Hernández, I. (1999). Cepa mutante de *Paecilomyces fumosoroseus* sobreproductora de quitinasas con mayor virulencia contra mosquita blanca (*Bemisia tabaco*) y falso medidor de la col (*Trichopfusua ni*). Colombia.
- Hidalgo, B., Salgado, M., Sastoque, L. (2007). Producción de quitinasas extracelulares con una cepa alcalófila halotolerante de *Streptomyces* sp. aisladas de residuos de camarón. Revista Mexicana de Ingeniería Química. Volumen 6. México.
- Humber, R., Hansen, K., Wheeler., M. (2009). Isaria, Paecilomyces, Evlachovaea and Nomuraea. Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures. Ithaca, New York 14853-2901. (U.S.A).
- Isaza, T. (2002) “Producción masiva de una cepa de *Bacillus thuringiensis* (Bt-40) con actividad contra *Tecia solanívora* (Polilla guatemalteca de la papa) en sustrato líquido y sólido”. Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Averiana - Bogotá. Colombia.
- Felsen, P., Panda, T. (1999). Studies on applications of chitin and its derivatives. Bioproc. Eng 20 505-512. (U.S.A).
- Flores, D., Jiménez, H. (2007). Efecto de los microorganismos eficientes sobre las características del suelo y su incidencia en el desarrollo de zanahoria (*Daucus carota*) en un andisol. Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín. Vol.60, No.1. p.28. Colombia.

- Gevers, D., Hunt, D., Polz, M., Vahora, N. (2008). Conservation of the Chitin Utilization Pathway in the Vibrionaceae. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 74. p. 44-51. Canadá.
- Gutiérrez, A. (2007). Impacto en la salud humana y el medio ambiente del uso de agroquímicos en la horticultura del Partido de La Plata, Provincia de Buenos Aires, Argentina.
- Krishna, C. (2005). Solid state fermentation system an overview. Critical review in biotechnology. Vol25: 1-30. (U.S.A).
- Lang, S., Ren, J. (2001). Microbial reclamation of shellfish wastes for the production of chitinases. Enzyme and microbial technology. Volumen 28, 376-382 pp. (U.S.A).
- Larone. R. (1995). Medically important fungi: a guide to identification, 3rd ed. American society for microbiology, Washington, D.C. (U.S.A).
- Lomer, H., Lomer, C. (2002). Pathologie The insectes. Universidad Grrenwich. Inglaterra. 244p
- Nava, I. (2009). Demostración de la actividad de quitina desacetilasa en *Bacillus thuringiensis*. México.
- Martínez, M., Mercado, M., Pedroza, A., Sastoque, I., Quevedo, B. (2007). Producción de Quitinasa extracelular con una cepa alcalófila halotolerante de *Streptomyces* sp aislada de residuos de camarón. Revista mexicana de ingeniería química .vol. 6 pp. 137-146. México.
- Mendéz, V. (1999). Control biológico poscosecha en Uruguay. Rev. Horticultura Internacional. Nro 26.Uruguay.
- Mendoza, G., Piedrahita, A., Ramírez, E. (2006). Estudio económico comparativo del control manual vs. el control químico de *Peronospora sparsa* en *Rosa* sp. Colombia.

- Miller, L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Inglaterra.
- Mirabal, L. (2003). Los ácaros depredadores como agentes de control biológico. Rev. Protección Veg. Vol. 18 No. 3. Cuba.
- Morales, M. (2006). Manejo de nemátodos fitoparasíticos utilizando productos naturales y biológicos. Universidad de Puerto Rico.
- Orrierta, F., Larea, V. (2001). Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Manejo integrado de plagas. N 62. Pg 96-100. Costa Rica.
- Palacios, A. (2002). Genes implicados en la adaptación de *Erwinia chrysanthemi* al microambiente de la planta. Universidad politécnica de Madrid. España.
- Pérez, N. (2004). Manejo Ecológico de plagas. Centro de estudios de desarrollo agrario y rural-CEDAR. Universidad Agraria de la Habana, San José de las Lajas, Cuba.
- Roig, T. (2005). Desinfección química de *Pedilanthus tithymaloides* L. Poit. Rev. Cubana. Plan med. Cuba.
- Romero, C. (1986). Problemas relacionados con la optimización del uso del suelo agrícola. Revista de estudios Agro-sociales. Num 173. España.
- Rosas, J. (2003). Actividad biológica de los exudados y filtrado crudo de *Hirsutella thompsonii* (cepa HtM120I) sobre *Tetranychus urticae* Koch y otros artrópodos. Universidad de Colimba. México
- Sastoque, E. (2005). Aislamiento y selección de microorganismos productores de quitinasas a partir de residuos de concha de camarón con potencial biocontrolador. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia
- Shirai, K. (2000). Utilización de desechos de crustáceos para la obtención de quitina, quitosano, proteína y quitinasas mediante biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. México.

- Soro. M. (2007). Estudio de la obtención de quitosano a partir de caparazón de camarón (*Penaeus annamie*) y su aplicación en la estabilidad de una emulsión de aceite y agua. Escuela superior politécnica del litoral. Ecuador.
- Villalba, S. (2006). Control de ácaros en el cultivo de fresas mediante la utilización de extractos naturales (Salcedo- Cotopaxi). Ecuador.
- Yu, C., Lee, A., Bassler, B., Roseman, S. (1991). Chitin utilization by marine bacteria. Biological Chemistry. Vol. 266. Inglaterra.

