



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

CARRERA DE AGRONOMÍA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

**“SELECCIÓN Y EVALUACIÓN DE BACTERIAS ANTAGONISTAS
PARA EL CONTROL DE (*Botrytis spp.*) BAJO CONDICIONES DE
LABORATORIO”**

Proyecto de Investigación presentado previo a la obtención del Título de
Ingeniera Agrónoma

Autora:
Simbaña Vinueza Lady Pamela

Tutora:
Toapanta Gallegos Diana Elizabeth

LATACUNGA – ECUADOR

Marzo 2026

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Simbaña Vinueza Lady Pamela, con cédula de ciudadanía No. 1750894121, declaro ser autora del presente Proyecto de Investigación: **“SELECCIÓN Y EVALUACIÓN DE BACTERIAS ANTAGONISTAS PARA EL CONTROL DE (*Botrytis spp.*) BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO”**, siendo la Ingeniera Mg. Diana Elizabeth Toapanta Gallegos, Tutora del presente trabajo; y, eximo expresamente a la Universidad Técnica de Cotopaxi y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

Además, certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Latacunga, 19 de febrero del 2026

Lady Pamela Simbaña Vinueza

C.C: 1750894121

ESTUDIANTE

CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTORA

Comparecen a la celebración del presente instrumento de cesión no exclusiva de obra, que celebran de una parte **SIMBAÑA VINUEZA LADY PAMELA**, identificada con cédula de ciudadanía **1750894121** de estado civil soltera, a quien en lo sucesivo se denominará **LA CEDENTE**; y, de otra parte, la Doctora Idalia Eleonora Pacheco Tigselema, en calidad de Rectora, y por tanto representante legal de la Universidad Técnica de Cotopaxi, con domicilio en la Av. Simón Rodríguez, Barrio El Ejido, Sector San Felipe, a quien en lo sucesivo se le denominará **LA CESIONARIA** en los términos contenidos en las cláusulas siguientes:

ANTECEDENTES: CLÁUSULA PRIMERA. - **LA CEDENTE** es una persona natural estudiante de la carrera de Agronomía titular de los derechos patrimoniales y morales sobre el trabajo de grado “**SELECCIÓN Y EVALUACIÓN DE BACTERIAS ANTAGONITAS PARA EL CONTROL DE (*Botrytis spp.*)**” **BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO**, la cual se encuentra elaborada según los requerimientos académicos propios de la Facultad; y, las características que a continuación se detallan:

Historial Académico

Inicio de la carrera: Octubre 2021 - Marzo 2022

Finalización de la carrera: Octubre 2025 – Marzo 2026

Tutor: Ing. Diana Elizabeth Toapanta Gallegos, Mg.

Tema: “**SELECCIÓN Y EVALUACIÓN DE BACTERIAS ANTAGONISTAS PARA EL CONTROL DE (*Botrytis spp.*) BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO**”

CLÁUSULA SEGUNDA. - **LA CESIONARIA** es una persona jurídica de derecho público creada por ley, cuya actividad principal está encaminada a la educación superior formando profesionales de tercer y cuarto nivel normada por la legislación ecuatoriana la misma que establece como requisito obligatorio para publicación de trabajos de investigación de grado en su repositorio institucional, hacerlo en formato digital de la presente investigación.

CLÁUSULA TERCERA. - Por el presente contrato, **LA CEDENTE** autoriza a **LA CESIONARIA** a explotar el trabajo de grado en forma exclusiva dentro del territorio de la República del Ecuador.

CLÁUSULA CUARTA. - OBJETO DEL CONTRATO: Por el presente contrato **LA CEDENTE**, transfiere definitivamente a **LA CESIONARIA** y en forma exclusiva los siguientes derechos patrimoniales; pudiendo a partir de la firma del contrato, realizar, autorizar o prohibir:

- a) La reproducción parcial del trabajo de grado por medio de su fijación en el soporte informático conocido como repositorio institucional que se ajuste a ese fin.
- b) La publicación del trabajo de grado.
- c) La traducción, adaptación, arreglo u otra transformación del trabajo de grado con fines académicos y de consulta.
- d) La importación al territorio nacional de copias del trabajo de grado hechas sin autorización del titular del derecho por cualquier medio incluyendo mediante transmisión.
- e) Cualquier otra forma de utilización del trabajo de grado que no está contemplada en la ley como excepción al derecho patrimonial.

CLÁUSULA QUINTA. - El presente contrato se lo realiza a título gratuito por lo que **LA CESIONARIA** no se halla obligada a reconocer pago alguno en igual sentido **LA CEDENTE** declara que no existe obligación pendiente a su favor.

CLÁUSULA SEXTA. - El presente contrato tendrá una duración indefinida, contados a partir de la firma del presente instrumento por ambas partes.

CLÁUSULA SÉPTIMA. - CLÁUSULA DE EXCLUSIVIDAD. - Por medio del presente contrato, se cede en favor de **LA CESIONARIA** el derecho a explotar la obra en forma exclusiva, dentro del marco establecido en la cláusula cuarta, lo que implica que ninguna otra persona incluyendo **LA CEDENTE** podrá utilizarla.

CLÁUSULA OCTAVA. - LICENCIA A FAVOR DE TERCEROS. - **LA CESIONARIA** podrá licenciar la investigación a terceras personas siempre que cuente con el consentimiento de **LA CEDENTE** en forma escrita.

CLÁUSULA NOVENA. - El incumplimiento de la obligación asumida por las partes en la cláusula cuarta, constituirá causal de resolución del presente contrato. En consecuencia, la resolución se producirá de pleno derecho cuando una de las partes comunique, por carta notarial, a la otra que quiere valerse de esta cláusula.

CLÁUSULA DÉCIMA. - En todo lo no previsto por las partes en el presente contrato, ambas se someten a lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, Código Civil y demás del sistema jurídico que resulten aplicables.

CLÁUSULA UNDÉCIMA. - Las controversias que pudieran suscitarse en torno al presente contrato, serán sometidas a mediación, mediante el Centro de Mediación del Consejo de la Judicatura en la ciudad de Latacunga. La resolución adoptada será definitiva e inapelable, así como de obligatorio cumplimiento y ejecución para las partes y, en su caso, para la sociedad. El costo de tasas judiciales por tal concepto será cubierto por parte del estudiante que lo solicitare.

En señal de conformidad las partes suscriben este documento en dos ejemplares de igual valor y tenor en la ciudad de Latacunga, a los 19 días del mes de febrero del 2026.

Lady Pamela Simbaña Vinueza

LA CEDENTE

Dra. Idalia Pacheco Tigselema, Ph.D.

LA CESIONARIA

AVAL DE LA TUTORA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

En calidad de Tutora del Proyecto de Investigación con el título:

“SELECCIÓN Y EVALUACIÓN DE BACTERIAS ANTAGONISTAS PARA EL CONTROL DE (*Botrytis spp.*) BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO”, de Simbaña Vinueza Lady Pamela, de la carrera de Agronomía, considero que el presente trabajo investigativo es merecedor del Aval de aprobación al cumplir las normas, técnicas y formatos previstos, así como también ha incorporado las observaciones y recomendaciones propuestas en la pre-defensa.

Latacunga, 19 de febrero del 2026

Ing. Diana Elizabeth Toapanta Gallegos, Mg.

C.C: 1750894121

DOCENTE TUTORA

AVAL DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE TITULACIÓN

En calidad de Tribunal de Lectores, aprobamos el presente Informe de Investigación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de Cotopaxi; y, por la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales; por cuanto, la postulante: Simbaña Vinuesa Lady Pamela, con el título del Proyecto de Investigación: **“SELECCIÓN Y EVALUACIÓN DE BACTERIAS ANTAGONISTAS PARA EL CONTROL DE (*Botrytis spp.*) BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO”**, ha considerado las recomendaciones emitidas oportunamente y reúne los méritos suficientes para ser sometido al acto de sustentación del trabajo de titulación.

Por lo antes expuesto, se autoriza grabar los archivos correspondientes en un CD, según la normativa institucional.

Latacunga, 19 de febrero del 2026

Ing. Edwin Chancusig Espín, Ph.D.

C.C: 050114883-7

LECTOR 1 (PRESIDENTE)

Ing. Geraldo Cuadrado Barreto, Mg.

C.C: 060310973-7

LECTOR 2 (MIEMBRO)

Ing. Francisco Hernán Chancusig, Mg.

CC: 050188392-0

LECTOR 3 (MIEMBRO)

AGRADECIMIENTO

Esta investigación de pregrado es el resultado de mi formación, se la debo a Dios, por brindarme la fortaleza, sabiduría y salud necesaria para culminar esta etapa tan importante de mi vida.

A mi tutora la Ing. Diana y a la Ing. Valentina, por su guía, paciencia y valiosos aportes durante el desarrollo de este trabajo. Mis sinceros agradecimientos a mi tribunal, por el tiempo empleado para la revisión, orientación, recomendaciones y paciencia que ha sido fundamental para mejorar el documento. A cada persona que me brindo su apoyo, conocimientos o palabras de aliento en el camino. Y especialmente a mi madre, por su amor incondicional, sacrificio y constante respaldo, quien ha sido mi mayor inspiración para seguir adelante.

Lady Pamela Simbaña Vinuesa

DEDICATORIA

Dedico este trabajo con todo mi amor y gratitud a mi querida madre, Gladys Simbaña, por ser mi pilar fundamental, por su fortaleza, por el sacrificio que hizo para brindarme la oportunidad de estudiar, también por su paciencia y apoyo incondicional en cada paso de mi formación. A mis hermanos, por creer en mí y por acompañarme en este camino con su cariño y motivación constante.

A mi amiga Deisy, por estar presente en los momentos más difíciles, por escucharme cuando más lo necesité y por ayudarme con paciencia. Y con especial ternura, a mi gatita y a mi perrito, por acompañarme fielmente en cada desvelada, convirtiendo el cansancio en compañía y las madrugadas en momentos menos solitario. Con infinita gratitud, les dedico este logro.

Lady Pamela Simbaña Vinuesa

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

**TÍTULO: “SELECCIÓN Y EVALUACIÓN DE BACTERIAS ANTAGONISTAS
PARA EL CONTROL DE (*Botrytis spp.*) BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO”**

Autora:
Simbaña Vinuesa Lady Pamela

RESUMEN

Una de las actividades económicas más relevantes en Ecuador es la producción de rosas. En 2025, las exportaciones que superaron las 28.779 toneladas generaron ingresos cercanos a 1.015.955 dólares. No obstante, esta industria se enfrenta a uno de sus mayores desafíos fitosanitarios el hongo *Botrytis cinerea*, causante del moho gris, capaz de provocar pérdidas de hasta el 60% de la cosecha si no se aplican medidas de control oportunas, este afecta principalmente flores y tallos. Con el fin de prevenir pérdidas que se calculan en más de 85.700 dólares, una gran cantidad de fincas gastan aproximadamente 95.000 dólares al año en agroquímicos para su control. Sin embargo, esta estrategia basada en el uso intensivo de fungicidas no solo representa un alto costo económico, sino que también genera resistencia cruzada, afecta la salud de los trabajadores y deja residuos nocivos en el ambiente. En este contexto, el presente estudio fue realizado en el laboratorio de microbiología de la Universidad Técnica de Cotopaxi, campus Salache, con el objetivo de evaluar la capacidad de control de bacterias antagonistas frente a *Botrytis spp.* bajo condiciones de laboratorio. Para ello, se recolectaron 37 muestras de suelo provenientes de una finca de rosas de exportación de las variedades Mandarin y Novia, ubicada en la provincia de Cotopaxi, cantón Latacunga, sector Eloy Alfaro. A partir de estas muestras se obtuvieron 16 aislamientos bacterianos, de los cuales se seleccionaron 6 cepas para su evaluación antagonista. Se identificaron las cepas observando las propiedades macroscópicas de la colonia, como el color, la forma, la opacidad, la textura y la superficie. Además, se realizaron pruebas bioquímicas como hemólisis y catalasa para determinar que pertenecían al género *Bacillus spp.* Luego se llevó a cabo un ensayo de enfrentamiento dual en un diseño completamente al azar, que midió el crecimiento micelial de *Botrytis spp.* durante siete días y se calculó el porcentaje de inhibición. [Los resultados mostraron que el crecimiento micelial promedio del testigo *Botrytis spp.* al día 7 fue de 2,54 cm, mientras que los tratamientos bacterianos presentaron valores entre 0 y 3,52 cm. Las cepas P4, A3 y P6.2 lograron una inhibición completa del crecimiento micelial del patógeno, mientras que otras cepas mostraron inhibición parcial. El análisis de varianza no evidenció diferencias estadísticas significativas entre tratamientos; sin embargo, se observaron tendencias biológicas relevantes que permitieron identificar bacterias con alto potencial antagonista. Dichos resultados demuestran que el género *Bacillus spp.* es un potencial controlador, ofrece una alternativa sostenible para el sector florícola.

Palabras clave: *Botrytis spp.*, bacterias antagonistas, resistencia cruzada, caracterización bacteriana, PICR, *Bacillus spp.*

TECHNICAL UNIVERSITY OF COTOPAXI
FACULTY OF AGRICULTURAL SCIENCE AND NATURAL RESOURCES

THEME: “SELECTION AND EVALUATION OF ANTAGONISTIC BACTERIA FOR THE CONTROL OF (*Botrytis* spp.) UNDER LABORATORY CONDITIONS”

Author:
Simbaña Vinueza Lady Pamela

ABSTRACT

One of the most relevant economic activities in Ecuador is rose production. In 2025, exports exceeding 28,779 tons generated revenues of approximately 1,015,955 USD. However, this industry faces one of its greatest phytosanitary challenges: the fungus *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mold, which can cause losses of up to 60% of the harvest if timely control measures are not applied. This pathogen primarily affects flowers and stems. To prevent losses estimated at more than 85,700 USD, many farms spend approximately 95,000 USD annually on agrochemicals for its control. Nevertheless, this strategy, based on intensive fungicide use, not only represents a high economic cost but also generates cross-resistance, affects workers' health, and leaves harmful residues in the environment. In this context, the present study was conducted in the Microbiology Laboratory of the 'Universidad Técnica de Cotopaxi', Salache Campus, with the objective of evaluating the antagonistic capacity of bacteria against *Botrytis* spp. under laboratory conditions. A total of 37 soil samples were collected from an export rose farm cultivating the Mandarin and Novia varieties, located in Cotopaxi Province, Latacunga Canton, Eloy Alfaro sector. From these samples, 16 bacterial isolates were obtained, of which 6 strains were selected for antagonistic evaluation. Strains were identified by observing macroscopic colony properties such as color, shape, opacity, texture, and surface. In addition, biochemical tests including hemolysis and catalase were performed, confirming that the isolates belonged to the genus *Bacillus* spp. A dual confrontation assay was then carried out in a completely randomized design, measuring the mycelial growth of *Botrytis* spp. over seven days and calculating the percentage of inhibition. The results showed that the average mycelial growth of the *Botrytis* spp. control at day 7 was 2.54 cm, while bacterial treatments presented values ranging from 0 to 3.52 cm. Strains P4, A3, and P6.2 achieved complete inhibition of pathogen mycelial growth, whereas other strains exhibited partial inhibition. Analysis of variance did not reveal statistically significant differences among treatments; however, biologically relevant trends were observed, allowing the identification of bacteria with high antagonistic potential. These findings demonstrate that the genus *Bacillus* spp. is a promising biocontrol agent, offering a sustainable alternative for the floriculture sector.

Keywords: *Botrytis* spp., antagonistic bacteria, cross-resistance, bacterial characterization, PICR, *Bacillus* spp.

