



UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERIA
Facultad de Tecnología de la Construcción

Monografía

DESARROLLO DE UN BIOPLAGUICIDA A BASE DE *BACILLUS subtilis* Y DETERMINACIÓN DE SU EFECTO ANTIFÚNGICO CONTRA, *ALTERNARÍA alternata*, *FUSARIUM equiseti* Y *FUSARIUM SP* EN EL CULTIVO DE PAPA (*SOLANUM TUBEROSUM L*) EN CONDICIONES DE INVERNADERO

Para optar al título de Ingeniero Agrícola

Elaborado por

Br. Mercedes Adriana Ayestas Hernández

Br. Becker Josué Talavera Cruz

Tutor

Ing. José Mamerto Méndez Úbeda

Asesor

Dr. Leandro Páramo Aguilera

Managua, Nicaragua
Abril 2018



UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERIA
FACULTAD DE TECNOLOGIA DE LA CONSTRUCCION
DECANATURA

DEC-FTC-REF-No.100
Managua, Julio 13 del 2017

Bachilleres
MERCEDES ADRIANA AYESTAS HERNÁNDEZ
BECKER JOSUÉ TALAVERA CRUZ
Su atención

Estimados Bachilleres:

Es de mi agrado informarles que el PROTOCOLO de su Tema MONOGRAFICO, titulado "DESARROLLO DE UN BIOPLAGUICIDA A BASE DE BACILLUS SUBTILIS Y DETERMINACIÓN DE SU EFECTO ANTIFÚNGICO CONTRA, ALTERNARIA ALTERNATA, FUSARIUM EQUISETI Y FUSARIUM SP EN EL CULTIVO DE PAPA (SOLANUM TUBEROSUM L) EN CONDICIONES DE INVERNADERO". Ha sido aprobado por esta Decanatura.

Asimismo les comunico estar totalmente de acuerdo, que el **Ing. José Méndez**, sea el tutor de su trabajo final.

La fecha límite, para que presenten concluido su documento, debidamente revisado por el tutor guía será el **15 de Enero del 2018**.

Esperando puntualidad en la entrega de la Tesis, me despido.

Atentamente,


Dr. Ing. Oscar Gutiérrez Somarriba
Decano

CC: Protocolo
Tutor
Archivo*Consecutivo
IJGG*Dara

Dedicatoria

A Jehová Dios:

Padre omnipotente, creador del cielo y la tierra e ingeniero por excelencia, por ser mi principal pilar durante mi desarrollo profesional y de vida.

A mis padres:

Por ser mis ejemplos de superación, perseverancia y constancia, brindarme el apoyo que tanto necesite en este proceso y sobre todo darme las mejores lecciones de vida.

A mis hermanos:

Por estar allí motivándome, mostrándome sus logros y haciéndome ver que cada quien forja el suyo mediante esfuerzo, pasos firmes y constantes.

A mis familiares:

Por todo su cariño y comprensión.

A los docentes:

Por transmitirnos sus conocimientos para darnos la mejor preparación profesional, y formarnos integralmente.

Mercedes Adriana Ayestas Hernández

Agradecimientos

A Jehová Dios, por darme la vida y proveerme salud, iluminar mi mente para mejorar sobre las adversidades, sobre todo por ser mi guía y mi fortaleza en cada paso y mostrarme amor incondicional.

A mis padres:

Oscar Enrique Ayestas y Josefa Hernández González, quienes me dieron su apoyo sostenido a través del tiempo, y me ayudaron a tener las fuerzas para culminar mis estudios.

A mis hermanos:

Oscar Eligio Ayestas Hernández

Osmar Rafael Ayestas Hernández

Weizmann Noel Ayestas Hernández

Por estar en unión familiar y motivarme en mis esfuerzos día a día.

A mis familiares:

Gracias a todos quienes estuvieron para mi directa e indirectamente ayudándome en mi preparación profesional.

A nuestro asesor y tutor:

Dr. Leandro Páramo y tutor Ing. José Méndez por la asesoría proporcionada en el presente trabajo, recomendaciones y paciencia mostrada en todo el proceso de nuestra tesis.

Al personal del laboratorio de microbiología de aguas y al DISEMOSA, por abrirnos sus puertas para hacer uso de las instalaciones y apoyarnos con sus conocimientos en esta investigación.

Mercedes Adriana Ayestas Hernández

Dedicatoria

A Dios padre eterno, por darme la vida e iluminarme en mi camino para lograr mis metas, a mis padres que son mi guía, mi ejemplo y apoyo incondicional, a mis hermanos que me motivan a ser mejor cada día y a todos mis familiares que de una u otra manera me dieron fuerzas para seguir con sus buenos deseos y amistad.

Agradecimientos

A Dios, que me dio sabiduría y entendimiento para llegar al final de mi carrera y dar inicio a un nuevo ciclo en mi preparación profesional.

A mis padres Elio Cesar Talavera y Alejandrina Cruz por brindarme el apoyo moral, económico y transmitirme mediante su ejemplo las mejores enseñanzas que me permitieron tener buenas cualidades como la perseverancia, bondad, honradez y muchas más que me han abierto puertas en el camino del saber y la vida.

A mis hermanos Helio Cesar Talavera Cruz, Alex Talavera Cruz por ser mi compañía y con quienes comparto mis logros.

A mis amigos, quienes me dieron su mano y llenaron de alegría mis días de estudiante con su amistad incondicional.

Becker Josue Talavera Cruz

RESUMEN

Los problemas más comunes en los cultivos en Nicaragua vienen dados por la incidencia de las enfermedades fúngicas, lo que ha abierto nuevas posibilidades a la investigación con microorganismos como alternativa de control biológico debido a sus capacidades bioquímicas y facilidad de su manejo para la protección de cultivos. En esta investigación, se llevó a cabo el desarrollo de un bioplaguicida a base de *Bacillus subtilis* cepa DCL4-31 (F) y se determinó el efecto antagónico contra hongos fitopatógenos en condiciones de invernadero, dicha bacteria fue seleccionada por presentar los mejores resultados de inhibición (50-100%) en pruebas de antagonismo in vitro frente a las cepas de fitopatógenos *Alternaria alternata*, *Fusarium sp.*, *Fusarium equiseti*.

Para la formulación del bioplaguicida fue necesario realizar una corrida cinética con el fin de conocer la velocidad de crecimiento y la curva de calibración con su ecuación, para luego calcular la concentración en UFC/mL de cada una de las aplicaciones realizadas del bioplaguicida a los 25, 50 y 75 días después de siembra (DDS). Para llevar a cabo los ensayos a nivel de invernadero, fue necesario establecer las condiciones que incluían, la preparación del inóculo de los hongos fitopatógenos, la preparación y esterilización del sustrato por el método de solarización, instalación del invernadero, instalación del riego por goteo y nebulizadores para controlar las altas temperaturas en las horas más críticas del día y desinfección de semilla certificada de papa.

Como resultado el Bioplaguicida a base de *Bacillus subtilis* se inoculó en concentraciones en un rango de $5.32E+08$ a $6.21E+08$ UFC/mL; los resultados del análisis físico-químico realizado al sustrato, reflejaron valores altos en los contenidos de macro y micro nutrientes, siendo estos valores ideales para el desarrollo del cultivo de papa. En cuanto a los resultados de la temperatura dentro del invernadero, los valores obtenidos no fueron favorables para el cultivo, afectando el desarrollo y tuberización de la planta. La dosis aplicadas mostraron resultados de inhibición a los 50 DDS contra los hongos fitopatógenos *Alternaria alternata* y *Fusarium sp.* con una eficacia del bioplaguicida aplicado de 52.10% y 44.49% respectivamente; contra *Fusarium equiseti* no hubo inhibición en ninguna de las etapas evaluadas.

Índice

1. INTRODUCCION.....	1
2. ANTECEDENTES.....	2
3. JUSTIFICACIÓN.....	3
4. OBJETIVOS.....	4
4.1. OBJETIVO GENERAL.....	4
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
5. MARCO TEORICO	5
5.1. BIOPLAGUICIDA.....	5
5.1.1. Definición de bioplaguicida	5
5.1.2. Clasificación	5
5.1.3. <i>Bacillus subtilis</i>	6
5.1.4. Bioplaguicida a base de <i>Bacillus subtilis</i>	7
5.2. CRECIMIENTO MICROBIANO.....	7
5.2.1. Medición del crecimiento microbiano	9
5.2.2. Cinética de crecimiento microbiano	11
5.2.3. Fases de crecimiento microbiano	12
5.2.4. Cámara de Neubauer	13
5.3. DISEÑO EXPERIMENTAL	15
5.3.1. Diseños de bloques completos al azar	15
5.3.2. Características.....	15
5.3.3. Modelo.....	15
5.4. CULTIVO PAPA (<i>Solanum tuberosum</i> L).....	16
5.4.1. Origen.....	16
5.4.2. Taxonomía	16
5.4.3. Morfología	17
5.4.4. Variedad Monte Carlo.....	18
5.4.5. Enfermedades	19
5.5. INVERNADERO	20
5.5.1. Definición de invernadero	20
5.5.2. Tipos de invernadero	20

5.6. SUSTRATO.....	22
5.6.1. Propiedades	23
5.6.2. Materiales.....	23
5.7. RIEGO POR GOTEO	24
5.7.1. Ventajas e inconvenientes del riego localizado por goteo.....	24
5.7.2. Componentes de un sistema de riego por goteo.....	25
6. HIPOTESIS.....	27
6.1. Hipótesis de investigación	27
6.2. Hipótesis estadística.....	27
7. DISEÑO METODOLOGICO.....	28
7.1. LOCALIZACIÓN	28
7.1.1. Macro localización	28
7.1.2. Micro localización	29
7.2. PREPARACIÓN DEL PROTOTIPO DEL BIOPLAGUICIDA.....	30
7.2.1. Selección de la cepa Microbiana	30
7.2.2. Preparación del preinoculo de bacteria	30
7.2.3. Curva de crecimiento por determinación turbidimétrica	30
7.2.4. Conteo de bacterias por el método de diluciones seriadas y vaciado en placa	32
7.2.5. Determinación de la concentración del Bioplaguicida aplicado en ensayo de antagonismo en invernadero.....	32
7.3. PREPARACIÓN DE LAS CONDICIONES PARA ENSAYO DE ANTAGONISMO EN INVERNADERO.....	33
7.3.1. Preparación del inoculó de los hongos fitopatógenos para la confrontación con el bioplaguicida	33
7.3.2. Instalación del invernadero	34
7.3.3. Instalación del riego	35
7.3.4. Preparación y esterilización del sustrato	37
7.3.5. Preparación y llenado de macetas	38
7.3.6. Desinfección de semilla de papa	38
7.3.7. Siembra	38
7.3.8. Requerimientos temperatura ambiente y humedad relativa dentro del invernadero.....	39
7.3.9. Manejo Agronómico del cultivo	39
7.3.10. Diseño experimental	40

7.3.11. Inoculación de los tratamientos	41
7.4. DETERMINACION DEL EFECTO ANTAGONICO DEL BIOPLAGUICIDA CONTRA HONGOS FITOPATOGENOS EN INVERNADERO	41
7.4.1. Variables de desarrollo	42
7.4.2. Variables de cosecha	42
7.4.3. Variables de sanidad	43
7.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	44
8. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	45
8.1. PREPARACIÓN DEL PROTOTIPO DEL BIOPLAGUICIDA	45
8.1.1. Pre-Inoculo de la bacteria <i>Bacillus subtilis</i>	45
8.1.2. Curva de crecimiento microbiano	46
8.1.3. Concentración del Bioplaguicida aplicado en ensayo de antagonismo en invernadero	47
8.2. PREPARACIÓN DE LAS CONDICIONES PARA ENSAYO DE ANTAGONISMO EN INVERNADERO	48
8.2.1. Concentraciones de hongos Fitopatógenos	48
8.2.2. Esterilización del sustrato	49
8.2.3. Análisis Físico- Químico del sustrato	49
8.2.4. Determinación de temperatura y humedad relativa dentro del invernadero ..	53
8.3. DETERMINACION DEL EFECTO ANTAGONICO DEL BIOPLAGUICIDA CONTRA HONGOS FITOPATOGENOS EN INVERNADERO	54
8.3.1. Variables de desarrollo	54
8.3.2. Variables de cosecha	57
8.3.3. Variable sanidad	59
9. CONCLUSIONES	62
10. RECOMENDACIONES	63
11. BIBLIOGRAFÍA	64

Índice de Figura

Figura 1. Micrografía electrónica de una raíz de guisantes con células de <i>Bacillus subtilis</i>	6
Figura 2. Curva de Crecimiento en un cultivo por lotes	12
Figura 3. Cámara de Neubauer y detalle de rejilla	14
Figura 4. Partes de la planta de papa	17
Figura 5. Morfología del cultivo de papa variedad Monte Carlo.....	18
Figura 6. Orientación de invernadero	21
Figura 7. Túnel individual.	22
Figura 8. Componentes de riego por goteo	26
Figura 9. Macro localización del departamento de Managua.....	28
Figura 10. Micro localización del área de trabajo.	29
Figura 11. Procedimiento medición de absorbancia	31
Figura 12. Conteo de bacterias	32
Figura 13. Preparación del inoculó de hongo Fitopatógeno	33
Figura 14. Procedimiento recuento en cámara de neubauer	34
Figura 15. Riego por goteo tipo espagueti.....	36
Figura 16. Preparación del sustrato	37
Figura 17. Preparación y llenado de macetera	38
Figura 18. Siembra de tubérculos y primera inoculación de tratamientos.....	39
Figura 19. Distribución de tratamientos en invernadero.	40
Figura 20. Curva de Crecimiento ABS vs Tiempo	46
Figura 21. Curva de Calibración UFC/mL vs Absorbancia	47
Figura 22. Gráficos de Variables de desarrollo.....	55
Figura 23. Gráficos de variables de cosecha	58
Figura 24. Resultados de las variables sanidad	60

Índice de Cuadro

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de <i>Bacillus subtilis</i>	6
Cuadro 2. Características de la variedad Monte Carlo	18
Cuadro 3. Dimensiones de un Invernadero – túnel	21
Cuadro 4. Aplicaciones de tratamientos	41
Cuadro 5. Escala usada para mediación de severidad en los tratamientos	43
Cuadro 6. Concentración de bioplaguicida aplicado	47
Cuadro 7. Concentraciones de hongos Fitopatógeno	48
Cuadro 8. Resultados de análisis físico del sustrato utilizado.	49
Cuadro 9. Resultados de análisis químico del sustrato utilizado.	51
Cuadro 10. Resultados de temperatura y humedades relativas tomadas en situ.	53
Cuadro 11. Resultado de análisis de varianza y prueba de Tukey para variables de desarrollo	54
Cuadro 12. Resultados de análisis de varianza y prueba de Tukey para variables de cosecha	57

Índice de Anexos

Anexo 1. Resultados del análisis químico del sustrato	i
Anexo 2. Rango de clasificación aproximada de nutrientes en suelos	ii
Anexo 3. Resultados del análisis físico del suelo	iii
Anexo 4. Certificado de registro semilla de papa variedad Monte Carlo	iv
Anexo 5. Tubérculos semilla variedad Monte Carlo	iv
Anexo 6. Fertilización base con 15-15-15, 5 días después de la siembra	v
Anexo 7. Aporque del cultivo.....	v
Anexo 8. Control manual y químico de malezas.....	vi
Anexo 9. Medición de variables de desarrollo a los 25 y 50 DDS.....	vi
Anexo 10. Medición de la temperatura del sustrato.....	vii
Anexo 11. Síntomas de tizón tardío	vii
Anexo 12. Medición de variables de cosecha.....	viii
Anexo 13. Aplicación de controles de calidad en la esterilización de medios de cultivos.....	viii
Anexo 14. Distribución de los tratamientos para su aplicación en ensayo de antagonismo en invernadero.....	ix
Anexo 15. Instalación del invernadero	ix
Anexo 16. Severidad e incidencia de daño en el desarrollo del cultivo de papa de Alternaría alternata.....	x
Anexo 17. Severidad e incidencia de daño en el desarrollo del cultivo de papa de Fusarium sp	xi
Anexo 18. Severidad e incidencia de daño en el desarrollo del cultivo de papa de Fusarium equiseti.....	xii
Anexo 19. Cosecha del cultivo de papa de Alternaría alternata	xiii
Anexo 20. Cosecha del cultivo de papa de Fusarium sp	xiv
Anexo 21. Cosecha del cultivo de papa de Fusarium equiseti.....	xv
Anexo 22. Crecimiento radicular	xvi

1. INTRODUCCION

Un factor que limita la producción del cultivo de la papa son las enfermedades de raíz ocasionadas por hongos, las cuales pueden ocasionar pérdidas en los rendimientos productivos; debido a esto, se realizan frecuentes y excesivas aplicaciones de fungicidas químicos, que han contribuido al daño de los ecosistemas, a los humanos y degradando aún más el suelo (Lopez, 2008).

Los Bioplaguicidas son eficaces en el control de plagas y enfermedades agrícolas, sin causar daños graves al ambiente o empeorar la contaminación del medio ambiente. La investigación y el desarrollo de su aplicación práctica en el campo se enfocan en mitigar la contaminación ambiental causada por residuos de plaguicidas químicos, aunque por su naturaleza biológica también promueven el desarrollo sustentable de la agricultura. El desarrollo de nuevos Bioplaguicidas estimula la modernización de la agricultura y sin duda, va a reemplazar gradualmente a una cantidad de los plaguicidas químicos. En la producción agrícola, en ambientes libres de contaminación, los Bioplaguicidas son sustitutos ideales para sus homólogos químicos tradicionales (Nava-Pérez, García-Gutiérrez, & Vázquez-Montoya, 2012).

Según estudios las cepas que muestran una potente actividad antifúngica, pertenecientes a las especies *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens*, deben su actividad microbicida a la capacidad de producir tres tipos de lipopéptidos cíclicos en cantidades elevadas y homogéneas, sintetizados no ribosómicamente, pertenecientes a las familias de las iturinas, surfactinas y fengicinas que inhibe el crecimiento fúngico y provoca alteraciones morfológicas en hifas procedentes de esporas pre-tratadas con los metabolitos excretados por la bacteria (Orberá, Serrat, & Eduardo, 2014).

En el presente trabajo investigativo se realizó la formulación de un Bioplaguicida a base de *Bacillus subtilis* y la determinación del efecto antifúngico, contra *Alternaria alternata*, *Fusarium equiseti* y *Fusarium sp* en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum L*) en condiciones de invernadero ubicado en el la Universidad Nacional de Ingeniería, Recinto Universitario Simón Bolívar.

2. ANTECEDENTES

Por parte de la Universidad Autónoma Agraria de México, se presentó un estudio reflejando el potencial antifúngico de cepas de *Bacillus subtilis* y extracto de *Larrea tridentata* contra *Rhizoctonia solani* en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum*). Los resultados indicaron que las cepas bacterianas tuvieron una clara actividad antifúngica, al igual que el extracto de *L. tridentata*. Las cepas de *Bacillus* sobresalieron además por su efecto estimulador del crecimiento de las plantas y del rendimiento de papa, así como por el efecto sinérgico al mezclar las bacterias con el extracto de *Larrea*; un efecto potenciador similar se observó al aplicar la mezcla de las cepas. Los resultados obtenidos con las cepas de *Bacillus*, así como su mezcla con el extracto de *L. tridentata* son alentadores. Los mismos sugieren que podrían ser utilizados para apoyar programas de control biológico contra *R. Solani*. Sin embargo, es necesario continuar con más trabajos *in vitro* para validar estos resultados (Hernández-Castillo, y otros, 2008).

En Nicaragua mediante la empresa RAMAC la compañía BellRod Corporation de origen hondureña dio a conocer uno de sus productos a base de *Bacillus Subtilis*, *B. megaterium*, *B. amyloliquifasciens* y *B. licheniformis* el cual lleva el nombre de Tacre Bacillus © formulado para combatir enfermedades que causan las especies patógenas, fue diseñado para cultivos que presenten enfermedades como la pudrición de la raíz , la marchitez de raíz, pudrición de plántulas , tizón temprano , tizón tardío , mancha de la hoja , enfermedades de pudrición de tallo y moho en los cultivos (BellRod Corporation, 2016).

Por otro lado, la Universidad Nacional de Ingeniería mediante su área de investigación ha llevado a cabo un estudio con el objetivo de caracterizar microbiológica y molecularmente la diversidad microbiana cultivable de bioinsumos comerciales que se producen en nuestro país, en la búsqueda de *Bacillus subtilis* para el control de hongos fitopatógenos de interés agrícola. A partir del procesamiento de muestras de 4 bioinsumos comerciales, se obtuvo un total de 30 microorganismos aislados. Además, se realizó la identificación molecular de 14 bacterias en la búsqueda de cepas nativas de *Bacillus subtilis* y otras bacterias promisorias que fueron confrontadas *in vitro* frente a 3 hongos fitopatógenos aislados de cultivos de papa (*Solanum tuberosum*) identificados también vía molecular, siendo estos *Alternaria alternata*, *Fusarium equiseti* y *Fusarium sp.* De las cepas de bacterias evaluadas 6 obtuvieron potencial antagónico siendo dos de estas *B. subtilis*, presentando una de estas cepas un porcentaje de inhibición de, 98.33, 100.00 y 83.96 frente a (*Fusarium sp*), (*A. alternata*), (*Fusarium equiseti*), respectivamente (Flores & Roque, 2017).

3. JUSTIFICACIÓN

En el país, existen serias limitaciones en la oferta y desarrollo de bienes y servicios orientados a la producción orgánica, uno de los casos particulares son los bioinsumos (biocontroladores de plagas) producidos a nivel local, la mayoría de estos productos poseen un bajo nivel tecnológico por lo que se desconoce las alternativas de biocontrol (parasitoides, presencia del tipo de microorganismos, otros), no se tiene estudios del espectro de funcionamiento de los mismos (MAGFOR, 2005).