### **Bibliografía electrónica**

- Araujo. A. (2001). Análisis sobre el cultivo de flores (III censo nacional agropecuario). Ecuador. Extraído el 27 de enero del 2010 de:  
[http://www.sica.gov.ec/censo/contenido/analisis\\_flores.pdf](http://www.sica.gov.ec/censo/contenido/analisis_flores.pdf).
- Benítez, S., Bentley, J., Bustamante, P. Corrales, L., Sánchez, L. (2007). Aislamiento de los microorganismos cultivables de la rizosfera de *Ornithogalum umbellatum* y evaluación del posible efecto biocontrolador en dos patógenos del suelo. México. Extraído el 23 de diciembre del 2009 de:  
[http://www.unicolmayor.edu.co/invest\\_nova/NOVA/nova8\\_artorig4.pdf](http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/nova8_artorig4.pdf)
- Braanker, W., Strijbosch, M. (2008). Flores etíopes de Holanda. Radio Nederland Wereldomroep. Holanda. Extraído el 01 de febrero del 2010 de:  
<http://static.rnw.nl/migratie/www.informarn.nl/holanda/economiaholandesa/act080509-flores-holanda-redirected>
- Cabello, A., Urbina, C., Villa, E., Tanaca, L., Hernández, S., reyes, e. (1989) Producción de enzimas por *Streptomyces* sp. creciendo con caparazón de camarón como sustrato. México. Extraído el 12 de diciembre del 2009 de:  
<http://bases.bireme.br/cgiin/wxislind.exe/iah/online>

- Cadena, E. (2008). Centro de estudios y análisis. Ecuador. Extraído el 20 del 2010:  
<http://www.hoy.com.ec/noticias-ecuador/exportacion-de-flores-para-el-mundo-293375-293375.html>
- Castillo, J. (2007). Compactación. México. Extraído el 11 de marzo del 2010 de:  
<http://www.monografias.com/trabajos15/compactacion/compactacion.shtml>
- Castillo, L. (2003). Hongos. Microbiología Agrícola. Capítulo 7. Argentina. Extraído el 11 de marzo del 2010 de: <http://www.unsa.edu.ar/matbib/micragri/micagricap7.pdf>
- Castro, K. (2007). El camarón ecuatoriano atrae a más clientes. Diario Expreso. Asociación de pesca blanca del Ecuador. Ecuador. Extraído el 08 de febrero del 2010 de:  
<http://www.pescablanca.com/>
- Casar, L. (2003). Estrategia de combate químico contra ácaro *Tetranychus* sp. En la producción de clavel bajo invernadero. Holanda. Extraído el 13 de febrero del 2010 de:  
<http://static.rnw.nl/migratie/www.informarn.nl/holanda/economiaholandesa/act080509-flores-holanda-redirected>
- Ceballos, M. (2005). Control biológico de plagas. México. Extraído el 12 de marzo del 2010 de: <http://www.monografias.com/trabajos29/control-plagas/control-plagas.shtml>
- Center, T., Hoddle, M., Driesche, T. (2006). Control de plagas y malezas por enemigos naturales. España. Extraído el 13 de marzo del 2010 de:  
[www.inta.gov.ar/manfredi/info/.../BOLETIN-entomol-7.pdf](http://www.inta.gov.ar/manfredi/info/.../BOLETIN-entomol-7.pdf) -
- Clavijo, A., Cotes, A. (2004). Evaluación de la actividad quitinasa en procesos de control biológico de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* en tomate, mediante fitoinvigorización de semillas en presencia de *Trichoderma koningii*. Colombia. Extraído el 23 de mayo de:  
[http://www.rcb.unal.edu.co/revista/vol1\\_num2/evaluacion\\_actividad.pdf](http://www.rcb.unal.edu.co/revista/vol1_num2/evaluacion_actividad.pdf).

- Darias, P. (2005). Los problemas de degradar el suelo. Uruguay. Extraído el 21 de enero del 2010 de: <http://riie.com.ar/?a=28949>
- Duiops, M. (2008). Hongos. México. Extraído el 14 de febrero del 2010 de: <http://www.duiops.net/seresvivos/hongos.html>
- Duran. C., Flores. I., Galvez. A., Garcia. R., Ramirez. M. (2003). Empleo de una enzima quitinolítica de *Serratia marcescens* para la obtención de carotenoproteínas a partir de cefalotórax de camarón. Tecnol. Ciencia. Colombia. Extraído de: [www.agroads.com.ar/detalle.asp?clasi=Bioestimulante organico-agriprotector](http://www.agroads.com.ar/detalle.asp?clasi=Bioestimulante%20organico-agriprotector)
- Fava, J., Trumper, E. (2004). Pulgones que atacan al cultivo de trigo. Argentina. Extraído el 13 de marzo del 2010 de: [www.inta.gov.ar/manfredi/info/.../BOLETIN-entomol-7.pdf](http://www.inta.gov.ar/manfredi/info/.../BOLETIN-entomol-7.pdf)
- Fick, K. (2007). Manejo integral del sistema suelo- planta. Colombia. Extraído el 22 de marzo de: [http://www.mundoanuncio.com/anuncio/especializacion\\_en\\_manejo\\_sostenible\\_del\\_sistema\\_sueloaguaplanta\\_en\\_el\\_tropico\\_bogota\\_cundinamarca\\_1175450584.html](http://www.mundoanuncio.com/anuncio/especializacion_en_manejo_sostenible_del_sistema_sueloaguaplanta_en_el_tropico_bogota_cundinamarca_1175450584.html)
- Frers, C. (2008). Los problemas de degradar el suelo. España. Extraído el 10 de marzo del 2010 de: <http://www.ecojoven.com/cinco/07/suelo.html>
- Garcia, J. (2004). La protección ambiental del suelo agrícola en canarias.México. Extraído el 23 de febrero del 2010 de: <http://www.ucm.es/info/ec/jec10/ponencias/414sanchezsanchez.pdf>
- Guerding, M. (2001). Control biológico una herramienta en la agricultura nacional. Ecuador. Extraído el 13 de marzo del 2010 de: <http://www.faceaucentral.cl/pdf/ecoengen-02/eco-p04-05.pdf>
- Guiraldo, J. (2007). Uso de hongos entomopatógenos. España. Extraído el 14 de febrero del 2010 de: <http://www.monografias.com/trabajos29/hongos-entomopatogenos/hongos-entomopatogenos.shtml>