INDICE DE CONTENIDOS

DECLARACIÓN DE AUTORÍA	ii
CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTORA.....	iii
AVAL DE LA TUTORA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.....	v
AVAL DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE TITULACIÓN	vi
AGRADECIMIENTO	vii
DEDICATORIA	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
INDICE DE CONTENIDOS	xi
ÍNDICE DE TABLAS	xv
ÍNDICE DE FIGURAS	xvi
1. INFORMACIÓN GENERAL DEL PROYECTO	1
2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO.....	2
3. BENEFICIARIOS	3
3.1. Beneficiarios indirectos	3
3.2. Beneficiarios directos	3
4. PROBLEMÁTICA.....	3
5. OBJETIVOS.....	4
5.1 Objetivo general.....	4
5.2 Objetivos específicos	5
6. ACTIVIDADES Y SISTEMAS DE TAREAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS	5
7. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TEÓRICA	8
7.1. Cultivo de rosa (Rosa sp.).....	8

7.1.1 Origen.....	8
7.1.2 Clasificación Taxonómica.....	8
7.2 Morfología de la Rosa.....	9
7.2.1 Raíz.....	9
7.2.2 Tallo	9
7.2.3 Hojas.....	9
7.2.4 Yema	9
7.2.5 Flor	10
7.2.6 Fruto	10
7.3 Fenología de la Rosa.....	10
7.4 Requerimientos edafoclimáticos del cultivo de rosa	11
7.5 Variedades	12
7.5.1 Variedad Mandarin X-Pressión.....	12
7.5.2 Variedad Novia	12
7.6 Plagas y enfermedades.....	13
7.7 Botrytis (<i>Botrytis cinerea</i>)	13
7.7.1 Clasificación taxonómica de <i>Botrytis cinerea</i>	14
7.7.2 Morfología.....	14
7.7.3 Ciclo Biológico	15
7.7.4 Ciclo de infección.....	16
7.7.5 Condiciones Óptimas para el Desarrollo de <i>Botrytis cinérea</i>	19
7.7.6. Síntomas.....	19
7.7.7 Signos.....	20
7.7.8 Control biológico.....	20
7.8 Género <i>Bacillus</i>	22
7.8.1 Características principales.....	22
7.8.2 Condiciones de desarrollo	23
7.8.3 Ciclo de vida.....	23
7.9 <i>Bacillus</i> como controlador biológico	24
7.9.1 Mecanismo de acción	25
7.10 Identificación de bacterias	27
7.10.1 Tinción Gram	27
7.11 Pruebas bioquímicas de identificación de bacterias	28

7.11.1 Prueba de Catalasa	28
7.11.2 Prueba de Oxidasa.....	29
7.11.3 Hemólisis (BAP)	29
7.12 Pruebas in vitro para evaluar el biocontrol de <i>Botrytis spp.</i>	29
7.12.1 Pruebas de enfrentamiento	30
8. VALIDACIÓN DE LAS PREGUNTA CIENTÍFICAS O HIPÓTESIS	30
8.1 Hipótesis afirmativa.....	30
8.2 Hipótesis nula	30
9. METODOLOGÍA.....	30
9.1 Tipos de investigación	30
9.1.1 Cualitativo	30
9.1.2 Cuantitativa	31
9.2 Tipo de método	31
9.2.1 Experimental	31
9.3 Localización.....	31
9.4 Origen y aislamiento de bacterias	31
9.4.1 Colecta de material vegetal y suelo (Fase de campo)	31
9.4.2 Aislamiento de bacterias de material vegetal (Fase de laboratorio).....	32
9.4.3 Procedimiento de diluciones para aislamiento bacteriano a partir de muestras de suelo	33
9.4 Selección de cepas para prueba de Tinción	35
9.4.1 Características macroscópicas.....	35
9.4.2 Características microscópicas	36
9.5 Ensayos Microscópicos (Tinción Gram)	37
9.6 Purificación de Bacterias	39
9.6.1 Obtención de cultivos puros.....	39
9.6.2 Conservación de las cepas obtenidas	40
9.7 Pruebas Bioquímicas de identificación de bacterias.....	41
9.7.1 Prueba de Catalasa	41
9.7.2 Hemólisis en Agar sangre	42
9.8 Selección de cepas con capacidad de control antagónico (Ensayo)	43
9.8.1 Pruebas de antagonismo	43

9.9 Análisis Estadístico.....	44
10. RESULTADOS Y DISCUSIONES	45
10.1 Selección de muestras bacterianas	45
10.1.1 Muestras obtenidas de tejido vegetal	45
10.1.2 Cepas obtenidas de submuestras edáficas	46
10.2 Cepas obtenidas de submuestras edáficas compatibles (<i>Bacillus</i>) con capacidad de control.	48
10.3 Capacidad de control de las bacterias obtenidas frente a <i>Botrytis</i> spp	49
10.3.1 Análisis estadístico (7 días evaluación)	49
10.3.2 Análisis estadístico (último día evaluación).....	50
11. IMPACTOS (SOCIALES, AMBIENTALES O ECONÓMICOS).....	51
11.1 Impacto Social	51
11.2 Impacto Ambiental	51
11.3 Impacto Económico	52
12. PRESUPUESTO DEL PROYECTO	52
13. CONCLUSIONES.....	53
14. RECOMENDACIONES	54
15. BIBLIOGRAFÍA	55
16. ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Actividades y sistema de tareas en relación a los objetivos planteados.	5
Tabla 2. Clasificación taxonómica.	9
Tabla 3. Características morfológicas de la variedad Mandarin X-Pression.....	12
Tabla 4. Características morfológicas de la variedad Novia.	13
Tabla 5. Clasificación taxonómica de Botrytis cinerea.	14
Tabla 6. Origen de aislamientos de muestras vegetales (tallos y pétalos) pertenecientes a la provincia de Cotopaxi.....	32
Tabla 7. Codificación y significado de las muestras obtenidas de material vegetal.	33
Tabla 8. Origen de aislamiento de submuestras edáficas de dos variedades (Mandarin y Novia) pertenecientes a la provincia de Cotopaxi.	33
Tabla 9. Características macroscópicas de Bacillus.	35
Tabla 10. Características microscópicas de Bacillus.....	36
Tabla 11. Clasificación de las cepas según sus características microscópicas.	38
Tabla 12. Resultado total, de muestras obtenidas del aislamiento de material vegetal.....	45
Tabla 13. Total, de muestras aisladas obtenidas de la primera fecha de colecta de submuestras.	46
Tabla 14. Total, de muestras aisladas obtenidas de la segunda fecha de colecta.	47
Tabla 15. Total, de muestras obtenidas de la resiembra de la segunda fecha de colecta.	47
Tabla 16. Total, muestras purificadas obtenidas de las submuestras edáficas.	48
Tabla 17. Análisis de la varianza del crecimiento promedio de Botrytis spp. durante siete días de evaluación bajo la aplicación de bacterias antagonistas.	49
Tabla 18. Análisis de la varianza del crecimiento de Botrytis spp. en el último día de evaluación.....	50
Tabla 19. Materiales de laboratorio utilizados para el aislamiento y purificación bacteriana.	52
Tabla 20. Reactivo principal utilizado para cultivo bacteriano.	52
Tabla 21. Costos de transporte y logística de campo.....	52
Tabla 22. Resumen del presupuesto estimado del proyecto.	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico de Botrytis.	16
Figura 2. Ciclo de infección de Botrytis cinerea.	19
Figura 3. Representación esquemática del ciclo de desarrollo de Bacillus spp.	24
Figura 4 Tinción Gram. Bacterias Gram negativas y Gram positivas.....	28
Figura 5. Morfología macroscópica.	36
Figura 6. Características microscópicas, Bacilos Gram positivos.....	37
Figura 7. Purificación de una cepa (SM6C2) mediante siembra por estría en medio de cultivo AN.	40
Figura 8. Las burbujas resultantes de la producción de oxígeno gaseoso indican claramente un resultado catalasa positivo. La muestra de abajo, es catalasa positiva. La especie Bacillus son catalasas positivas. A) Formación burbujas indica catalasa positiva cepa (P4n), B) Baja cantidad de burbujas y C) No hay formación de burbujas, catalasa negativa.	41
Figura 9. Hemólisis de tres cepas: 1 hemólisis β (beta) (SNC2-5), 2 hemólisis β (beta) (SNC3-3), 3 hemólisis γ (gamma) (SMC1-3).	42
Figura 10. Esquema, prueba de enfrentamiento.	43
Figura 11. Prueba de enfrentamiento, implementación del ensayo.....	44
Figura 12. Porcentaje de crecimiento micelial de Botrytis spp. al día 7 bajo la aplicación de bacterias antagonistas.	51

1. INFORMACIÓN GENERAL DEL PROYECTO

Título del Proyecto:

“SELECCIÓN Y EVALUACIÓN DE BACTERIAS ANTAGONISTAS PARA EL CONTROL DE (*Botrytis spp.*) BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO”

Fecha de inicio:

Abril 2025

Fecha de finalización:

Enero 2026

Lugar de ejecución:

Universidad Técnica de Cotopaxi

Facultad que auspicia:

Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales.

Carrera que auspicia:

Ingeniería Agronómica.

Proyecto de investigación vinculado:

Metabolitos secundarios en defensa de las plantas contra enfermedades y plagas.

Equipo de Trabajo:

Tutor: Ing. Diana Elizabeth Toapanta Gallegos, Mg.

Lector 1: Ing. Chancusig Espín Edwin Marcelo, Mg. PhD.

Lector 2: Ing. Cuadrado Barreto Geraldo Ariolfo, Mg.

Lector 3: Ing. Chancusig Francisco Hernán, Mg.

Responsable del Proyecto:

Nombre: Lady Pamela Simbaña Vinuesa

Teléfono: 0989590099

Correo electrónico: lady.simbana4121@utc.edu.ec

Área de Conocimiento:

Agricultura - Agricultura, Silvicultura y Pesca - Producción Agropecuaria

1.1 Línea de investigación

a. Desarrollo soberanía y seguridad alimentaria

1.2 Línea 1

a. Producción agrícola sostenible

1.3 Línea de vinculación

a. Gestión de recursos naturales, biodiversidad, biotecnología y genética para el desarrollo humano social.

2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

La industria de la floricultura se enfrenta a diversos problemas causados por enfermedades, entre las cuales se encuentra el moho gris (también denominado pudrición gris), que es provocado por el hongo *Botrytis spp.* Esta enfermedad es muy común en los cultivos de rosas que se desarrollan en invernaderos, dado que las plantas afectadas pierden gran parte de su valor comercial. Por lo tanto, es esencial llevar a cabo medidas de control preventivo para impedir su propagación y asegurar la calidad de las flores que se destinan a la exportación (Cajas Pacheco, 2017).

Según Harkema et al. (2013), la infección por *Botrytis* en rosas inicia cuando se depositan conidios durante el desarrollo floral, y los síntomas se manifiestan primero como pequeñas pústulas latentes. Bajo condiciones favorables, especialmente con una humedad relativa superior al 93%, estas lesiones progresan a necrosis y afectan los pétalos. Además, dado que las distancias entre las zonas de producción y los mercados de destino suelen ser extensas, el riesgo de contaminación aumenta con el tiempo, favoreciendo la proliferación de *Botrytis spp.* en el producto final.

Por lo tanto, los estándares de calidad de los mercados internacionales del sector florícola exigen que los productos estén libres de *Botrytis spp.* La presencia de este patógeno no solo reduce la capacidad exportadora de las rosas, sino que también genera devoluciones y reclamos

financieros contra los productores afectados, este impacta su rentabilidad lo que ha conllevado hacer uso de fungicidas químicos (Herrera Romero, 2015).

El uso de químicos convencionales utilizados para su control presenta inconvenientes como la resistencia del patógeno, los efectos adversos en el medioambiente y los riesgos para la salud de las personas (Palomino & Ccoa, 2022). Ante esta situación, esta investigación busca ofrecer una alternativa sostenible para la empresa y el sector florícola mediante el uso de bacterias con capacidad controladora, que ayuden a manejar la enfermedad de forma eficiente. De esta manera, se podrá sostener esta actividad agrícola y comercial, la cual tiene un impacto significativo en la economía del país.

3. BENEFICIARIOS

3.1. Beneficiarios indirectos

Los beneficiarios directos de este proyecto son los 320 estudiantes de la carrera de Agronomía de la Universidad Técnica de Cotopaxi, ya que los resultados obtenidos de la investigación, pueden ser tomados como referencia para futuras investigaciones que planteen estrategias innovadoras para el manejo de *Botrytis spp.*, en un enfoque más sostenible y eficiente que responda a las demandas del sector agrícola.

3.2. Beneficiarios directos

Los beneficiarios indirectos, son los investigadores, los productores a pequeña y gran escala de rosas (Chavarro, 2021), quienes podrían utilizar los resultados obtenidos como nuevas herramientas y enfoques para el desarrollo de estudios relacionados con el control biológico de patógenos a partir de microorganismos.

4. PROBLEMÁTICA

El hongo *Botrytis cinerea*, el cual es capaz de causar hasta un 40% de pérdidas en caso de que no se lleve a cabo adecuadamente acciones de prevención o control, impacta en la producción de rosas en Ecuador. Este patógeno, conocido como moho gris, ejerce una afectación en los tejidos vegetales a lo largo de todas las etapas fenológicas, desde la etapa de cultivo hasta la de almacenamiento. Su presencia, una vez que es detectada por los compradores internacionales, provoca problemas y reclamos comerciales, lo que pone en riesgo la actividad exportadora del país (Orellana, 2011).

El cultivo de rosas en el Ecuador constituye una de las principales actividades del sector florícola, siendo el segundo consumidor de agroquímicos a nivel nacional; sin embargo, también representa una fuente fundamental de ingresos para la economía del país debido a su alta demanda en los mercados internacionales. En el año 2017, Ecuador exportó aproximadamente 654 millones de dólares en rosa fresca cortada (PROECUADOR, 2020). Esta tendencia de crecimiento se ha mantenido en los últimos años, ya que para el 2025 las exportaciones sobrepasaron las 28.779 toneladas, lo que representó un incremento interanual del 8,7 % respecto al primer trimestre de 2024 y generó ingresos cercanos a los 1.015.954 dólares (BCE, 2025). Sin embargo, la sostenibilidad y rentabilidad de este sector se ven seriamente afectadas por la presencia de *Botrytis* spp., un patógeno que causa daños principalmente en flores y tallos, provocando importantes pérdidas económicas. Estudios realizados en empresas florícolas indican que este hongo puede reducir significativamente la producción, comprometiendo la calidad y la comercialización del producto; en casos severos, las pérdidas pueden alcanzar hasta el 60 %, lo que incrementa los costos de producción debido a la necesidad de implementar medidas de control más estrictas (Gómez, 2014).

El aumento de la demanda de rosas, tanto a nivel nacional como internacional, ha provocado un notable crecimiento en la producción de flores. Con el fin de cumplir con los estándares de calidad requeridos, se han utilizado intensivamente fungicidas, insecticidas y fertilizantes (Flores, 2015). No obstante, esta dependencia de agroquímicos, sobre todo de fungicidas, ha conducido a un uso excesivo y prolongado que ha suscitado varios problemas. Por una parte, las fincas utilizan aplicaciones intensivas para reducir las pérdidas económicas, cerca de 95 000 dólares anualmente para prevenir daños que superan los 85 700 dólares (Amaya, 2021). No obstante, esta estrategia tiene importantes desventajas, entre las que se incluyen la acumulación de residuos químicos que perjudican el medio ambiente y la salud de los empleados, el desarrollo de resistencia en los patógenos y su elevado coste económico. Todo esto disminuye gradualmente la efectividad de los tratamientos.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Seleccionar y caracterizar bacterias antagonistas para el control de *Botrytis* spp. bajo condiciones de laboratorio.

5.2 Objetivos específicos

- Colectar muestras de material vegetal y suelo proveniente del cultivo de rosas destinadas a la exportación.
- Aislar bacterias antagonistas de material vegetal y suelo obtenido del cultivo de rosas de exportación.
- Caracterizar morfológicamente bacterias antagonistas con capacidad de control para *Botrytis spp.* in vitro.
- Evaluar la capacidad de control de las bacterias seleccionadas frente a *Botrytis spp.* in vitro.

6. ACTIVIDADES Y SISTEMAS DE TAREAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS

Tabla 1. *Actividades y sistema de tareas en relación a los objetivos planteados.*

OBJETIVO 1	ACTIVIDADES	RESULTADOS ESPERADOS	MEDIOS DE VERIFICACIÓN
Colectar muestras de material vegetal y suelo proveniente del cultivo de rosas destinadas a la exportación.	<ul style="list-style-type: none"> - Recolección de muestras en campo de dos variedades (Mandarin y Novia). - Transporte del material vegetal y suelo hacia el laboratorio. 	<ul style="list-style-type: none"> - Desinfección de las muestras para su respectivo aislamiento. 	<ul style="list-style-type: none"> - Registro fotográfico - Fichas de recolección de muestras y listado de campo.

	<ul style="list-style-type: none"> - Geolocalización de los lugares de colecta. 		
OBJETIVO 2	ACTIVIDADES	RESULTADOS ESPERADOS	MEDIOS DE VERIFICACIÓN
Aislar bacterias antagonistas de material vegetal y suelo obtenido del cultivo de rosas de exportación	<ul style="list-style-type: none"> - Siembra del material vegetal y suelo en AGAR Nutritivo. - Purificación y conservación de aislamientos bacterianos. - Clasificación de varias cepas a partir de características como su 	<ul style="list-style-type: none"> - Aislamiento de las muestras para la obtención de bacterias. - Multiplicación de cajas para obtener colonias. - Obtención de colonias bacterianas con potencial antagonistas. 	<ul style="list-style-type: none"> - Placas de Petri con aislamientos bacterianos. - Tabla de datos. - Fotografías

	crecimiento, color, forma.		
OBJETIVO 3	ACTIVIDADES	RESULTADOS ESPERADOS	MEDIOS DE VERIFICACIÓN
Caracterizar morfológicamente bacterias antagonistas con capacidad de control para <i>Botrytis spp.</i> in vitro.	<ul style="list-style-type: none"> - Observación bajo microscopio 10x a 100 x - Tinción de Gram - Descripción morfológica de las bacterias 	<ul style="list-style-type: none"> - Observación de las muestras tanto micro y macroscópica para su clasificación. - Clasificación de bacterias Gram positivas y negativas. - Caracterización de las bacterias con desempeño antagónico. 	<ul style="list-style-type: none"> - Descripción de colonias y estructuras. - Identificación a nivel de especie de las bacterias seleccionadas - Fotografías
OBJETIVO 4	ACTIVIDADES	RESULTADOS ESPERADOS	MEDIOS DE VERIFICACIÓN
Evaluar la capacidad de control de las bacterias seleccionadas frente a <i>Botrytis spp.</i> in vitro.	<ul style="list-style-type: none"> - Implementación de bioensayo con interacción de factores (a x b) Con 6 	<ul style="list-style-type: none"> - Identificación de bacterias con capacidad de control micelial. 	<ul style="list-style-type: none"> - Resultados de ensayos - Fotografías de placas - Análisis estadístico de

	<p>tratamientos y 5 repeticiones con dos testigos (<i>Bacillus</i> y <i>Botrytis</i>)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pruebas de enfrentamiento entre bacterias y <i>Botrytis spp.</i> - Medición de halos de inhibición. 		datos.
--	--	--	--------

7. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TEÓRICA

7.1. Cultivo de rosa (*Rosa sp.*)

7.1.1 Origen

La rosa es considerada originaria de China y se conoce desde hace más de cuatro mil años. A lo largo de su trayectoria, la rosa se expandió hasta llegar a Italia, Grecia, España, Persia e India, naciones que la conocieron en toda su historia. En el siglo XIX, Josefina de Francia, emperatriz, ordenó la recolección de todas las variedades de rosas que existían en ese tiempo por toda Europa y creó los célebres jardines de rosas en el palacio de Malmaison. Desde entonces, el cultivo de la rosa obtuvo el aliciente que la transformaría en la flor más célebre del mundo (Yong, 2004).