En el cultivo de papa en particular, los problemas más comunes en Nicaragua son el tizón tardío (*Phytophthora infestans*), tizón temprano (*Alternaria solani*), Sarna negra de la papa (*Rhizoctonia solani*), hongos que son favorecidos por las altas precipitaciones, disminuyen el rendimiento y generan pérdidas considerables a los productores, que recurren a grandes gastos económicos, haciendo uso excesivo de agroquímicos para tratar de controlar estas enfermedades. Para contrarrestar los efectos de contaminación de productos químicos y el daño causado por estas enfermedades han surgido productos biológicos (bioinsumos) los cuales son una alternativa viable; sin embargo, estos son obtenidos de forma artesanal y no cuentan con certificación (INTA, 2004).

La Universidad Nacional de Ingeniería frente a las exigencias del mercado nacional, inició una investigación sobre *Bacillus subtilis*, el cual demostró tener efecto antagónico contra hongos que causan grandes pérdidas en los cultivos. Después de realizar los estudios a nivel de laboratorio y evaluarlo in vitro, se vio la necesidad de llevarlo a un nivel mayor de investigación, para lo cual se realizó el diseño de un prototipo de bioplaguicida a base de *Bacillus subtilis*, evaluando el efecto antagónico en condiciones de invernadero contra diferentes hongos fitopatógenos (*Alternaria alternata*, *Fusarium equiseti* y *Fusarium sp*), del cultivo de papa variedad Monte Carlo. Esto ayudará en el proceso de obtener un producto nacional comprobando la efectividad para certificarlo en el sector agrícola de nuestro país.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

- Formular un bioplaguicida a base de *Bacillus subtilis* determinando su acción antifúngica contra los hongos fitopatógenos *Alternaría alternata*, *Fusarium equiseti* y *Fusarium sp*, que afectan el cultivo de la papa variedad Monte Carlo en condiciones de invernadero.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desarrollar un prototipo de bioplaguicida utilizando aislados de *Bacillus subtilis* considerando parámetros cinéticos para un proceso de crecimiento microbiano, concentraciones de células y operaciones unitarias implicadas en el proceso de formulación.
- Establecer el diseño experimental a emplearse para confrontar en condiciones de invernadero, cepas de *Bacillus subtilis* contra hongos Fitopatógeno *Alternaría alternata*, *Fusarium equiseti* y *Fusarium sp* en el cultivo de papa.
- Determinar el efecto de *Bacillus subtilis* sobre hongos Fitopatógeno *Alternaría alternata*, *Fusarium equiseti* y *Fusarium sp* que afectan al cultivo de papa, a través del registro de variables de desarrollo, la severidad de enfermedades y cosecha en condiciones de invernadero.

5. MARCO TEORICO

5.1. BIOPLAGUICIDA

5.1.1. Definición de bioplaguicida

Los Bioplaguicidas, se definen como todo tipo de productos que se utilizan en el manejo de plagas y enfermedades de los cultivos, cuyo mecanismo de acción se basa en procesos naturales. Sin embargo, no es fácil establecer un consenso en su definición, ya que resulta difícil matizar el concepto de natural, y porque dicha definición está sometida a influencias de tipo regulatorio y de percepción social. Así, la Unión Europea considera bioplaguicida a tipos de plaguicidas basados en microorganismos o en productos naturales, mientras que la Environmental Protection Agency (EPA) en Estados Unidos, incluye además las plantas que incorporan material genético añadido (Montesinos, 2013).

5.1.2. Clasificación

Los Bioplaguicidas pueden agruparse en tres grandes categorías:

➤ **Bioplaguicidas microbianos**

Consisten en compuestos con un microorganismo (bacteria, hongo, virus o protozoo) como ingrediente activo. Los plaguicidas microbianos pueden controlar distintos tipos de peste, aunque cada ingrediente activo es específico para una peste en particular. Por ejemplo, hay especies de hongos que controlan el crecimiento de maleza y otros que se utilizan en el tratamiento de insectos específicos (Broca Pérez, 2009).

Los bioplaguicidas microbianos más utilizados son subespecies del *Bacillus thuringiensis* (Bt). Cada rama de este tipo de bacteria produce una mezcla distinta de proteínas, y específicamente mata a una o algunas especies relacionadas de larvas de insectos. Mientras que algunas especies de Bt controlan a las larvas de polilla encontradas en las plantas, otras especies de Bt son específicas para el tratamiento de larvas de moscas y mosquitos (Broca Pérez, 2009).

➤ **Protectores incorporados**

Son sustancias plaguicidas que las plantas producen a partir de material genético que se ha añadido a la planta. Por ejemplo, pueden tomar el gen de la proteína plaguicida del Bt e introducirlo en el material genético de la planta. Entonces la planta produce la sustancia que destruye a la plaga específica (Broca Pérez, 2009).

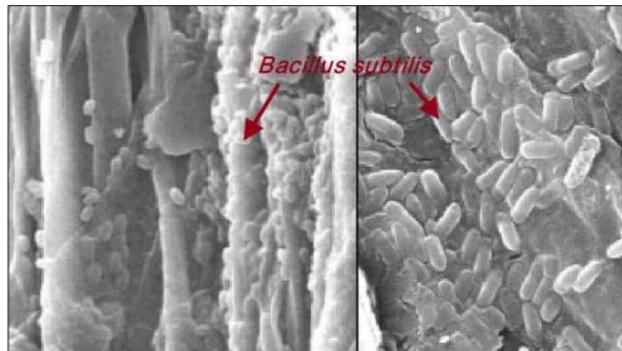
➤ **Bioplaguicidas bioquímicos**

Son sustancias naturales que controlan plagas por medio de mecanismos no tóxicos. Los plaguicidas convencionales, en contraste, son generalmente materiales sintéticos que matan directamente o inactivan a la plaga. Entre los plaguicidas bioquímicos se encuentran sustancias como feromonas y extractos de plantas olorosas que atraen a los insectos a las trampas (Broca Pérez, 2009).

5.1.3. *Bacillus subtilis*

En 1872, Ferdinand Cohn reconoció y nombró a la bacteria *Bacillus subtilis*. Ésta es considerada una bacteria Gram positiva, aerobia facultativa, la cual se encuentra por lo general en el suelo, aire y material en descomposición. Sin embargo, en la mayoría de condiciones no se encuentra biológicamente activo sino en forma de spora. La bacteria *Bacillus subtilis* se caracteriza por su habilidad para formar endosporas protectoras que permiten al organismo tolerar condiciones ambientales extremas (Todar, 2001).

Figura 1. Micrografía electrónica de una raíz de guisantes con células de *Bacillus subtilis*



(Photo: Dr. Schmiedeknecht, Humboldt University Berlin)(Kilian et al., 2001).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *Bacillus subtilis*

<i>Bacillus subtilis</i>	
Clasificación científica	
Reino	Bacteria
Filo	Firmicutes
Clase	Bacilli
Orden	Bacillales
Familia	Bacillaceae
Género	<i>Bacillus</i>
Especie	<i>subtilis</i>
Nombre binomial	
<i>Bacillus subtilis</i>	

Fuente: (Ehrenberg 1835) Cohn 1872

Las bacterias aerobias formadoras de endosporas de la clase *Bacilli* (*Bacillus spp.* y los géneros relacionados) actúan directamente en el enfrentamiento de organismos fitopatógenos, mediante la producción extracelular de antibióticos, toxinas, enzimas hidrolasas y lipopéptidos antimicrobianos. Los lipopéptidos de origen bacteriano ejercen una amplia acción antifúngica, antibacteriana y antiviral, y además constituyen moléculas efectoras que activan los mecanismos de resistencia inducida en plantas (Orberá *et al.*, 2014).

5.1.4. Bioplaguicida a base de *Bacillus subtilis*

Los estudios publicados recientemente sobre las potencialidades de las bacterias de la clase *Bacilli* para el control de crecimiento de hongos fitopatógenos, continúan haciendo referencia al aislamiento de especies del género *Bacillus* productoras de lipopéptidos, enzimas quitinasas y proteasas; entre ellas, *B. amyloliquefaciens* y *Bacillus subtilis*, así como cepas de especies no definidas del mismo género (Orberá *et al.*, 2014).

Las proteasas, las quitinasas y los lipopéptidos antimicrobianos se encuentran entre los metabolitos responsables de la actividad antifúngica y antibacteriana de cepas de *B. subtilis*. Las cepas que muestran una potente actividad antifúngica, pertenecientes a las especies *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens*, deben su actividad microbicida a la capacidad de producir tres tipos de lipopéptidos cíclicos en cantidades elevadas y homogéneas, sintetizados no ribosómicamente, pertenecientes a las familias de las iturinas, surfactinas y fengicinas. Ejemplo de ello es el aislado endofítico *B. subtilis* HC8, que inhibe el crecimiento fúngico y provoca alteraciones morfológicas en hifas procedentes de esporas pretratadas con los metabolitos excretados por la bacteria (Orberá *et al.*, 2014).

En la actualidad, los Estados Unidos de América encabeza la lista de países productores de bioplaguicidas elaborados a partir de bacterias rizosféricas, incluyendo especies del género *Bacillus*. Predominan las formulaciones producidas a partir de *Bacillus pumilus* (QST 2808 Sonata™ y GB34 Yield Shield®) y *B. subtilis* GBO3 Kodiak®. En el año 2012 en China se registraron 18 bioproductos producidos a partir de *Bacillus spp* (Orberá *et al.*, 2014).

5.2. CRECIMIENTO MICROBIANO

El crecimiento se puede considerar como el aumento ordenado de todos los constituyentes químicos de un organismo, lo cual, para los organismos unicelulares, conduce a un aumento en el número de individuos en la población. Se puede considerar el crecimiento al nivel de individuos dentro de una población (ciclo

celular) o el crecimiento de poblaciones celulares (ciclo de crecimiento). En un medio de apoyo para el crecimiento adecuado, los microorganismos unicelulares aumentan de tamaño y, por último, se dividen en dos por un proceso de fisión binaria o gemación (Wulf, 1989).

Es importante distinguir entre el crecimiento de células individuales y el crecimiento de poblaciones, ya que en los microorganismos debido a su pequeño tamaño no se hacen estudios de crecimiento individual sino estudios de crecimiento de poblaciones. El crecimiento de una población es el aumento del número de células como consecuencia de un crecimiento individual y posterior división. El crecimiento de una población ocurre de una manera exponencial. El crecimiento exponencial es una consecuencia del hecho de que cada célula se divide dando dos (2) células hijas, las cuales al dividirse darán cada una dos células hijas, así es que en cada período de división la población se duplica (Pedrique & De Castro, 2008).

La velocidad de crecimiento exponencial se expresa como tiempo de generación (G) y este se define como el tiempo que tarda una población en duplicarse. Los tiempos de generación varían ampliamente entre los microorganismos, algunos crecen rápidamente y presentan tiempos de generación de unos 30 minutos y otros tienen tiempos de generación de varias horas o incluso días (Pedrique & De Castro, 2008).

Se designa como:

$$x = N^0 \text{ de bacterias al tiempo } 0$$

$$y = N^0 \text{ de bacterias al tiempo } t$$

$$t = \text{tiempo de crecimiento exponencial}$$

A tiempo 0 $y = x$

Después de:

1 generación $y = x * 2$

2 generación $y = (x * 2) * 2 = 2^2 x$

3 generación $y = (2^2 x) * 2 = 2^3 x$

n generación $y = (2^n x)$

Para calcular n = (número de generaciones)

Resolviendo la ecuación (1) para n se tiene: $\log y = \log x + n \log 2$

$$n = \frac{\log y - \log x}{\log 2}$$

Si se sustituye en la ecuación anterior $\log 2$ por su valor 0.3010, se tiene que:

$$1/0.3010 = 3.3n = 3.3 \log y/x$$

Por consiguiente, aplicando la ecuación anterior puede calcularse el número de generaciones que han tenido lugar, siempre que se conozca la población inicial “x”, y la población “y” después del tiempo “t”.

El tiempo de generación G es igual a t (tiempo transcurrido en fase exponencial para llegar de x a y) dividido por el número de generaciones n, o sea:

$$G = t/n$$

5.2.1. Medición del crecimiento microbiano

Existen varios métodos para medir el crecimiento de células microbianas, entre los cuales tenemos: Peso seco celular, absorción, peso húmedo, volumen de células empacadas, número de células, masa de un componente celular, etc.

➤ **Peso seco celular**

El método más usado para medir el crecimiento microbiano es secar volúmenes conocidos de cultivo celular lentamente hasta obtener un peso constante. Cuando se trata de células que sedimentan rápidamente, como levaduras, esto usualmente implica centrifugación (4,6 x 10³ rpm). Luego las células concentradas se colocan en una estufa a 90°C o a 105 °C hasta obtener un peso constante. El peso de las células secas usualmente se expresa en términos de g/L. En las determinaciones de peso seco celular existen fuentes de error importantes debido a la absorción de humedad atmosférica por las células secas y los tubos de centrífuga o las membranas durante el enfriamiento. Esto se puede evitar al enfriar en un desecador o mediante la determinación de la cantidad de agua absorbida por las membranas o tubos y con la corrección adecuada del peso medido (Wulf, 1989).

➤ **Absorción**

A menudo se obtiene ventaja del hecho de que, en una celda espectrofotométrica, las células microbianas desvían la luz, de modo que la cantidad de ésta que llega al detector del espectrofotómetro está relacionada directamente con el número de

células presentes en la muestra del cultivo de acuerdo a la Ley de Beer. Por lo general, se emplean longitudes de onda alrededor de 600 nm. Es importante entender que como la absorbancia es afectada por el tamaño y la forma de las células, la relación entre la absorbancia y el número de células cambia si el tamaño o la forma de ésta cambian durante el crecimiento del cultivo (Wulf, 1989).

➤ **Peso húmedo**

Este quiere decir simplemente la centrifugación o filtración del cultivo seguida por el pesado directo. Aunque es un método extremadamente rápido, es importante estandarizar correctamente el procedimiento, ya que se mide el agua tanto intracelular como extracelular, lo cual puede causar errores considerables (Wulf, 1989).

➤ **Volumen de células empacadas**

Mediante la centrifugación de muestras del cultivo en tubos de centrífuga graduados se puede determinar rápidamente el volumen de células empacadas. Este método es muy inexacto, especialmente cuando se miden pequeños cambios en la población celular (Scragg, 1996).

➤ **Número de células**

El crecimiento se puede determinar también en términos de número de células por litro. El número total de células se puede medir colocando muestras de cultivo adecuadamente diluidas sobre portaobjetos de microscopios graduados como los de Herber o los hematocitómetros y contando el número de células con la ayuda de un microscopio. Aunque este método es relativamente rápido y exacto no distingue entre células viables y no viables, también muy agotador; sin embargo, se cuenta con contadores de células automáticos (Wulf, 1989).

➤ **Masa de un componente celular**

En los casos donde se dificulte el uso de otros métodos, la cantidad de un componente celular, la cual es una cantidad constante del peso seco total, se puede usar para estimar la concentración de células o de biomasa. Se han usado componentes como el nitrógeno, proteína, RNA, DNA y ATP celulares. Pueden surgir dificultades, ya que varía la cantidad de estos componentes en la célula, a menudo considerablemente, durante el crecimiento de las células, especialmente cuando las condiciones de éste son diferentes (Scragg, 1996).

➤ **Mediciones físicas**

El crecimiento de las células microbianas va acompañado siempre de generación de calor. Recientemente se demostró que hay una relación directa entre la cantidad de calor producido y la concentración de biomasa. Este método es directo, no

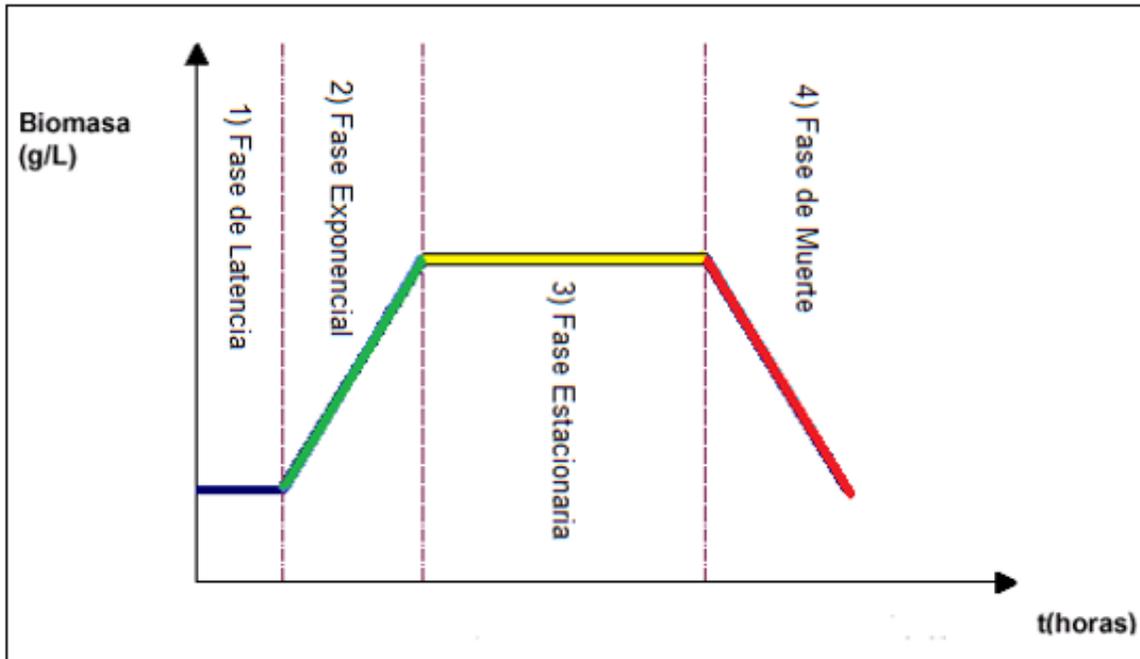
requiere de muestreo y es instantáneo, pero es más adecuado para biorreactores a gran escala, puesto que la cantidad de calor generado en escala pequeña puede ser demasiado pequeña para ser adecuada. Para cultivos aeróbicos es posible medir la rapidez de captación de oxígeno, ya que se ha demostrado que está directamente relacionada con la concentración de biomasa. Es obvio que este método no es adecuado para cultivos anaeróbicos (Wulf, 1989).

5.2.2. Cinética de crecimiento microbiano

El conocimiento de la cinética y producción de metabolitos es fundamental en el tratamiento cuantitativo de los procesos de fermentación. El conocimiento de la cinética de un cultivo permite la predicción del transcurso de la fermentación, la evaluación de velocidades, rendimientos y productividades y entrega información útil para establecer las estrategias de producción y optimización del proceso (Scragg, 1996).

El comportamiento cinético de una población está determinado por un conjunto de factores genéticos y ambientales. Entre estos últimos destacan las condiciones de operación (composición del medio, temperatura, pH y otras) y la modalidad de cultivo entre las que distinguimos el cultivo por lotes y el cultivo por lotes alimentados o semicontinuo. El cultivo por lotes se define como aquel que se realiza sin intercambio de materia con los alrededores, salvo lo referente a los gases (aireación, producción de dióxido de carbono y otros) que se suministran y retiran del sistema en forma continua. En esta modalidad de cultivo se adicionan inicialmente los nutrientes y luego se inocula con una determinada cantidad de células viables, que produce una serie de eventos característicos denominada Curva de Crecimiento, la cual se representa por una gráfica del peso seco celular o biomasa (x), (g/L) contra el tiempo de incubación en horas (h), tal como se muestra en la Figura 2 (Scragg, 1996).

Figura 2. Curva de Crecimiento en un cultivo por lotes



Fuente: Scragg, 1996.

5.2.3. Fases de crecimiento microbiano

➤ Fase de latencia

Cuando una población bacteriana es inoculada en medio fresco, el crecimiento usualmente no comienza de inmediato sino después de un tiempo llamado de latencia, que puede ser corto o largo dependiendo de las condiciones.

La fase de latencia representa un periodo de transición para los microorganismos cuando son transferidos a una nueva condición. En esta fase se producen las enzimas necesarias para que ellos puedan crecer en un nuevo medio ambiente.

En esta fase no hay incremento en el número de células, pero hay gran actividad metabólica, aumento en el tamaño individual de las células, en el contenido proteico, ADN y peso seco de las células. Si un cultivo que está creciendo en fase exponencial es inoculado al mismo medio de cultivo bajo las mismas condiciones de crecimiento, no se observa fase de latencia y el crecimiento exponencial sigue a la misma velocidad. Si el inóculo se toma de un cultivo viejo (fase estacionaria) y se inocula en el mismo medio, generalmente se presenta la fase de latencia esto, se debe a que las células generalmente agotan una serie de coenzimas esenciales u otros constituyentes celulares y se requiere cierto tiempo para su resíntesis.

También se observa latencia cuando el inóculo está formado por células que han sido dañadas, pero no muertas, bien sea por tratamiento con calor, radiaciones o sustancias químicas, puesto que requieren reparar dicho daño.

➤ **Fase exponencial o fase logarítmica**

Es el período de la curva de crecimiento en el cual el microorganismo crece exponencialmente, es decir que cada vez que pasa un tiempo de generación la población se duplica. Bajo condiciones apropiadas la velocidad de crecimiento es máxima. Las condiciones ambientales (temperatura, composición del medio de cultivo, etc.) afectan a la velocidad de crecimiento exponencial.

➤ **Fase estacionaria**

En cultivos en recipientes cerrados una población no puede crecer indefinidamente en forma exponencial. Las limitaciones del crecimiento ocurren ya sea por agotamiento de algún nutriente esencial, por acumulación de productos tóxicos, porque se alcance un número de células elevado para el espacio disponible o por una combinación de las causas anteriores. Este periodo durante el cual cesa el crecimiento se conoce como fase estacionaria.