- Gonzales, E. (2008). La importancia de la conservación del suelo. México. Extraído el 10 de marzo del 2010 de: <http://www.aeac-sv.org/pdfs/infoerosion.pdf>
- Gonzales, F. (2006). Medicina y maquillaje. Expreso Obregón. México. Extraído el 08 de febrero del 2010 de <http://www.expreso.com.mx/edicionimpresa/20061023/2/2.pdf>
- Estrada, E. (2010). Holanda, unos de los principales productores de flores a nivel mundial. Holanda. Extraído el 21 de enero del 2010 de: <http://www.oem.com.mx/oem/notas/n401539.htm>
- Heinlein, R. (2007). Entomología un mundo de maravillas. México. Extraído el 23 de marzo del 2010 de <http://entomologiaa5.blogspot.com/>.
- Hidalgo, C. (2000). Insuficiente producción de flores para exportar. El Universal. México. Extraído el 21 de enero del 2010 de: [http://www2.eluniversal.com.mx/pls/impreso/noticia.html?id\\_nota=11442&tabla=estados](http://www2.eluniversal.com.mx/pls/impreso/noticia.html?id_nota=11442&tabla=estados)
- Hipolito, O. (2008). Insecticidas Biorracionales. Puerto Rico. Extraído el 20 del 2010 de <http://academic.uprm.edu/ofarrill/HTMLobj-323/biorational.pdf>
- Jara, P., Montesdioca, F. (2007). Estudio económico de la cría masal del ácaro benéfico *Amblyseius californicus* para control de (*Tetranychus urticae*) en rosas. Ecuador. Extraído el 20 de enero del 2010 de: <http://www.uce.edu.ec/upload/20090210092827.pdf>
- Koch, A. (2006). Araña roja. México. Extraído el 11 de febrero del 2010 de: [http://www.agricultura.gva.es/rvfc/pdfs/fichas\\_tec/f\\_arana\\_roja.pdf](http://www.agricultura.gva.es/rvfc/pdfs/fichas_tec/f_arana_roja.pdf)
- Hutchinson, C. (2008). El hombre, responsable número uno de la desertificación México. Extraído el 11 de marzo del 2010 de: <http://www.calalberche.org/t3/page2.asp?Id=82765&Rf=41&Rt=4>
- La Rosa, J. Lorenzo. GA. Mascarini, L. (2006). Producción y calidad de Rosa híbrida ‘Grand Gala’ en cultivo con y sin suelo. Argentina. Extraído el 01 de febrero del 2010



de::www.maa.gba.gov.ar/agricultura\_ganaderia/floricultura/CULTIVO/84.doc+parametro  
s+calidad+de+flores&cd=4&hl=es&ct=clnk&gl=ec

- Ledesma, E. (2008). Equabiológica agroindustria de control biológico C.A. Ecuador. Extraído el 14 de marzo del 2010 de:  
[http://www.aebe.com.ec/data/files/Inovaciones/productos\\_biologicos.pdf](http://www.aebe.com.ec/data/files/Inovaciones/productos_biologicos.pdf)
- Mateos, P. (2006). Aislamiento y selección de microorganismos industriales. México. Extraído el 30 de noviembre del 2009 de: <http://nostoc.usal.es/sefin/MI/tema03MI.html>
- Miliarium, S. (2004). Generalidades. Perú. Extraído el 10 de marzo del 2010 de:  
<http://www.miliarium.com/Proyectos/SuelosContaminados/ArchivosMemoria/Contaminacion/suelos.asp>
- Morales, F. (2004). Enfermedades de plantas causadas por virus transmitidos por insectos. Colombia. Extraído el 11 de marzo de:  
<http://www.tropicalwhiteflyipmproject.cgiar.org/docs/docs/web-control-fisico-enfermedades-plantas.pdf>
- Moran, F. (2004). Producción de plantas ornamentales en macetas en invernadero. México. Extraído el 14 de marzo del 2010 de:  
[http://www.uaaan.mx/academic/Horticultura/Memhort04/02-Prod\\_plantas\\_ornam\\_macetaenvernadero.pdf](http://www.uaaan.mx/academic/Horticultura/Memhort04/02-Prod_plantas_ornam_macetaenvernadero.pdf)
- Moreno, A. (2007). Nemátodos. México. Extraído el 11 de marzo del 2010 de:  
<http://www.ucm.es/info/tropico/docencia/Textos/D5%20NEMATODOS.pdf>
- Pedramol, I. (2006). Camarón. Brasil. Extraído el 07 de febrero del 2010 de:  
<http://www.pedramol.com/mariscos/camaron.htm>
- Pérez, N. (1994). Control biológico, bases de la experiencia Cubana. Cuba. Extraído el 28 de marzo del 2009 de: <http://www.laneta.apc.org/emis/sustanci/plaguici/contro.htmg>

- Poe, A. (2003). Viviendo en Bahía una guía para los eco ciudadanos. Ecuador. Extraído el 11 de febrero del 2010 de: <http://www.riomuchacho.com/assets/reciclaje.pdf>
- Preesman. B. (2006). Guía del cultivo de la rosa. The Netherlands. Canadá. Extraído el 03 de febrero del 2010 de:  
[http://www.roskamhorticultura.com/filesroskam/file/rose\\_grow\\_esp.pdf](http://www.roskamhorticultura.com/filesroskam/file/rose_grow_esp.pdf)
- Ramirez, O., Arroyo, A. (1982). Actividad quitinolítica de *Entamoeba invadens*. Brasil. Extraído el 29 de enero de;  
<http://bases.bireme.br/cgiin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=7782&indexSearch=ID>
- Ramón, A., Rodas, F. (2009). El control orgánico de plagas y enfermedades de los cultivos y la fertilización natural del suelo. Ecuador. Extraído el 13 de marzo del 2010 de:  
[http://ifc.dpz.es/recursos/publicaciones/29/16/\\_ebook.pdf](http://ifc.dpz.es/recursos/publicaciones/29/16/_ebook.pdf)
- Risal, M. (2008). Protocolo de quitina coloidal. México. Extraído 21 de enero del 2010 de:  
<http://translate.google.com.ec/translate?hl=es&langpair=en%7Ces&u=http://vyoma108.blogspot.com/2008/01/colloidal-chitin-protocol.html>
- Sánchez, V. (2002). Control Biológico de malezas. Costa Rica. Extraído el 10 de enero del 2010 de: <http://web.catie.ac.cr/informacion/RMIP/rev64/control.pdf>
- Salazar, D. (2007). Control biológico de plagas. México. Extraído el 14 de febrero del 2010 de:  
[http://www.foroswebgratis.com/mensajee\\_re\\_control\\_biologico\\_de\\_plagas\\_amblyseius\\_californicus-92099-728248-1-2531305.htm](http://www.foroswebgratis.com/mensajee_re_control_biologico_de_plagas_amblyseius_californicus-92099-728248-1-2531305.htm)
- Suquilanda. M. (2001). Alternativas orgánicas en floricultura. Ecuador. Extraído el 01 de febrero del 2010 de:

[http://www.sica.gov.ec/agronegocios/productos%20para%20invertir/organicos/organicos\\_ecuador/flores\\_organicas.htm](http://www.sica.gov.ec/agronegocios/productos%20para%20invertir/organicos/organicos_ecuador/flores_organicas.htm)

- Suquilanda, M. (2003). Manejo integrado de plagas en el cultivo del arroz. Ecuador. Extraído el 13 de marzo del 2010 de:  
<http://www.opsecu.org/bevestre/revistas/Dr.%20Ar%C3%A1uz/MIPARROZ.pdf>
- Universidad de Tolima. (2006). Desarrollo de cultivares de plátano de consumo local resistentes a la *Sigatoka negra* para América Latina Convenio de Cooperación Técnica BID/IICA FTG/RF-9901-RG. Colombia. Extraído el 12 de abril del 2010 de:  
[http://www.fontagro.org/Projects/9Platano/final\\_infotec\\_consolidado\\_99\\_01.pdf](http://www.fontagro.org/Projects/9Platano/final_infotec_consolidado_99_01.pdf)

### **Corporaciones**

- AsturnaturaDB. (2010). Rosáceas. Costa Rica. Extraído el 02 de febrero del 2010 de:  
<http://www.asturnatura.com/familia/rosaceae.html>
- Ayudaproyecto. (2007). Resumen del estudio de mercado de flores. Boletín num. 23. Perú. Extraído el 01 de febrero del 2010 de :  
<http://www.ayudaproyecto.com/boletin/47.htm>
- Bayer. (2010). Plagas que afectan a las rosas. (U.S.A.). Extraído el 04 de febrero del 2010 de: <http://www.es.bayeradvanced.com/articulo/insectos-que-atacan-a-las-rosas.html>
- Banco Central del Ecuador. (2006). Flores. Ecuador. Extraído el 3 de noviembre del 2009 de: <http://www.sica.gov.ec/cadenas/flores/index.html>
- Canelos, F. (2008). CBA control biológico. Colombia. Extraído el 14 de marzo del 2010 de: <http://www.agroecuador.com/web/index>.
- Chemtura Corporation. (2010). Producción de productos orgánicos. México. Extraído el 17 de febrero del 2010 de: <http://www.chemtura.com/bu/v/index.jsp?vnextoid=>

- Corporación de Promoción de Exportaciones e Inversiones (CORPEI). (2009). Descripción del sector del camarón en Ecuador. Ecuador. Extraído el 07 de febrero del 2010 de: [www.corpei.org/contenido.ks%3FcontenidoId%3D3001+CAMARON&cd](http://www.corpei.org/contenido.ks%3FcontenidoId%3D3001+CAMARON&cd)
- Institución estatal de investigación, certificación y acompañamiento al sector agropecuario nacional (CORPOICA). (2006). Un vistazo al mercado de las flores. Colombia. Extraído el 28 de enero del 2010 de: <http://www.corpoica.org.Publicaciones/Estrategiasdeinnovacintecnologicasparaelsectorfloricultor.pdf>
- Cruz, M. (2010). Instituto Oceanográfico de la Armada del Ecuador (INOCAR). Ecuador. Extraído el 4 de enero del 2010 de: [www.hoy.com.ec/...ecuador/inocar-advierte-temporal-durante-esta-semana-en-las-costas-ecuatorianas-400167.html](http://www.hoy.com.ec/...ecuador/inocar-advierte-temporal-durante-esta-semana-en-las-costas-ecuatorianas-400167.html)
- Departamento de protección vegetal. (2003). Metodología. Uruguay. [http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/Curso\\_CB/Anexo\\_practicos.pdf](http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/Curso_CB/Anexo_practicos.pdf)
- Difco. (2009). Yeast Nitrogen Base. (U.S.A). Extraído el 6 de febrero del 2010 de: [http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/Yeast\\_Media.pdf](http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/Yeast_Media.pdf)
- Environmental Protection Agency (EPA). (1990). Guides to Pollution Prevention. The Pesticide Formulating Industry. (U.S.A.). Extraído el 31 de enero del 2010 de: [http://org/Agencia\\_de\\_Protecci%C3%B3n\\_Ambiental\\_de\\_los\\_Estados\\_Unidos](http://org/Agencia_de_Protecci%C3%B3n_Ambiental_de_los_Estados_Unidos)
- Instituto de Fitopatología y Fisiología Vegetal. (2003). Dinámica de la producción en un cultivo de rosas. Argentina. Extraído el 21 de enero del 2010 de: [http://www.maa.gba.gov.ar/agricultura\\_ganaderia/floricultura/SANIDAD/86.doc](http://www.maa.gba.gov.ar/agricultura_ganaderia/floricultura/SANIDAD/86.doc).
- Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Quito-Ecuador. (2005). Estrategia de control del ácaro *Tetranychus urticae* en babaco de invernadero. Extraído el 18 de enero del 2010 de :