7.1.2 Clasificación Taxonómica

Según (Gibson, 2000), clasifica a la rosa de la siguiente manera:

Tabla 2. *Clasificación taxonómica.*

Reino	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Rosales
Familia:	Rosáceas
Género:	<i>Rosa</i>
Especie:	<i>Sp</i>
Nombre científico:	<i>Rosa sp.</i>
Nombre común:	Rosa

7.2 Morfología de la Rosa

Una de las características más importantes en el cultivo de la rosa es ser una planta siempre verde, con floración continua (Fainstein, 2000). La rosa posee:

7.2.1 Raíz

La rosa posee una raíz muy agresiva, pivotante, vigorosa, profunda y bien desarrollada que puede llegar a medir entre 1 y 2 m (Vidalie, 2001).

7.2.2 Tallo

Los rosales presentan ramas lignificadas, crecimiento erecto, son leñosas con la finalidad de sostener los tallos y terminar siempre en un botón floral, tiene la capacidad de transportar la savia desde la raíz a las hojas, posee crecimiento erecto, es de color verde o con tintes rojizos cuando son jóvenes, posee espinas desarrolladas con variadas formas (Grijalva, 2018).

7.2.3 Hojas

Posee una superficie lisa compuesta de 5 a 7 folíolos insertados a lo largo del tallo, con la presencia de estípulas (Grijalva, 2018).

7.2.4 Yema

Se encuentran en cada vértice formado por la unión entre las hojas y el tallo, cada una de las cuales dan lugar a un tallo floral, sin embargo, algunas producen solo tallos vegetativos, consideradas “ciegos”. Las primeras estructuras de las yemas son los promordios foliares que

son hojas fotosintéticas que permiten la latencia de las yemas, las rodean y por ende las protegen (Yanchapaxi, 2010)

7.2.5 Flor

Las flores son completas sostenida del tallo por el pedúnculo, posee un número variable de pétalos y generalmente con cinco sépalos (Weyler & Kusery, 2001).

7.2.6 Fruto

Son secos, indehiscentes, monospermos y duros, se muestran al final cuando la flor ha completado el ciclo de apertura, se denomina cinorrodón (Álvarez M. , 2001).

7.3 Fenología de la Rosa

Según Grijalva (2018), los estados fenológicos de la rosa son:

- **Día cero**

El ciclo fenológico de una variedad de rosa inicia al momento que se realiza el corte, en ese momento se activa la yema seleccionada.

- **Yema inducida**

Se denomina con este nombre al estado en la yema después de 8 a 10 días del pinch, la yema presenta una coloración rojiza e hinchada característica que la yema esta activa.

- **Brote en espuela**

Toma este nombre por la forma de la yema, similar a la espuela de un ave después de los 15 días de haber realizado el pinch, a medida que va creciendo la yema se van desplegando los primeros foliolos.

- **Panoja**

Este estado se presenta en un tallo en desarrollo a los 35 días de realizado el pinch, este estado es la última fase de crecimiento del brote sin mostrar el botón.

- **Punto arroz**

En este estado fenológico se le da este nombre característico por la semejanza que tiene a una espiga de arroz por su tamaño y forma, en este estado se da inicio al apareamiento del botón floral de la rosa.

- **Punto arveja**

Este estado se presenta a los 45 días después del pinch, se observa que la elongación del tallo es mayor, así como empieza a crecer el pedúnculo floral.

- **Punto garbanzo**

Toma el nombre porque el tamaño del botón es similar al tamaño de un garbanzo, en este punto el tallo de la rosa presente 50 a 55 días después del pinch.

- **Punto rayando color**

Se presenta a los 64 días después de realizado del pinch, se denomina de esta manera porque los sépalos del botón floral empiezan abrirse formando rayas y dejando observar el color de la variedad.

- **Punto desprendiendo sépalos**

Se presenta a los 72 días después del pinch, la característica es que los sépalos que cubren al botón se empiezan a desprender desde la parte apical del botón floral.

- **Punto de corte**

Es el punto culminante del ciclo, esto se da cuando el tallo está listo para ser cosechado, el ciclo del cultivo se determina cuando el botón ha llegado a su apertura comercial, para el mercado americano, ruso o europeo.

7.4 Requerimientos edafoclimáticos del cultivo de rosa

El crecimiento y la evolución de la rosa dependen primordialmente de factores climáticos como son la humedad, la luz y la temperatura, pues estos inciden directamente en el desarrollo del vegetal.

Uno de los factores más relevantes es la luz, porque está vinculado con la eficacia fotosintética de la planta; por lo tanto, requiere entre seis horas de luz al día. Por otro lado, el rango apropiado de temperatura para este cultivo es de 17 a 25 °C (con un mínimo de 15 °C), ya que, de ser menor, el tiempo de crecimiento de los tallos se alarga y puede generar deformidad en los pétalos y un incremento en la formación de tallos ciegos (Flores, 2015; Ordoñez, 2019 & Tupe, 2019).

El invernadero deber contar con una humedad relativa en un rango entre 60 y 70 %, ya que la humedad influye en la brotación de las yemas y presencia de patógenos; el suelo debe ser

arcilloso y con buen drenaje y se recomienda añadir materia orgánica, el pH óptimo debe ser de 6 a 7 (Flores, 2015).

7.5 Variedades

7.5.1 Variedad Mandarin X-Pressión

7.5.1.1 Características generales

La variedad de rosa Mandarin X-Pressión se caracteriza por su color único que combina tonos rosados y melocotón, con un centro verde brillante y una apertura extra grande. Sus pétalos, con una forma ondulada, se funden en un suave degradado que va desde un tono rosa o coral hasta un matiz anaranjado. Es una rosa de aspecto elegante y sofisticado, su densidad de siembra es de 400 plantas/m² y su índice de productividad es de 0,90 tallos por planta (Naranjo Roses, 2025).

7.5.1.2 Características morfológicas

Tabla 3. *Características morfológicas de la variedad Mandarin X-Pression.*

Longitud del tallo	50 - 60 cm
Ciclo de producción	6 a 8 meses
Tamaño de botón	6.0 - 6.5 cm
Número de pétalos	80
Días en florero	14 días
Color	Color melocotón, con matices rosados y anaranjados
Hojas	Hojas compuestas, pinnadas
Flor	Apertura grande

Fuente: (Naranjo Roses, 2025).

7.5.2 Variedad Novia

7.5.2.1 Características generales

La rosa Novia, que poseen delicado color rosa con toques de blanco en los bordes de sus pétalos, es una de las variedades rosadas más buscadas en todos los mercados, tanto a nivel nacional como internacional, debido a su belleza, durabilidad y color. Se emplea de manera extensa en todo tipo de composiciones florales, sobre todo en bodas y celebraciones, por su elegancia moderna, que se destaca a través de los bordes blancos de sus pétalos. La rosa

representa la amistad y el amor. La rosa Novia cultivada en Ecuador es una flor vibrante, intensa y llamativa que simboliza la pasión y el respeto (Finca de Rosas., 2025). Su densidad de siembra es de 113 plantas por metro cuadrado y su índice de productividad es de 1,00 tallos por planta

7.5.2.2 Características morfológicas

Tabla 4. Características morfológicas de la variedad Novia.

Longitud del tallo	50 - 60 cm
Ciclo de producción	5 a 4 meses
Tamaño de botón	6.0 - 6.5 cm
Número de pétalos	45
Días en florero	14 días
Color	Rosa con bordes blancos
Hojas	Forma ovalada y bordes dentados
Flor	Grande

Fuente: (Naranjo Roses, 2025).

7.6 Plagas y enfermedades

La mayoría de los registros de enfermedades y plagas en las rosas dependen de las condiciones sanitarias en que los tallos entran desde el campo, ya que se intenta reducir la propagación de patógenos manejando las condiciones postcosecha temperatura y humedad relativa (Barón Gamboa, 2019). Las plagas más comunes que se han informado son: pulgones, ácaros, moscas blancas, trips y gusanos cogolleros. Las enfermedades más comunes reportadas son: mancha negra, mildiú polvoriento, mildiú veloso y moho gris (Donaldo Gutierrez, 2017). Es por ello que el proceso de selección del material vegetal al ingreso de la postcosecha resulta crucial para reducir y evitar los reclamos de clientes en exportaciones y generar problemas legales para el país exportador si se trata de plagas cuarentenarias (ICA, 2018)

7.7 Botrytis (Botrytis cinerea)

Botrytis cinerea, que se llama también moho o podredumbre gris, es un hongo necrotrófico y patógeno que tiene impacto en más de 200 especies de plantas, particularmente en las que son cultivadas en áreas cerradas, como por ejemplo invernaderos o interiores (Husqvarna., 2019). El género *Botrytis*, que incluye hongos fitopatógenos muy conocidos como *B. cinerea*, tiene la capacidad de infectar tallos, flores, plántulas, bulbos, raíces, hojas y semillas. El hongo invade la planta y destruye rápidamente los tejidos en cultivos, ya sean de invernaderos o de campo.

Igualmente, causa enfermedades en la etapa de post-cosecha; empieza con una infección latente en el cultivo y se propaga posteriormente durante la cosecha, el traslado y el almacenamiento (Ornamentales Syngenta Colombia, 2018).

7.7.1 Clasificación taxonómica de *Botrytis cinerea*

En la tabla 5 se puede identificar la taxonomía de *Botrytis cinerea* empezando por nombre del género proviene del griego botrys que significa racimo de uvas. cinerea el adjetivo específico deriva latín cinéreo, en alusión al color cenicientos de las esporas acumuladas sobre el moho (José, 2020).

Tabla 5. Clasificación taxonómica de *Botrytis cinerea*.

SUPER REINO	Eucaryote
REINO	Fungi
DIVISIÓN	Amastigomycoa
CLASE	Deuteromycetes
SUBCLASE	Hyphomycetide
ORDEN	Moniliales
FAMILIA	Moniliaceae
GENERO	<i>Botrytis</i>
ESPECIE	<i>Cinerea</i>

Fuente: (ITIS, 2021).

7.7.2 Morfología

Produce un abundante micelio de color gris, junto con varios conidióforos largos y ramificados. Las células apicales redondeadas generan racimos de conidios ovoideos, que suelen ser regulares, de $12.5\text{--}24 \times 10\text{--}16 \mu\text{m}$, unicelulares e incoloros o de tonalidad gris. Los conidióforos y los racimos de conidios se asemejan a un racimo de uvas (Álvarez, 2012).

Los conidios constituyen la principal unidad de dispersión y de farmacoresistencia de los hongos. Tienen una vida útil corta en el campo, y su probabilidad de supervivencia depende de la temperatura, la humedad, el nivel de actividad microbiana y la luz. Los conidios pueden permanecer viables en 12 especies de plantas, conservando su viabilidad e infectividad incluso en condiciones adversas (Álvarez, 2012). El hongo libera conidios con mayor facilidad en climas húmedos, y estos se dispersan luego por el viento. Con frecuencia, el hongo produce esclerocios irregulares, planos, duros y de color negro. Algunas especies de *Botrytis cinerea*

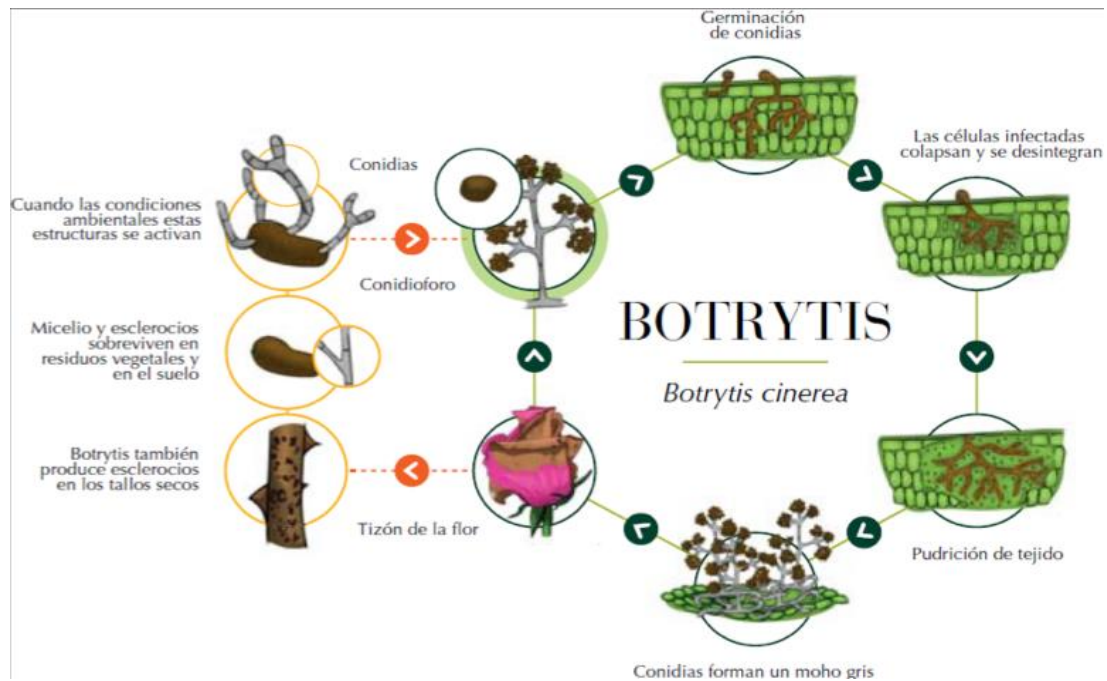
pueden presentar, ocasionalmente, una fase en la que se forma el asca, con ascosporas en un apotecio. *Botrytis cinerea* puede hibernar en el suelo como esclerocios o como micelio que crece sobre restos vegetales en descomposición.

Las clamidosporas son células transparentes que pueden variar ampliamente en forma y tamaño. Se las considera estructuras que facilitan la resistencia ante condiciones adversas. Cuando el micelio se descompone, estas células pueden formarse a partir de la transformación de ciertas partes del micelio y ser liberadas. En situaciones de carencia de nutrientes y humedad, estas estructuras tienen la capacidad de germinar y generar microsporas. Estas últimas permanecen latentes hasta que se presentan nutrientes; en ese momento, las hifas invaden el huésped, producen esporas y, finalmente, conidios (Álvarez, 2012). Se considera al esclerocio como la estructura más relevante para la supervivencia y reproducción de los hongos. Los esclerocios pueden soportar condiciones ambientales adversas y dar lugar a estructuras denominadas asenoides, que muestran una notable capacidad para producir conidios. La formación de estas estructuras está influenciada por factores como la temperatura, la luz, el pH y la composición de los tejidos en los que se desarrollan. Además, los esclerocios contienen compuestos como melanina y nutrientes (Espinosa de los Monteros, 2006).

7.7.3 Ciclo Biológico

El desarrollo tiene inicio en restos de plantas infectadas que no fueron removidos; el micelio presente empieza a crecer con el incremento de la humedad relativa. A plena luz diurna, el micelio genera estructuras denominadas conidióforos, y en sus extremos se forman esporas llamadas conidios, las cuales son dispersadas por el aire y pueden entrar en contacto con las hojas y tallos del cultivo (Canna., 2016). El ciclo biológico del hongo antes descrita se presenta en la (Figura 1).

Figura 1. Ciclo biológico de *Botrytis*.



Fuente: (Agrinos G. , 2005).

7.7.4 Ciclo de infección

Los conidios de *Botrytis cinerea* pueden producirse sobre cualquier material vegetal y esparcirse a grandes distancias a través de corrientes de aire (Arcos, 2011). Una vez que los conidios llegan a la superficie del hospedador, el ciclo de infección comienza a facilitar su descripción e investigación. Según (Arranz et al. 2000), puede considerarse dividido en varias fases:

7.7.4.1 Adhesión y germinación

Si las esporas caen sobre el hospedador (los pétalos de rosa) y quedan expuestas al agua libre y a temperaturas frescas, pueden infectarlo. El viento dispersa estas esporas y las deposita en la parte de la flor. Cuando los pétalos están húmedos y las condiciones son propicias para la germinación de las esporas (entre 15 y 22 °C), el hongo puede invadir la flor, lo que podría hacer que los pétalos se marchiten y la infección se extienda a la parte floral sin mostrar síntomas de inmediato. Al alcanzar la superficie del huésped, se inicia el ciclo de infección, que consta de dos fases iniciales: la germinación y la adhesión de las esporas (Rebollar Alviter, 2011).