➤ **Fase de muerte**

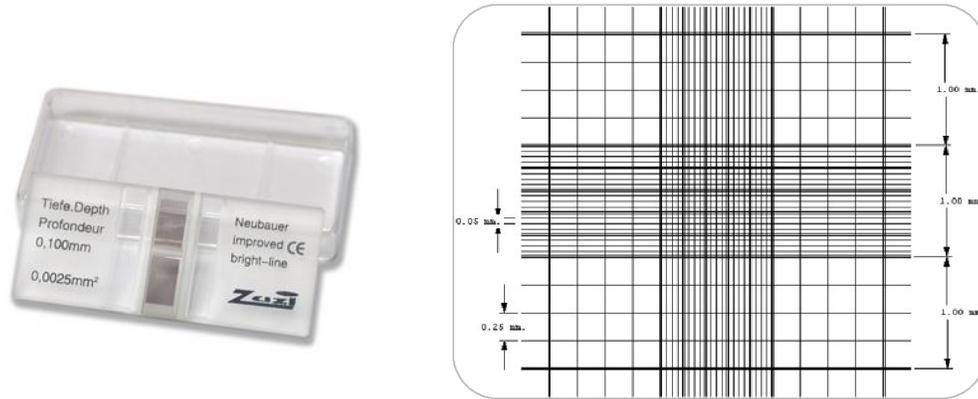
Si la incubación continúa después de que una población microbiana alcanza la fase estacionaria, las células pueden seguir vivas y continuar metabolizando, pero va a comenzar una disminución progresiva en el número de células viables y cuando esto ocurre se dice que la población ha entrado en fase de muerte.

5.2.4. Cámara de Neubauer

Se trata de una gruesa placa de cristal con forma de portaobjetos, de unos 30 x 70 mm y unos 4 mm de grosor. En una cámara simple, la porción central, que es donde se realiza el conteo, está dividida en 3 partes (Bastidas, s.f).

Se utiliza para contar células u otras partículas en suspensiones bajo el microscopio. Las cámaras de conteo se utilizan principalmente para el análisis de sangre (conteo de leucocitos, eritrocitos, trombocitos), pero las cámaras de conteo sirven también para el conteo de bacterias, esporas del moho y para cualquier tipo de recuento citológico (Bastidas, s.f).

Figura 3. Cámara de Neubauer y detalle de rejilla



Fuente: (Bastidas, s.f)

En la parte central se encuentra grabada una retícula cuadrangular. La retícula completa mide 3 mm x 3 mm de lado. Subdividida a su vez en 9 cuadrados de 1 mm de lado cada uno.

El cuadrado central se divide en 25 cuadrados medianos de 0,2 mm de lado, y cada uno de estos cuadros se subdivide a su vez en 16 cuadrados pequeños. El cuadrado central está por tanto formado por 400 cuadrados pequeños. Figura 3.

El cubreobjetos es un cuadrado de cristal de aproximadamente 22 mm x 22 mm. Debe colocarse sobre la cámara de recuento de forma que cubra la parte central de la cámara, delimitando un espacio entre la cámara y el cubreobjetos de 0,1 mm. (Bastidas, s.f).

➤ **Los elementos necesarios para realizar un recuento**

- a) Muestra celular a medir
- b) Cámara de Neubauer
- c) Microscopio óptico
- d) Cubre objetos
- e) Pipeta / micropipeta con puntas

➤ **Los pasos para realizar el conteo celular son:**

- Preparación de la muestra.
- Introducción de la muestra en la cámara de Neubauer
- Preparación y enfoque del microscopio.
- Cálculo de la concentración.

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Total Células Contadas} \times 250.000}{\text{Número de Cuadrados}}$$

Fuente: (Bastidas, s.f)

5.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

5.3.1. Diseños de bloques completos al azar

Conocido como diseño de doble vía, se aplica cuando los materiales son heterogéneos. Las unidades experimentales homogéneas se agrupan formando grupos homogéneos llamados bloques.

Tratamientos A, B, C, D

Bloque I: B, C, A, D

Bloque II: C, D, A, B

Bloque III: B, A, D, C

Bloque IV: D, A, C, B

Las fuentes de variación para el análisis estadístico son:

Fuentes Grados de libertad

Tratamiento (t-1) = 4

Bloques (r-1) = 3

Error (t-1) (r-1) = 12

5.3.2. Características

1. Las unidades experimentales son heterogéneas.
2. Las unidades homogéneas están agrupadas formando los bloques.
3. En cada bloque se tiene un número de unidades igual al número de Tratamientos (bloques completos).
4. Los tratamientos están distribuidos al azar en cada bloque.
5. El número de repeticiones es igual al número de bloques.

5.3.3. Modelo

Cada observación del experimento es expresada mediante una ecuación Lineal en los parámetros, el conjunto conforma el modelo para el diseño de Bloques completos al azar:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{ij} \quad i = 1,2 \dots t \quad j=1,2 \dots r$$

Donde:

μ =Parámetro, efecto medio

τ_i =Parámetro, efecto del tratamiento I

β_j = Parámetro, efecto del bloque j

ϵ_{ij} = valor aleatorio, error experimental de la u.e.i, j

Y_{ij} =observación en la unidad experimental

5.4. CULTIVO PAPA (*Solanum tuberosum L*)

5.4.1. Origen

La papa (*Solanum tuberosum L*), es una planta originaria de América, por lo que es posible encontrarla a través de gran parte del territorio donde la mayoría de los campesinos han tenido algún contacto con ella. Aunque la historia de la papa puede trazarse en el centro de origen del lago Titicaca (Bolivia-Perú) y en el norte del Perú diez siglos atrás. La adaptabilidad de la papa a diversas condiciones de temperatura fotoperiodismo, suelos, entre otros y de producir desde los 80 o 90 días en adelante, han hecho que se haya estudiado, en especial fuera de América y que hoy aparezca junto al trigo y maíz con muchos antecedentes bibliográficos (Montaldo, 1984).

5.4.2. Taxonomía

La papa se clasifica taxonómicamente de la siguiente manera (Enciclopedia Agropecuaria Terranova, 1995):

Reino: plantae

Clase: Angiospermae

Subclase: Dicotiledónea

Orden: tubiflorales

Familia: solanaceae

Género: Solanum

Especie: tuberosum

5.4.3. Morfología

La papa es una planta suculenta, herbácea y anual. Posee un tallo aéreo; que puede ser ramificado hueco y triangular en su sección transversal. Se considera principal, él que crece directamente del tubérculo y a las ramas laterales de éste, se les denomina tallos secundarios. Las hojas son alternas al igual que los estolones; consisten en un pecíolo con folíolo terminal; folíolos laterales secundarios y a veces terciarios intersticiales (INTA, 2004).

➤ La raíz

Las que provienen de semilla sexual, son delgadas, de ellas salen las radículas laterales. Las plantas que crecen directamente del tubérculo, desarrollan raíces adventicias en los nudos del tallo y un sistema radical generalmente a profundidad entre 46 a 50 cm (INTA, 2004).

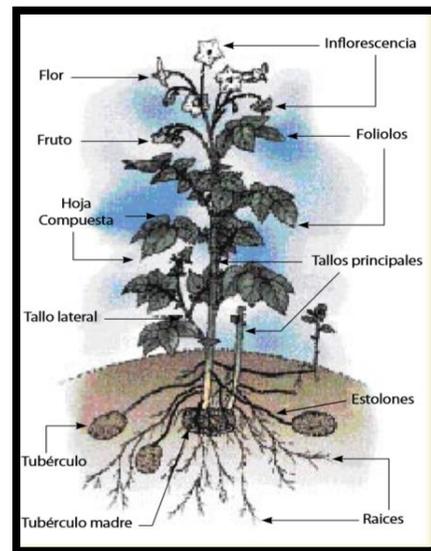
➤ Las flores

Son pentámeras, de colores diversos, tienen estilo y estigma simples y ovario bilocular, la inflorescencia de la papa es una cima terminal que puede ser simple o compuesta, no todas las variedades provenientes de papa tubérculo y de semilla sexual florecen y forman bayas, en las variedades provenientes de semilla sexual la floración se retarda una o dos semanas más, las flores se autopolinizan en un 98 % y un 2 % de polinización cruzada (INTA, 2004).

➤ El tubérculo

Los tubérculos comienzan a formarse a partir de los estolones, que son tallos laterales que crecen dentro del suelo y son emitidos por los tallos principales, cuando la planta comienza la floración (en variedades que florecen), esto ocurre entre los 35 a 45 días después de la siembra, los tubérculos están formados a los 60 días, desarrollándose hasta cuando la planta alcanza su madurez fisiológica: 90 días para variedades precoces; 110 a 120 días para variedades de ciclo intermedio y más de 120 para variedades tardías (INTA, 2004).

Figura 4. Partes de la planta de papa



Fuente: (CENTA, El Salvador).

➤ **El fruto**

Es una baya de color verde, donde se encuentra la verdadera semilla sexual, es de forma redonda y llega a medir hasta 2.5 cm, en el interior del fruto crecen las semillas, unas 200 por baya, el tiempo de maduración de las bayas es de 45 a 60 días después de la floración (INTA, 2004).

5.4.4. Variedad Monte Carlo

Es una variedad de madurez precoz de 85 días, de muy buen follaje, con tubérculos de forma oval de piel rojo claro con multiresistencia a PCN (*Globodera Rostochienis* y *Globodera Pallida*), resistente a clima tropical, alta resistencia a sarna común y nematodos (ECROMA, 2017).

Figura 5. Morfología del cultivo de papa variedad Monte Carlo.



Fuente: ECROMA, 2007.

Cuadro 2. Características de la variedad Monte Carlo

Descripción		Resistencia	
Mercado:	Desiree, Memphis, Cardinal, Ronaldo	Virus del enrollado:	8
Ciclo:	Precoz 85 días	Resistencia virus X:	8
Follaje:	Muy bueno	Resistencia virus Y:	7
Color de piel:	Rojo claro	Resistencia a phytophthora (hoja):	5
Color de la carne:	Blanco	Resistencia a phytophthora (tubérculos):	8
Forma de los tubérculos:	Oval	Resistencia a golpe:	Resistente
Profundidad de los ojos:	Superficiales	Resistencia a sarna común:	8
Calibre de los tubérculos:	Grande	Sarna verrugosa:	Resistente
Rendimiento:	Muy alto	Porcentaje materia seca:	21%

Fuente: ECROMA, 2007.

5.4.5. Enfermedades

➤ **Tizón tardío (*Phytophthora infestans*)**

El Tizón Tardío se manifiesta inicialmente con la aparición de manchas acuosas circulares e irregulares en el follaje que, en pocos días se vuelven necróticas de color castaño cuando están secas o negras si están húmedas. Bajo condiciones de mucha humedad; las manchas se extienden rápidamente y forman zonas pardas con bordes irregulares. En el borde de la lesión y en el envés de la hoja, se forma una zona blanquecina constituida por hifas del hongo (INTA, 2004).

➤ **Tizón temprano (*Alternaria solani*)**

La enfermedad aparece en forma de manchas foliares irregulares constituidas por anillos concéntricos. Las manchas tienen un color que varía de marrón a negro y pueden ser pequeñas, profundas y con bordes bien definidos. En las hojas y en menor grado en los tallos, se forman manchas necróticas, marcadas internamente por una serie de anillos concéntricos. Usualmente, aparecen cerca de la floración y van aumentando a medida que madura la planta (INTA, 2004).

Control: Se controla haciendo uso de semilla tratada o libre de la enfermedad o con aspersiones de fungicidas. Las aplicaciones deben repetirse a intervalos de 1 a 2 semanas dependiendo de la severidad e intensidad de la enfermedad y frecuencia de lluvias. Otras prácticas efectivas son la rotación de cultivos, eliminación y quema de restos de plantas infectadas y la erradicación de malezas (INTA, 2004).

➤ **Rizoctoniasis (*Rhizoctonia solani*)**

El hongo causante de esta enfermedad se presenta en casi todos los suelos debido a una amplia gama de hospederos, sobrevive en residuos de plantas y en forma de esclerocios, se disemina fácilmente sobre los tubérculos. La enfermedad se presenta como lesiones en la punta de los brotes que causan retardos o fallas en la emergencia. Cancros pardos ligeramente hundidos de varios tamaños y formas afectan los estolones y los tallos a ras o debajo del suelo. Estos cancros pueden circundar el tallo y generar la formación de tubérculos aéreos, marchitez y muerte de la planta (INTA, 2004).

Control: Rotación de cultivo con gramíneas, disminuye la presencia de la enfermedad. También la enfermedad puede ser aminorada con aplicaciones de fungicidas mezcladas con suelo en la franja de siembra. Es efectivo el tratamiento de los tubérculos – semilla para reducir el inoculo (INTA, 2004).

➤ **Marchitez bacteriana (*Ralstonia solanacearum*)**

Esta enfermedad, después de tizón tardío, es la más importante en términos del daño económico. Por mucho tiempo ha sido una enfermedad muy temida entre los productores porque se ha considerado fatal y que nada se puede hacer una vez que aparece (INTA, 2004).

La bacteria puede vivir en la planta y en los tubérculos de la papa y en otras plantas cultivadas o malezas sin producir síntomas, también puede mantenerse en el suelo, en el agua y en restos vegetales. En estos casos sólo el análisis de las muestras en laboratorio nos puede permitir su detección (INTA, 2004).

Control: Uso de papa-semilla sana, Desinfección de herramientas. Para esto se puede usar un litro de cloro al 5% diluido en un litro de agua o una onza de formalina en un litro de agua, evitar el paso de personas, animales o vehículos extraños por el área sembrada, no sembrar papa para semilla en terrenos donde recién se haya sembrado papa (INTA, 2004).

5.5. INVERNADERO

5.5.1. Definición de invernadero

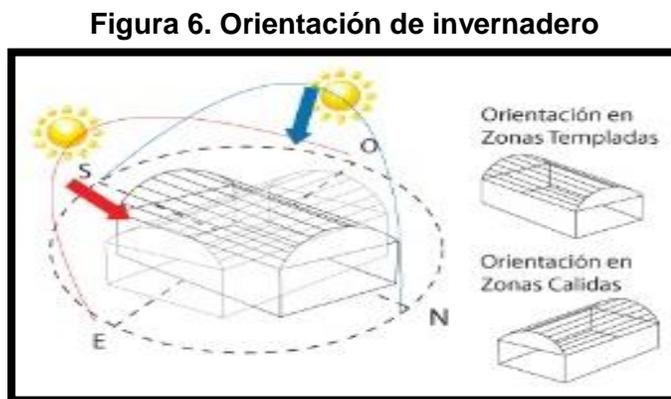
Es una construcción agrícola de estructura metálica, usada para el cultivo y/o protección de plantas, con cubierta de película plástica traslúcida que no permite el paso de la lluvia al interior y que tiene por objetivo reproducir o simular las condiciones climáticas más adecuadas para el crecimiento y desarrollo de las plantas cultivadas establecidas en su interior, con cierta independencia del medio exterior y cuyas dimensiones posibilitan el trabajo de las personas en el interior. Los invernaderos pueden contar con un cerramiento total de plástico en la parte superior y malla en los laterales (HIDRO ENVIRONMENT, 2015).

5.5.2. Tipos de invernadero

Las características y formas del invernadero estarán dispuesta por las condiciones climáticas (temperatura, luz solar, lluvia y aire) y orografía, conforme a lo mencionado se establece la orientación de la estructura Oeste–Este como se muestra en la figura 6 (HIDRO ENVIRONMENT, 2015).

Debido a esto puede intentarse una clasificación según criterios (por ej. materiales para la construcción, tipo de material de cobertura, características de la techumbre, etc.). De lo anterior, los tipos de invernaderos más comunes o utilizados en el mundo se encuentran:

- Invernadero-túnel
- Invernadero capilla (a dos aguas)
- Invernaderos en diente de sierra
- Invernadero capilla modificado
- Invernadero con techumbre curva
- Invernadero tipo “parral” ó “almeriense”
- Invernadero “holandés” (tipo Venlo)
- **Invernadero-túnel**



Fuente: Hidro Environment, 2015.

Es difícil establecer una línea divisoria entre lo que es un invernadero y un macro túnel, por no existir un parámetro definido, en México gracias a la norma mexicana que da definido como invernadero (HIDRO ENVIRONMENT, 2015).

En general, de acuerdo a diferentes opiniones al respecto, podemos definir como invernadero aquella estructura que supera los 2,75-3,00 m³/m². Se trata de invernaderos que tienen una anchura y altura variable, encontrándose en el mercado modelos importados con las siguientes dimensiones:

Cuadro 3. Dimensiones de un Invernadero – túnel

Ancho (m)	Altura del cenit (m)	Altura total (m)
3-5	1.5	-----
6	2.5	1.3
8	3.2	1.7
9	3.3	1.7

Fuente: Hidro Environment, 2015.

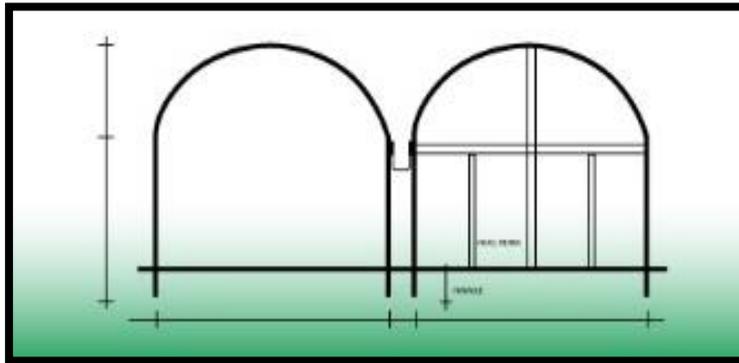
Ventajas

- Alta resistencia a los vientos y de fácil instalación.
- Tiene un alto grado de paso de luz solar.
- Apto tanto para materiales de cobertura flexible como rígidos.

Desventajas

- Relativamente pequeño volumen de aire retenido (escasa inercia térmica) pudiendo ocurrir el fenómeno de inversión térmica.
- Solamente recomendado para cultivos de bajo a mediano porte (lechuga, flores, frutillas, etc).

Figura 7. Túnel individual.



Fuente: Hidro Evironment, 2015.

5.6. SUSTRATO.

Sustrato es el elemento o conjunto de elementos sobre los que las plantas sitúan sus raíces, sirviendo de elemento estabilizador y anclaje en la tierra y como almacén de nutrientes. En un cultivo hidropónico (aquel en el que se alimenta a la planta a través de agua con nutrientes y NO se alimenta de la tierra) digamos que solo tiene función estructural. El sustrato puede ser muy variado y con características muy diferentes en relación al material o materiales que empleemos para este fin. En la naturaleza el sustrato correspondería normalmente a la tierra del suelo (ECOagricultor, 2012).

Hay que tener en cuenta que para un cultivo en maceta, el sustrato que escojamos tiene una importancia vital, debido a la limitación espacial del recipiente, rara vez podrán expandir sus raíces como lo harían en el suelo. Además, el sustrato que escojamos debe ser poroso y retener el agua, además de los nutrientes (ECOagricultor, 2012).

5.6.1. Propiedades

-Porosidad: es el espacio entre las partículas del sustrato. Una porosidad elevada favorece el crecimiento de las raíces.

-Retención de agua: Depende de los microporos del sustrato, los cuales retendrán el agua hasta que la planta la consuma o ésta se pierda.

-Aireación: depende de los macroporos, los cuales permiten la circulación del aire y el agua, permitiendo la respiración de las raíces.

-El pH: Mide la concentración de iones de hidrógeno en la solución acuosa del sustrato. Tiene valores entre 0 y 14, en el que 0 es muy ácido, 7 neutro y 14 muy básico. Lo ideal es tener un pH que ronde 7, para asegurarnos que las plantas puedan asimilar bien los nutrientes (ECOagricultor, 2012).

-Almacén y aporte de nutrientes: La capacidad de almacenar nutrientes y de ir liberándolos poco a poco.

Y según algunos autores también incluiremos la ligereza, ya que en un cultivo en maceta el peso de ésta puede llegar a ser muy importante.

Lo ideal para un sustrato, según diferentes autores, es que sea ligero, con un buen almacén y aporte de nutrientes y cuya relación entre micronutrientes y macronutrientes este equilibrada. Esto dependerá del material o materiales que empleemos como tierra para nuestras plantas. (ECOagricultor, 2012)

5.6.2. Materiales

-Sustrato universal: De fabricación normalmente no muy ecológica, posee habitualmente una mezcla formada a base de turba. Es el que más encontramos en las tiendas de jardinería. Posee muy baja aireación y media retención de agua, el aporte de nutrientes es bajo, por lo que se recomienda abonar antes del cultivo.

-Fibra de coco: Bastante aireación y retención de agua. Posee un peso muy bajo y aporta pocos nutrientes, por lo que siempre mezclaremos con estiércol, compost o vermicompost.

-Turba: Proveniente de canteras en regiones frías, es un producto poco ecológico (por ser explotado como una mina), y es uno de los más utilizados. Posee gran capacidad de retención de agua y nutrientes, además de buena aireación, pero posee un pH excesivamente ácido y por sí aporta pocos nutrientes.

-Compost: Es el resultado del proceso de descomposición de la materia orgánica a inorgánica llevado a cabo por microorganismos aerobios (en presencia de aire). Posee correcta aireación y retención de agua. Su almacenaje de nutrientes es medio y su capacidad de aporte de estos muy elevada. Sus propiedades son bastante variables dependiendo de los elementos con los que lo hemos formado. (ECOagricultor, 2012)

5.7. RIEGO POR GOTEO

El riego por goteo es un sistema presurizado donde el agua se conduce y distribuye por conductos cerrados que requieren presión. Desde el punto de vista agronómico, se denominan riegos localizados porque humedecen un sector de volumen de suelo, para un buen desarrollo del cultivo. También se lo denomina de alta frecuencia, lo que permite regar desde una o dos veces por día, todos o algunos días, dependiendo del tipo de suelo y las necesidades del cultivo. La posibilidad de efectuar riegos frecuentes permite reducir notoriamente el peligro de estrés hídrico, ya que es posible mantener la humedad del suelo a niveles óptimos durante todo el periodo de cultivo, mejorando las condiciones para el desarrollo de las plantas (INTA, 2015).