[http://mail.iniapecuador.gov.ec/isis/view\\_detail.php?mfn=4798&qtype=search&dbinfo=PADIPR&words=TETRANYCHUS%20URTICAE](http://mail.iniapecuador.gov.ec/isis/view_detail.php?mfn=4798&qtype=search&dbinfo=PADIPR&words=TETRANYCHUS%20URTICAE)

- Organización Mundial de la Salud (OMS). (1993). Tecnología de control aplicable a la formulación y el envasado de plaguicidas. p. 82. Ginebra. Extraído el 13 de Mayo de:  
<http://bases.bireme.br/cgi/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&nextAction=lnk&base=MAILLIL&lang=p&exprSearch=CH1.1&>
- Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca. (2003). Listado de los plaguicidas prohibidos en Ecuador. Ecuador. Extraído el 13 de marzo de:  
<http://www.agrocalidad.gov.ec/inocuidad/PLAGUICIDASPROHIBIDOS.pdf>
- Servicio Nacional de Sanidad Agraria. (2010). Procedimiento para la preparación de hongos entomopatógenos. Perú. Extraído el 14 de febrero del 2010 de:  
[http://www.senasa.gob.pe/0/modulos/JER/JER\\_Interna.aspx?ARE=0&PFL=2&JER](http://www.senasa.gob.pe/0/modulos/JER/JER_Interna.aspx?ARE=0&PFL=2&JER)
- Todo agrícola Ecuador S.A. (2009). Plaguicidas. Ecuador. Extraído el 14 de febrero del 2010 de: <http://www.agrocalidad.gov.ec/inocuidad/PLAGUICI.pdf>

## ANEXOS

### Anexo A

Tabla 1. Número y combinaciones de tratamientos usados en el ensayo a nivel de laboratorio.

<i>N<sub>o</sub></i>	<i>Tratamiento</i>	<i>Repetición</i>
1	B8 con goteo de pipeta	2
2	B8 con inmersión de 30 segundos	2
3	B8 + <i>P. fumosoroseus</i> con goteo de pipeta	2
4	B8 + <i>P. fumosoroseus</i> con inmersión de 30 segundos	2
5	B8 + quitosano con goteo de pipeta	2
6	B8 + quitosano con inmersión de 30 segundos	2
7	B8 + <i>P. fumosoroseus</i> + quitosano con goteo de pipeta	2
8	B8 + <i>P. fumosoroseus</i> con inmersión de 30 segundos	2
9	B8 + <i>P. fumosoroseus</i> con goteo de pipeta con 5 días de intervalos	2
10	A 2 con goteo de pipeta	2
11	A2 con inmersión de 30 segundos	2
12	A2 + <i>P. fumosoroseus</i> con goteo de pipeta	2
13	A2 + <i>P. fumosoroseus</i> con inmersión de 30 segundos	2
14	A2 + quitosano con goteo de pipeta	2
15	A2 + quitosano con inmersión de 30 segundos	2
16	A2 + <i>P. fumosoroseus</i> + quitosano con goteo de pipeta	2
17	A2 + <i>P. fumosoroseus</i> con inmersión de 30 segundos	2
18	A2 + <i>P. fumosoroseus</i> con goteo de pipeta con 5 días de intervalos	2
19	B7 con goteo de pipeta	2
20	B7 con inmersión de 30 segundos	2
21	B7 + <i>P. fumosoroseus</i> con goteo de pipeta	2
22	B7 + <i>P. fumosoroseus</i> con inmersión de 30 segundos	2
23	B7 + quitosano con goteo de pipeta	2
24	B7 + quitosano con inmersión de 30 segundos	2
25	B7 + <i>P. fumosoroseus</i> + quitosano con goteo de pipeta	2
26	B7 + <i>P. fumosoroseus</i> con inmersión de 30 segundos	2
27	B7 + <i>P. fumosoroseus</i> con goteo de pipeta con 5 días de intervalos	2
28	<i>P. fumosoroseus</i> con goteo de pipeta	2
29	<i>P. fumosoroseus</i> con inmersión de 30 segundos	2
30	<i>P. fumosoroseus</i> + quitosano con goteo de pipeta	2
31	<i>P. fumosoroseus</i> + quitosano con inmersión de 30 segundos	2
32	Quitosano con goteo de pipeta	2
33	Quitosano con inmersión de 30 segundos	2
34	Blanco con goteo de pipeta	2
35	Blanco con inmersión de 30 segundos	2

Anexo B

Tabla 2. Ensayos iniciales para el aislamiento

	<i>Agar</i>	<i>Caparazón</i>	<i>Agua estéril</i>	<i>Dilución</i>
1	Agar 1	Licuado	destilada	10 <sup>-1</sup> .
2	Agar 1	Licuado	destilada	10 <sup>-2</sup> .
3	Agar 1	Licuado	destilada	10 <sup>-3</sup> .
4	Agar 1	Licuado	peptonada	10 <sup>-1</sup> .
5	Agar 1	Licuado	peptonada	10 <sup>-2</sup> .
6	Agar 1	Licuado	peptonada	10 <sup>-3</sup> .
7	Agar 1	Molido	destilada	10 <sup>-1</sup> .
8	Agar 1	Molido	destilada	10 <sup>-2</sup> .
9	Agar 1	Molido	destilada	10 <sup>-3</sup> .
10	Agar 1	Molido	peptonada	10 <sup>-1</sup> .
11	Agar 1	Molido	peptonada	10 <sup>-2</sup> .
12	Agar 1	Molido	peptonada	10 <sup>-3</sup> .
13	Agar 2	Licuado	destilada	10 <sup>-1</sup> .
14	Agar 2	Licuado	destilada	10 <sup>-2</sup> .
15	Agar 2	Licuado	destilada	10 <sup>-3</sup> .
16	Agar 2	Licuado	peptonada	10 <sup>-1</sup> .
17	Agar 2	Licuado	peptonada	10 <sup>-2</sup> .
18	Agar 2	Licuado	peptonada	10 <sup>-3</sup> .
19	Agar 2	Molido	destilada	10 <sup>-1</sup> .
20	Agar 2	Molido	destilada	10 <sup>-2</sup> .
21	Agar 2	Molido	destilada	10 <sup>-3</sup> .
22	Agar 2	Molido	peptonada	10 <sup>-1</sup> .
23	Agar 2	Molido	peptonada	10 <sup>-2</sup> .
24	Agar 2	Molido	peptonada	10 <sup>-3</sup> .
25	Agar 3	Licuado	destilada	10 <sup>-1</sup> .
26	Agar 3	Licuado	destilada	10 <sup>-2</sup> .
27	Agar 3	Licuado	destilada	10 <sup>-3</sup> .
28	Agar 3	Licuado	peptonada	10 <sup>-1</sup> .
29	Agar 3	Licuado	peptonada	10 <sup>-2</sup> .
30	Agar 3	Licuado	peptonada	10 <sup>-3</sup> .
31	Agar 3	Molido	destilada	10 <sup>-1</sup> .
32	Agar 3	Molido	destilada	10 <sup>-2</sup> .