La primera etapa del proceso es la adhesión de estructuras de propagación (como los conidios), y ocurre en dos fases:

- i. En la fase inicial, los conidios se hidratan para establecer interacciones hidrófobas. Su germinación depende de diversos factores, entre ellos la disponibilidad de la superficie, las fuentes de carbono y otros nutrientes, así como el etileno producido por las plantas.
- ii. En la segunda fase, los conidios germinan y generan una matriz formada por lípidos, polisacáridos y melanina, la cual facilita que el hongo se adhiera a la superficie del hospedador.

La segunda etapa es la germinación, que comienza con la hinchazón de los conidios y la formación del tubo germinativo, seguida por el desarrollo de las extremidades superiores (Espinosa de los Monteros, 2006).

7.7.4.2 Penetración

La penetración en tejidos vegetales se inicia por la acción de diversas actividades enzimáticas o por distintos procesos mecánicos (incluida la diferenciación de estructuras osmóticas en algunos sistemas) (Llanos Melo, 2018). La infección puede comenzar en tejidos dañados por ciertos patógenos o en tejidos previamente infectados, ya sea mediante penetración directa o a través de aberturas naturales como estomas. En ese contexto, el vestíbulo o tubo embrionario puede comenzar a penetrar. *Botrytis cinerea* puede además producir sustancias capaces de degradar el material vegetal y favorecer la penetración. Entre estas sustancias se encuentran enzimas como la cutinasa, que rompe la cutina, la primera barrera protectora de la planta. Otra enzima implicada es la pectinasa, que degrada la pectina, y la lipasa de la pared celular; esta lipasa hidroliza ésteres de ácidos grasos insaturados de cadena larga presentes en una parte de la epidermis, así como la cera del tejido (Espinosa de los Monteros, 2006).

7.7.4.3 Muerte del tejido vegetal

Cuando el hongo penetra los tejidos vegetales, genera focos primarios que se difundirán a través de compuestos fitotóxicos y metabolitos secundarios producidos por *Botrytis cinerea*, como toxinas, botridial, dihidrobotridial y bocinola (Llanos Melo, 2018). Estos compuestos participan en el desarrollo de placas necróticas que se originan en el hospedador. En las plantas, el ácido oxálico forma cristales de oxalato de calcio, los cuales pueden actuar como quelantes de iones calcio y cobre. La retirada de calcio de la pectina provoca absorción de agua, hinchamiento y deformación de la pared celular (Espinosa de los Monteros, 2006).

Otra vía para causar muerte celular es la generación de especies reactivas de oxígeno, como el anión superóxido, el radical hidroxilo y el peróxido de hidrógeno (Llanos Melo, 2018). Por ello, el establecimiento del patógeno en la zona de penetración provoca la muerte de células vecinas al punto de entrada y da lugar a una lesión primaria como resultado de la respuesta defensiva de la planta (Arranz, Eslava, & Benito, 2000).

7.7.4.4 Fase de latencia

Debido al papel de los mecanismos de defensa de la planta, tras la penetración y las lesiones primarias, suele iniciarse el periodo de incubación, durante el cual la planta intenta contener las lesiones patógenas que permanecen localizadas en la zona necrótica inicial. En esta fase las condiciones son favorables para el hongo, que permanece inactivo. Con el aumento de los azúcares y la mejora de las condiciones para la enfermedad, las infecciones latentes pueden reactivarse, ya sea en la parte superior de la planta o en cualquier momento antes o después de la cosecha (Llanos Melo, 2018).

7.7.4.5 Colonización y maceración

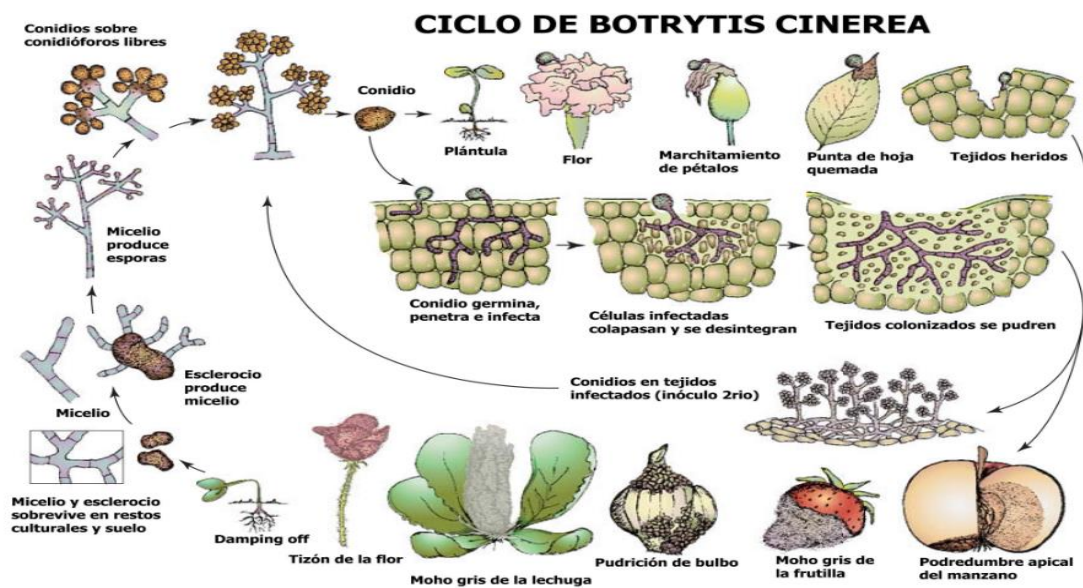
Con el paso del tiempo, en algunas enfermedades relevantes, los patógenos pueden vencer las barreras defensivas de las plantas. Esto ocurre cuando las condiciones vuelven a ser favorables para el hongo y este logra invadir los tejidos vegetales desde dentro de las células. En consecuencia, la infección se manifiesta mediante la secreción de una serie de enzimas degradantes que extraen nutrientes de los tejidos vegetales circundantes para favorecer su crecimiento (Espinosa de los Monteros, 2006). El patógeno comenzó a extenderse por los tejidos vegetales circundantes, lo que confirma la colonización y la maceración rápida del tejido infectado. En ese tejido dañado, el patógeno genera una nueva tanda de esporas, capaces de iniciar un nuevo ciclo de infección (Arranz, Eslava, & Benito, 2000).

7.7.4.6 Esporulación y dispersión

Una vez confirmada la infección en la Figura 2, se produce la descomposición de los tejidos vegetales, lo que favorece la formación de conidios en la superficie del cultivo y da lugar al color característico de la enfermedad. Después de que el hongo genera esporas, la dispersión de conidios vuelve a iniciarse en la superficie de otra planta (Espinosa de los Monteros, 2006). Aunque los botones jóvenes no se infectan con facilidad, la ausencia de síntomas no implica la ausencia de infección durante la maduración. Estas infecciones pueden aparecer como grupos de esporas grises que cubren el botón tras la cosecha.

La enfermedad se manifestará solo bajo condiciones de alta humedad relativa sostenida; si no se mantienen esas condiciones, en botones demasiado maduros no cosechados, solo se observarán frutos aislados con formación de esporas grises (Rebollar Alviter, 2011). Las esporas de *Botrytis* pueden generarse en cualquier material vegetal y ser transportadas a largas distancias por las corrientes de aire. Se producen millones de esporas en cada tallo, y incluso la brisa puede dispersarlas a grandes distancias (Llanos Melo, 2018).

Figura 2. Ciclo de infección de *Botrytis cinerea*.



Fuente: (Agrios G., 2005).

7.7.5 Condiciones Óptimas para el Desarrollo de *Botrytis cinérea*

La humedad relativa es el factor principal para el crecimiento de hongos. Requiere alta humedad para la germinación de conidios (rango típico 93-100%) y para la esporulación (70-100%). La mejor temperatura de crecimiento y desarrollo de enfermedades suele ser 15 °C. Los patógenos pueden permanecer activos a bajas temperaturas (0–10 °C), lo que puede provocar pérdidas significativas en cultivos durante periodos fríos prolongados (Llanos Melo, 2018).

7.7.6. Síntomas

- Hojas: las lesiones iniciales son manchas marrones o grisáceas con halo amarillento, que progresan hacia necrosis extensa (Gauthier et al., 2021).
- Flores y botones florales: decoloración, marchitamiento prematuro y áreas húmedas que se vuelven marrones o grises, afectando la calidad de las flores (Téllez, 2022).

- Tallos: lesiones alargadas de color marrón; si no se controlan, pueden provocar colapso estructural y marchitamiento. Suelen aparecer cerca de heridas, especialmente en cultivos ornamentales como rosas.
- Brotes jóvenes: necrosis que avanza desde el ápice hacia la base, provocando la muerte regresiva de ramas completas (Terrones J., Nieto, & Nava, 2019).

Las condiciones de alta humedad y temperaturas moderadas agravan estos síntomas, especialmente en tejidos envejecidos o dañados, que son más susceptibles a la infección inicial (Téllez, 2022).

7.7.7 Signos

Signos visibles del patógeno: micelio denso de color gris claro a gris oscuro cubre áreas infectadas, más pronunciado en alta humedad (Agrios N. , 2007).

Según indica Muñoz (2008), los conidios son una capa conidial que da el aspecto polvoriento o aterciopelado grisáceo; estas estructuras facilitan la dispersión rápida por viento, agua o contacto.

Lo esclerocios en casos avanzados o bajo ciertas condiciones, se forman esclerocios negros y duros que permiten la supervivencia en ambientes adversos. Los esclerocios, junto con conidios y micelio, son signos clave para confirmar la presencia del patógeno (Gauthier et al., 2021).

7.7.8 Control biológico

El uso excesivo de agroquímicos en la agricultura ha generado impactos negativos sobre el medio ambiente, incluyendo la contaminación de suelos y cuerpos de agua, y la reducción de la diversidad microbiana beneficiosa para las plantas. Además, implica riesgos para la salud humana por contacto directo y prolongado con estos productos y la posible ingesta. En este contexto, la agricultura moderna se ha visto obligada a adoptar enfoques más sostenibles para el control de plagas y enfermedades, con el objetivo de proteger el medio ambiente, la biodiversidad y la salud de las personas (Viera-Arroyo et al., 2020).

7.7.8.1 Uso de microorganismos biocontroladores

Según Viera-Arroyo et al. (2020), el biocontrol es la aplicación de microorganismos vivos para mitigar y eliminar fitopatógenos, emergiendo como alternativa a productos químicos dañinos.

Los agentes de biocontrol incluyen hongos, bacterias y levaduras, que emplean mecanismos como competencia, antibiosis y estimulación de defensas de la planta para inhibir el crecimiento

del patógeno. Géneros frecuentes: *Trichoderma*, *Bacillus*, *Penicillium*, *Beauveria*, *Pochoma*, entre otros (Rivera-Méndez et al., 2019). En particular, *Bacillus* destaca por su capacidad antagonica frente a hongos fitopatógenos. Las pruebas in vitro evalúan la eficacia mediante análisis microbiológicos, genéticos, metagenómicos y bioquímicos; tras ello se ventila la transición a ensayos en campo (Rivera-Méndez et al., 2019).

7.7.8.2 Mecanismos de antagonismo para el biocontrol de *Botrytis* spp.

El biocontrol de *Botrytis* spp. puede lograrse mediante varios mecanismos de antagonismo que logren reducir y suprimir el crecimiento de estos fitopatógenos. Los cuales se describen a continuación:

7.7.8.2.1 Competencia por espacio y nutrientes

El antagonista compite con el patógeno por recursos esenciales (nutrientes, agua y espacio), evitando que el patógeno acceda a azúcares, aminoácidos u otros sustratos necesarios (Hernández et al., 2007).

7.7.8.2.2 Antibiosis

El antagonista produce sustancias que inhiben el crecimiento o la actividad metabólica del patógeno, incluso sin contacto directo. Estas moléculas pueden permanecer activas tras la muerte del antagonista (Nuñez Lara & Vinueza Páez, 2023). Algunas de las sustancias implicadas incluyen péptidos de síntesis ribosomal, policétidos y péptidos de síntesis no ribosomal (Pedraza-Herrera et al., 2020).

7.7.8.2.3 Inducción de Resistencia

El biocontrol puede activar mecanismos de defensa del hospedante ante la infección (Nuero, 1993). Mediante la producción de compuestos antimicrobianos (p. ej., ácido salicílico) y proteínas relacionadas con la patogénesis, se genera una respuesta inmune. Esta resistencia se caracteriza por una mayor rapidez y eficacia de la planta ante ataques futuros tras una exposición inicial (Nuñez Lara & Vinueza Páez, 2023). Este tipo de resistencia se caracteriza por la capacidad que tiene el hospedador para responder rápida y eficazmente a futuros ataques de patógenos después de una exposición inicial (Nuero, 1993).

7.7.8.2.4 Explotación

Como describen (Nuñez Lara & Vinueza Páez, 2023), este antagonismo es directo e implica contacto cercano entre patógeno y hospedador, donde el patógeno extrae nutrientes. Debe

ocurrir en presencia de otro patógeno depredador del patógeno objetivo (hiperparasitismo). Se recomienda principalmente para reducir el inóculo en infecciones secundarias tras una infección primaria (Nuero, 1993).

7.7.8.2.5 Lisis

Este mecanismo implica enzimas líticas (quitinasas, peroxidasas, celulasas, lipasas y proteasas) que degradan la pared celular de microorganismos o causan su lisis. Se liberan oligómeros de glucano que actúan como elicitores de defensa en la planta. También pueden producirse enzimas que bloquean la comunicación entre microorganismos (Pedraza-Herrera et al., 2020).

7.8 Género *Bacillus*

El género *Bacillus* pertenece al reino Bacteria, filo Firmicutes, clase Bacilli, orden Bacillales y familia Bacillaceae. Fue descrito por Ferdinand Cohn en 1872, debido a su capacidad para formar endosporas termorresistentes (Toral-Navarro, 2019). Actualmente comprende más de 379 especies, agrupadas por similitud genética y funcional. Se distinguen principalmente dos grupos: (a) *B. cereus*, asociado a patogenicidad en humanos y animales; y (b) bacilos ambientales, que incluyen especies con propiedades antagónicas contra fitopatógenos. Ejemplos representativos del grupo ambiental: *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* y *Bacillus thuringiensis*, reconocidos por su potencial como biocontroladores (Villarreal-Delgado et al., 2018).

Las especies de *Bacillus* muestran una amplia distribución en ecosistemas acuáticos, terrestres e incluso extremos a nivel global (Zhang et al., 2023). Aunque el suelo es su principal hábitat, donde predominan como saprógrafos, esta adaptabilidad favorece una diversidad genética y funcional notable entre las especies del género (Villarreal-Delgado et al., 2018).

7.8.1 Características principales

Morfología y movimiento:

- ✓ *Bacillus* son bacterias en forma de bacilo, con diámetro cercano a 850 nm.
- ✓ Presentan flagelos periféricos que permiten la movilidad.

Clasificación y fisiología:

- ✓ Son gram positivas.
- ✓ Pueden desarrollarse principalmente en condiciones aerobias, pero también pueden vivir como anaerobios facultativos.

Resistencia y tolerancia ambiental:

- ✓ Pueden sobrevivir en condiciones extremas: temperaturas de aproximadamente 10 °C a 48 °C.
- ✓ Toleran rangos de pH desde 4.9 hasta 9.3.
- ✓ Esta resistencia y adaptabilidad está relacionada con la capacidad de formar endosporas (hasta 14 esporas) (González-León et al., 2022).

Por otro lado, destacan por producir una amplia variedad de compuestos antimicrobianos.

7.8.2 Condiciones de desarrollo

El género *Bacillus* presenta una distribución ubicua, se encuentra en ecosistemas terrestres y acuáticos, incluyendo suelos, cuerpos de agua, atmósfera, rizosfera y ambientes extremos como desiertos (Pimentel-Silva, 2022). Fisiológicamente, estas bacterias muestran su óptimo desarrollo en condiciones de pH neutro, aunque son capaces de tolerar rangos ácidos de hasta 2-3 unidades de pH. En cuanto a sus requerimientos térmicos, aunque algunas cepas termófilas prosperan entre 55°C y 70°C, la mayoría de las especies son mesófilas, con temperaturas óptimas de crecimiento entre 30°C y 45°C (Villarreal-Delgado et al., 2018).

Nutrición: en medios sintéticos, *Bacillus* puede cultivarse utilizando diversas fuentes de carbono (azúcares, alcoholes, ácidos orgánicos) y nitrogenación a partir de amonio, lo que refleja su versatilidad metabólica (Zhang et al., 2023). Esta versatilidad metabólica explica en parte su amplia distribución ecológica.