5.7.1. Ventajas e inconvenientes del riego localizado por goteo

Ventajas

- Mejor aprovechamiento del agua. Se ahorra entre un 40-60 % de agua con respecto a otros sistemas de riego.
- Facilidad para realizar fertirrigación.
- Disminución del riesgo de enfermedades.
- Reducción de la mano de obra, sobre todo porque disminuyen las malas hierbas al no humedecer la totalidad del suelo.
- Disminución de la utilización de abonos y fitosanitarios.
- Incremento de la productividad y de la calidad de los cultivos.
- Riegos de alta frecuencia.

- Facilita la automatización. Se puede utilizar en terrenos de mucha pendiente.

Inconvenientes

- Alto costo de instalación.
- Alto costo de mantenimiento.
- Dificultad de dar lavados en profundidad.
- Posibilidad de salinización del suelo.
- Necesidad de mayor preparación técnica del agricultor.
- Necesidad de fertilizantes totalmente solubles en agua.
- Necesidad de alto grado de filtración.

Sin embargo, el gran ahorro de agua que produce, permitiendo regar zonas áridas o semiáridas con escasez de agua o con agua de baja calidad, junto con la posibilidad de fertirrigar, aumentando la calidad y cantidad de las cosechas, hace que el riego localizado por goteo sea cada vez más utilizado (INTA, 2015).

5.7.2. Componentes de un sistema de riego por goteo

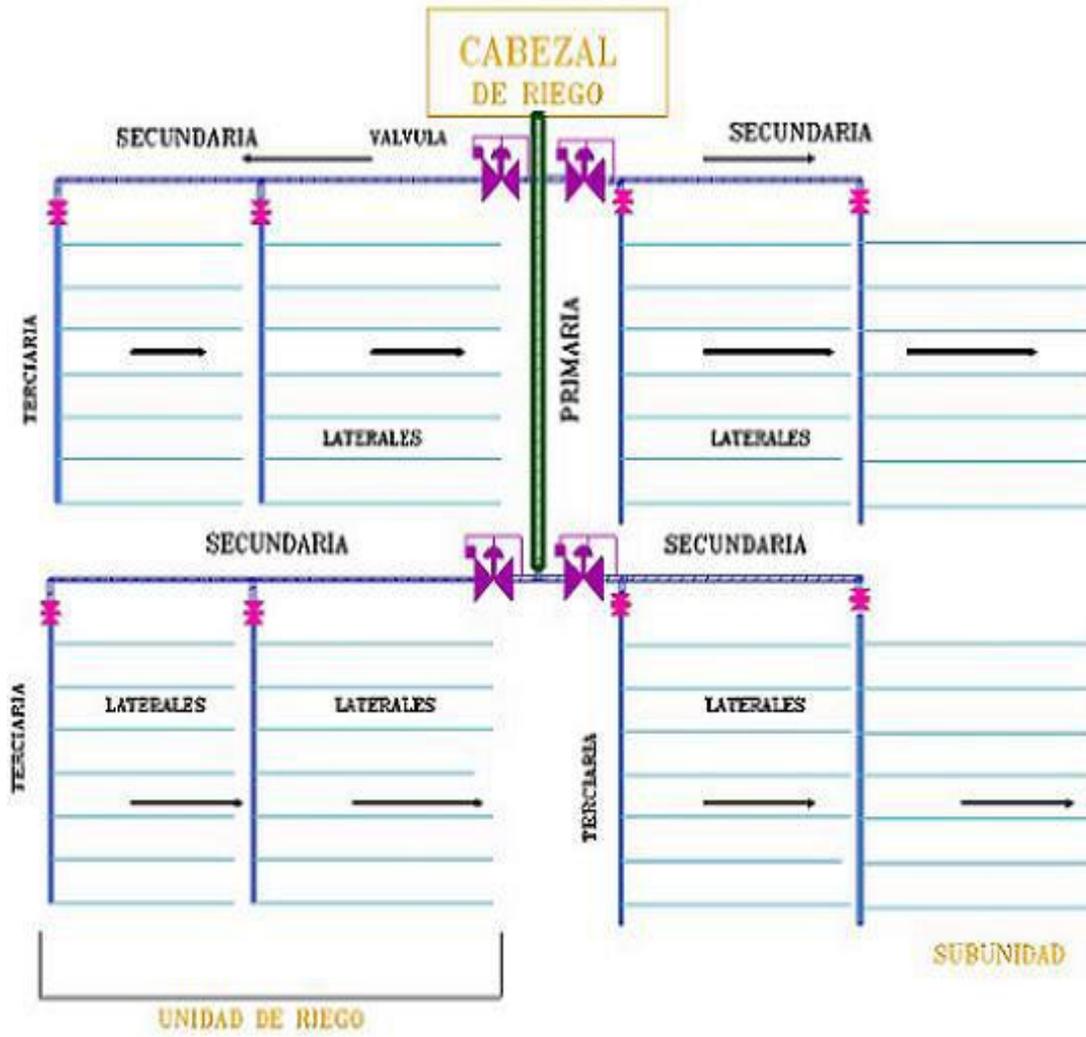
Impulsión: Grupo de bombeo desde balsa, río, pozo y depósitos.

Cabezal de riego: Pre filtrado, filtros de arena (cuando sea necesario), equipo de fertirrigación. Filtros de mallas o anillas. Hidrante de red colectiva a presión y dispositivos de control.

Red de distribución: Conductora, maestra y laterales.

Emisores: Tuberías emisoras, integrados, pinchados.

Figura 8. Componentes de riego por goteo



Fuente: INTA, 2015.

6. HIPOTESIS

6.1. Hipótesis de investigación

El bioplaguicida a base de *Bacillus subtilis* presenta actividad antifúngica e inhibe el desarrollo de los hongos fitopatógenos *Alternaría alternata*, *Fusarium equiseti* y *Fusarium sp* que afectan al cultivo de papa variedad Monte Carlo en condición de invernadero.

6.2. Hipótesis estadística

Ho: El bioplaguicida a base de *Bacillus subtilis* no presenta actividad anti fúngica y no tiene ningún efecto en la inhibición del desarrollo de los hongos fitopatógenos *Alternaría alternata*, *Fusarium equiseti* y *Fusarium sp* que afectan al cultivo de papa variedad Monte Carlo en condición de invernadero.

Ha: El bioplaguicida a base de *Bacillus subtilis* presenta actividad antifúngica en al menos uno de los hongos fitopatógenos *Alternaría alternata*, *Fusarium equiseti* y *Fusarium sp* que afectan al cultivo de papa variedad Monte Carlo en condición de invernadero.

7. DISEÑO METODOLOGICO

7.1. LOCALIZACIÓN

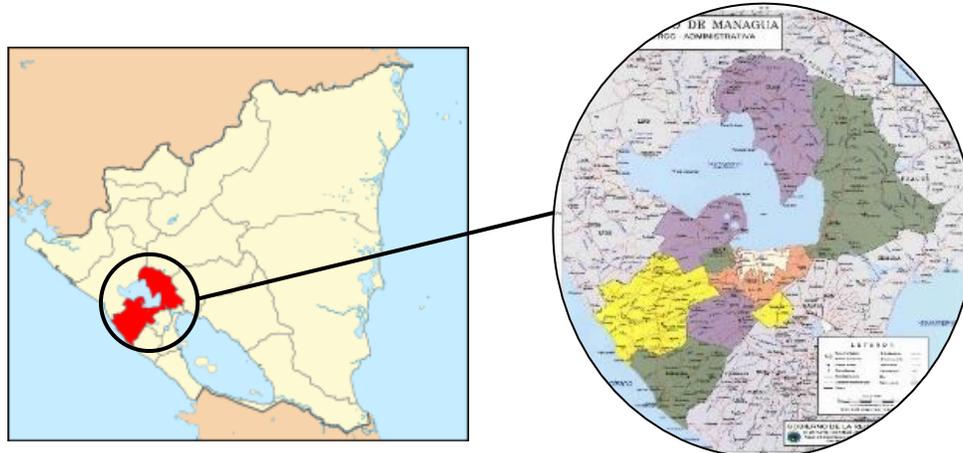
La preparación del inóculo y la reproducción de la cepa *Bacillus Subtilis* CEPA F, se realizó en el laboratorio de microbiología del Programa de Investigación Estudios Nacionales y Servicios Ambientales (PIENSA) de la Universidad Nacional de Ingeniería, ubicado en el Recinto Universitario Simón Bolívar, en la avenida universitaria, Managua, Nicaragua.

La aplicación y evaluaciones del bioplaguicida a base de *Bacillus Subtilis* se llevaron a cabo en el mismo recinto, en el predio ubicado a un costado del edificio Bremen Overseas Research & Development Association (BORDA), se especifica a continuación la macro y micro localización donde se desarrollaron los experimentos.

7.1.1. Macro localización

El Departamento de Managua se encuentra en las coordenadas 12°8'N 86°15'O.

Figura 9. Macro localización del departamento de Managua



Fuente: © INETER 2012 - Dirección General de Geodesia y Cartografía, Wikipedia.org

El departamento limita al norte con los departamentos de León y Matagalpa; al sur con el Océano Pacífico y el departamento de Carazo; al este con los departamentos de Boaco, Granada y Masaya y al oeste con el departamento de León. Con temperatura media anual de 28.5 °C y precipitación anual de 1411.9 mm. Managua está emplazada sobre el extremo oeste de la llanura interlacustre, sobre un terreno bastante regular a una altura promedio de 85 msnm con una suave pendiente hacia el sur. En la parte agropecuaria Managua tiene 6900 manzanas cultivadas de café, entre otros cultivos en el departamento se encuentran: caña de azúcar, maíz, arroz, frijol, musáceas (plátanos y banano) en 1,795 manzanas; maní en 4,758 manzanas y piña en 828 manzanas.

7.1.2. Micro localización

Figura 10. Micro localización del área de trabajo.



Fuente: Google Maps, 2015.

Sede Central ubicada en la Avenida Universitaria Managua, Nicaragua. Apartado Postal: 5595.

Latitud: 12° 7'43.39"N

Longitud: 86°16'12.72"O

Recinto Universitario Simón Bolívar, Universidad Nacional de Ingeniería.

7.2. PREPARACIÓN DEL PROTOTIPO DEL BIOPLAGUICIDA

La preparación del prototipo de bioplaguicida a base de *Bacillus subtilis* se realizó en el Laboratorio de Microbiología de las aguas del Programa de Investigación Estudios Nacionales y Servicios Ambientales (PIENSA) de la Universidad Nacional de Ingeniería, ubicado en el Recinto Universitario Simón Bolívar, Managua, Nicaragua. Se utilizó un medio de cultivo comercial Lb Broth líquido, para la multiplicación de la cepa bacteriana *Bacillus subtilis* y fase de prueba en invernadero.

7.2.1. Selección de la cepa Microbiana

Para la fase de invernadero se trabajó con la cepa de *Bacillus subtilis* DCL4-31 (F) que expresó los mejores resultados en investigaciones anteriores de antagonismo in vitro, presentando un porcentaje de inhibición de 98.33 % contra *Fusarium sp*, 100% contra *Alternaria Alternata* y 83.96 % contra *Fusarium Equiseti* (Flores & Roque, 2017).

7.2.2. Preparación del preinoculo de bacteria

En un frasco de Erlenmeyer con capacidad de 200 mL, se preparó 100 mL de medio de cultivo LB Broth líquido, el cual se esterilizó en autoclave a una temperatura de 121°C durante 15 minutos. Se inoculó la bacteria y se dejó en constante agitación en un Shaker de laboratorio marca Meyvis, a una velocidad de 170 rpm durante 12 horas; una vez finalizado el tiempo se midió la absorbancia para conocer su concentración (Páramo, 2014).

7.2.3. Curva de crecimiento por determinación turbidimétrica

Esta medición se realizó en un espectrofotómetro LAMDA BIOXLS UV/VIS, la cual se basa en el hecho de que un cultivo de bacterias actúa como una suspensión coloidal que intercepta la luz que pasa a través de ella. Dentro de ciertos límites, la cantidad de luz que es absorbida es directamente proporcional a la concentración de células. Es decir que la densidad óptica es una medida de la luz absorbida y/o dispersada por la muestra. Para medir turbidez se utilizó un haz de luz de $\lambda = 540$ nm, ya que es sabido que los cultivos bacterianos no presentan una absorción significativa a esta longitud de onda (Páramo, 2014).

Figura 11. Procedimiento medición de absorbancia
A. Muestra en agitación en schaker, B. Colocación de muestra en celda, C. Medición de absorbancia en espectrofotómetro.



Fuente: Propia

Procedimiento:

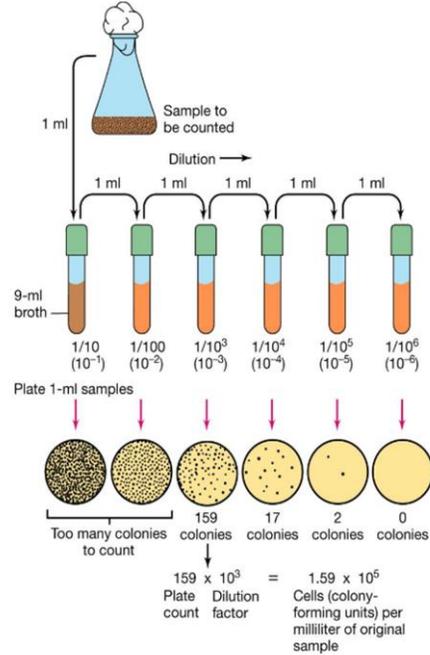
Se prepararon cinco Erlenmeyer con 90 mL cada uno de medio de cultivo LB Broth y se esterilizaron en un autoclave, preparando un blanco y un control en el que se mediría la absorbancia (Páramo, 2014).

El pre-inoculo que desde la noche anterior se dejó en crecimiento y se encontró en condiciones metabólicas aptas para ser inoculado a un volumen mayor de medio, se tomó 10 mL y se inoculó a los 4 Erlenmeyer restantes de los preparados anteriormente y se llevó al Shaker (Mayvis) donde estuvo en constante agitación a una velocidad de 170 rpm (Figura 11A), anotando el tiempo cero y habiendo hecho una primer lectura de absorbancia a 540 nm con el espectrofotómetro ya calibrado, cada 15 minutos se tomaron 3 mL de la muestra (Figura 11B) a las cuales se les midió la absorbancia (Figura 11C); una vez terminado el experimento, se graficó la curva de crecimiento bacteriano Absorbancia vs Tiempo (min) (Páramo, 2014).

7.2.4. Conteo de bacterias por el método de diluciones seriadas y vaciado en placa

Es un recuento de células bacterianas vivas solamente, para esto se prepararon 6 tubos de ensayo con 9 mL de agua destilada estéril, se marcaron con las diluciones desde 1×10^{-1} hasta 1×10^{-6} dependiendo la muestra tomada (Figura 12), de cada una de las muestras a cuales se les midió la absorbancia. Con ayuda de una pipeta estéril se tomó un 1 mL y se transfirió al tubo de dilución 1:10, mezclando en vortex y descartando la pipeta, repitiendo el proceso hasta realizar la solución 1:1000000. Utilizando el método siembra en profundidad se distribuyó con una nueva pipeta 1 mL de la dilución a una placa Petri marcada correspondiente al número de muestra y dilución, se esparció en toda la superficie de la placa a través de agitación con movimientos oscilatorios y se le agrego medio de cultivo AN agar, una vez las placas Petri inoculas se dejaron incubando en posición invertida por 12 horas. Finalmente, se procedió a contabilizar las colonias de cada plato Petri para llegar a la concentración dada en (UFC/mL) (Páramo, 2014), una vez realizado el recuento en placa Petri, se obtuvo la curva de calibración UFC/mL vs Tiempo y UFC/mL vs Absorbancia con ayuda de Microsoft Excel, obteniendo la curva de tendencia y la ecuación de la misma.

Figura 12. Conteo de bacterias



Fuente: (Madigan, Martinko, & Thomas, 2006)

7.2.5. Determinación de la concentración del Bioplaguicida aplicado en ensayo de antagonismo en invernadero

Para conocer esta concentración se tomó la absorbancia del bioplaguicida antes de su inoculación en el invernadero en cada etapa del cultivo y a través de la ecuación encontrada anteriormente, se procedió a realizar el cálculo matemático y se determinó la concentración que fue aplicada en cada etapa.

7.3. PREPARACIÓN DE LAS CONDICIONES PARA ENSAYO DE ANTAGONISMO EN INVERNADERO

7.3.1. Preparación del inoculó de los hongos fitopatógenos para la confrontación con el bioplaguicida

La preparación de inoculo de hongos fitopatógeno se realizó en el Laboratorio de Microbiología de las aguas del Programa de Investigación Estudios Nacionales y Servicios Ambientales (PIENSA) de la Universidad Nacional de Ingeniería.

✓ Selección de la cepa de cada Fitopatógeno

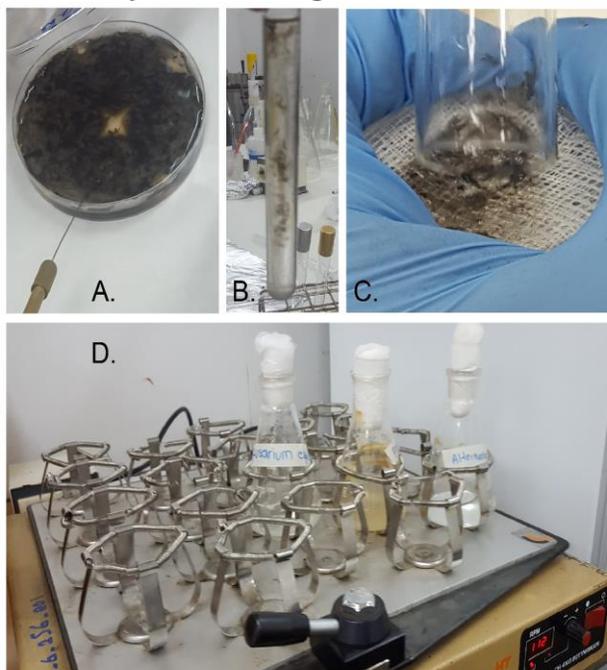
Para la fase de invernadero se trabajó con las cepas M5 – 65 (*Alternaria alternata*), M1-2-1 (*Fusarium sp*), M3-1-1 (*Fusarium equiseti*), aislados de plantas de papa enfermas procedente del departamento de Jinotega (Flores & Roque, 2017).

✓ Preparación del inoculo

Se utilizaron cultivos de los hongos fitopatógenos de una semana de crecimiento en medio de cultivo Potato Dextrose Agar (PDA), con los cuales se realizó una suspensión de esporas, como se describe a continuación: Se agregaron 20 mL de agua destilada estéril a las placas petri que contenían cada uno de los hongos fitopatógenos. Se realizó una suspensión con la totalidad del hongo, raspando con ayuda de una aza metálica estéril la parte superficial del hongo (Figura 13A). Con ayuda de una pipeta estéril, se extrajeron la suspensión de esporas y se depositó en un tubo de ensayo para su homogenización en vortex (Figura 13B). Una vez realizada la homogenización se filtró con gaza esteril en un Erlenmeyer que contenía 80 mL de agua destilada estéril (Figura 13C) y se colocó en un schaker para su homogenización final (Figura 13D).

Figura 13. Preparación del inoculó de hongo Fitopatógeno

A. Raspado del hongo con una aza, B. Tubo de ensayo con patógeno, C. Filtrado a Erlenmeyer, D. Homogenización en schaker



Fuente: Propia

✓ **Concentración de hongos Fitopatógeno por recuento en cámara de Neubauer**

Se colocó un cubreobjetos sobre la cámara de Neubauer (Figura 14A), con ayuda de una pipeta se extrajo una pequeña muestra de los Erlenmeyer que contenían la suspensión de esporas de cada uno de los hongo fitopatógenos. Se colocó la punta de la pipeta en el borde del cubreobjetos en el extremo de la cámara de Neubauer y se dejó que el líquido penetrara por capilaridad entre la cámara y el cubreobjetos ver (Figura 14B) (Pérez & Méndez, 2013).

Una vez que la cámara estaba cargada con las esporas del hongo, se colocó en la bandeja del microscopio y se sujetó con la pinza de sujeción, se enfocó en el microscopio hasta que se pudieran ver nítidas las esporas por el binocular (Figura14C),

Figura 14. Procedimiento recuento en cámara de neubauer. A. Cámara de Neubauer con cubreobjetos, B. Llenado de la cámara, C. Microscopio



Fuente: Propia

se localizó el primer cuadro y se procedió con el conteo, en este caso se contabilizaron los cuatro cuadros de las equinas y el cuadro central. Este procedimiento se repitió con cada uno de los hongos fitopatógenos, aplicando las correspondiente formulas se obtuvieron las diferentes concentraciones para cada hongo fitopatógeno en cada aplicación (Pérez & Méndez, 2013).

7.3.2. Instalación del invernadero

Conociendo los requerimientos óptimos para el cultivo de la papa, se tomaron en cuenta todos los factores para la instalación del invernadero. El cual, se instaló según las condiciones climáticas de la ciudad de Managua que se encuentra a una altura aproximada: 82.97 msnm y a una temperatura promedio: 27°C (Según características generales de los distritos de Managua, alcaldía de Managua), por lo que se debe tener en cuenta el movimiento del aire en el invernadero, el cual es de vital importancia en las zonas tropicales en especial por debajo de los 1000 metros sobre el nivel del mar, donde la alta radiación solar calienta el aire dentro de las estructuras. Utilizando el invernadero en una posición este-oeste que es la orientación para las zonas cálidas, se facilitó la aireación en la dirección del viento de la zona (Ver Anexo 15, pág. ix).