	<i>Agar</i>	<i>Caparazón</i>	<i>Agua estéril</i>	<i>Dilución</i>
33	Agar 3	Molido	destilada	10 <sup>-3</sup> .
34	Agar 3	Molido	peptonada	10 <sup>-1</sup> .
35	Agar 3	Molido	peptonada	10 <sup>-2</sup> .
36	Agar 3	Molido	peptonada	10 <sup>-3</sup> .
37	Agar 1	Blanco	destilada	-
38	Agar 2	Blanco	destilada	-
39	Agar 3	Blanco	destilada	-

#### Anexo C

Tabla 3. Resultados de las hojas inoculadas con las 4 cepas aisladas disueltas en dos tipos de bases.

<i>Cepa</i>	<i>Base</i>	<i>Muestra vegetal</i>	<i>Resultado</i>
B7	Agua	Hoja	Contaminación del ambiente
B7	Extracto	Hoja	Contaminación del ambiente
B8	Agua	Hoja	Contaminación del ambiente
A1	Extracto	Hoja	Hoja en perfecto estado
A2	Agua	Hoja	Esporulación externa en la hoja
A2	Extracto	Hoja	Esporulación externa en la hoja
A3	Agua	Hoja	Colonización en toda la hoja
A3	Extracto	Hoja	Colonización en toda la hoja
Blanco	Agua	Hoja	Contaminación del ambiente
Blanco	Extracto	Hoja	Hoja seca

#### Anexo D

Tabla 4. Resultados de los botones inoculados con las 4 cepas aisladas disueltas en dos bases diferentes.

<i>Cepa</i>	<i>Base</i>	<i>Muestra vegetal</i>	<i>Resultado</i>
B7	Agua	Botón	Maltrato de la flor
B7	Extracto	Botón	Maltrato de la flor
			Contaminación del ambiente
B8	Agua	Botón	Pudrición de puntas
B8	Extracto	Botón	Contaminación del ambiente
H2	Agua	Botón	Pudrición de puntas
H2	Extracto	Botón	Maltrato de flor
H3	Agua	Botón	Contaminación del ambiente
H3	Extracto	Botón	Pudrición de puntas
			Contaminación del ambiente
Blanco	Agua	Botón	Pudrición de puntas
Blanco	Extracto	Botón	Contaminación del ambiente



## Anexo E

Tabla 5. Resultados de los tallos inoculados con las 4 cepas aisladas disueltas en dos tipos de bases.

<i>Cepa</i>	<i>Base</i>	<i>Muestra vegetal</i>	<i>Resultado</i>
B7	Agua	Tallo	Contaminación del ambiente
B7	Extracto	Tallo	Contaminación del ambiente
B8	Agua	Tallo	Contaminación del ambiente
B8	Extracto	Tallo	Contaminación del ambiente
H2	Agua	Tallo	Colonización externa del hongo
H2	Extracto	Tallo	Colonización externa del hongo
H3	Agua	Tallo	Contaminación del ambiente
H3	Extracto	Tallo	No hay colonización
Blanco	Agua	Tallo	Contaminación del ambiente
Blanco	Extracto	Tallo	Contaminación del ambiente

## Anexo F

Tabla 6. Resultados de las raíces inoculados con las 4 cepas aisladas disueltas en dos bases diferentes.

<i>Cepa</i>	<i>Base</i>	<i>Muestra vegetal</i>	<i>Resultado</i>
B7	Agua	Raíz	Contaminación del ambiente
B8	Agua	Raíz	Contaminación del ambiente
B8	Extracto	Raíz	Raíz seca
H2	Agua	Raíz	Raíz en buen estado
H2	Extracto	Raíz	Contaminación del ambiente
H3	Agua	Raíz	Contaminación del ambiente

## Anexo G

Tabla 7. Resultados de la adaptación de las cepas quitinolíticas A3, A2, B8, B7 y de *P. fumosoroseus* a 6 diferentes medios de cultivo.

	<i>Medio de cultivo</i>	<i>B7</i>	<i>B8</i>	<i>A2</i>	<i>A3</i>	<i>P. fumosoroseus</i>
1	Agar base extracto de camarón	C.C	C.C	S.C	S.C	S.C
2	Agar formulado	C.C	C.C	C.C	S.C	S.C
3	Agar Yeast Nitrogen Base	S.C	S.C	C.C	S.C	S.C
4	PDA + quitina	S.C	C.C	S.C	S.C	S.C
5	PDA + extracto de camarón	C.C	C.C	C.C	S.C	C.C
6	PDA + extracto de camarón + quitina	C.C	C.C	S.C	S.C	S.C

C.C: con crecimiento; SC: sin crecimiento

Anexo H

Tabla 9. Mediciones de la curva de estandarización de N-acetilglucosamina.