7.8.3 Ciclo de vida

El ciclo biológico de *Bacillus* consta de dos fases principales:

- i. Fase de crecimiento vegetativo: proliferación exponencial por fisión binaria simétrica.
- ii. Fase de esporulación: inducida por condiciones ambientales adversas (estrés nutricional o físico-químico), con división celular asimétrica que genera endosporas. Las endosporas son estructuras metabólicamente inactivas que protegen el material genético mediante múltiples capas de resistencia (González-León et al., 2022).

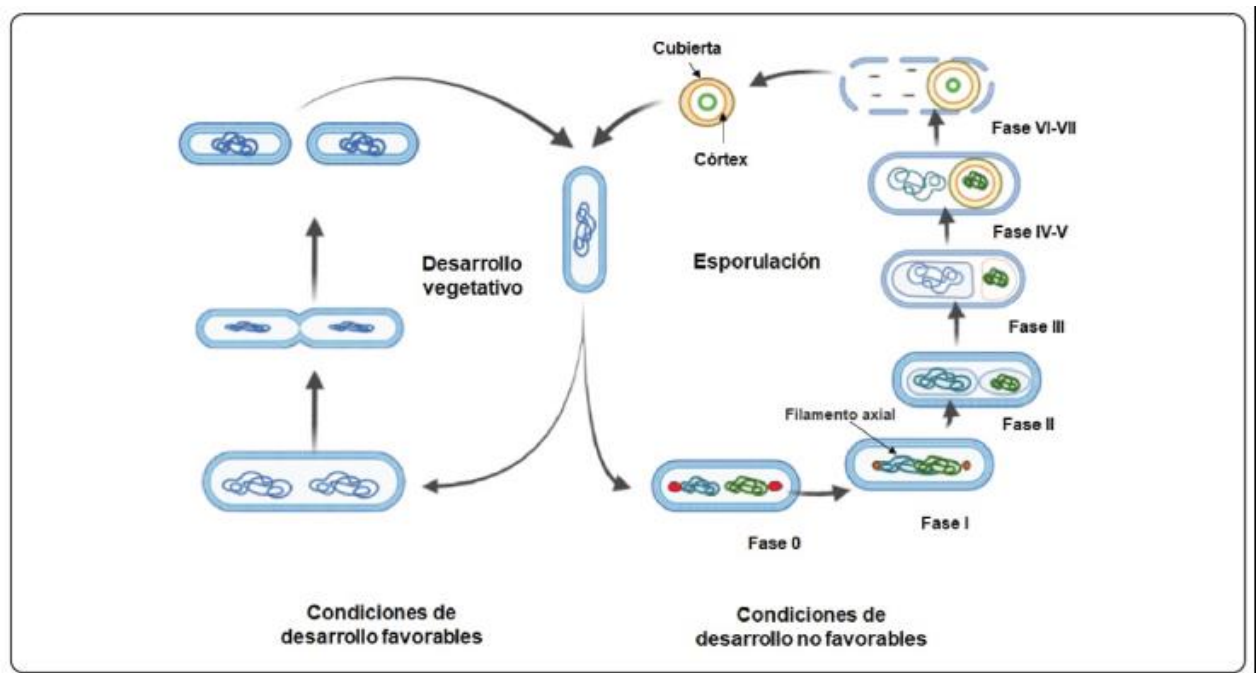
Mecanismo de esporulación (descrito por González-León et al., 2022) en siete etapas secuenciales, con referencia a la Figura 3:

- ✓ **Fase 0 (Inducción):** Un subgrupo de células detecta limitaciones nutricionales y secreta factores líticos (Skf y Sdp) que degradan células vecinas en estado vegetativo,

permitiendo que el agresor obtenga nutrientes para iniciar la esporulación (canibalismo bacteriano).

- ✓ **Fase I (Condensación genómica):** El ADN bacteriano se polariza formando un filamento axial. La proteína RacA asegura la distribución equitativa del material genético entre la célula madre y la preespora.
- ✓ **Fase II (División asimétrica):** Se forma un tabique polar que delimita los compartimentos celulares (célula madre y preespora)
- ✓ **Fase III (Engulfment):** La preespora es engullida completamente por la célula madre mediante un septo asimétrico, regulado por los factores sigma σ_E , σ_F , σ_G y σ_K .
- ✓ **Fases IV-V (Ensamblaje de estructuras protectoras):** Síntesis del córtex (péptidoglicano modificado) y de las cubiertas proteicas externas que confieren resistencia.
- ✓ **Fases VI-VII (Maduración y liberación):** La endospora completa su maduración bioquímica y es liberada tras la lisis de la célula madre.

Figura 3. Representación esquemática del ciclo de desarrollo de *Bacillus spp.*



Fuente: (González-León et al., 2022).

7.9 *Bacillus* como controlador biológico

En la agricultura contemporánea, las pérdidas de cosecha por patógenos microbianos (virus, hongos y bacterias) representan un reto clave. Los enfoques tradicionales, como la rotación de

cultivos y la aplicación de pesticidas químicos, han generado contaminación ambiental debido a la acumulación de compuestos tóxicos en suelos y cuerpos de agua (Pimentel-Silva, 2022).

El uso de microorganismos antagonistas del género *Bacillus* ha emergido como una alternativa prometedora, ya que producen metabolitos secundarios con actividad antibacteriana, antifúngica y antiviral (Vinchira-Villarraga & Moreno-Sarmiento, 2019). El potencial biocontrolador de *Bacillus* se evidenció inicialmente con la proteína Cry de *Bacillus thuringiensis*, que presenta citotoxicidad específica en membranas intestinales de insectos plaga, resultando en su muerte (Villarreal-Delgado et al., 2018).

Estudios recientes han ampliado el uso de *Bacillus* a otras especies del género, como *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* y *B. subtilis*, demostrando eficacia frente a fitopatógenos agrícolas (Villarreal-Delgado et al., 2018). En particular, *Bacillus subtilis* sintetiza metabolitos antimicrobianos de bajo peso molecular (bacteriocinas, péptidos y lipopéptidos) y enzimas hidrolíticas que inhiben el desarrollo fúngico (Pimentel-Silva, 2022).

7.9.1 Mecanismo de acción

Relación planta-microorganismo:

Bacillus, destacando *B. subtilis*, actúa como rizobacteria promotora de crecimiento vegetal (PGPR). Estos bacilos colonizan el sistema radicular mediante la formación de biopelículas, mediadas por quimiotaxis hacia exudados radiculares ricos en nutrientes (polisacáridos, azúcares y ácidos orgánicos) (González-León et al., 2022). Esta simbiosis confiere múltiples beneficios a la planta, que incluye:

- Solubilización de fosfatos inorgánicos.
- Incremento de la fijación biológica de nitrógeno.
- Biosíntesis de fitohormonas (Ácido indolacético, gibberelinas y citoquininas).

Mecanismos de biocontrol a nivel genómico:

Aproximadamente entre el 4–5% del genoma de *Bacillus* está dedicado a la producción de metabolitos secundarios antimicrobianos. Estos metabolitos se clasifican en dos grupos según su volatilidad:

- Compuestos volátiles: hidrocarburos, alcoholes, aldehídos y compuestos sulfurados. Actúan a distancia difundiéndose en la rizosfera.

- Compuestos no volátiles: principalmente lipopéptidos (de origen ribosomal y no ribosomal). Requieren contacto directo con el patógeno.

Diversidad metabólica y acción en el control de fitopatógenos:

La diversidad de metabolitos explica la eficacia de *Bacillus* en el control de patógenos mediante múltiples modos de acción (González-León et al., 2022).

A continuación, se describe más a detalle el mecanismo de acción de cada uno:

➤ **Lipopéptidos**

Lipopéptidos:

- ✓ Acción antimicrobiana: interactúan con membranas bacterianas/fúngicas, formando poros y provocando colapso osmótico.

Clasificación:

- ✓ Ribosomales: participan en señalización celular y comunicación entre bacterias.
- ✓ No ribosomales: producidos por NRPS (sintetasas no ribosomales) y actúan desestabilizando membranas (González-León et al., 2022).

➤ **Sideróforos**

Moléculas que quelan hierro, limitando su disponibilidad para patógenos y facilitando la competencia por este micronutriente. La producción de sideróforos se asocia a la formación de biopelículas y potencia el efecto antagónico (González-León et al., 2022).

➤ **Enzimas líticas**

Destacan β -glucanasas y quitinasas que degradan polisacáridos estructurales de paredes fúngicas:

- Ejemplos clave: β -glucanasas y quitinasas, que degradan polisacáridos estructurales de paredes fúngicas.
- Ejemplos específicos:

- β -1,3-glucanasas en *B. amyloliquefaciens* lisando hifas de *Colletotrichum lagenarium*.
- Expresión del gen *ChiA* en *B. circulans* incrementando la actividad contra *Botrytis elliptica*.

7.10 Identificación de bacterias

7.10.1 Tinción Gram

La tinción de Gram distingue a las bacterias en dos grupos principales: Gram positivas y Gram negativas. Las bacterias Gram positivas retienen la coloración azul-violeta, mientras que las Gram negativas se decoloran y luego se tiñen con safranina. Esta divergencia en las tinciones se debe a las diferencias en la estructura de sus paredes celulares.

Detalles estructurales:

- Bacterias Gram positivas:
 - Pared celular gruesa, rica en peptidoglucanos y otros polímeros.
 - Propiedad impermeable que facilita la retención de la coloración azul-violeta durante el proceso de tinción.
- Bacterias Gram negativas:
 - Pared celular con capa de peptidoglucanos delgada.
 - Presencia de una bicapa de lipoproteínas que se degrada durante la etapa de decoloración, permitiendo que la celda se decoloriza y luego se repinte con safranina (Rodríguez & Arenas, 2018).

Las diferencias entre Gram positivas y Gram negativas pueden observarse en la Tabla 6 y la Figura 4

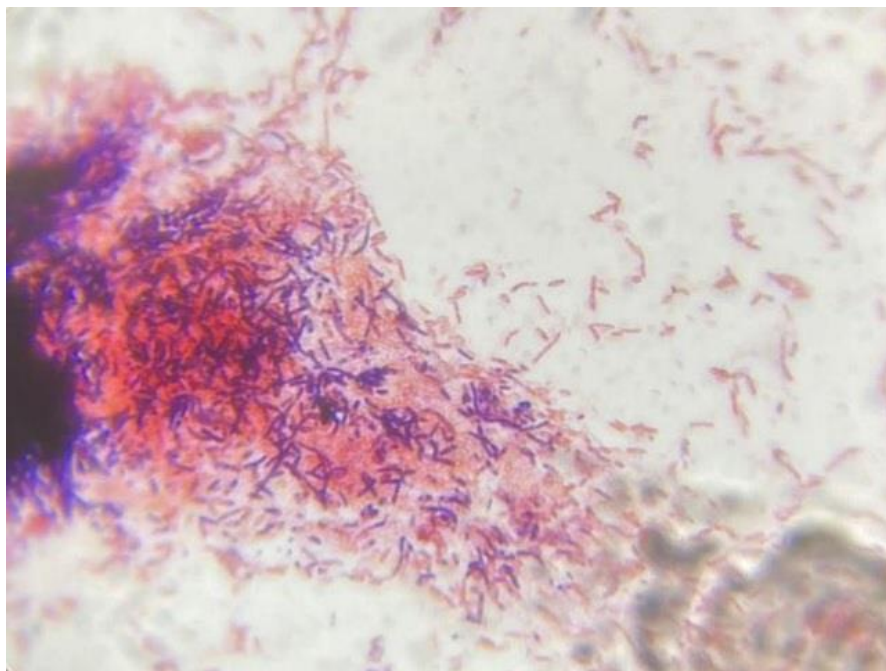
Tabla 6. *Diferencias entre bacterias Gram positivas y Gram negativas.*

	Bacterias Gram positivas	Bacterias Gram negativas
Color con la tinción de Gram	Violeta	Rojo
Pared celular Gruesa	Gruesa	Delgada

Presencia de lipopolisacáridos en pared celular	Ausente	Presente
Presencia de ácidos lipoteicoicos y teicoicos en pared celular	Presente	Ausente

Fuente: (Rodríguez & Arenas, 2018)..

Figura 4 Tinción Gram. Bacterias Gram negativas y Gram positivas.



Fuente: (MARRODMIR, 2023).

7.11 Pruebas bioquímicas de identificación de bacterias

7.11.1 Prueba de Catalasa

La catalasa es una enzima encargada de descomponer el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Esta prueba se emplea para verificar la presencia de la catalasa en microorganismos, la cual está presente en la mayor parte de las bacterias aerobias y en las bacterias anaerobias facultativas que poseen citocromo oxidasa. Una excepción notable la constituyen los *Streptococcus*, que típicamente no presentan catalasa (Caballero Pascual, 2005).

7.11.2 Prueba de Oxidasa

Esta prueba está diseñada para confirmar la presencia de enzimas oxidasas. La reacción de oxidasa surge por la existencia de un sistema de citocromo oxidasa. Los citocromos forman parte de la cadena de transporte de electrones de la respiración aeróbica, transfiriendo electrones al oxígeno y generando agua como producto final. Por lo general, el sistema de citocromo oxidasa se halla en organismos aerobios, en algunos anaerobios facultativos y, de forma excepcional, en ciertos microaerófilos (por ejemplo, *Vibrio fetus*); en cambio, los anaerobios estrictos carecen de actividad oxidasa. Además, la presencia de oxidasa suele asociarse a la producción de catalasa, ya que esta enzima degrada el peróxido de hidrógeno generado durante la reducción del oxígeno, evitando su acumulación tóxica (Caballero Pascual, 2005). Estas herramientas facilitan el procesamiento y la interpretación de datos en investigaciones de biología molecular y biotecnología.

7.11.3 Hemólisis (BAP)

Esta prueba proporciona información sobre las enzimas hemolíticas presentes en una bacteria. Al emplear un medio de cultivo enriquecido con glóbulos rojos, es posible determinar si la bacteria tiene la capacidad de destruir las células y digerir la hemoglobina contenida en ellas. típicamente se usa un medio nutritivo enriquecido con 5% de sangre de carnero, conocido como agar sangre (Parker, Outland, & Dr. Wilson, 2022).

Según Johansson & Hansson (2017), la identificación bacteriana a través de la hemólisis se realiza mediante el cultivo en agar sangre, donde las bacterias se diferencian según su capacidad para secretar hemolisinas. La hemólisis genera una zona de aclaramiento alrededor de las colonias en el agar sangre. Las bacterias pueden producir distintos tipos de hemólisis:

- α -hemólisis (alfa): aclaramiento incompleto, con nota de tono verdoso.
- β -hemólisis (beta): aclaramiento total.
- γ -hemólisis (gamma): ausencia de hemólisis, lo que puede interpretarse como una aparente contradicción.

7.12 Pruebas in vitro para evaluar el biocontrol de *Botrytis spp.*

En la actualidad, con el fin de reducir el uso de pesticidas en cultivos vegetales, se explora el empleo de microorganismos con capacidad de control biológico sobre plagas y enfermedades, aprovechando su biomasa y metabolitos secundarios. Estos microorganismos poseen una notable habilidad para proteger las plantas, empleando su propia biomasa y los compuestos que

producen de forma natural. Entre los géneros más estudiados se encuentran: *Trichoderma*, *Bacillus*, *Penicillium*, *Beauveria* y *Pochoma*, entre otros (Rivera-Méndez, 2019).

En particular, las bacterias del género *Bacillus* destacan por su capacidad antagónica frente a hongos fitopatógenos. Para evaluar su potencial, se realizan primero pruebas de laboratorio que examinan su microbiología, genética y bioquímica. Una vez que se verifica su eficacia en un entorno controlado, se procede a la experimentación en condiciones de campo agrícola (Rivera-Méndez, 2019).

7.12.1 Pruebas de enfrentamiento

Estas pruebas permiten evaluar la interacción entre un fitopatógeno y un biocontrolador, con el objetivo de analizar el antagonismo: la capacidad de ciertos microorganismos (hongos o bacterias) para inhibir el crecimiento de otros microorganismos patógenos. En la técnica de cultivo dual, se coloca un disco de 5 mm que contiene el microorganismo antagonista en una caja de Petri, ya sea en el centro o cerca de un extremo; en los extremos opuestos se coloca otro disco de 5 mm que contiene el microorganismo fitopatógeno. De este modo, ambos microorganismos compiten por colonizar el medio de cultivo mediante sus propios mecanismos de acción (Cadena & López., 2021).

8. VALIDACIÓN DE LAS PREGUNTA CIENTÍFICAS O HIPÓTESIS

8.1 Hipótesis afirmativa

La caracterización de bacterias permite identificar cepas con potencial controlador.

8.2 Hipótesis nula

La caracterización de bacterias no permite identificar cepas con potencial controlador.

9. METODOLOGÍA

9.1 Tipos de investigación

9.1.1 Cualitativo

Se utilizó un enfoque de investigación cualitativo, ya que se identificó las especies de bacterias con potencial controlador para *Botrytis spp.* en condiciones de laboratorio. En este proceso se incluye la descripción de aspectos como la forma, el tamaño, el color y las estructuras de las bacterias seleccionadas.

9.1.2 Cuantitativa

La investigación adoptó un enfoque cuantitativo, puesto que se recopiló y analizaron datos numéricos (como número de cepas aisladas y crecimiento bacteriano).