Se empleó un invernadero tipo túnel para realizar esta investigación, con una dimensión de 3 m de ancho y 7 m largo, conformado por tres arcos de tubos de hierro galvanizado, la cubierta externa de malla antiviral, plástico transparente en el techo los cuales estuvieron sujetos a la estructura del túnel utilizando lockers y zigzag de hierro galvanizado. Para evitar el exceso de luz solar se colocó en la parte superior una malla sarán (30% sombra) también conocida como malla sombra del invernadero.

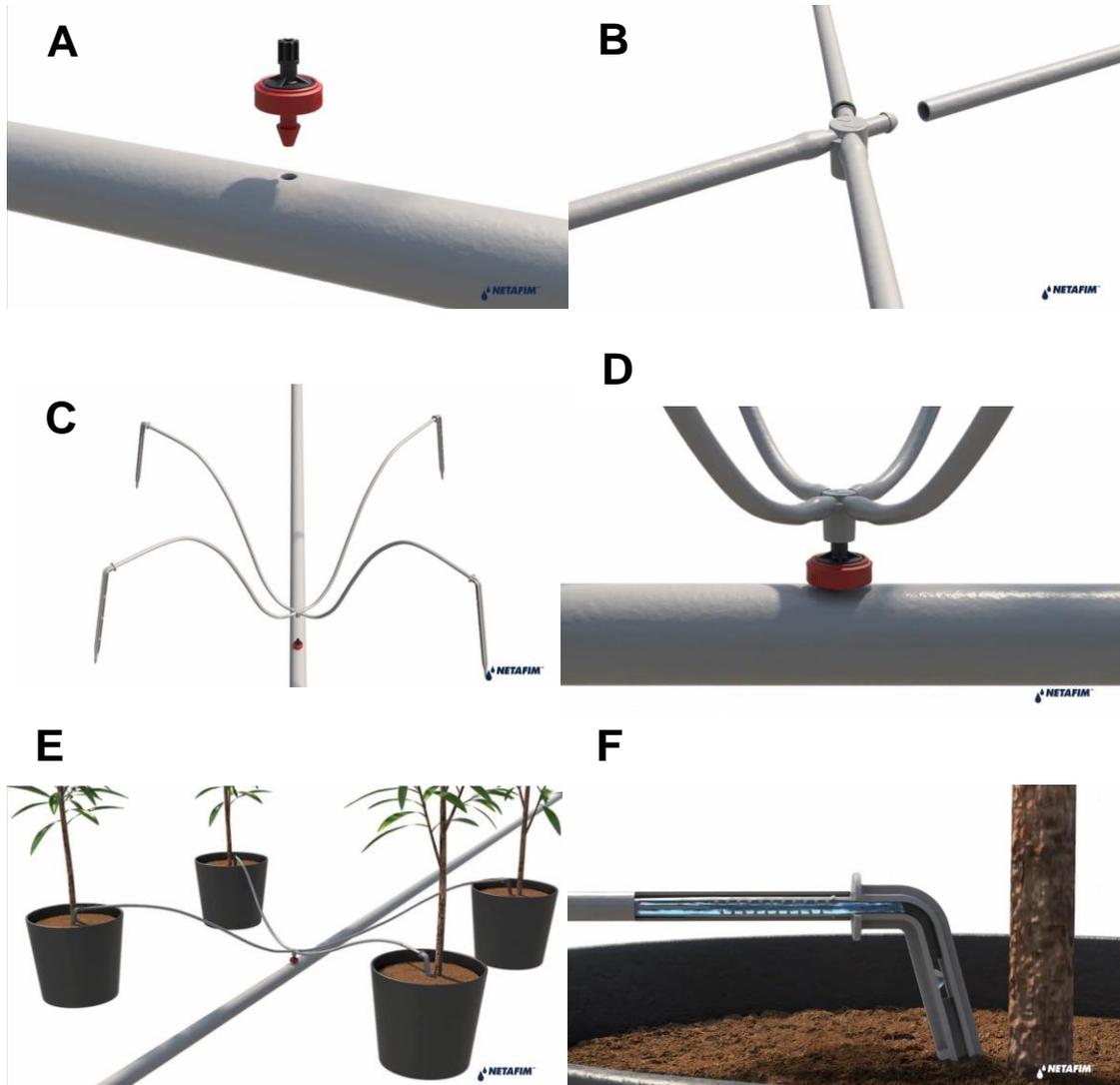
7.3.3. Instalación del riego

Se escogió el riego por goteo tipo espagueti por su fácil instalación, su reducido costo económico y por su eficiencia. Con este sistema el cultivo recibió las proporciones óptimas de agua.

El sistema de riego estuvo alimentado por la red de agua potable que abastece al Recinto Universitario, el sistema estuvo conformado por dos laterales de manguera de Polietileno de 16mm de diámetro a los cuales se le instalaron 4 goteros de botón de 4 litros/hora (Figura 15A), se instaló un distribuidor y 4 micro tubos de 8mm de diámetro por distribuidor (Figura 15B), en el otro extremo de cada micro tubo se instaló un gotero de estaca (Figura 15C), se colocó un gotero de estaca por macetera (Figura 15E).

Para reducir la temperatura en el interior del invernadero se colocaron Nebulizadores, los cuales se ubicaron en la parte más alta del mismo, de tal forma que cuando se pusieran a funcionar se creara una neblina que posibilitara disminuir las altas temperaturas en las horas más críticas del día, al finalizar la instalación del sistema se realizó una evaluación de presiones con ayuda de un manómetro de glicerina para garantizar su funcionalidad.

Figura 15. Riego por goteo tipo espagueti.
Gotero de botón conectado a un lateral de polietileno, B. Conexión de distribuidor y microtubo de 8 mm de diámetro, C. Conexión de goteros de estaca en el microtubo, D. Conexión de los goteros de estaca al gotero de botón, E. Colocación de goteros de estaca en cada macetera, F. Aplicación del agua en cada macetera.



Fuente: Netafim, 2017.

7.3.4. Preparación y esterilización del sustrato

Figura 16. Preparación del sustrato
A. Homogenización de compost y arena, B. Aumento de humedad del sustrato, C. Recubrimiento del sustrato con plástico negro, D. Medición de temperatura



Fuente: Propia

Se utilizó compost fabricado en un vivero y arena en proporciones 60–40. 60% compost y 40% arena, para obtener una textura que permita la aireación y la retención de humedad.

El sustrato preparado con los componentes y las proporciones descritas anteriormente se homogenizó (Figura 16A), se esterilizó utilizando el método de solarización, para lo cual se agregó agua al sustrato (Figura 16B) y se cubrió con plástico negro (Figura 16C) y se dejó expuesto al sol por 60 días. Con un termómetro digital, se monitoreó las temperaturas alcanzadas por el sustrato (Figura 16D) que permitan

eliminar cualquier microorganismo presente, que pudiera afectar el desarrollo del experimento (Villa, 2010).

✓ **Análisis fisicoquímico del sustrato**

Se realizaron dos análisis al sustrato, un análisis físico que se realizó en el Laboratorio de Edafología de la Universidad Nacional de Ingeniería (UNI) y un análisis químico en el que se contrataron los servicios del Laboratorio de Suelos y Agua de la Universidad Nacional Agraria (UNA). Esto con el fin de evaluar las condiciones físico-químicas del sustrato para el desarrollo óptimo de cultivo de papa.

7.3.5. Preparación y llenado de macetas

Para este ensayo se utilizaron maceteras plásticas con capacidad de 15 litros, a las cuales se le perforaron 4 ranuras en los costados para poder observar el crecimiento radicular y tuberización; se colocó una macetera ranurada sobre otra sin ranurar y se procedió a llenarlas con el sustrato.

Figura 17. Preparación y llenado de macetera



Fuente: Propia

7.3.6. Desinfección de semilla de papa

Se utilizó en este experimento semilla de papa de la variedad Monte Carlo, conocida por ser una variedad de madurez semi-precoz de 85 días, la cual se adquirió en el norte del país en la ciudad de Jinotega. Para su desinfección, los tubérculos se asperjaron con una solución de hipoclorito de sodio al 3%, seguidamente se lavaron con agua destilada estéril y se dejaron secar sobre papel toalla (Hernández-Castillo *et al.*, 2008).

7.3.7. Siembra

Se depositaron 4 tubérculos semillas en cada macetera, previamente llenadas con una capa de 15 cm de sustrato estéril, luego se le aplicó el tratamiento correspondiente, en el caso de los tratamientos con hongos se aplicó primeramente el bioplaguicida e inmediatamente se aplicó el patógeno a tratar; en las maceteras que solo contenían el hongo no se le aplicó el producto de bioplaguicida en las semillas. Posteriormente se cubrieron los tubérculos con una capa más de sustrato estéril (Figura 18) (Elhayes, 2017).

Figura 18. Siembra de tubérculos y primera inoculación de tratamientos. A. Aplicación de bioplaguicida, B. Tubérculo semilla, C. Distribución de semilla de papa en la macetera



Fuente: Propia

7.3.8. Requerimientos temperatura ambiente y humedad relativa dentro del invernadero

El cultivo requiere temperaturas de 18°C a 20°C para su tuberización (formación de tubérculos) y crecimiento, aunque se adapta bien a temperaturas entre 18°C a 25°C (INTA, 2004). Utilizando un termo-higrómetro digital, se monitoreo la temperatura y la humedad relativa en el interior del invernadero.

Cuando los valores de temperatura y humedad relativa aumentaban, se ponían en funcionamiento el sistema de nebulización para ajustar estos valores a rangos óptimos para el desarrollo del cultivo y favorecer la tuberización y el ambiente adecuado para el desarrollo de los microorganismos.

7.3.9. Manejo Agronómico del cultivo

Fertilización: Para la fertilización se utilizó fertilizante sintético 15-15-15 (fuente óptima de los tres macro nutrientes primarios N-P-K), aplicando de forma manual la dosis de fertilizante según las necesidades del cultivo durante la primera y tercera semana después de la siembra (Ver Anexo 6, pág. v)

Control de malezas: El control de malezas se realizó antes de la siembra dentro del invernadero y periódicamente de forma manual, eliminado las malas hierbas que competían con el cultivo en las maceteras, también se hizo una aplicación fuera del invernadero de glifosato dos meses después de la siembra (Ver Anexo 8, pág. vi)

7.3.10. Diseño experimental

En esta investigación se utilizó un diseño de Bloques Completos al Azar (DBCA), con 8 tratamientos (fitopatógenos vs bioplaguicida, testigo positivo y testigo absoluto) y cuatro repeticiones (bloques). Los tratamientos se asignaron el mismo número de veces aleatoriamente a cada uno de los bloques, de esta manera fue posible mantener la variabilidad entre unidades experimentales y maximizar las diferencias entre bloques (Castillo, 2011).

Las dimensiones del área en estudio fue de 7 metros de largo por 3 metros de ancho, es decir una superficie de 21 m², conteniendo 4 bloques y a su vez cada bloque con 8 maceteras.

✓ Descripción de los tratamientos

En esta investigación se confrontó el bioplaguicida con cada uno de los hongos fitopatógenos. Así mismo se aplicó individualmente cada hongo y el bioplaguicida solo. También hubo un testigo absoluto el cual no se le inoculó ningún microorganismo (Figura 19).

T1: *Alternaría alternata* VS

Bioplaguicida

T2: *Fusarium sp* VS Bioplaguicida

T3: *Fusarium equiseti* VS

Bioplaguicida

T4: *Alternaría alternata*

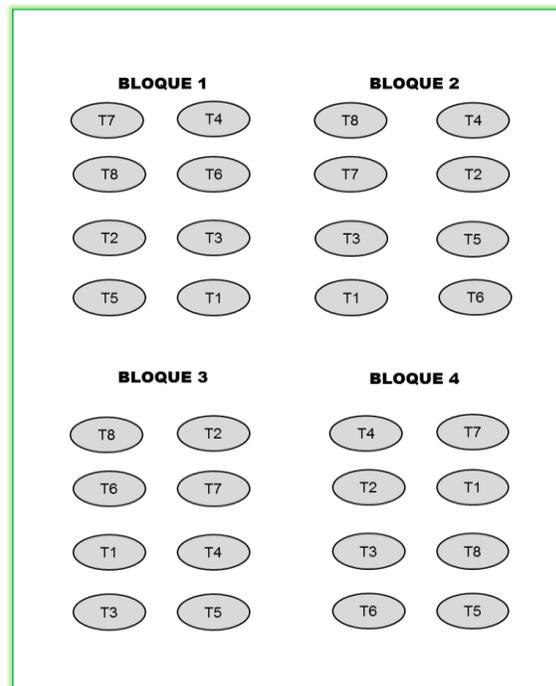
T5: *Fusarium sp*

T6: *Fusarium equiseti*

T7: Bioplaguicida

T8: Testigo Absoluto

Figura 19. Distribución de tratamientos en invernadero.



Fuente: Propia

7.3.11. Inoculación de los tratamientos

Bioplaguicida: Para el control de las enfermedades causado por los hongos en estudio en el cultivo de papa, se realizó una primera inoculación del tratamiento a base de *Bacillus Subtilis* al momento de la siembra, aplicando una lámina de bioplaguicida pulverizado sobre los tubérculos semilla. Se realizó además aplicación de 10 mL del bioplaguicida con ayuda de un atomizador manual en la superficie del sustrato en la macetera. Nota: Únicamente se inocularon los tubérculos en los tratamientos que se contempló el uso del bioplaguicida, se realizaron aplicaciones al sustrato a los 25 DDS, y por ultimo a los 50 y 75 DDS al follaje (Cuadro 4) (Corrales, Sánchez, Cuervo, Joya, & Maquez, 2012).

Se realizaron aspersiones del Bioplaguicida tanto en la superficie del sustrato con 10 mL como en la parte foliar de la planta con 20 mL, tratando de cubrir todo el follaje.

Patógenos: Para cada uno de los patógenos *Alternaría alternata*, *Fusarium sp* y *Fusarium equiseti*, se asperjo los microorganismos correspondientes al tratamiento en el sustrato con un volumen de 10 mL al momento de la siembra y 25 DDS, posteriormente se realizaron dos aplicaciones al área foliar de la planta con un volumen de 20 mL de cada microorganismo a los 50 DDS Y 75DDS (CUADRO 4).

Cuadro 4. Aplicaciones de tratamientos

Lugar	Tratamiento	DDS
Sustrato y semilla	bioplaguicida y patógenos	Siembra
Sustrato	bioplaguicida y patógenos	25
Foliar	bioplaguicida y patógenos	50
Foliar	bioplaguicida y patógenos	75

Fuente: Propia

7.4. DETERMINACION DEL EFECTO ANTAGONICO DEL BIOPLAGUICIDA CONTRA HONGOS FITOPATOGENOS EN INVERNADERO

Se tomaron en cuenta un grupo de variables en la elaboración de este estudio, todo esto con el fin de obtener datos de cada una de las variedades que fueron evaluadas y comparadas. De esta manera se midieron las distintas variables en el momento del desarrollo vegetativo del cultivo (Ver Anexo 9, pág. vi) y durante la cosecha (Ver Anexo 12, pág. viii).

7.4.1. Variables de desarrollo

- **Altura de Tallo:** Se llevó a cabo la medición de la variable altura de tallo a los 25 y 50 DDS; utilizando una cinta métrica, se midió la longitud que hay desde la base del tallo hasta la yema apical en centímetros, para las mediciones posteriores se tomaron medidas del mismo tallo seleccionado la primera vez.
- **Diámetro de Tallo:** La medición de variable diámetro de tallo se realizó a los 25 y 50 DDS, las medidas se tomaron en milímetros en la base del tallo haciendo uso de un vernier o pie de rey.
- **Número de Tallos:** Se contabilizaron el número de tallos a los 25 y 50 DDS, observando cada planta muestreada con sumo cuidado para evitar daños.
- **Número de Hojas:** Se contabilizaron manualmente el número de hojas de cada planta muestreada a los 25, y 50 DDS con sumo cuidado para evitar daños.

7.4.2. Variables de cosecha

- **Número de Tubérculos por Planta:** Se realizó una inspección a cada una de las plantas muestreadas y contabilizaran el número de tubérculos.
- **Peso de Tubérculo:** Se tomó el peso en gramos de cada uno de los tubérculos de todas las plantas muestreadas haciendo uso de una balanza de precisión.
- **Diámetro Polar:** Se midió diámetro polar en milímetros a lo largo de cada tubérculo de las plantas muestreadas, haciendo uso de un vernier o pie de rey.
- **Diámetro Ecuatorial:** Se midió el diámetro ecuatorial en milímetros en la zona media alrededor de cada tubérculo de las plantas muestreadas, haciendo uso de un vernier o pie de rey.

7.4.3. Variables de sanidad

- **Severidad:** el porcentaje de severidad, corresponde al grado de la enfermedad en aquellas plantas que resultaron infectadas en cada muestreo. Para esta variable se sugiere la siguiente escala, tomando en cuenta el porcentaje de daño del área total a los 50, 65 y 75 días después de siembra (Orjeda, 1998).

Cuadro 5. Escala usada para mediación de severidad en los tratamientos

Escala	Descripción	% de infección
0	Sin síntomas en el follaje o raíz	0
1	Necrosis radical leve, sin síntomas en el follaje	20
2	Necrosis radical y clorosis leve del follaje	40
3	Pudrición radical y amarillamiento moderado del follaje	60
4	Pudrición radical severa y amarillamiento severo del follaje	80
5	Muerte de la planta	100

Fuente: (Orjeda, 1998)

$$\%SEV = \left[\frac{(N_0 \times 0) + N_1 \times 1 + N_2 \times 2 + N_3 \times 3 + N_4 \times 4 + N_5 \times 5}{N_n \times 5} \right]$$

Donde:

N_0 = No. de plantas con valor 0 de la escala.

N_1 = No. de plantas con valor 1 de la escala.

N_2 = No. de plantas con valor 2 de la escala.

N_3 = No. de plantas con valor 3 de la escala.

N_4 = No. de plantas con valor 4 de la escala.

N_5 = No. de plantas con valor 5 de la escala.

Incidencia: el porcentaje de incidencia corresponde al número de plantas infestada en cada muestreo a los 50,65 y 75 días después de siembra se realizó el conteo de toda la población para determinar la incidencia del daño (Orjeda, 1998).

$$\%INC = \left[\frac{\text{No. de plantas enfermas}}{\text{No. de plantas total}} \right] \times 100$$

Eficacia según la fórmula de Abbott: Corresponde al porcentaje no infectado del tratamiento tomando como referencia el porcentaje de daño causado al testigo positivo (Orjeda, 1998).

$$\%Eficacia = \left(1 - \frac{\%T}{\%TP} \right) * 100$$

Donde:

%T: Porcentaje presente en el Tratamiento

%TP: Porcentaje presente en Testigo Positivo

7.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de varianza (ANOVA), es la técnica utilizada para interpretar los resultados de este tipo de experimento se sabría entonces que al menos uno de los promedios de la variable respuesta determinado para un tratamiento, es diferente de los obtenidos para los otros tratamientos. Para identificar cuál o cuáles promedios son diferentes resulta necesario realizar pruebas adicionales (Fallas, 2012)

El método de Tukey se utiliza en ANOVA para crear intervalos de confianza para todas las diferencias en parejas entre las medias de los niveles de los factores mientras controla la tasa de error por familia que especifique. Es importante considerar la tasa de error por familia cuando se realizan múltiples comparaciones debido a que la probabilidad de cometer un error tipo I para una serie de comparaciones es mayor que la tasa de error para cualquier comparación individual. Para contrapesar esta mayor tasa de error, el método de Tukey ajusta el nivel de confianza de cada intervalo individual, de modo que el nivel de confianza simultáneo resultante sea igual al valor que especifique (Fallas, 2012).

Una vez recopilados los datos de las variables respuesta a medirse en esta investigación se procedió a promediarse utilizando Microsoft Excel con ayuda de este programa se elaboró una tabla la cual contenía los valores promedios de las variables medidas de cada uno de los tratamiento por bloques, esta tabla fue copiada a la versión estudiantil del software InfoStat para llevar a cabo el análisis de varianza y prueba de Tukey, se seleccionó el análisis de varianza se separaron las variables dependiente y la variables de clasificación y como método de comparación se seleccionó el método de Tukey con un valor de significancia de 5%, obteniendo como resultados automáticamente las tablas de análisis de variancias y gráficos de barras de la prueba de Tukey para cada una de las variables evaluadas.

8. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

8.1. PREPARACIÓN DEL PROTOTIPO DEL BIOPLAGUICIDA

B.subtilis es una especie de interés para el desarrollo de bioinsumos promotores de crecimiento y como antifúngico para tratar enfermedades causadas por hongos en cultivos de interés agrícola, empleando métodos clásicos de cultivo, para detectar estos organismos (Islam *et al*, 2015). Con el fin de determinar las concentraciones utilizadas para el presente ensayo, se realizó una evaluación mediante el método de recuento en placas descrito anteriormente en la metodología (Páramo, 2014).

8.1.1. Pre-Inoculo de la bacteria *Bacillus subtilis*

Páramo (2012), realizó un ensayo de crecimiento de dos cepas de *Bacillus subtilis* (IS16 y IIS10); en el cual preparo una solución madre o pre-inoculo de cada cepa, utilizando 10 mL de LB esteril en tubo de ensayo y dejándolo crecer durante 20 horas a una velocidad de 50 rpm, obteniendo como resultados concentraciones de solución madre de 1.23E+08 UFC/mL y 1.1E+08 UFC/mL respectivamente.