<i>N<sub>o</sub></i>	<i>g/L</i>	<i>Absorbancia 540 mn.</i>
1	0,05	0,183
2	0,10	0,198
3	0,15	0,235
4	0,20	0,287
5	0,25	0,346
6	0,5	0,41
7	1,00	0,479
8	1,5	0,521
9	2,00	0,616
10	2,5	0,783

Anexo I

Tabla 8. Porcentaje de ácaros vivos, muertos y perdidos, obtenidos por cada tratamiento en las pruebas de control de ácaros a nivel de laboratorio.

	<i>Tratamiento</i>	<i>% vivos</i>	<i>% muertos</i>	<i>% perdidos</i>
1	B7	23,53	47,06	29,41
2	B7+ quitosano	61,54	7,69	30,77
3	B7 + quitosano (5to D)	25,81	38,71	35,48
4	B7 (5toD)	20,59	5,88	73,53
5	B8	6,25	18,75	75
6	B8+ <i>P. fumosoroseus</i> (a)	4,35	182,61	-86,96
7	B8+ <i>P. fumosoroseus</i> (e)	16,67	42,59	40,74
8	B8+quitosano	7,5	22,5	70
9	B8+quitosano(5toD)	9,09	27,27	63,64
10	B8+ <i>P. fumosoroseus</i> (5toD)	9,62	13,46	76,92
11	B8+quitosano+ <i>P. fumosoroseus</i>	4,35	-	95,65
12	A2	20	16	64
13	A2+quitosano	18,18	21,21	60,61
14	A2+quitosano(5toD)	18,52	33,33	48,15
15	A2+quitosano + <i>P. fumosoroseus</i>	7,41	22,22	70,37
16	<i>P. fumosoroseus</i> + quitina	8	24	68
17	blanco(a)	22,5	10	67,5
18	blanco(e)	22,06	2,94	75

(a): soluto agua estéril

(e): soluto extracto de camarón

Fuente: Autor

Anexo J

Tabla 10. Valores de absorbancia a 540nm obtenidos a partir de la fermentación de las tres cepas durante 36.

540nm	Día 0	Día 12	Día 18	Día 24	Día 30	Día36
B7	0	0,01	0,032	1,297	0,126	0,012
B8	0	0,02	0,016	1,016	0,883	0,034
A2	0	0,039	0,046	0,936	0,333	0,123

Anexo K

Tabla 11. Formulación de Yeast Nitrogen Base (Difco)

<i>Difco™ Yeast Nitrogen Base</i>	
<i>Fuente de nitrógeno</i>	
Sulfato de amonio	5.0 g
<i>Aminoácidos</i>	
L-Histidina Monohidroclorada	10.0 mg
LD-Metionina	20.0 mg
LD-Triptofano	20.0 mg
<i>Vitaminas</i>	
Biotina	2.0 g
Pantotenato de calcio	400.0 g
Ácido fólico	2.0 g
Inositol	2,000.0 g
Niacina	400.0 g
Acido p-Aminobenzoico	200.0 g
Pirodixina hidroclorada	400.0 g
Riboflavina .	200.0 g
Tiamina hidroclorada	400.0 g
<i>Compuestos suplementarios</i>	
Acido bórico	500.0 g
Sulfato	40.0 g
Potasio	100.0 g
Cloruro ferric	200.0 g
Sulfato de magnesio	400.0 g
Molibdato de sodio	200.0 g
Sulfato de zinc	400.0 g
<i>Sales</i>	
Monofosfato de potasio	1.0 g
Sulfato de magnesio	0.5 g
Cloruro de sodio	0.1 g
Cloruro de calcio	0.1 g

Fuente (D.P.V, 2003).

Anexo L

Tabla 12. Formulación de Brain Heart Infusion (BD Difco).

<i>Fórmula (en gramos por litro)</i>		<i>Instrucciones</i>
Infusión de cerebro de ternera	200.0	Disolver 52 g de polvo en un litro de agua destilada. Calentar a ebullición hasta su disolución total. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C.
Infusión corazón vacuno	250.0	
Peptona	10.0	
Cloruro de sodio	5.0	
Glucosa	2.0	
Fosfato disódico	2.5	
Agar	15.0	
pH final: 7.4 ± 0.2		

Fuente: (Salinas, 2008).

Anexo M

Tabla 13. Porcentaje de eficiencia de los 8 tratamientos aplicados, evaluados a las 48 horas, en hojas de la parte alta de la planta.

<i>Tratamientos</i>	<i>Repeticiones</i>					
	1	2	3	4	Promedio	% E
B7 + <i>P. fumosoroseus</i> (5to día)	40	100	100	97,62	84,4	74,05
B7 + quitosano	100	100	97,22	88,89	96,53	86,18
Quitosano	37,5	100	98,33	75	77,71	67,36
B8 + <i>P. fumosoroseus</i>	66,67	100	97,22	0	65,97	55,62
B8 + quitosano	95,83	66,67	96,43	94,44	88,34	77,99
<i>P. fumosoroseus</i>	0	100	94,44	50	61,11	50,76
A2 + quitosano	55,56	0	87,5	100	60,76	50,41
A2 + <i>P. fumosoroseus</i>	94,44	100	94,44	77,78	91,67	81,31
Blanco	3,92	6,22	4,74	26,53	10,35	0

Anexo N

Tabla 14. Porcentaje de eficiencia de los 8 tratamientos aplicados evaluados a las 48 horas en hojas de la parte baja de la planta.

<i>Tratamientos</i>	<i>Repeticiones</i>					
	1	2	3	4	Promedio	%E
B7 + <i>P. fumosoroseus</i> (5to día)	37,5	95	95,24	87,5	78,81	52,75
B7 + quitosano	100	25	98,33	89,29	78,15	52,1
Quitosano	93,33	100	98,81	80	93,04	66,98
B8 + <i>P. fumosoroseus</i>	100	72,73	98,44	100	92,79	66,74
B8 + quitosano	100	91,67	88,89	80	90,14	64,08
<i>P. fumosoroseus</i>	77,78	66,67	100	81,82	81,57	55,51
A2 + quitosano	100	100	100	85,71	96,43	70,37
A2 + <i>P. fumosoroseus</i>	88,89	50	75	68,75	70,66	44,6
Blanco	16,28	17,24	58,04	12,66	26,06	-

Anexo O

Tabla 15. Estadísticos descriptivos de la eficacia de los tratamientos evaluados al tercer día.