9.2 Tipo de método

9.2.1 Experimental

En esta investigación se evaluó la eficiencia de ciertas bacterias antagonistas en un entorno controlado. En este contexto, se manipularon variables independientes, como diferentes cepas de bacterias, para observar su impacto en variables dependientes, como el control del crecimiento de *Botrytis spp.* La naturaleza experimental de este estudio permitió identificar relaciones de causa y efecto, ya que se controló los factores externos, facilitando así una comprensión precisa de cómo las bacterias antagonistas afectan al patógeno en condiciones controladas.

9.3 Localización

La investigación se desarrolló en el laboratorio de Microbiología del campus Salache de la Universidad Técnica de Cotopaxi.

9.4 Origen y aislamiento de bacterias

9.4.1 Colecta de material vegetal y suelo (Fase de campo)

La colecta se realizó en una finca productora de rosas de exportación ubicada en el cantón Latacunga, parroquia Eloy Alfaro, con las siguientes coordenadas geográficas Lat. 0°59'49" S; Long. 78°36'20" W y Altitud. 2710 msnm.

Para la colecta se seleccionaron rosas de dos diferentes variedades (Novia y Mandarin X-Pression). Esta se realizó el 18 de junio, las muestras destinadas al aislamiento de bacterias con potencial controlador cumplieron con los siguientes criterios: plantas sin la presencia de plagas y enfermedades, así como tallos y botones florales en punto de corte.

Las submuestras edáficas se recolectaron del mismo lugar en dos fechas 26 de mayo y 30 de junio, estas fueron tomadas a una profundidad de 10 cm mediante el uso de un barreno, para ello se siguió protocolos estandarizados para el muestreo de suelos (AGROCALIDAD, 2018). Con el fin de preservar la integridad microbiana de las muestras, estas fueron inmediatamente colocadas en bolsas plásticas limpias, las cuales fueron selladas y protegidas de la luz. Una vez trasladadas las muestras al Laboratorio de Microbiología de la Universidad Técnica de Cotopaxi, las muestras fueron procesadas dentro al día siguiente posteriores a su colecta.

9.4.2 Aislamiento de bacterias de material vegetal (Fase de laboratorio)

El 18 de junio se realizó la colecta y aislamiento de tejido vegetal correspondiente de dos variedades de rosa: Mandarin y Novia, con el fin de evaluar la presencia de bacterias endófitas.

Las muestras vegetales (tallos, hojas y pétalos) fueron separadas en segmentos y sometidos a un lavado con agua destilada para remover residuos superficiales y partículas adherentes. La desinfección se realizó mediante inmersión en hipoclorito de sodio al 3% durante 2 min (tiempo estandarizado según Padrón, 2020), seguido de tres enjuagues consecutivos con agua destilada estéril para eliminar residuos del hipoclorito. Todos los procedimientos se ejecutaron en cámara de flujo laminar (BIOBASE) bajo condiciones asépticas.

Según el protocolo de (Soto Plancarte et al., 2017), para el procesamiento de muestras vegetales, los fragmentos desinfectados se cortaron en secciones de 0.5 cm y se sembraron en cajas Petri con Agar Nutritivo. Para la preparación del medio se disolvió 23 g/L de Agar Nutritivo (concentración estándar para aislamiento bacteriano, según (Martínez & Zhurbenko, 2018), equivalente a 9.20 g en 400 mL de agua destilada estéril (volumen preparado para 20 cajas). Las cajas se incubaron a 30-35°C durante 24-48 horas en condiciones de oscuridad en la incubadora (BINDER redLINE), según las recomendaciones de la (Senasica, 2020), para el crecimiento de bacterias.

Tras la colecta en el sector seleccionado y al seguir el protocolo establecido, se obtuvieron cuatro muestras de material vegetal: dos correspondientes a la variedad Mandarin y dos a la variedad Novia. De estas, se aislaron siete cepas bacterianas sin distinción específica entre variedades, tal como se detalla en la (Tabla 6).

Tabla 6. Origen de aislamientos de muestras vegetales (tallos y pétalos) pertenecientes a la provincia de Cotopaxi.

N°	Simbología/Aislamiento	Origen	Locación	Coordenadas	
				S	W
1	T.A. M1	Tejido vegetal	Eloy Alfaro	0°59'49"	78°36'20"
2	T.A. M2	Tejido vegetal	Eloy Alfaro	0°59'49"	78°36'20"
3	P. M	Tejido vegetal	Eloy Alfaro	0°59'49"	78°36'20"
4	P. N1	Tejido vegetal	Eloy Alfaro	0°59'49"	78°36'20"
5	P. N2	Tejido vegetal	Eloy Alfaro	0°59'49"	78°36'20"
6	P. N3	Tejido vegetal	Eloy Alfaro	0°59'49"	78°36'20"

7	T.A. N	Tejido vegetal	Eloy Alfaro	0°59'49"	78°36'20"
---	--------	----------------	-------------	----------	-----------

Elaborado por: (Simbaña Lady, 2025).

Tabla 7. Codificación y significado de las muestras obtenidas de material vegetal.

Codificación	Significado
T.A.M	Tallo alto-Mandarin
P.M	Pétalo-Mandarin
T.A. N	Tallo alto-Novia
P.N	Pétalo-Novia

Elaborado por: (Simbaña Lady, 2025).

9.4.3 Procedimiento de diluciones para aislamiento bacteriano a partir de muestras de suelo

Se realizaron diluciones seriadas, para ello se tomó 1 gr de suelo colectado, se homogenizó con 9 mL de agua destilada estéril en tubos de ensayo de 15 mL, así se obtuvo la dilución madre.

Posteriormente, se preparó una serie de diluciones seriadas de las dos variedades (*Mandarin* y *Novia*) desde 10^{-1} (solución madre) hasta 10^{-5} . Para ello, se tomó 1 mL de la suspensión bacteriana inicial y se transfirió a un tubo con 9 mL de medio de dilución, de la cual se obtuvo una dilución 10^{-1} . Este proceso se repitió sucesivamente cuatro veces más, que generó diluciones de 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y finalmente 10^{-5} . Para el aislamiento bacteriano, se sembraron por triplicado 100 μ L de las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} en placas de Petri con Agar Nutritivo y Agar Sangre, se utilizó la técnica de placa extendida con asa de Drigalski estéril (Leboffe & Pierce, 2020). Las placas se incubaron de 30-35 °C durante 24-48 horas en la incubadora (BINDER redLINE). Todos los procedimientos se realizaron bajo condiciones asépticas en cámara de flujo laminar (BIOBASE).

Tras la colecta en el sector seleccionado, se obtuvieron cuatro submuestras edáficas: dos recolectadas el 26 de mayo y dos el 30 de junio. En la primera fecha, se realizaron nueve aislamientos de la variedad *Mandarin* y nueve de *Novia*, de los cuales se logró aislar nueve cepas el 27 de mayo. En la segunda fecha, el procedimiento se repitió en dos ocasiones, obteniéndose seis cepas bacterianas el 30 de junio y quince el 1 de julio. En total, se aislaron 30 cepas, tal como se detalla en la (Tabla 8).

Tabla 8. Origen de aislamiento de submuestras edáficas de dos variedades (*Mandarin* y

Novia) pertenecientes a la provincia de Cotopaxi.

N°	Simbología/Aislamiento	Origen	Dilución	Locación	Coordenadas	
					S	W
27-may						
1	M1.C1	Suelo	-3	Eloy Alfaro	0°59'49"	78°36'20"
2	M4.C1	Suelo	-3	Eloy Alfaro	0°59'49"	78°36'20"
3	M5.C1	Suelo	-3	Eloy Alfaro	0°59'49"	78°36'20"
4	M1.C2	Suelo	-3	Eloy Alfaro	0°59'49"	78°36'20"
5	M6.C2	Suelo	-3	Eloy Alfaro	0°59'49"	78°36'20"
6	N2.C1	Suelo	-3	Eloy Alfaro	0°59'49"	78°36'20"
7	N4.C1	Suelo	-3	Eloy Alfaro	0°59'49"	78°36'20"
8	N3.C2	Suelo	-3	Eloy Alfaro	0°59'49"	78°36'20"
9	N5.C2	Suelo	-3	Eloy Alfaro	0°59'49"	78°36'20"
30-jun						
10	M1.C1	Suelo	-3	Eloy Alfaro	0°59'49"	78°36'20"
11	M2.C1	Suelo	-3	Eloy Alfaro	0°59'49"	78°36'20"
12	M1.C3	Suelo	-3	Eloy Alfaro	0°59'49"	78°36'20"
13	M2.C3	Suelo	-3	Eloy Alfaro	0°59'49"	78°36'20"
14	M2.C2	Suelo	-5	Eloy Alfaro	0°59'49"	78°36'20"
15	N3.C2	Suelo	-3	Eloy Alfaro	0°59'49"	78°36'20"
1-jul						
16	N2.C1	Suelo	-3	Eloy Alfaro	0°59'49"	78°36'20"
17	N2.C2	Suelo	-3	Eloy Alfaro	0°59'49"	78°36'20"
18	N3.C2	Suelo	-3	Eloy Alfaro	0°59'49"	78°36'20"
19	N3.C3	Suelo	-3	Eloy Alfaro	0°59'49"	78°36'20"
20	N1.C1	Suelo	-4	Eloy Alfaro	0°59'49"	78°36'20"
21	N2.C2	Suelo	-4	Eloy Alfaro	0°59'49"	78°36'20"
22	M2.C1	Suelo	-3	Eloy Alfaro	0°59'49"	78°36'20"
23	M3.C1	Suelo	-3	Eloy Alfaro	0°59'49"	78°36'20"
24	M1.C3	Suelo	-3	Eloy Alfaro	0°59'49"	78°36'20"
25	M2.C3	Suelo	-3	Eloy Alfaro	0°59'49"	78°36'20"

N°	Simbología/Aislamiento	Origen	Dilución	Locación	Coordenadas	
					S	W
26	M3.C3	Suelo	-3	Eloy Alfaro	0°59'49"	78°36'20"
27	M1.C1	Suelo	-4	Eloy Alfaro	0°59'49"	78°36'20"
28	M3.C1	Suelo	-4	Eloy Alfaro	0°59'49"	78°36'20"
29	M1.C2	Suelo	-4	Eloy Alfaro	0°59'49"	78°36'20"
30	M1.C3	Suelo	-4	Eloy Alfaro	0°59'49"	78°36'20"

Elaborado por: (Simbaña Lady, 2025).

9.4 Selección de cepas para prueba de Tinción

9.4.1 Características macroscópicas

Una vez obtenidas las muestras de tejido vegetal y submuestras edáficas en el área de estudio, estas se procesaron para aislar cepas bacterianas del género *Bacillus*. El análisis de estas cepas permitió identificar características macroscópicas distintivas, las cuales se describen detalladamente en la (Tabla 9). Y se observa en la (Figura 5).

Tabla 9. Características macroscópicas de *Bacillus*.

Color de la colonia	Gris/Blanco cremoso
Forma	Redonda
Opacidad	Opacas
Superficie	Planas
Textura	Rugosas a menudo secas
Tamaño	2-4 mm
Bordes	Regulares o irregulares

Fuente: (Errigton & Aart., 2020).

Figura 5. *Morfología macroscópica.*



Fuente: *(Simbaña Lady, 2025).*

9.4.2 Características microscópicas

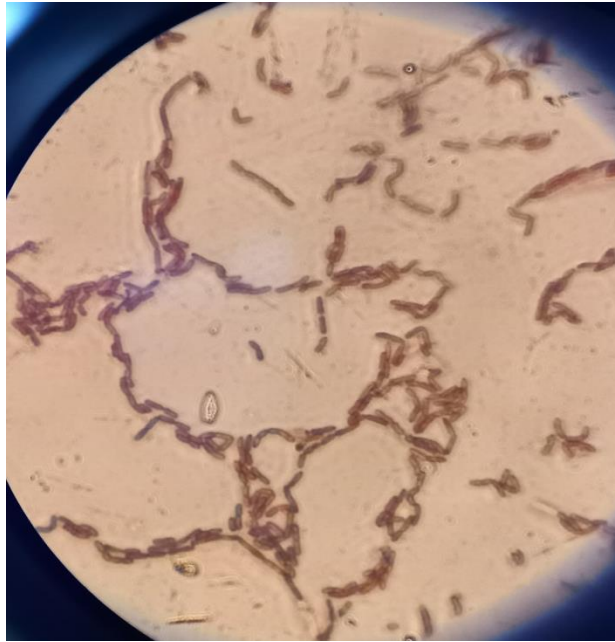
Una vez registradas las características macroscópicas (Tabla 9), se procedió a la observación microscópica de los aislamientos la cual consiste en (Tabla 10). Y se observa en la (Figura 6).

Tabla 10. *Características microscópicas de Bacillus.*

Tinción Gram	Positivo (morado)
Forma	Bacilo con forma de bastón

Fuente: *(Errigton & Aart., 2020).*

Figura 6. *Características microscópicas, Bacilos Gram positivos.*



Fuente: *(Simbaña Lady, 2025).*

9.5 Ensayos Microscópicos (Tinción Gram)

Los cultivos bacterianos se sometieron a la tinción de Gram después de 24 horas de incubación, se siguió el procedimiento descrito por López-Jácome et al., (2014). Dicho procedimiento permitió observar y registrar las formas de las células bacterianas, sus tamaños y agrupaciones, así como clasificarlas en Gram positivas o negativas. El proceso empleó los siguientes reactivos: solución de Cristal violeta al 2% (colorante primario), Lugol al 1% (mordiente), Alcohol-Acetona al 95% (agente decolorante) y Safranina (contrastante).

Para la preparación de los frotis bacterianos, se recolectaron colonias de cultivos previos en agar nutritivo, y se utilizó un asa de siembra estéril. Se colocó una gota de agua sobre un portaobjetos y con ayuda de un asa de siembra se transfirió un fragmento de la colonia encima de la gota de agua se homogenizó suavemente las células bacterianas con la gota de agua, dejándose secar a temperatura ambiente. Para fijar el frotis después de secarlo, se utilizó un flameado controlado: los portaobjetos fueron pasados tres veces por la llama de un mechero, cuidando que no se sobrecalentara para conservar así la muestra.

El protocolo de tinción se ejecutó en cuatro etapas secuenciales: (1) aplicación de cristal violeta durante 1 minuto, seguido de lavado con agua destilada; (2) tratamiento con solución de Lugol (mordiente) por 1 minuto para estabilizar el complejo colorante-pared bacteriana; (3)

decoloración controlada con alcohol-acetona durante exactamente 10 a 15 segundos; y (4) contrastación con safranina durante 45 segundos para visualización de microorganismos Gram-negativos. Entre cada etapa se realizaron lavados con agua destilada para eliminar reactivos residuales. Las preparaciones finales se secaron a temperatura ambiente antes de su observación microscópica, de acuerdo con las recomendaciones de (Casasola, 2022).

La observación se realizó con microscopio óptico (Olympus CX31) con objetivos de 10× a 100× (inmersión en aceite). La clasificación se basó en la retención del color (violeta: Gram-positivas; rojo/rosa: Gram-negativas), según se detalla en la (Tabla 11).

Tabla 11. *Clasificación de las cepas según sus características microscópicas.*

N°	Simbología	Origen	Dilución	CLASIFICACIÓN	
				Gram Positivas/Negativas	Características
1	M1.C1	Suelo	-3	+	Bacilos
2	M4.C1	Suelo	-3	+/-	Cocos y bacilos
3	M5.C1	Suelo	-3	-	Bacilos
4	M1.C2	Suelo	-3	+	Cocos y bacilos
5	M6.C2	Suelo	-3	+	Bacilos
6	N2.C1	Suelo	-3	+/-	Bacilos cocos
7	N4.C1	Suelo	-3	+/-	Cocos y bacilos
8	N3.C2	Suelo	-3	+/-	Cocos y bacilos
9	N5.C2	Suelo	-3	+/-	Cocos y bacilos
10	M1.C1	Suelo	-3	+	Bacilos
11	M2.C1	Suelo	-3	+	Bacilos
12	M1.C3	Suelo	-3	+	Bacilos
13	M2.C3	Suelo	-3	+	Bacilos
14	M2.C2	Suelo	-5	+	Bacilos
15	N3.C2	Suelo	-3	+	Bacilos
16	N2.C1	Suelo	-3	+/-	Bacilos
17	N2.C2	Suelo	-3	+	Bacilos
18	N3.C2	Suelo	-3	+/-	Bacilos
19	N3.C3	Suelo	-3	+	Bacilos
20	N1.C1	Suelo	-4	+	Bacilos

N°	Simbología	Origen	Dilución	CLASIFICACIÓN	
				Gram	Características
				Positivas/Negativas	
21	N2.C2	Suelo	-4	+	Bacilos
22	M2.C1	Suelo	-3	+	Bacilos
23	M3.C1	Suelo	-3	+/-	Bacilos
24	M1.C3	Suelo	-3	+	Bacilos
25	M2.C3	Suelo	-3	+	Bacilos
26	M3.C3	Suelo	-3	+	Bacilos
27	M1.C1	Suelo	-4	+	Bacilos y cocos
28	M3.C1	Suelo	-4	+/-	Bacilos
29	M1.C2	Suelo	-4	+	Bacilos
30	M1.C3	Suelo	-4	+/-	Bacilos
31	T.A. M1	T. vegetal		-	Bacilos
32	T.A. M2	T. vegetal		-	Cocos y bacilos
33	P. M	T. vegetal		-	Bacilos
34	P. N1	T. vegetal		+	Cocos
35	P. N2	T. vegetal		-	Bacilos
36	P. N3	T. vegetal		-	Bacilos
37	T.A. N	T. vegetal		-	Cocos y bacilos

Elaborado por: (Simbaña Lady, 2025).