En este ensayo, al inocular la bacteria a 100 mL de medio de cultivo LB Broth esteril y dejándolo crecer durante un periodo de 12 horas en constante agitación a una velocidad de 170 rpm, la solución madre o pre-inoculo dio como resultado una absorbancia de 2.315, equivalente a una concentración de 5.95E+08 UFC/mL.

Estos resultados difieren con los obtenidos por Páramo (2012), el cual obtuvo una concentración alrededor de 5 veces menor en sus pre-inoculos; lo cual pudo estar relacionado con la variación de la velocidad de agitación y disponibilidad de oxígeno para la bacteria. (Bedoya-Pérez & Hoyos-Sánchez, 2010) refuerzan esta hipótesis explicando la influencia de la relación Agitación - Aireación sobre el crecimiento celular, mostrando que al incrementar la velocidad de agitación y caudal de aire favoreció la transferencia de masa incrementando la producción celular.

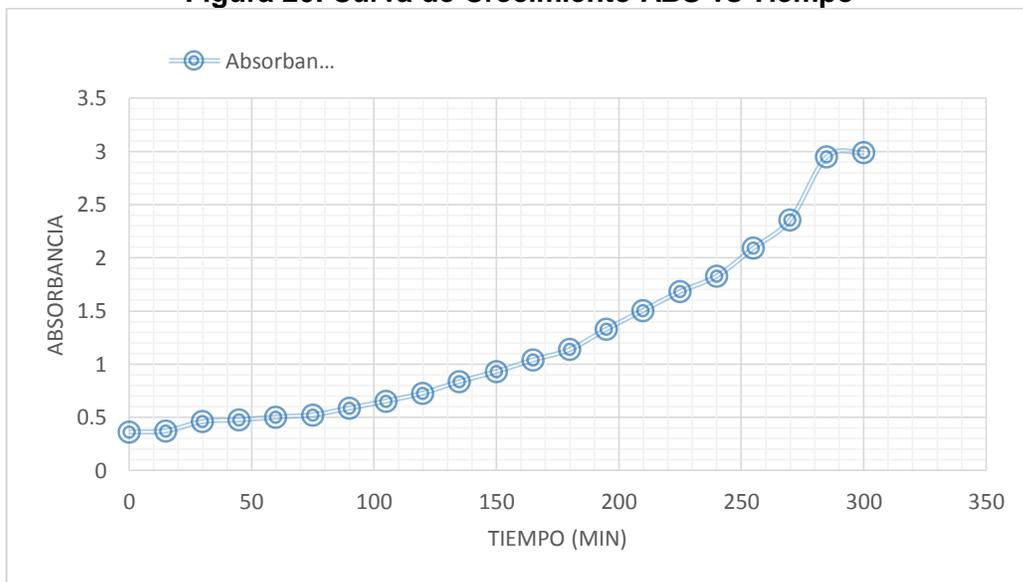
8.1.2. Curva de crecimiento microbiano

Los requisitos para que se dé un crecimiento microbiano incluye factores tanto químicos como físicos, las células necesitan condiciones favorables que beneficien su proceso de reproducción, cuando las condiciones son óptimas las células pasan por diferentes fases que son características de todas las formas de vida microbiana. El cultivo controlado de *Bacillus subtilis*, nos permitió diferenciar algunas de las fases encontrándose representadas en una curva de crecimiento microbiano (Monroy, Ospina, Paternina, & Vargas, s.f.). Esta curva se divide en cuatro fases denominadas fase de latencia, fase exponencial o fase logarítmica, fase estacionaria y fase de muerte.

Páramo (2012), realizó un ensayo de crecimiento microbiano a dos cepas de *Bacillus subtilis* (IS16 y IIS10), utilizando el medio de crecimiento LB esteril, dando inicio a la corrida cinética, agitando la muestra a 150 rpm y leyendo absorbancia a 540 nm cada 2 horas; utilizando además, el método de recuento en placa para obtener la concentración de células, dando resultados similares ambas cepas, mostrando una fase de adaptación cercana a las 6 horas a partir de la cual entran en fase exponencial permaneciendo así hasta 20 horas a partir de la cual entran en la fase estacionaria, obteniendo concentraciones para la cepa IS16 de $8.13E+08$ UFC/mL y la cepa IIS10 de $9.56E+08$ UFC/mL y una absorbancia final de 2.44 y 2.87 respectivamente.

En este ensayo, el procedimiento para obtener la curva de crecimiento microbiano, se realizó como fue detallado en la metodología; el cual dio inicio a las 10:00 am y finalizó a las 3:00 pm obteniendo la siguiente gráfica:

Figura 20. Curva de Crecimiento ABS vs Tiempo

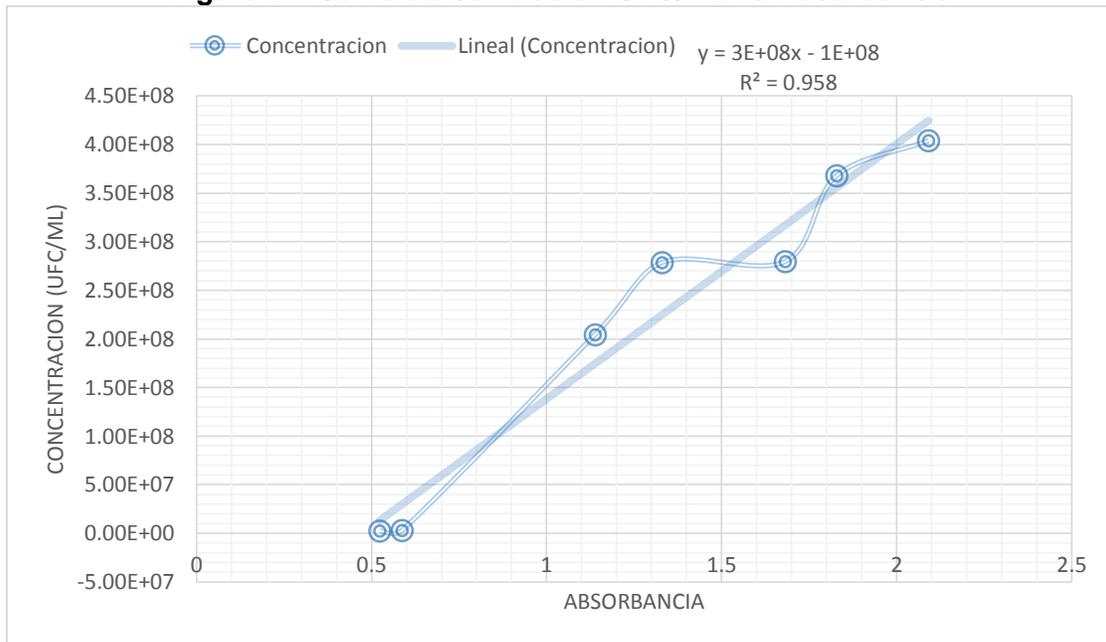


Fuente: Propia

Como se puede observar en la Figura 20, la etapa de latencia de la bacteria *B. subtilis*, se encuentra en los primeros 75 minutos del experimento, durante ese tiempo la bacteria solo tuvo un incremento de 0.16 en absorbancia; la etapa exponencial inicio a los 75 minutos y finalizó a los 285 minutos, observándose un mayor crecimiento bacteriano al aumentar la lectura de absorbancia de 0.16 a 2.95; posteriormente la bacteria entra a la etapa estacionaria donde deja de crecer, ya sea por agotamiento de nutrientes o por concentración celular.

Después de realizar el conteo de placas, se procedió a elaborar el grafico de concentración UFC/mL VS Absorbancia, determinando además, la línea de tendencia con su ecuación $y = 3E+08x - 1E+08$ (Figura 21). Esta ecuación se utilizó, para determinar la concentración aplicada en diferentes etapas del cultivo, además es fundamental al momento en que se desee continuar con el proceso de escalado con el fin de obtener mayores volúmenes de biomasa celular.

Figura 21. Curva de Calibración UFC/mL vs Absorbancia



Fuente: Propia

8.1.3. Concentración del Bioplaguicida aplicado en ensayo de antagonismo en invernadero

Cuadro 6. Concentración de bioplaguicida aplicado

Tiempo de aplicación (DDS)	Siembra	25	50	75
Absorbancia	2.106	2.106	2.315	2.404
Concentración (UFC/ml)	5.32E+08	5.32E+08	5.95E+08	6.21E+08

Fuente: Propia

Los valores obtenidos en esta investigación para la cepa de *Bacillus subtilis* DCL4-31 (F), son similares a los reportados por Páramo (2012); el cual, obtuvo concentraciones del mismo orden para ambas cepas de *B. subtilis* evaluadas y valores de absorbancias de la cepa IIS-10, similares a los obtenidos por la cepa DCL4-31 (F) en este estudio. La diferencia está con el tiempo de crecimiento obtenido por Páramo (2012), el cual para obtener las concentraciones reportadas tuvieron un periodo de crecimiento alrededor de las 20 horas, mientras que en este estudio el periodo en fase exponencial fue de solo 4.75 horas; esto pudo deberse a la concentración del pre-inoculo, el cual fue alrededor de 5 veces mayor en esta investigación que el pre-inoculo utilizado por Páramo (2012).

8.2. PREPARACIÓN DE LAS CONDICIONES PARA ENSAYO DE ANTAGONISMO EN INVERNADERO

8.2.1. Concentraciones de hongos Fitopatógenos

Corrales *et al.*, (2012), en su investigación utilizaron para la inoculación de hongo fitopatógeno, una suspensión de esporas en agua destilada estéril, la cual calibraron para obtener una concentración de 1E+04 UFC/mL, generando el testigo positivo una severidad de 100%.

Una vez realizado el procedimiento descrito anteriormente en la metodología para cada uno de los hongos fitopatógenos *Alternaria alternata*, *Fusarium sp* y *Fusarium equiseti*, se obtuvieron las siguientes concentraciones aplicadas en las diferentes etapas fenológicas del cultivo.

Cuadro 7. Concentraciones de hongos Fitopatógeno

Tiempo aplicación (DDS)	Siembra	25	50	75
<i>Alternaria alternata</i>	2.00E+05	NSC	2.50E+05	NSC
<i>Fusarium sp</i>	5.45E+06	3.25E+06	6.65E+06	-----
<i>Fusarium equiseti</i>	2.00E+05	2.50E+05	3.50E+05	-----

NSC: no se pudo contabilizar Fuente: Propia

Los resultados obtenidos en esta investigación difieren a los de Corrales *et al.*, (2012), ya que la concentración ajustada del fitopatógeno fue de 1E+04 UFC/mL y cómo se puede observar en el cuadro 7, las concentraciones de los fitopatógenos utilizadas en este estudio superan a las presentadas por Corrales *et al.*, (2012), debido a que en esta investigación no se ajustó a una concentración definida.

8.2.2. Esterilización del sustrato

La solarización es una práctica mediante la cual, al cubrir el suelo con una película de plástico transparente, la energía solar se aprovecha para incrementar en el suelo la temperatura a niveles letales para muchos fitopatógenos, insectos y maleza.

Según Sáinz & Ramírez (2007), ha demostrado que la solarización controla efectivamente muchos patógenos del suelo, como son: *Alternaria*, *Dydimella*, *Fusarium spp.*, *Phymatotrichum*, *Plasmodiophora*, *Pyrenochaeta spp.*, *Pythium spp.*, *Bipolaris*, *Rhizoctonia*, *Rosellinia*, *Sclerotinia*, *Sclerotium spp.*, *Thielaviopsis*, *Verticillium*, *Agrobacterium*, *Streptomyces*, *Orobanche* y nematodos, reduciéndolo significativamente a temperaturas entre 40 - 50°C. En esta investigación, se solarizo el sustrato por un periodo de 60 días y con ayuda de un termómetro digital, se monitoreó la temperatura alcanzada por el sustrato, la cual anduvo en el rango de 43.2°C, valor que se encuentre dentro del rango presentado por Sáinz & Ramírez (2007), permitiendo por lo tanto, eliminar cualquier microorganismo presente que pudo afectar el desarrollo del experimento.

8.2.3. Análisis Físico- Químico del sustrato

✓ Análisis Físico

En el Cuadro 8 se presentan los resultados del análisis físico de suelo realizado en el laboratorio de Edafología (UNI), los cuales fueron evaluados en base a la Guía de prácticas de campo y laboratorio de la asignatura Fundamentos de suelos (Méndez & López, 2011).

Cuadro 8. Resultados de análisis físico del sustrato utilizado.

PROPIEDAD	VALOR	CLASIFICACIÓN
Capacidad de Campo (%)	44.86%	Alta
Punto de Marchitez Permanente %	24.38%	Media
Densidad Aparente (Da)	0.83 gr/cm ³	Muy Baja
Densidad Real (Dr)	2.28 gr/cm ³	Bajo
Porosidad Total (Pt)	63.60%	Alta
Conductividad Eléctrica (CE)	0.0446 (mmhos/cm)	No salino

Fuente: (Méndez & López, 2011)

En lo que respecta a la capacidad de campo (CC), Mendez & López (2011) señalan que esta propiedad hidrofísica del suelo es de gran importancia, ya que con la misma se puede conocer las posibilidades de retención de agua en el suelo, también sirve de base para el cálculo del agua disponible y la porosidad de aireación del suelo, factores determinantes del rendimiento de los cultivos.

El sustrato utilizado en este estudio, presenta valores de capacidad de campo de 44.86 %, valor que es considerado alto, es decir que buena parte del agua es retenida por el suelo después de haber sido mojado, lo que nos permite determinar de una mejor manera cuánta agua aplicar y así evitar cambios bruscos en el contenido de humedad en el suelo, que causan deformaciones en los tubérculos y mayores ataques de larvas de polillas de la papa.

Así mismo, el punto de marchitez permanente (PMP) es la humedad mínima del suelo necesaria para que una planta se mantenga ilesa. Si la humedad del suelo es menor que el punto de marchitamiento de la planta, ésta se marchitará. (Cortéz & Hurtado, 2002) expresan en la guía técnica de papa, que los excesos de humedad favorecen la diseminación de bacterias y hongos, recomendándose mantener el agotamiento permisible entre el 30 al 35% del agua útil en el suelo, por esto es indispensable conocer este valor para mantener un riego que evite que las plantas se marchiten y mueran evitando así pérdidas en la cosecha, en este resultado obtuvimos una marchitez de 24.38%, el cual es un valor medio, lo que indica que no se debe disminuir la humedad hasta ese valor o menos, porque las plantas no podrían recuperarse de ese estado.

La densidad aparente según Cortes & Hurtado (2002), el rango óptimo para el cultivo de la papa es de 1.20 gr/cm³, lo que se aduce a la relación entre el peso de una muestra y el volumen que ella ocupa. En los resultados de laboratorio se obtuvo un valor de densidad aparente muy baja de 0.83 gr/cm³, es una densidad que no supera el mínimo de 1 gr/cm³, esto es debido al efecto beneficioso de la materia orgánica, que disminuye la densidad aparente al influir positivamente en la porosidad, habrá menos compactación y mayor contenido de humedad en el suelo, como podemos apreciar con la capacidad de campo que se presentó anteriormente, este valor menor al óptimo no altera negativamente al cultivo.

Mendez & López (2011) citan que la densidad real (Dr) o densidad de la fase sólida del suelo, es la relación entre la masa del suelo seco y la masa de igual volumen de agua. El valor de la densidad real depende de la naturaleza de los minerales integrantes y de la cantidad de sustancias orgánicas. Para la mayoría de los suelos el valor medio de la densidad de su fase sólida es de 2.65 gr/cm³, variando en función de las causas indicadas. Cuanto más humus contiene el suelo, menor es la densidad real. La densidad real del sustrato fue de 2.28 gr/cm³, el cual se considera un valor bajo, es decir, que el suelo contaba con mucha materia orgánica, lo que es favorable para el cultivo.

Según (Méndez & López, 2011) la conductividad eléctrica se define como la capacidad de una sustancia de conducir la corriente eléctrica. Esta relaciona con la presencia de iones disueltos en el agua, los cuales son partículas cargadas eléctricamente; cuanto mayor sea la cantidad de iones disueltos mayor será la conductividad eléctrica del agua o el suelo. (Mesa, 2003), menciona que la influencia de la salinidad en los cultivos, expresada en conductividad eléctrica, a partir de 2 a 4 milimhos comienzan las afectaciones entre 20 y 50 % del rendimiento; por encima de estos valores de conductividad eléctrica, los daños son mayores. Los datos indican un resultado no salino en base al valor obtenido de 0.0446 milimhos/cm que es menor a 2.0 en milimhos/cm, es decir es casi nulo, lo cual favorece al cultivo de papa.

Todas estas propiedades (capacidad de campo, densidad aparente y densidad real) se relacionan también con la porosidad, el resultado obtenido de porosidad fue de 63.6 %, el cual es considerado como alta, lo que proporciona al suelo una gran capacidad de aireación y circulación del agua, lo que en muchos de los casos es algo deseable, este valor permite determinar qué tan a menudo se debe aplicar el riego para mantener una buena humedad en la planta, tal como se ha abordado anteriormente.

✓ **Análisis químico**

En el Cuadro 9, se presentan los resultados del análisis químico del suelo realizado en el Laboratorio de Suelos y Agua (UNA), los cuales fueron evaluados en base a tabla de rango de clasificación aproximada de nutrientes en suelos de Nicaragua (Quintana *et al.*, 1983).

Cuadro 9. Resultados de análisis químico del sustrato utilizado.

PROPIEDAD	VALOR	CLASIFICACIÓN
Potencial Hidrogeno (pH):	6.79	Ligeramente acido
Materia Orgánica (MO):	4.14%	Alto
Nitrógeno(N)	0.21%	Alto
Fosforo (P disp.):	17.77 ppm	Medio
Potasio (K)	0.29 ppm	Medio
Calcio (Ca).	16.45 meq/100 g	Alto
Magnesio (Mg).	4.92 meq/100 g	Alto
Capacidad de intercambio catiónico	25.91 meq/100 g suelo	Medio

Fuente: Quintana *et al.*, 1983.

Según Cortéz & Hurtado (2002), para el cultivo de papa los rangos óptimos de pH del suelo para el adecuado desarrollo está entre 5 a 7, el cual es considerado como una de las principales variables en los suelos, ya que controla muchos procesos químicos; afecta específicamente la disponibilidad de los nutrientes de las plantas, mediante el control de las formas químicas de los nutrientes. En el caso del sustrato utilizado en este estudio, el pH tiene un valor de 6.79, el cual se encuentra dentro del rango adecuado, permitiendo al cultivo aprovechar la mayoría de los nutrientes disponibles.

En cuanto a la Materia Orgánica (MO), el análisis de laboratorio dio un valor de 4.14, el cual se encuentra en un rango alto. La materia orgánica favorece la fertilidad del suelo, le da al suelo un color oscuro que hace que absorba más radiaciones y aumente su temperatura, estabiliza su estructura, incrementa su permeabilidad, aumenta su capacidad de retención de agua, lo que facilita el asentamiento de vegetación y dificulta la erosión hídrica y eólica (Consumoteca, 2009), de ahí que sea muy útil para conocer la fertilidad del sustrato.

Cortéz & Hurtado (2002) explican que la mayor absorción de nutrientes ocurre durante los primeros 56 días después de la siembra; en el cultivo de papa las plantas extraen del suelo el nitrógeno durante el período anterior a la floración, por lo que es conveniente fertilizar antes que aparezcan las primeras flores, valores mayores de 0.15% de nitrógeno son altos, los resultados reportan que el sustrato contaba con 0.21%, lo que indica un alto contenido de nitrógeno.

En lo que respecta al fosforo Cortéz & Hurtado (2002), señala que este nutriente es extraído por las plantas durante todo el ciclo del cultivo, según Quintana *et al.*, 1983 señala que los valores menores a 10 ppm corresponde a un suelo pobre, entre 10-20 ppm un suelo medio y mayores de 20 ppm un suelo alto. El fosforo presentó un valor medio en el sustrato de 17.77 ppm, lo que indica una presencia regular de este nutriente para ser aprovechado en el cultivo. Con el fin de evitar cualquier efecto de indisponibilidad de este nutriente, se decidió aplicar fertilizante completo (15-15-15).

Por otra parte, Torres Duggan (2016) afirma que una buena nutrición potásica aumenta la resistencia a condiciones adversas como sequías o presencia de enfermedades, el K cumple funciones trascendentes en la fisiología de las plantas. Actúa a nivel del proceso de la fotosíntesis, en la translocación de fotosintatos, síntesis de proteínas, activación de enzimas claves para varias funciones bioquímicas; en el análisis químico, se obtuvo un valor de 0.29 ppm, que corresponde a una valoración media. Según Quintana *et al.*, (1983), por ser uno de los macronutrientes que necesita la mayoría de los cultivos, también fue adicionado mediante el fertilizante completo 15-15-15, que mejoro a un nivel óptimo los requerimientos del cultivo de la papa.

8.2.4. Determinación de temperatura y humedad relativa dentro del invernadero.

En el Cuadro 10 se presentan los valores de temperatura promedio y humedad relativa, medidas a los 65, 70 y 75 DDS.

Cuadro 10. Resultados de temperatura y humedades relativas tomadas en situ.

DDS	Hora	T°C (prom)	Hr (prom)
65	06:00 a.m.	28.3	80
	12:00 m.d.	31.1	84
	06:00 p.m	29.2	76
70	06:00 a.m.	28	79
	12:00 m.d.	36.9	82
	06:00 p.m	31	80
75	06:00 a.m	28.5	82
	12:00 m.d.	33.1	67
	06:00 p.m	28.8	72

Fuente: Propia

Según (INTA. 2004), el cultivo de la papa requiere temperaturas de 18°C a 20°C para su tuberización (formación de tubérculos) y crecimiento, aunque se adapta bien a temperaturas entre 18°C a 25°C; en el Cuadro 10 se puede observar, que la temperatura promedio se encuentran entre los 28°C y 36.9°C, lo cual difiere con el rango óptimo de este cultivo, lo que genera un mal desarrollo de la planta afectando el rendimiento. (Khedher *et al.*, 1985) fundamenta lo antes mencionado señalando en su estudio, que temperaturas mayores a los 30°C producen plantas más altas, hojas más pequeñas y valores más altos en la relación tallos/hojas. (Nowak & Colborne, 1989) indican que en el cultivo de papa se reduce significativamente la tuberización y sufren retrasos en la formación de tubérculos y en algunos casos no logran tuberizar.