Tratamientos aplicados	Altura del foliolo	Media	Desv. típ.	N
Blanco	Superior	6,0150	2,31473	4
	Inferior	10,7300	2,22880	4
	Total	8,3725	3,28283	8
B7 + <i>P. fumosoroseus</i> (5to)	Superior	84,4050	29,62459	4
	Inferior	78,8100	27,77345	4
	Total	81,6075	26,75163	8
B7 + quitosano	Superior	96,5275	5,25761	4
	Inferior	78,1550	35,74762	4
	Total	87,3413	25,61167	8
quitosano	Superior	77,7075	29,13312	4
	Inferior	93,0350	9,16261	4
	Total	85,3713	21,60668	8
B8 + <i>P. fumosoroseus</i>	Superior	90,2775	9,75402	4
	Inferior	92,7925	13,39520	4
	Total	91,5350	10,93074	8
B8 + quitosano	Superior	88,3425	14,47235	4
	Inferior	90,1400	8,24505	4
	Total	89,2413	10,94631	8
<i>P. fumosoroseus</i>	Superior	71,5275	29,94756	4
	Inferior	81,5675	13,85763	4
	Total	76,5475	22,25910	8
A2 + quitosano	Superior	74,6550	22,63184	4
	Inferior	96,4275	7,14500	4
	Total	85,5413	19,41221	8
A2 + <i>P. fumosoroseus</i>	Superior	91,6650	9,62058	4
	Inferior	70,6600	16,14158	4
	Total	81,1625	16,65507	8
Total	Superior	75,6803	31,51322	36
	Inferior	76,9242	29,62790	36
	Total	76,3022	30,37540	72

Anexo P

Tabla 16. Estadísticos descriptivos de la eficacia de los tratamientos evaluados al onceavo día.

Tratamientos aplicados	Altura del foliolo	Media	Desv. típ.	N
Blanco	Superior	10,2571	,78214	4
	Inferior	11,7015	1,71260	4
	Total	10,9793	1,45440	8
B7 + <i>P. fumosoroseus</i> (5to)	Superior	69,2646	24,14987	4
	Inferior	70,8333	7,21688	3
	Total	69,9369	17,59751	7
B7 + quitosano	Superior	50,7437	18,13604	4
	Inferior	84,7400	23,59104	4
	Total	67,7419	26,64006	8
Quitosano	Superior	74,1667	21,14763	4
	Inferior	75,0000	30,00000	4
	Total	74,5833	24,03288	8
B8 + <i>P. fumosoroseus</i>	Superior	94,0967	4,86032	4
	Inferior	88,6275	4,90333	4
	Total	91,3621	5,38277	8
B8 + quitosano	Superior	68,2525	34,64844	4
	Inferior	76,6669	28,17556	4
	Total	72,4597	29,57975	8
<i>P. fumosoroseus</i>	Superior	60,0008	30,30731	4
	Inferior	70,4425	26,06924	4
	Total	65,2217	26,75944	8
A2 + quitosano	Superior	88,4375	19,18591	4
	Inferior	74,2857	25,66132	4
	Total	81,3616	22,29783	8
A2 + <i>P. fumosoroseus</i>	Superior	72,2231	13,02846	4
	Inferior	87,6197	12,65018	5
	Total	80,7768	14,47465	9
Total	Superior	65,2714	29,88666	36
	Inferior	71,5682	28,91388	36
	Total	68,4198	29,36813	72

Anexo Q

Tabla 17. ANOVA de un factor para el nivel de foliolo.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	27,851	1	27,851	,030	,864
Intra-grupos	65481,340	70	935,448		
Total	65509,190	71			

Anexo R

Tabla 18. ANOVA de un factor para bloques.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	2268,641	3	756,214	,813	,491
Intra-grupos	63240,549	68	930,008		
Total	65509,190	71			

Anexo S

Tabla 19. ANOVA de un factor para tratamientos.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	42841,589	8	5355,199	14,884	,000
Intra-grupos	22667,602	63	359,803		
Total	65509,190	71			



Anexo T

Tabla 20. Porcentaje de la efectividad de los tratamientos evaluados con la prueba de Tukey al tercer día.

Tratamientos aplicados	N	Subconjunto	
	1	2	1
Blanco	8	8,3725	
<i>P. fumosoroseus</i>	8		76,5475
A2 + <i>P. fumosoroseus</i>	8		81,1625
B7 + <i>P. fumosoroseus</i> (5to)	8		81,6075
Quitosano	8		85,3713
A2 + quitosano	8		85,5413
B7 + quitosano	8		87,3413
B8 + quitosano	8		89,2413
B8 + <i>P. fumosoroseus</i>	8		91,5350
Significación		1,000	,818

Anexo U

Tabla 21. Porcentaje de la efectividad de los tratamientos evaluados con la prueba de Tukey al onceavo día.

Tratamientos aplicados	N	Subconjunto	
	1	2	1
Blanco	8	10,9793	
<i>P. fumosoroseus</i>	8		65,2217
B7 + quitosano	8		67,7419
B7 + <i>P. fumosoroseus</i> (5to)	7		69,9369
B8 + quitosano	8		72,4597
Quitosano	8		74,5833
A2 + <i>P. fumosoroseus</i>	9		80,7768
A2 + quitosano	8		81,3616
B8 + <i>P. fumosoroseus</i>	8		91,3621
Significación		1,000	,246

Anexo V

Tabla 22. Nomenclatura utilizada en las tablas de ANOVA.

<i>Nomenclatura</i>	<i>Significado</i>
FV	Fuente de varianza
SC	Suma de cuadrados
CM	Cuadrado medio
P	Significancia