9.6 Purificación de Bacterias

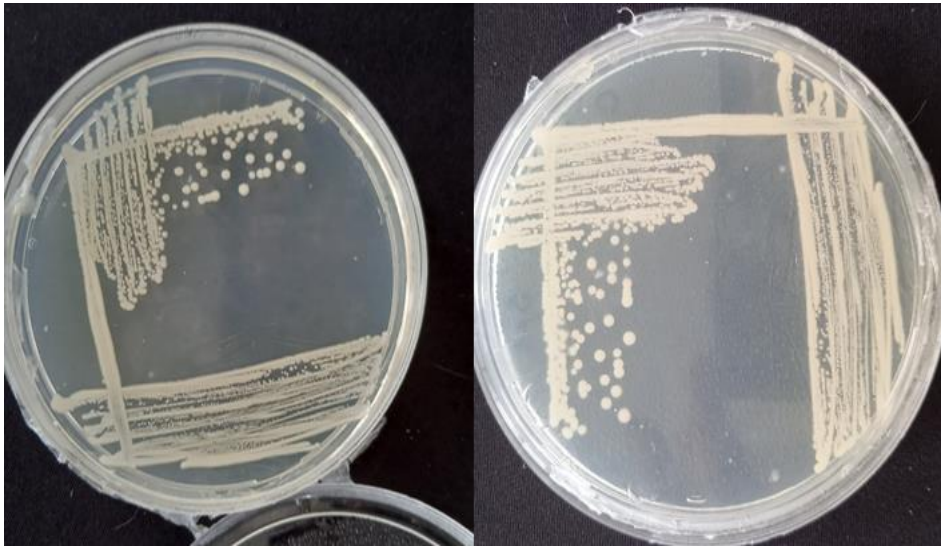
9.6.1 Obtención de cultivos puros

Tras la clasificación preliminar e identificación de posibles cepas de *Bacillus*, se procedió a la obtención de cultivos puros mediante resiembra de las colonias aisladas. El subcultivo se realizó mediante siembra por estrías en agar, según la técnica de agotamiento descrita por Sanz, (2011). Para cada aislamiento, se tomó una muestra con asa bacteriológica estéril, previamente flameada y enfriada, la cual se depositó en el extremo de la placa con medio de cultivo sólido y se estrió en tres fases sucesivas para lograr el aislamiento celular. Este proceso de resiembra se repitió en dos ocasiones para cada cepa con el objetivo de verificar la pureza de los cultivos. Las placas inoculadas se incubaron a temperatura controlada entre 30-35 °C durante un período

de 24 a 48 horas, de acuerdo con los parámetros establecidos para la correcta recuperación de microorganismos viables.

El análisis de muestras recolectadas permitió la purificación de 16 cepas bacterianas (Figura 7), exclusivamente a partir de submuestras edáficas que presentaron características coloniales compatibles con *Bacillus*. Por el contrario, las muestras de tejido vegetal no desarrollaron colonias con características macro o microscópicas asociadas a este género bacteriano, por lo que se excluyó su inclusión en los análisis posteriores.

Figura 7. Purificación de una cepa (SM6C2) mediante siembra por estría en medio de cultivo AN.



Fuente: (Simbaña Lady, 2025).

9.6.2 Conservación de las cepas obtenidas

Para la conservación de las 16 cepas bacterianas obtenidas durante el proceso de purificación, se empleó una mezcla crioprotectora de caldo nutritivo y glicerol, se utilizaron para ello tubos Eppendorf de 1.5 mL de capacidad. En primer lugar, se preparó el medio nutritivo con las instrucciones del fabricante, que indican una concentración de 8 g/L; en este caso, se utilizó un volumen proporcional de 8 mL de agua destilada para cubrir los 16 tubos y 0,64 gr del medio, lo cual fue posteriormente esterilizado en autoclave a 121 °C durante 35 minutos. Una vez enfriado el medio, con la ayuda de una micropipeta se distribuyeron 500 µL de caldo y 500 µL de glicerol en cada tubo Eppendorf y se volvió autoclavar. Posteriormente, se procedió con la incorporación de las bacterias, para lo cual se realizó un raspado suave de las colonias seleccionadas y se transfirió cuidadosamente al interior de los tubos ya preparados, y se obtuvo

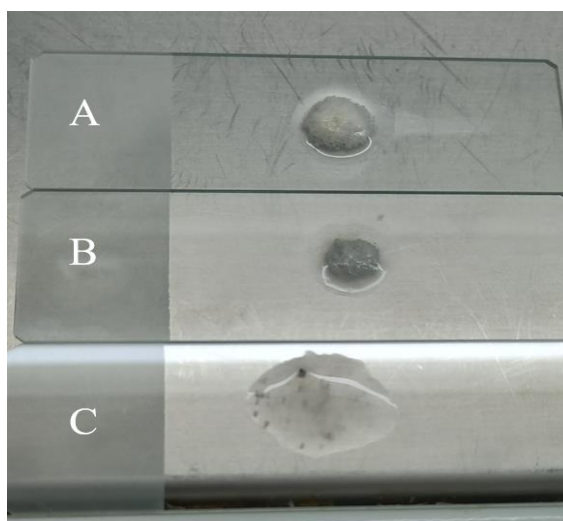
una mezcla homogénea. Esta operación se repitió para cada una de las 16 cepas. Finalmente, las muestras fueron mantenidas en refrigeración durante una hora para estabilizar el contenido y luego almacenadas en congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, para garantizar su viabilidad a largo plazo.

9.7 Pruebas Bioquímicas de identificación de bacterias

9.7.1 Prueba de Catalasa

De acuerdo con el protocolo estandarizado de Johansson & Hansson (2017), se evaluó la actividad oxidasa de las cepas preseleccionadas como *Bacillus* mediante la aplicación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2 al 3%). Para esto se tomó una colonia aislada con asa bacteriológica estéril, se depositó en un portaobjetos limpio y se agregó una gota del reactivo, observándose inmediatamente la formación de burbujas en caso de resultado positivo (actividad catalasa característica de *Bacillus*), mientras que las muestras de tejido vegetal que previamente no mostraron características macro-microscópicas compatibles fueron excluidas de este análisis. Esta prueba complementó los resultados obtenidos en la caracterización inicial y permitió verificar la presencia del género de interés en los cultivos puros obtenidos. Esto se evidencia en la (Figura 8).

Figura 8. Las burbujas resultantes de la producción de oxígeno gaseoso indican claramente un resultado catalasa positivo. La muestra de abajo, es catalasa positiva. La especie *Bacillus* son catalasas positivas. A) Formación burbujas indica catalasa positiva cepa (P4n), B) Baja cantidad de burbujas y C) No hay formación de burbujas, catalasa negativa.

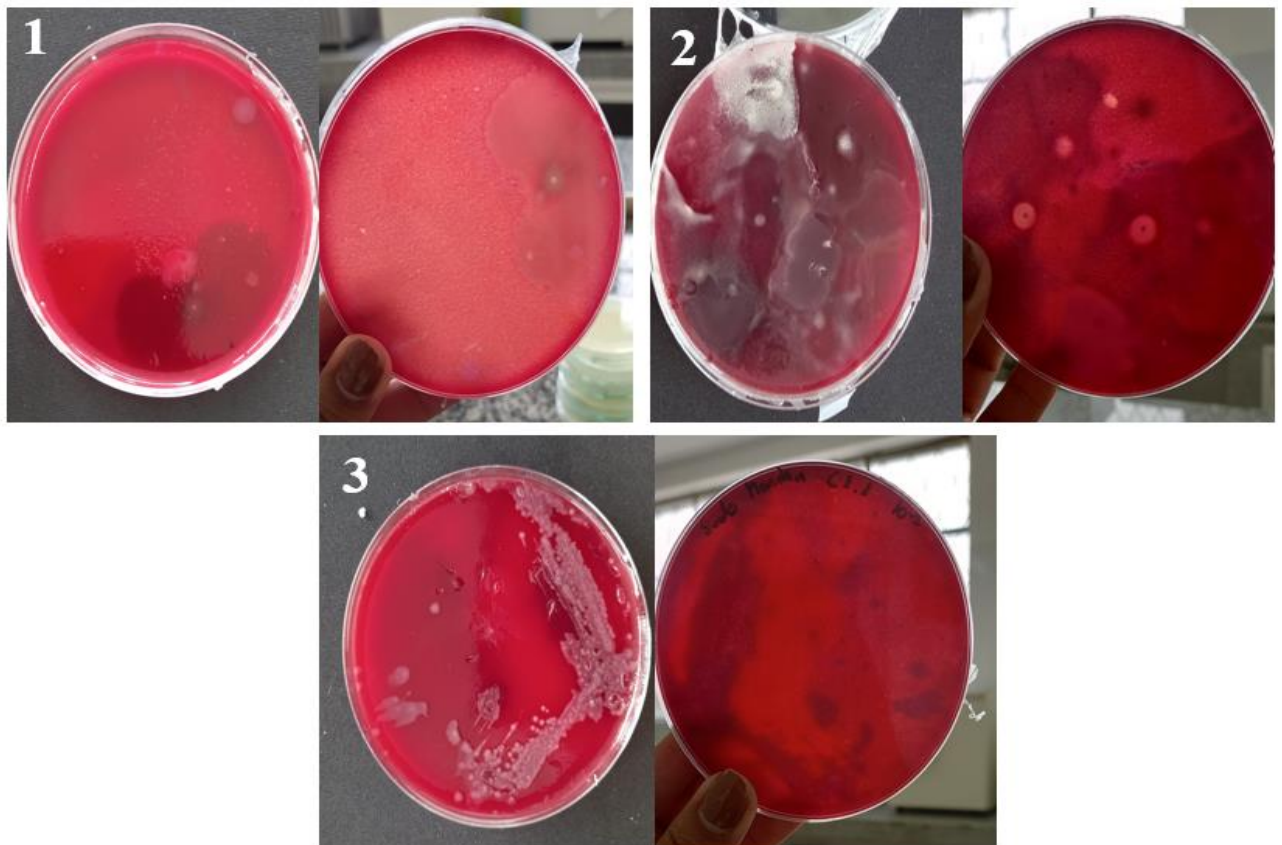


Fuente: (Simbaña Lady, 2025).

9.7.2 Hemólisis en Agar sangre

Para la elaboración del agar sangre (BAP), se determinó que para 20 cajas Petri de 20 mL cada una, se necesitaban 400 mL de medio. Por lo tanto, se pesaron 16.8 g de agar sangre (42 g/L) y se disolvieron en agua destilada; después, se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 45 minutos. Tras dejar que enfriara hasta llegar a los 45-50 °C, se le incorporó sangre humana estéril (5% v/v), mezclándose con suavidad antes de dispensar 20 mL por caja en condiciones asépticas. Simultáneamente, para determinar la hemólisis, las colonias fueron sembradas en agar sangre e incubadas a 35-37 °C durante un periodo de 24 a 48 horas. Se registró si había hemólisis β (áreas transparentes), α (verdes/opacas) o γ (sin cambios). De las 20 cajas sembradas tres presentaron hemólisis. Esto se puede observar en la (Figura 9).

Figura 9. Hemólisis de tres cepas: 1 hemólisis β (beta) (SNC2-5), 2 hemólisis β (beta) (SNC3-3), 3 hemólisis γ (gamma) (SMC1-3).



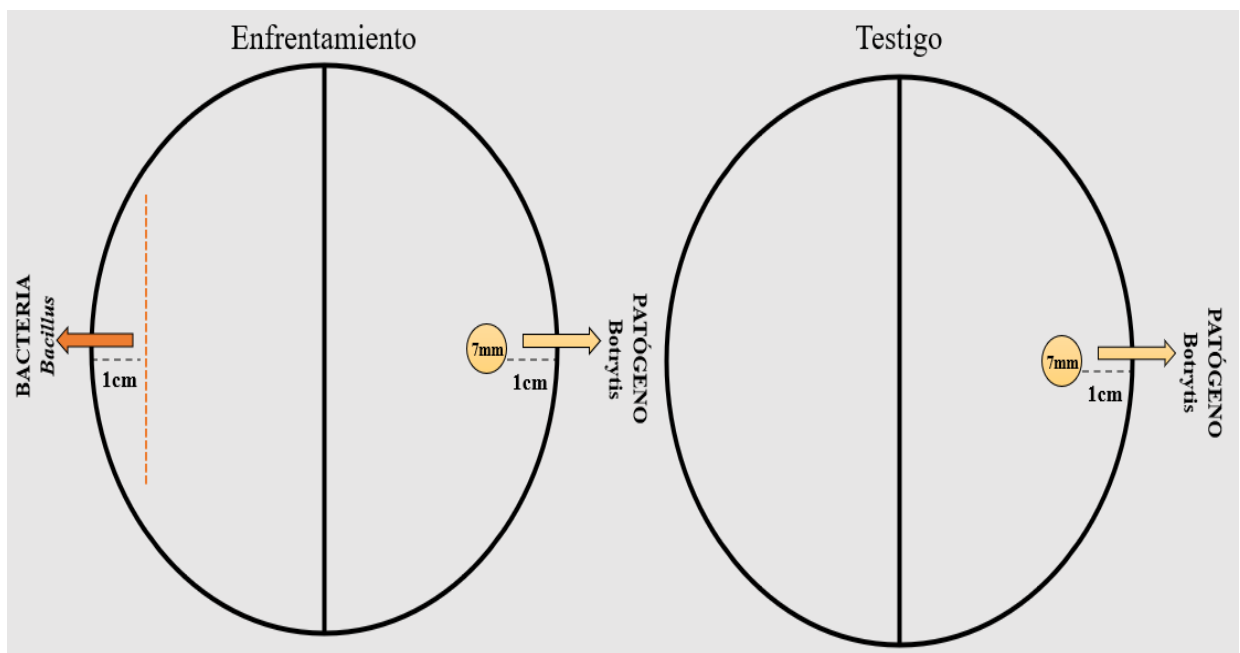
Fuente: (Simbaña Lady, 2025).

9.8 Selección de cepas con capacidad de control antagónico (Ensayo)

9.8.1 Pruebas de antagonismo

Para determinar la capacidad antagónica de las cepas bacterianas contra *Botrytis spp.*, se implementó una técnica de enfrentamiento dual, como señala la metodología descrita por (Yanet-Suárez & Cabrales, 2016), para ello se utilizó discos de micelio de 7 mm obtenidos con una punta de micropipeta estéril y sembrados en PDA (Calvo et al., 2012), estas fueron colocadas a un 1 cm del borde de la caja Petri; en el extremo opuesto, a igual distancia, se inoculó la bacteria evaluada (con cinco repeticiones por tratamiento). Como controles (testigo), se incluyeron cajas con *Botrytis spp.* y otras con cepas de *Bacillus* (Acosta et al., 2021), se utilizó una plantilla estandarizada que se observa en la (Figura 10) para garantizar precisión en la disposición. Todos los ensayos se incubaron a 25°C durante 7 días, periodo durante el cual se monitoreó diariamente la interacción microbiana.

Figura 10. Esquema, prueba de enfrentamiento.



Elaborado por: (Simbaña Lady, 2025).

9.8.1.1 Determinación de la actividad antagonista de *Bacillus spp.* (Porcentaje de Inhibición)

Para determinar el porcentaje de inhibición generado por las diferentes cepas de *Bacillus* ante el hongo patógeno se determinaron por ecuación descrita en la investigación realizada por (Yanet-Suárez & Cabrales, 2016):

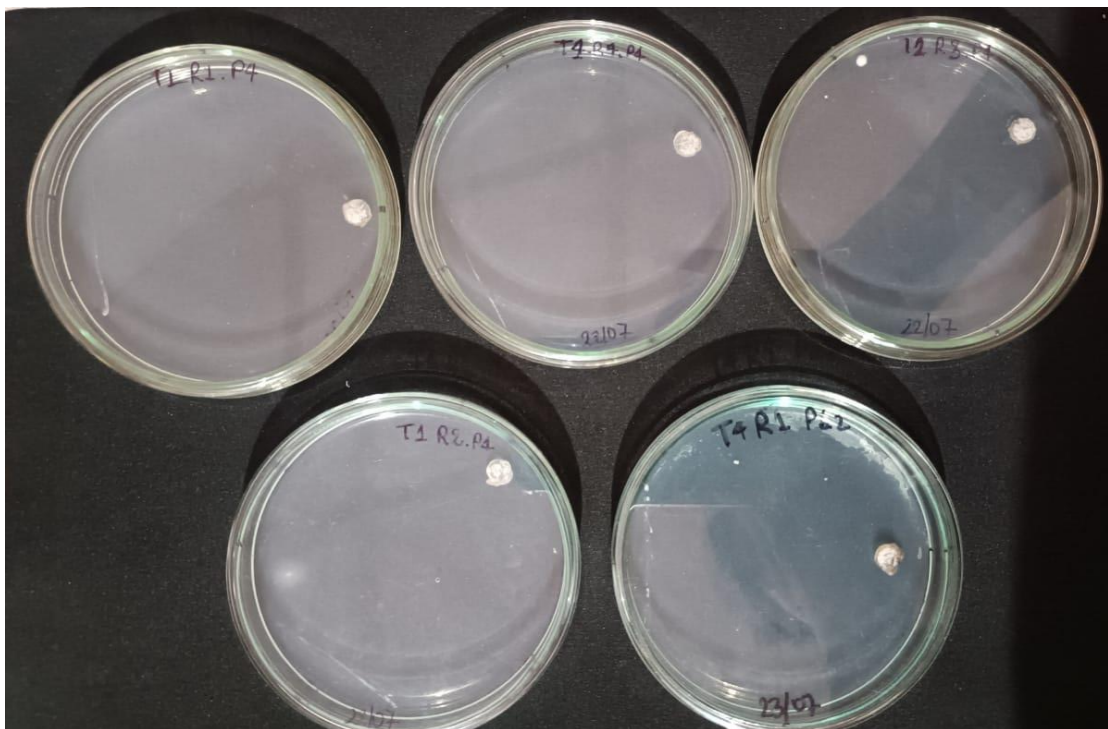
$$\%I = \frac{R_c - R_t}{R_c} \times 100$$

Donde:

R_c = Radio de crecimiento del hongo en el testigo (sin bacteria) en cm.