8.3. DETERMINACION DEL EFECTO ANTAGONICO DEL BIOPLAGUICIDA CONTRA HONGOS FITOPATOGENOS EN INVERNADERO

8.3.1. Variables de desarrollo

Estas variables fueron tomadas en la etapa fenológica de desarrollo del cultivo de la papa variedad Monte Carlo, para evaluar los efectos promotores de crecimiento de la bacteria *Bacillus subtilis* a los 25 DDS y 50 DDS obteniendo los siguientes resultados.

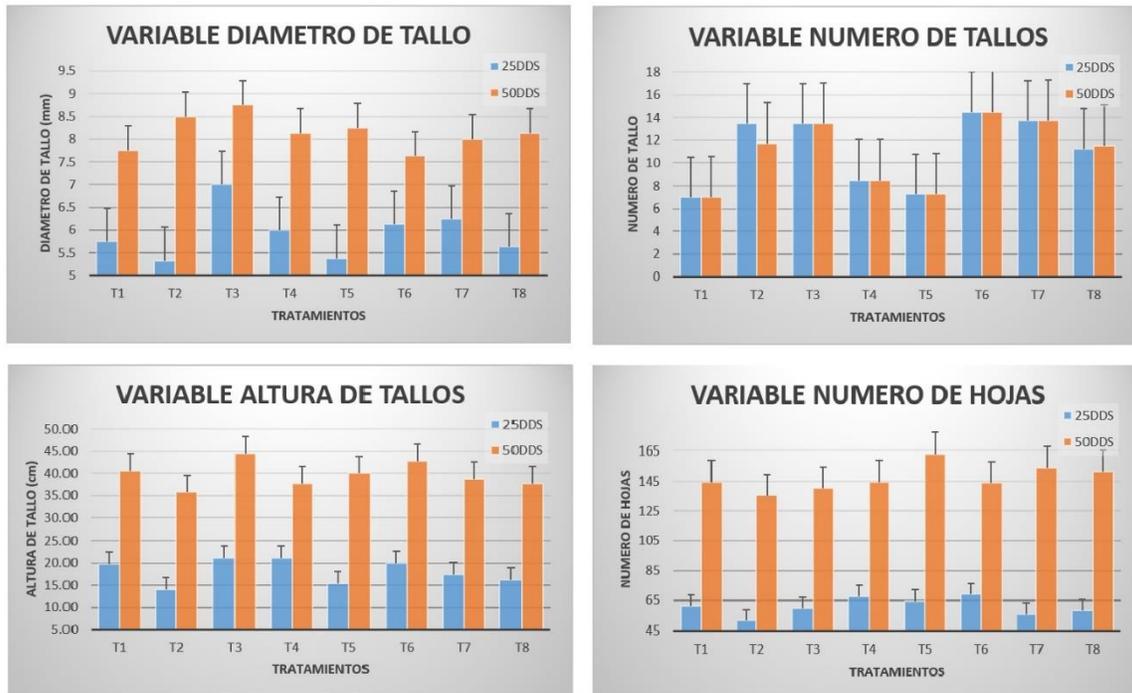
Cuadro 11. Resultado de análisis de varianza y prueba de Tukey para variables de desarrollo

Tratamiento	Diámetro de tallo (mm)		Número de tallos		Altura de tallo (cm)		Número de hojas	
	25 DDS	50 DDS	25 DDS	50 DDS	25 DDS	50 DDS	25 DDS	50 DDS
T1	5.75 a	7.75 a	7 a	7 a	19.75 a	40.63 a	61 a	144.75 a
T2	5.33 a	8.5 a	13.5 a	11.75 a	14 a	35.75 a	51.75 a	135.25 a
T3	7 a	8.75 a	13.5 a	13.5 a	21.13 a	44.5 a	59.5 a	140.5 a
T4	6 a	8.13 a	8.5 a	8.5 a	21.13 a	37.75 a	67.5 a	144.75 a
T5	5.38 a	8.25 a	7.25 a	7.25 a	15.38 a	40 a	64.5 a	163.25 a
T6	6.13 a	7.63 a	14.5 a	14.5 a	20 a	42.75 a	68.75 a	144 a
T7	6.25 a	8 a	13.75 a	13.75 a	17.38 a	38.75 a	55.75 a	153.75 a
T8	5.63 a	8.13 a	11.25 a	11.5 a	16.25 a	37.75 a	58 a	151 a
GL t	7	7	7	7	7	7	7	7
Gl error	24	24	24	24	24	24	24	24
F	0.56	0.46	0.79	0.72	1.02	0.56	0.61	0.38
P-Valor	0.781 NS	0.853 NS	0.6053 NS	0.6594 NS	0.4405 NS	0.7810 NS	0.7404 NS	0.9035 NS

Fuente: Propia

En el cuadro 11 se pueden observar el resultado del análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey, para las variables de desarrollo, Diámetro de tallo (mm), Número de tallos, Altura de tallo (cm) y Número de hojas a los 25 DDS Y 50DDS. Al realizar el análisis de varianza, se obtuvo un P-Valor en cada una de las variables, mayores al nivel de significancia estadística de 0.05, no habiendo diferencias significativas entre los tratamientos evaluados, por lo que se acepta la hipótesis nula (Ho), donde el Bioplaguicida a base de *Bacillus subtilis* no promueve el crecimiento del cultivo y no tiene efecto en la inhibición del desarrollo de los hongos fitopatógenos *Alternaria alternata*, *Fusarium equiseti* y *Fusarium sp* que afectan al cultivo de papa variedad Monte Carlo en condición de invernadero.

Figura 22. Gráficos de Variables de desarrollo



Fuente: Propia

Los resultados obtenidos mediante el análisis de varianza para las variables de desarrollo nos muestran que no hubo diferencia significativa; en la Figura 22 se observan los valores promedio de cada uno de los tratamientos para las variables diámetro de tallo, número de tallo, altura de tallo y número de hojas; en el caso del tratamiento T7 (Bioplaguicida) superó a T8 (Testigo absoluto) en las variables número de tallos, altura de tallos y número de hojas; por otro lado, el tratamiento Bioplaguicida vs *Alternaria alternata* (T1) superó a su control positivo *Alternaria alternata* (T4) en la variable altura de tallos por 2.88 cm. El tratamiento Bioplaguicida vs *Fusarium sp.* (T2) presentó mejores resultados que su control positivo *Fusarium sp.* (T5) en las variables diámetro de tallo y número de tallo y en cuanto al tratamiento Bioplaguicida vs *Fusarium equiseti* (T3), estuvo por encima de su control positivo *Fusarium equiseti* (T6) en las variables diámetro de tallo y altura de tallo.

Ramos – Hernandez (2011) evaluó el crecimiento promotor de *Bacillus subtilis* en el cultivo de tomate, inoculó las cepas Mza01 y Lvpa en las semillas del cultivo las cuales fueron sembradas posteriormente en sustrato estéril, estas fueron transplantadas a un invernadero 28 días después y se realizaron dos evaluaciones de tallo, hoja y área foliar específica en cm². El tratamiento de inoculación con *B. subtilis* en el primer y segundo muestreo demostró que, la cepa Mza01 en plantas de tomate incrementó de manera significativa el área foliar en 107 % y 165.1 % respectivamente para cada muestreo, también lo superó en acumulación de materia

seca en tallo, en raíz, y en hoja, mostrando que hubo un efecto promotor de crecimiento en cada uno de los muestreos realizados en cuanto a el área foliar y ejerció un efecto positivo al incrementar los rendimientos de fruto en el cultivo de tomate.

A diferencia de lo reportado por Ramos-Hernandez (2011), el cual mostró como resultado que ambas cepas evaluadas evidenciaron tener un incremento de manera significativa en el área foliar, ya que hubo un efecto promotor de crecimiento. En este trabajo como fue mencionado anteriormente, las variables de desarrollo al realizar el análisis de varianza (ANOVA) no se encontró diferencias significativas entre los tratamientos evaluados, lo cual pudo estar influenciado por las altas temperaturas registradas dentro del invernadero y según INTA (2004), las temperaturas óptimas están entre 18°C a 25°C; estas altas temperaturas, tuvieron como efecto tallos altos y débiles, provocando que las plantas cayeran hacia los lados, Khedher *et al.*, (1985), señala en su estudio que temperaturas mayores a los 30°C producen plantas más altas, hojas más pequeñas.

Por otro lado estos resultados de desarrollo coinciden con lo reportado por Corrales *et al.*, (2012), el cual realizó una investigación en invernadero utilizando cepas de *Bacillus subtilis*, al analizar el número de ramas y parte aérea de las plantas al inicio y al final, el análisis estadístico de los datos mostró que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los tratamientos evaluados, pero si en la raíz, se puede deber a que las bacterias del genero *Bacillus spp.*, han sido reportadas en la literatura como promotoras de crecimiento vegetal al estimular el desarrollo de las raíces de las plantas; cabe destacar que aunque en esta investigación no se evaluó el peso ni longitud radicular se pudo observar que los tratamiento en los que se inoculo la bacteria *Bacillus subtilis*, presentaron un mayor sistema radicular (Ver Anexo 22, pág. xvi).

8.3.2. Variables de cosecha

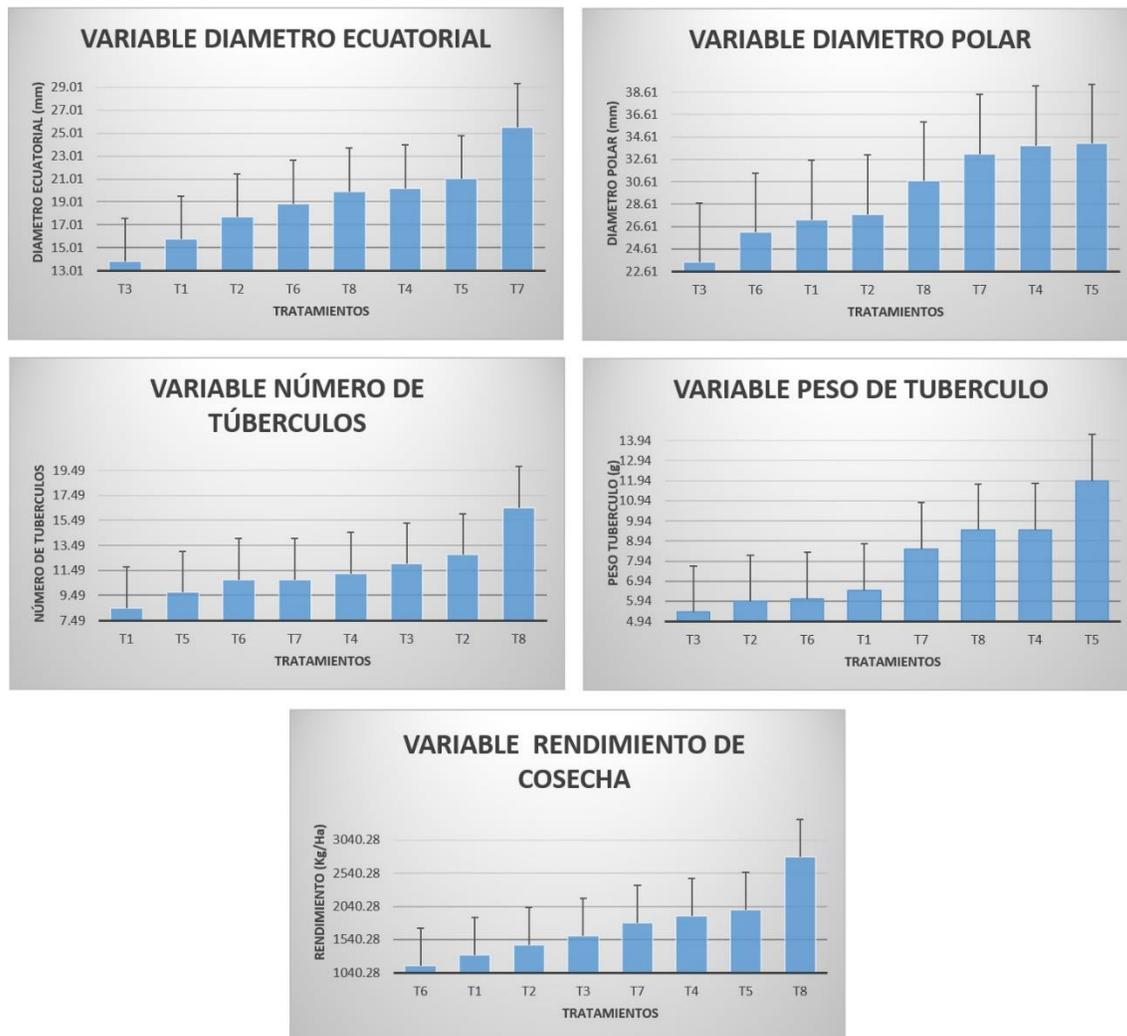
Cuadro 12. Resultados de análisis de varianza y prueba de Tukey para variables de cosecha

TRATAMIENTO	No. Tubérculo	D. Polar (mm)	D. Ecuatorial (mm)	Peso Tubérculo (g)	Rendimiento de cosecha (kg/ha)
T1	8.5 a	27.22 a	15.75 a	6.49 a	1312.92 a
T2	12.75 a	27.71 a	17.69 a	5.93 a	1462.62 a
T3	12 a	23.41 a	13.79 a	5.39 a	1590.88 a
T4	11.25 a	33.87 a	20.19 a	9.5 a	1894.3 a
T5	9.75 a	34.03 a	21.04 a	11.94 a	1985.91 a
T6	10.75 a	26.08 a	18.86 a	6.07 a	1150.48 a
T7	10.75 a	33.1 a	25.56 a	8.54 a	1787.5 a
T8	16.5 a	30.66 a	19.91 a	9.47 a	2789.39 a
GL TRATAMIENTO	7	7	7	7	7
GL ERROR	24	24	24	24	24
F	0.53	0.57	0.89	1	0.81
P-VALOR	0.7998 NS	0.7759 NS	0.5302 NS	0.4575 NS	0.5855 NS

Fuente: Propia

En el cuadro 12 se pueden observar el resultado de análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey para las variables de cosecha, Número de tubérculos, Diámetro polar (mm), Diámetro ecuatorial (mm), Peso de tubérculo (g) y Rendimiento de cosecha (kg/ha). Al realizar el análisis de varianza para las variables de cosecha, se obtuvieron P-Valores en cada una de las variables, mayores al nivel de significancia estadística de 0.05, encontrando que no hay diferencias significativas entre los tratamientos evaluados, por lo que se acepta la hipótesis nula (Ho).

Figura 23. Gráficos de variables de cosecha



Fuente: Propia

Los resultados obtenidos mediante el análisis de varianza para las variables de cosecha nos muestran que no hubo diferencia significativa, en la figura 23 se observan los valores promedios de cada uno de los tratamientos para las variables diámetro ecuatorial, diámetro polar, número de tubérculos, peso de tubérculo y rendimiento de cosecha, encontrando en los valores promedios de diámetro polar y diámetro ecuatorial que los tubérculos cosechados fueron muy pequeños, lo que se reflejó en un menor peso de tubérculos y por ende en el rendimiento de la cosecha muy bajo.

Para la variable diámetro ecuatorial, el tratamiento T7 (Bioplaguicida) fue el que sobresalió de entre todos los tratamientos evaluados; por otro lado el tratamiento Testigo absoluto (T8) fue el que presentó los mejores resultados en las variables

Número de Tubérculos y Rendimiento (Kg/Ha), las cuales son las variables de mayor interés para los productores.

Hernández-Castillo *et al.*, (2008), emplearon tubérculos de papa variedad César los cuales fueron inoculados a nivel de invernadero por tratamientos de *Bacillus* con dos cepas B9 y B15 las cuales fueron aisladas de la rizosfera del suelo, de plantas de chile y papas, para la aplicación de los tratamientos se depositó en una maceta un tubérculo de papa con 50 gr de trigo infectado con el hongo *Rhizoctonia solani* al que luego se le asperjó con un atomizador manual la suspensión de esporas de *Bacillus*, agregándole suelo estéril para cubrirlo, a los 60 días se realizaron evaluaciones de altura de planta, peso fresco del follaje y de tallos subterráneos, así como de incidencia y severidad, se pudo notar que se incrementó el rendimiento notablemente en los tratamientos donde se aplicaron las cepas de *Bacillus spp.*, los resultados de esta investigación también mostraron que las cepas B9 y B15 tuvieron un efecto sinérgico en la producción.

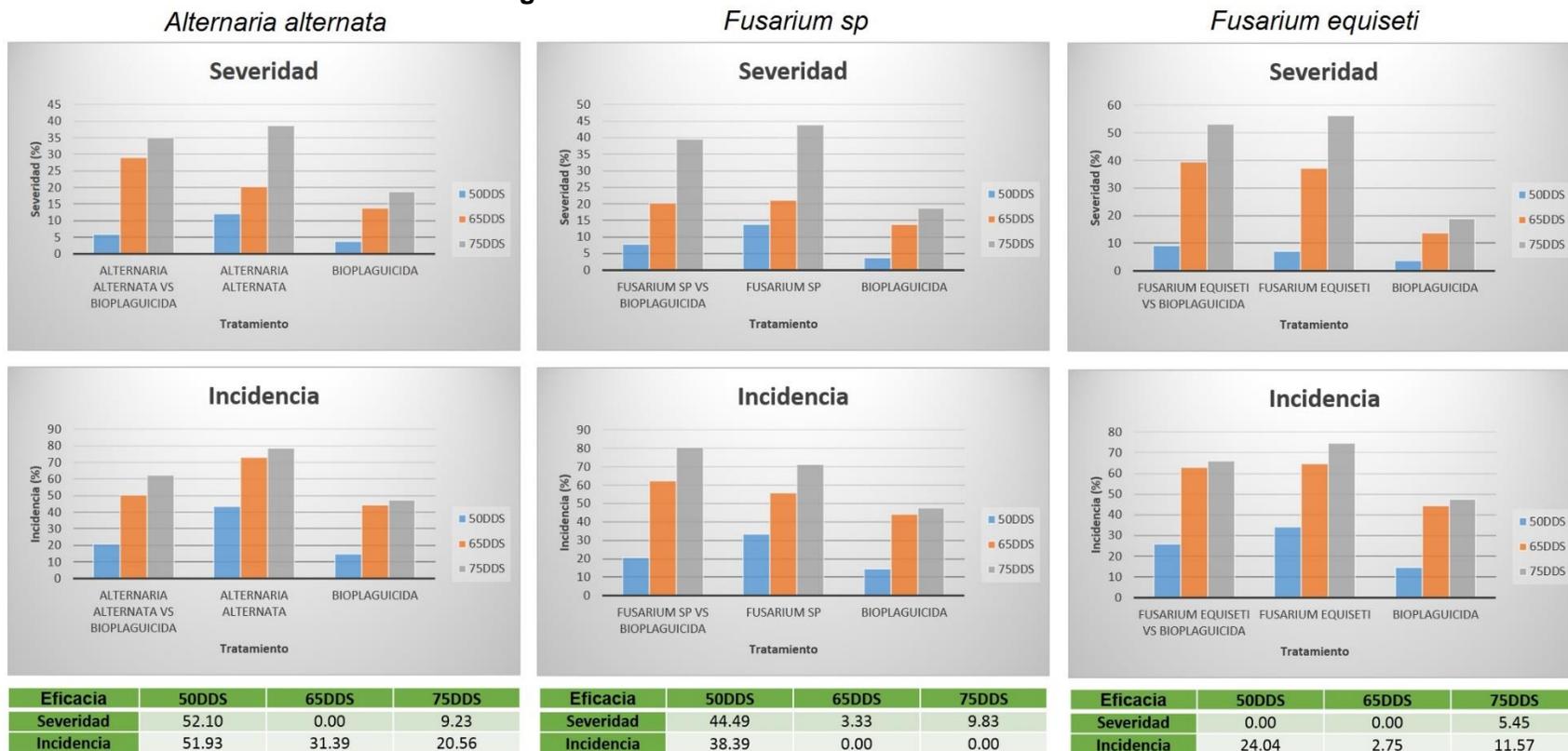
Nuestros resultados difieren a lo reportado por Hernández-Castillo *et al.*, (2008), quienes utilizaron en su investigación tubérculos de papa variedad César, evaluando a nivel de invernadero el efecto promotor de crecimiento de dos cepas B9 y B15 de *Bacillus*, demostrando que ambas cepas incrementaron el rendimiento notablemente en los tratamientos donde se aplicaron. En este trabajo, el mayor rendimiento de cosecha lo obtuvo el tratamiento Testigo absoluto con un total de 2768.39 Kg/Ha equivalente a 61.3 qq/Ha. Este rendimiento obtenido se encuentra muy por debajo de la media nacional para el cultivo de papa, el cual según INTA. (2004), esta entre 400 – 500 qq/Ha, esto es debido a que el experimento fue realizado en una zona con altas temperaturas, lo cual generó un mayor desarrollo en el área foliar y menos desarrollo de tubérculos y raíces, en algunos casos el cultivo no logró tuberizar.

8.3.3. Variable sanidad

Corrales *et al.*, (2011), en su investigación evaluaron el efecto biocontrolador de 4 cepas de *Bacillus spp.* frente a *Fusarium spp.* en el cultivo de romero bajo condiciones de invernadero; obteniendo en todos los tratamientos con *Bacillus* un mayor peso seco en hojas, en comparación con los bioensayos y los testigos. Sin embargo, fue la cepa B2 el que mostró el mayor y mejor porcentaje frente a los testigos, en cuanto al peso seco en raíz y tallo, en lo referente a los resultados de severidad para la cepa B2, obtuvo un resultado de severidad de 13.3 %, siendo esta cepa con la que el hongo presentó menor severidad de la enfermedad en comparación con las demás cepas evaluadas, siendo estadísticamente diferentes con respecto al Testigo positivo, el cual presentó una severidad mayor de 50 %.

En la figura 24 se observan los gráficos de severidad e incidencia de daño, así como el cuadro de eficacia del bioplaguicida a base de *Bacillus subtilis* frente a cada uno de los hongos Fitopatógenos evaluados.

Figura 24. Resultados de las variables sanidad



Fuente: Propia

Al evaluar el efecto biocontrolador de *Bacillus subtilis* DCL4-31 (F) contra los hongos fitopatógenos, el bioplaguicida inhibió el desarrollo de los hongos *Alternaría alternata* y *Fusarium sp* a los 50 DDS (Figura 24), con una eficacia de 52.10% y 44.49% respectivamente en la variable Severidad y en un 51.93% y 38.39% respectivamente en la variable Incidencia de daño. En cuanto al hongo *Fusarium equiseti*, los resultados obtenidos indican que no hubo inhibición; por cual se acepta la hipótesis alternativa y se rechaza la hipótesis nula.

Los resultados obtenidos en este trabajo son similares a los reportados por Corrales *et al.*, (2011), quienes obtuvieron una eficacia del producto aplicado de 73.4%. De igual manera en esta investigación, se obtuvieron resultados de inhibición contra *Alternaría alternata* y *Fusarium sp.* a los 50 DDS, obteniendo eficacias del bioplaguicida aplicado de 52.10% y 44.49%; contra *Fusarium equiseti* el bioplaguicida no inhibió el crecimiento del hongo, siendo la eficacia del producto de 0.00%. Los resultados de inhibición de los hongos fitopatógenos en condiciones de invernadero, concuerdan con los resultados de antagonismo obtenidos en condiciones in vitro, en los cuales se observó que la bacteria inhibió en un menor porcentaje al hongo fitopatógeno *Fusarium equiseti*.

9. CONCLUSIONES

- La cepa aislada de *Bacillus subtilis* demostró tener un crecimiento acelerado en la prueba de cinética a nivel de laboratorio, obteniendo concentraciones en un rango de 5.32E+08 a 6.21E+08 UFC/mL en un periodo de tiempo de 5 horas, en la cual la fase exponencial de crecimiento de la bacteria duro 3.5 horas, creciendo en un medio de cultivo comercial LB Broth (Miller).
- Los resultados obtenidos en cuanto a temperatura no fueron favorables para el cultivo, afectando el desarrollo y tuberización de la planta, ya que estas fueron mayores a 30°C sobrepasando a la temperatura optima de 18 a 20°C.
- Los resultados físico-químico realizados al sustrato mostraron que este contaba con los nutrientes necesario para el desarrollo óptimo del cultivo mostrando ser un sustrato muy fértil además de contar con buenas propiedades físicas para almacenamiento de agua y adecuada aireación.
- Finalmente, en las pruebas de confrontación a nivel de invernadero, para determinar el efecto antagonista del bioplaguicida a base de *Bacillus subtilis* contra los hongos fitopatógeno *Alternaría alternata*, *Fusarium sp*, *Fusarium equiseti*, el bioplaguicida presentó resultados de inhibición a los 50 DDS contra los hongos fitopatógenos *Alternaría alternata* y *Fusarium sp.*, obteniendo una eficacia del bioplaguicida aplicado de 52.10% y 44.49% respectivamente; contra el hongo fitopatógeno *Fusarium equiseti* los resultados obtenidos indican que no hubo inhibición.

10. RECOMENDACIONES

- Establecer un lugar de ensayo más amplio que evite el contacto entre tratamientos y propicie una mejor aplicación de los insumos, evitando la contaminación cruzada de microorganismos.
- Realizar otros ensayos de antagonismo en las zonas productoras de papas en el norte del país, para evitar problemas de temperaturas elevadas evaluando diferentes concentraciones del bioplaguicida.
- Aplicar volúmenes del bioplaguicida, considerando la cantidad de tallos por planta, con el fin de obtener una aplicación más uniforme del bioplaguicida en el cultivo.
- En la realización de futuros ensayos de antagonismo en invernadero y/o campo, considerar la proporción 1000:1 que debe guardar el antagonista para ser eficiente en el control biológico del fitopatógeno.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Bastidas, O. (s.f). <http://www.celeromics.com>. Obtenido de <http://www.celeromics.com/es/resources/docs/Articles/Conteo-Camara-Neubauer.pdf>
- Bedoya-Pérez, J.-C., & Hoyos-Sánchez, R.-A. (2010). efecto de la relación agitación-aireación sobre el crecimiento celular. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Volumen 63*(Numero 1), 5293-5305.
- BellRod Corporation. (Julio de 2016). *BellRod*. Obtenido de BellRod Corporation: <http://bellrodcorporation.com/producto/tacre-bacillus/>
- Broca Pérez, B. (22 de junio de 2009). *Repositorio Dspace*. Obtenido de Repositorio de Tesis del Instituto Politécnico Nacional: [http://tesis.bnct.ipn.mx/dspace/bitstream/123456789/3767/1/EVALUACION EXPERIMENTAL.pdf](http://tesis.bnct.ipn.mx/dspace/bitstream/123456789/3767/1/EVALUACION_EXPERIMENTAL.pdf)
- Castillo, C. (lunes 4 de Julio de 2011). *Estadística, Matemática y Computación*. Obtenido de Estadística, Matemática y Computación: <http://reyesestadistica.blogspot.com/2011/07/diseno-de-experimentos-al-completo-azar.html>
- Consumoteca. (14 de octubre de 2009). www.consumoteca.com. Obtenido de <https://www.consumoteca.com/bienestar-y-salud/medio-ambiente/materia-organica/>
- Corrales, L., Sánchez, C., Cuervo, J., Joya, J., & Maquez, K. (2012). *Efecto biocontrolador de Bacillus spp., frente a Fusarium sp., bajo condiciones de invernadero en plantas de tomillo(thymus vulgaris L.)*. artículo producto de la investigación , Bogotá, Colombia.
- Cortéz, M., & Hurtado, G. (Diciembre de 2002). <http://www.centa.gob.sv>. Obtenido de Guía técnica del cultivo de papa: <http://www.centa.gob.sv/docs/guias/hortalizas/Guia%20Papa.pdf>
- ECOagricultor. (Noviembre de 2012). www.ecoagricultor.com. Obtenido de <https://www.ecoagricultor.com/tipos-de-sustrato-para-huertos-en-maceta/>
- ECROMA. (2017). Obtenido de <http://www.ecroma.com/monte-carlo#top>
- Elhayes, J. (7 de marzo de 2017). easy harvest potato planter (Video). *easy harvest potato planter (Video)*. Obtenido de <https://www.youtube.com/watch?v=zszmMPTg4wY>
- Enciclopedia Agropecuaria Terranova. (1995). *Producción agrícola*. Bogotá: Enciclopedia Agropecuaria Terranova. Recuperado el 15 de Noviembre de 2015

- Fallas, J. (2012). *ucipfg*. Obtenido de http://www.ucipfg.com/Repositorio/MGAP/MGAP-05/BLOQUE-ACADEMICO/Unidad-2/complementarias/analisis_de_varianza_2012.pdf
- Flores, M., & Roque, E. (2017). *Aislamiento y caracterización microbiana (microbiológica y molecular) en la búsqueda de Bacillus subtilis a partir de bioinsumos comerciales y pruebas de antagonismo frente a hongos fitopatógenos*. Managua.
- Hernández-Castillo, F., Lira-Saldidar, R., Cruz-Chávez, L., Gallegos-Morales, G., Galindo-Cepeda, M., Padrón-Corral, E., & Hernández-Suárez, M. (2008). Potencial antifúngico de cepas de *Bacillus* spp. y extracto de *Larrea tridentata* contra *Rhizoctonia solani* en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.). *Revista Internacional de BOTANICA EXPERIMENTAL*, 241-252.
- HIDRO ENVIRONMENT. (13 de NOVIEMBRE de 2015). *hidroenv.com.mx*. Obtenido de http://www.hidroenv.com.mx/catalogo/index.php?main_page=page&id=44
- INTA. (enero de 2004). *CNIDA-UNA*. Obtenido de <http://cenida.una.edu.ni/relectronicos/RENH10M722.pdf>
- INTA. (Enero de 2004). Guía MIP en el cultivo de la papa. (J. J. Báez, Ed.) *Manejo Integrado de Plagas*, 5-39. Recuperado el 15 de Noviembre de 2015, de <http://www.inta.gob.ni/biblioteca/index.php/component/booklibrary/101/view/58/Gu%C3%ADas%20t%C3%A9cnicas%20INTA/242/manejo-integrado-de-plagas-cultivo-de-la-papa-guia-mip>
- INTA. (2015). *Manual de riego por Goteo*. Recuperado el 15 de Noviembre de 2015, de http://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_manual_riego_por_goteo.pdf
- INTA. 2004, 9.-1. 3.-4. (s.f.). *Guía manejo integrado de plagas en el cultivo de la papa*.
- Lopez, V. (Enero-Diciembre de 2008). Potencial antifungico de cepas de *Bacillus* spp y extracto de *Larrea tridentata* contra *Rhizoctonia solani* en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L)(con 5 tablas). *Phyton*, 77: 241 - 252. Obtenido de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S1851-56572008000100020&script=sci_arttext#1
- Madigan, M., Martinko, J., & Thomas, B. (2006). *Brock biology of microorganisms* (11th ed.). New Jersey: Upper Saddle River.
- MAGFOR. (2005). *Estrategia Nacional para el fomento de la producción orgánica de Nicaragua*. Managua, Nicaragua.
- Méndez, J., & López, L. (2011). *Guía de prácticas de campo y Laboratorio de Fundamentos de Suelos*. Nicaragua.

- Mesa, D. (2003). Obtención de plantas resistentes a la salinidad para los suelos salinos cubanos. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola, Tomo 37, No. 3*, 217-226.
- Monroy, A., Ospina, A., Paternina, L., & Vargas, C. (s.f.). *www.academia.edu*. Obtenido de http://www.academia.edu/9291458/curva_de_crecimiento_mo
- Montaldo, Á. (1984). *Cultivo y mejoramiento de la papa*. San José, Costa Rica: Centro Interamericano de Documentación e información agrícola. Recuperado el 15 de Noviembre de 2015
- Montesinos, E. (2013). Los bioplaguicidas: expectativas y nuevos retos. *Phytoma España*, 245: 14. Obtenido de <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4257020>
- Nava-Pérez, E., García-Gutiérrez, C., & Vázquez-Montoya, J. R.-B. (Septiembre-Diciembre de 2012). Bioplaguicidas: Una opción para el control biológico de plagas. *Ra Ximhai*, 17-29. Obtenido de <http://uaim.edu.mx/webraximhai/Ej-25barticulosPDF/3%20NAVA-PEREZ.pdf>
- Nowak, J., & Colborne, D. (1989). *In vitro tuberization and tuber proteins as indicators of heat stress tolerance in potato*. American Potato Journal.
- Orberá, T., Serrat, M. d., & Eduardo, O. (2014). *Potencialidades de la cepa SR/B-16 de Bacillus subtilis*. La Habana: Biotecnología Aplicada.
- Orjeda, G. (1998). *Evaluation of Musa germplasm for resistance to Sigatoka*. Wageningen, Holanda.
- Páramo, L. (2014). *Practica de laboratorio. Temas I y II: Cinética enzimática y Cinética microbiana. Modulo IV: Pricipios de ingeniería de los bioprocesos. Maestría Interinstitucional en Biotecnología*. Managua.
- Pedrique, M., & De Castro, N. (2008). Reproducción y Crecimiento Microbiano. *Catedra de Microbiologia - Facultad de Farmacia* (págs. 1-23). UCV.
- Scragg, A. (1996). *Biotecnología para ingenieros: sistemas biológicos en procesos tecnológicos. 1ra.Edición*. México: Limusa .
- Todar. (2001). *The Genus Bacillus*. . University of Wisconsin.
- Villa, M. S. (2010). *Desifecion de sustratos*. Texcoco, Mexico.
- Wulf, G. y. (1989). *Biotecnología manual de microbiología industrial. 1ra Edición*. Zaragoza, España: Acribia S.A.

Anexo 2. Rango de clasificación aproximada de nutrientes en suelos



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES Y DEL AMBIENTE
LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS DE LABORATORIO
Rango de Clasificación Aproximada de Nutrientes en Suelos
de Nicaragua (Quintana et al., 1983)

pH	Clasificación
< 4.6	Extremadamente ácido
4.6 - 5.2	Muy fuertemente ácido
5.2 - 5.6	Fuertemente ácido
5.6 - 6.2	Medianamente ácido
6.2 - 6.6	Ligeramente ácido
6.6 - 6.8	Muy ligeramente ácido
6.8 - 7.2	Neutro
7.2 - 7.4	Muy ligeramente alcalino
7.4 - 7.8	Ligeramente alcalino
7.8 - 8.4	Medianamente alcalino
8.4 - 8.8	Fuertemente alcalino
8.8 - 9.4	Muy frecuentemente alcalino
> 9.4	Extremadamente alcalino

Capacidad de Intercambio Catiónica

<5	meq/100 g suelo	Muy baja
5 - 15	meq/100 g suelo	Baja
15 - 25	meq/100 g suelo	Media
25 - 40	meq/100 g suelo	Alta
>40	meq/100 g suelo	Muy alta

Rango de contenidos de macronutrientes.

Nutrientes	Unidades	Pobre	Medio	Alto
Nitrógeno (N)	%	< 0.07	0.07 - 0.15	> 0.15
Fósforo (P)	ppm	< 10	10 - 20	> 20
Potasio (K)	meq/100 g	< 0.2	0.2 - 0.3	> 0.3
Calcio (Ca)	meq/100 g	< 2.5	2.5 - 5.5	> 5.5
Magnesio (Mg)	meq/100 g	< 0.3	0.3 - 1.0	> 1.0
Mat. Orgánica (MO)	%	< 2	2 - 4	> 4

Rangos de contenidos de micronutrientes (extracción Olsen)

Nutriente	Unidades	Muy bajo	Bajo	Medio	Alto
Hierro (Fe)	ppm	5 - 10	10 - 16	16 - 21	21-2
Zinc (Zn)	ppm	1 - 2	2.1 - 3.1	3.1 - 4.2	4.2 - 5.3
Cobre (Cu)	ppm	0.2 - 0.8	0.8 - 1.5	1.5 - 2.2	2.2 - 3.0
Manganeso (Mn)	ppm	2-4	4-6	6-8	8 - 12



Anexo 3. Resultados del análisis físico del suelo



UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERIA
 FACULTAD DE TECNOLOGIA DE LA CONSTRUCCION
 Departamento de Ingeniería Agrícola
 LABORATORIO DE EDAFOLOGIA

RESULTADOS DE ANALISIS DE SUELO

Nombre: MONOGRAFIA BIOPLAGUICIDA **Fecha de muestreo:** 16/05/17 **Nombre del lugar de muestreo:** UNI
Localidad: RUSB **Municipio:** Managua **Departamento:** Managua
Tipo de muestra: Alterada.

ANALISIS

Fecha de ingreso: 16/05/2017 **Fecha de análisis:** 08/06/2017

Ítem	Código	Identificación	Cc (%)	PMP (%)	%H	Da (gr/cm ³)	Dr (gr/cm ³)	%P	%MO	Textura Bouyoucos		
										% Ar	%L	%A
1	001	Sustrato	44.86	24.38		0.83	2.28	63.60				

NOTA: Cc (Capacidad de Campo), PMP (Punto de Marchitez Permanente), %H (Porcentaje de Humedad), Da (Densidad Aparente), Dr (Densidad Real), %P (Porosidad Total), %MO (Materia Orgánica).

Ing. Miguel Fonseca Chávez
 Jefe Dpto. Ingeniería Agrícola

Ing. Lester Lara Corea
 Administrador FTC

Anexo 4. Certificado de registro semilla de papa variedad Monte Carlo

 NAK - NEDERLAND			
BASIS Pootgoed			
Soort:	AARDAPPEL (Solanum tuberosum)		
Ras:	MONTE CARLO		
Tel.nr.:	10411		
Certificering:	01-03-2017		
Geteeld in:	Nederland	Friesland	
Maat in mm:	45/55		
Oogstjaar:	2016		
 Volgens opgave behandeld met: THIAFENIDAZOOL EN IMAZALIL			
EK3 - PLANTENPASPOORT		ZP - d2/a6/a13	
EG systeem	Model 2	647.955.452	22,7 kg

Stichting Nederlandse Algemene Keuringsdienst voor zaaizaad en pootgoed van landbouwgewassen (NAK) Nederland (Randweg 14, 8304 AS Emmeloord)						
Dit document en de voorgeschreven sluiting - mis ongeschonden - zijn het bewijs van goedkeuring van de NAK. Ce document et la fermeture prescrite - pourvu qu'ils soient intacts - attestent l'approbation du NAK. Nachweis der NAK-Anerkennung - falls Esbott und Verschluss unbeschädigt approval by the NAK. El presente documento es la prueba de la aprobación certificada - si está sellado - contiene la garantía de aprobación por el NAK. Prova de aprovação da parte da NAK - contanto que esteja intacto - com encerramento prescrito.						
Misbruik is strafbaar (Art. 219 en 226 W. v. Sr.)						
Nederlands Basis pootgoed Basis zaad Soort Ras Partij Maat Teiler	Italiano Tubero di base Sementi di base Specie Varietà Lotto Calibro Produttore	Français Plante de base Semence de base Espèce Variété Lot Calibre Producteur	Deutsch Basis Pflanzgut Basis Saatgut Art Sorte Partie Größe Erzeuger	English Basic seed Basic seed Species Variety Lot Size Grower	Español Semilla básica Semilla básica Especie Variedad Partido Calibrado Cultivador	Portugues Batata de semente base Semente base Espécie Variedade Lote Tamanho Agricultor

Anexo 5. Tubérculos semilla variedad Monte Carlo



Anexo 6. Fertilización base con 15-15-15, 5 días después de la siembra



Anexo 7. Aporque del cultivo



Anexo 8. Control manual y químico de malezas



Anexo 9. Medición de variables de desarrollo a los 25 y 50 DDS

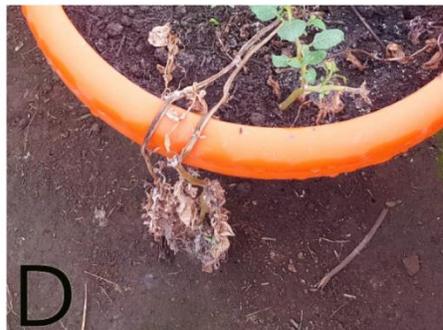


Anexo 10. Medición de la temperatura del sustrato



Anexo 11. Síntomas de tizón tardío

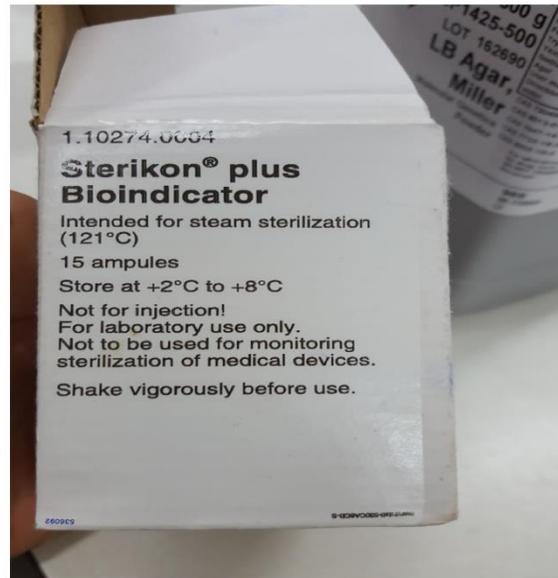
A. Manchas necróticas en las hojas. B. Inicio de la enfermedad en el cogollo.
C. Marchitamiento de toda la planta. D. Muerte de la planta.



Anexo 12. Medición de variables de cosecha



Anexo 13. Aplicación de controles de calidad en la esterilización de medios de cultivos



Anexo 14. Distribución de los tratamientos para su aplicación en ensayo de antagonismo en invernadero



Anexo 15. Instalación del invernadero

A. Estructura de hierro galvanizado, B. Instalación de malla antivirüs, C. Tensado con Lockers y Zigzag, D. Colocación de plástico y malla sarán.



Anexo 16. Severidad e incidencia de daño en el desarrollo del cultivo de papa de *Alternaria alternata*



Anexo 17. Severidad e incidencia de daño en el desarrollo del cultivo de papa de *Fusarium sp*



Anexo 18. Severidad e incidencia de daño en el desarrollo del cultivo de papa de *Fusarium equiseti*



Anexo 19. Cosecha del cultivo de papa de *Alternaria alternata*



Anexo 20. Cosecha del cultivo de papa de *Fusarium sp*

Fusarium sp vs
Bioplaguicida

Fusarium sp

Bioplaguicida

Bloque I



Bloque II



Bloque III



Bloque IV



Anexo 21. Cosecha del cultivo de papa de *Fusarium equiseti*



Anexo 22. Crecimiento radicular

Alternaria alternata vs Bioplaguicida



Alternaria alternata



Bioplaguicida



Fusarium equiseti vs Bioplaguicida



Fusarium equiseti



Bioplaguicida



Fusarium sp. vs Bioplaguicida



Fusarium sp.



Bioplaguicida