R_t = Radio de crecimiento del hongo en presencia de la bacteria (tratamiento) en cm.

Figura 11. Prueba de enfrentamiento, implementación del ensayo.



Fuente: (Simbaña Lady, 2025).

9.9 Análisis Estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) utilizando un diseño completamente al azar (DCA) para analizar estadísticamente los datos recopilados en las pruebas de enfrentación. Este tipo de diseño permite evaluar hipótesis relacionadas con los parámetros de posición de sujetos seleccionados aleatoriamente bajo condiciones similares (Maldonado et al., 2018). La variable

dependiente en la prueba de enfrentamiento fue el porcentaje de inhibición del hongo provocado por las diferentes bacterias, siendo estas últimas la variable independiente; estos ensayos se realizaron con 5 repeticiones.

Se utilizó el programa de estadística InfoStat versión 2020. Además, se llevaron a cabo pruebas mediante la prueba de Tukey con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$ (Maldonado et al., 2018). En esta prueba se compararon las medias de los diferentes tratamientos para identificar la cepa con mayor actividad antagonista.

10. RESULTADOS Y DISCUSIONES

10.1 Selección de muestras bacterianas

Luego del aislamiento de bacterias a partir de muestras tanto de material vegetal como de submuestras edáficas se obtuvieron los siguientes resultados.

10.1.1 Muestras obtenidas de tejido vegetal

Tabla 12. Resultado total, de muestras obtenidas del aislamiento de material vegetal.

18-jun	
Codificación	Significado
T.A.M1	Tejido vegetal-Mandarin
T.A.M2	Tejido vegetal-Mandarin
P.M	Tejido vegetal-Mandarin
PN1	Tejido vegetal-Novia
PN2	Tejido vegetal-Novia
PN3	Tejido vegetal-Novia
T.A.N	Tejido vegetal-Novia

Elaborado por: (Simbaña Lady, 2025).

Las bacterias que fueron aisladas a partir de material vegetal se detallan en la (tabla 12). La codificación indica de donde fueron aisladas las bacterias obtenidas T.A. y P. indican el tipo de muestra tomadas (tallo alto y pétalos), mientras que el sufijo hace referencia a la variedad correspondiente. Tras la siembra y evaluación de las muestras, ninguna presentó características morfológicas microscópicas ni macroscópicas compatibles con el género *Bacillus*. Por lo tanto, no fue posible continuar con las pruebas específicas para esta bacteria y fueron descartadas. A pesar de que las especies del género *Bacillus* se encuentran ampliamente distribuidas en la

naturaleza debido a su habilidad para formar endosporas estructuras que les permite sobrevivir en condiciones ambientales extremas y facilitar su aislamiento en una variedad de hábitats, incluidos suelos, aguas y superficies vegetales (Tejera-Hernández et al., 2011) ninguna de las muestras de tejido vegetal analizadas (tanto de las variedades Mandarín como Novia) presentó características (microscópicas y macroscópicas) compatibles con este género bacteriano.

Esta ausencia puede explicarse por el hecho de que *Bacillus* se encuentra principalmente en el suelo, considerado su reservorio natural. La mayoría de sus especies son saprófitas, es decir, dependen de la materia orgánica en descomposición presente en el suelo para su desarrollo, lo cual convierte a esta matriz en un entorno óptimo para su proliferación, más que el interior de los tejidos vegetales (Mc Spadden, 2004). Por tanto, el aislamiento de *Bacillus* a partir de tejido vegetal puede ser limitado o incluso ausente si las condiciones no son favorables o si no existe una interacción endofítica establecida con la planta.

10.1.2 Cepas obtenidas de submuestras edáficas

Para este análisis se realizaron dos colectas y tres aislamientos

Tabla 13. Total, de muestras aisladas obtenidas de la primera fecha de colecta de submuestras.

27-may		
Nº	Codificación	Significado
1	SM1C1	Suelo-Mandarín
2	SM4C1	Suelo-Mandarín
3	SM5C1	Suelo-Mandarín
4	SM1C2	Suelo-Mandarín
5	SM6C2	Suelo-Mandarín
6	SN2C1	Suelo-Novia
7	SN4C1	Suelo-Novia
8	SN3C2	Suelo-Novia
9	SN5C2	Suelo-Novia

Elaborado por: (Simbaña Lady, 2025).

A partir de estas submuestras se sembraron 16 cajas Petri, de las cuales se obtuvo un total de 9 aislamientos bacterianos que presentaban características macroscópicas compatibles con el género *Bacillus* (colonias opacas, de borde irregular, secas o rugosas).

No obstante, durante el proceso de purificación, solo uno de estos aislamientos logró ser compatible con las características de *Bacillus*, tales como bacilos Gram positivos, que corresponde a la cepa –3SM6C2, proveniente de la muestra SM6C2 (suelo variedad Mandarin).

Tabla 14. Total, de muestras aisladas obtenidas de la segunda fecha de colecta.

30-jun		
N°	Codificación	Significado
1	SM1C1	Suelo-Mandarin
2	SM2C1	Suelo-Mandarin
3	SM1C3	Suelo-Mandarin
4	SM2C3	Suelo-Mandarin
5	SM2C2	Suelo-Mandarin
6	SN3C2	Suelo-Novia

Elaborado por: (Simbaña Lady, 2025).

A partir de estas submuestras se sembraron 18 cajas Petri, obteniéndose 6 aislamientos bacterianos. La mayoría de estos aislamientos presentan características micro y macroscópicas compatibles con *Bacillus*, como forma de colonia rugosa o seca, bordes irregulares, y bacilos Gram positivos en observación microscópica preliminar.

Tabla 15. Total, de muestras obtenidas de la resiembra de la segunda fecha de colecta.

1-jul		
N°	Codificación	Significado
1	SN2C1	Suelo-Novia
2	SN2C2	Suelo-Novia
3	SN3C2	Suelo-Novia
4	SN3C3	Suelo-Novia
5	SN1C1	Suelo-Novia
6	SN2C2	Suelo-Novia
7	SM2C1	Suelo-Mandarin
8	SM3C1	Suelo-Mandarin
9	SM1C3	Suelo-Mandarin
10	SM2C3	Suelo-Mandarin
11	SM3C3	Suelo-Mandarin

1-jul		
N°	Codificación	Significado
12	SM1C1	Suelo-Mandarin
13	SM3C1	Suelo-Mandarin
14	SM1C2	Suelo-Mandarin
15	SM1C3	Suelo-Mandarin

Elaborado por: (Simbaña Lady, 2025).

De 36 cajas sembradas se obtuvieron 15 aislamientos bacterianos, una cantidad considerable que sugiere éxito en el proceso de resiembra. Una gran parte de los aislamientos presenta características compatibles con bacterias del género *Bacillus*, como morfología de colonias secas, opacas, de bordes irregulares y estructuras bacilares en microscopia.

10.2 Cepas obtenidas de submuestras edáficas compatibles (*Bacillus*) con capacidad de control.

Como resultado del muestreo realizado, se logró la purificación de 16 cepas bacterianas representadas en la (Tabla 16) aisladas a partir de submuestras edáficas mediante la técnica de siembra por estrías en agar (Sanz, 2011). Cabe destacar que las muestras de tejido vegetal no mostraron crecimiento microbiano que cumpliera con los criterios establecidos para el género de interés.

Tabla 16. Total, muestras purificadas obtenidas de las submuestras edáficas.

N°	Aislamiento	Dilución	Codificación	Significado
1	SM6C2	-3	P0	Suelo-Mandarin
2	SM2C3	-3	P1	Suelo-Mandarin
3	SM6C2	-3	P4	Suelo-Mandarin
4	SM1C1	-3	P6.1	Suelo-Mandarin
5	SM1C1	-3	P6.2	Suelo-Mandarin
6	SM1C1	-3	P8	Suelo-Mandarin
7	SM1C1	-3	P8.2	Suelo-Mandarin
8	SM1C3	-3	P11.2	Suelo-Mandarin
9	SM2C3	-3	P12	Suelo-Mandarin
10	SM1C3	-4	P17.1	Suelo-Mandarin
11	SM1C3	-4	P17.3	Suelo-Mandarin

N°	Aislamiento	Dilución	Codificación	Significado
12	SN1C1	-4	A2	Suelo-Novia
13	SN2C2	-4	A3	Suelo-Novia
14	SN2C2	-4	A4.3	Suelo-Novia
15	SN2C2	-4	A4.4	Suelo-Novia
16	SN2C2	-4	A4.5	Suelo-Novia

Elaborado por: (Simbaña Lady, 2025).

De las 16 cepas purificadas, 6 presentan características morfológicas micro y macroscópicas compatibles con bacterias del género *Bacillus*. Estas características incluyen:

- Colonias de aspecto seco u opacas, de borde irregular o rugoso, crecimiento moderado a rápido en placas de cultivo AN, presencia de estructuras bacilares observadas en tinción de Gram, posible capacidad de esporulación, catalasa positiva y hemólisis beta o alfa.

10.3 Capacidad de control de las bacterias obtenidas frente a *Botrytis spp.*

10.3.1 Análisis estadístico (7 días evaluación)

Como se observa en la (Tabla 17), el p-valor obtenido ($p = 0,1516$) es mayor al nivel de significancia establecido ($\alpha = 0,05$), lo que indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos evaluados en el crecimiento promedio de *Botrytis spp.* durante el período de evaluación.

El coeficiente de variación (CV) fue de 224,61 %, valor que refleja una alta variabilidad experimental, característica común en ensayos biológicos in vitro con microorganismos, atribuible a la respuesta diferencial del patógeno frente a los tratamientos bacterianos evaluados a lo largo del tiempo.

Tabla 17. Análisis de la varianza del crecimiento promedio de *Botrytis spp.* durante siete días de evaluación bajo la aplicación de bacterias antagonistas.

F.V.	GL	CM	p-valor
Tratamiento	6	1,18	0,1516 ns
Error experimental	25	0,68	
Total	31		

CV (%)	224,61
---------------	---------------

Elaborado por: (Simbaña Lady, 2025).

Este resultado sugiere que, durante el período total de evaluación, la respuesta del patógeno fue variable entre el avance de los días y repeticiones, lo que disminuyó las diferencias entre tratamientos al analizarse de manera conjunta. La ausencia de significancia estadística no implica que los tratamientos carezcan de efecto biológico, sino que dicho efecto no fue uniforme ni consistente durante todos los días de evaluación.

Dado que el análisis de varianza no detectó diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0,05$), no se procedió a la aplicación de la prueba de comparación de medias de Tukey. Según (Jim Frost, 2019), esto se debe a que las pruebas, como Tukey, solo son estadísticamente válidas en el caso de que ANOVA sea significativo, ya que su objetivo es identificar entre qué tratamientos existen dichas diferencias.

10.3.2 Análisis estadístico (último día evaluación)

Como se observa en la (Tabla 18), el análisis de varianza del crecimiento micelial de *Botrytis spp.* al día 7 no mostró diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($p = 0,1491$). De igual manera, la prueba de comparación de medias de Tukey ($\alpha = 0,05$) ubicó a todos los tratamientos dentro de un mismo grupo estadístico. Sin embargo, desde el punto de vista biológico, los tratamientos P6.2, P4 y A3 presentaron inhibición total del crecimiento micelial, mientras que el *tratamiento* A2 permitió un mayor desarrollo del patógeno.

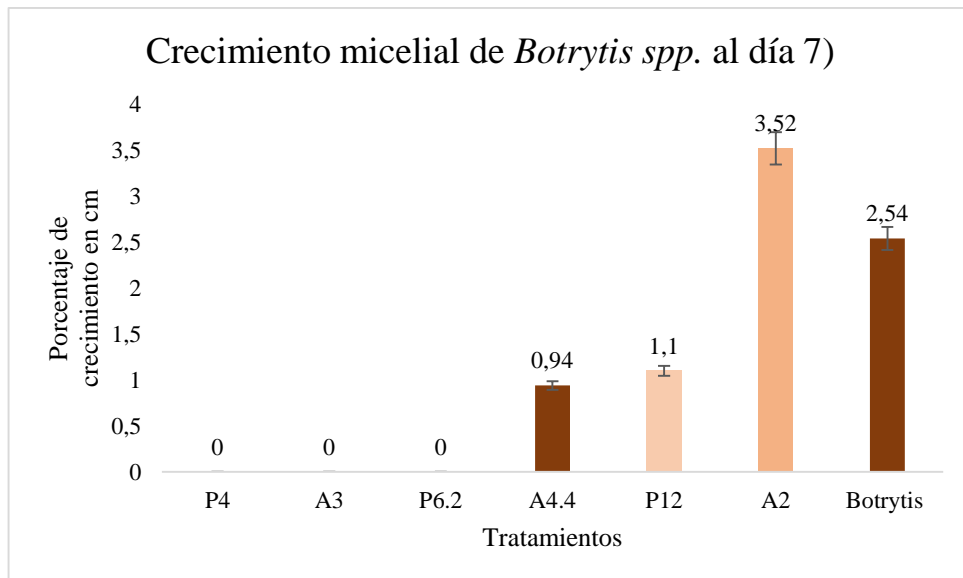
Tabla 18. Análisis de la varianza del crecimiento de *Botrytis spp.* en el último día de evaluación.

F.V.	GL	CM	p-valor
Tratamiento	6	9,64	0,1491 ns
Error experimental	28	5,55	
Total	34		
CV (%)		203,51	

Elaborado por: (Simbaña Lady, 2025).

El análisis de varianza indicó que no existieron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($p > 0,05$). El elevado coeficiente de variación sugiere una alta dispersión de los datos, atribuible a la variabilidad del crecimiento micelial entre repeticiones, situación frecuente en ensayos in vitro con microorganismos antagonistas.

Figura 12. Porcentaje de crecimiento micelial de *Botrytis spp.* al día 7 bajo la aplicación de bacterias antagonistas.



Elaborado por: (Simbaña Lady, 2025).

La figura muestra el crecimiento micelial promedio de *Botrytis spp.* al día 7 para cada tratamiento. Se observa que los tratamientos P6.2, P4 y A3 inhibieron completamente el crecimiento del patógeno, mientras que A2 presentó el mayor desarrollo micelial.

11. IMPACTOS (SOCIALES, AMBIENTALES O ECONÓMICOS)

11.1 Impacto Social

El empleo de métodos de control puede disminuir el consumo de productos químicos, lo que protege la salud de las personas expuestas. Asimismo, el uso de estas prácticas crea conciencia sobre la agricultura sostenible y ecológica, lo que promueve comportamientos más responsables entre los productores.

11.2 Impacto Ambiental

Al sustituir fungicidas químicos por biocontroladores se disminuye la contaminación del suelo, el agua y el aire, protegiendo los ecosistemas locales. Debido a que las bacterias biocontroladores son organismos naturales que no afectan a especies no objetivo, contribuyendo a la preservación de la biodiversidad.

11.3 Impacto Económico

Los productores tendrán la oportunidad de disminuir los gastos importantes en fungicidas químicos que normalmente suponen un alto coste en la producción, si las bacterias controladoras son eficaces. Asimismo, los productos agrícolas elaborados por métodos ecológicos son más bien recibidos en mercados globales, sobre todo en zonas que requieren certificaciones orgánicas.

12. PRESUPUESTO DEL PROYECTO

Tabla 19. *Materiales de laboratorio utilizados para el aislamiento y purificación bacteriana.*

Ítem	Cantidad	Precio unitario (USD)	Costo total (USD)
Cubre objetos 22x22 mm PK/100	1 caja	1,14	1,14
Parafilm 125x4 FT	1 unidad	36,00	36,00
Cajas Petri 100x15 mm	20 unidades	2,48	49,60
Porta objetos con extremo esmerilado pk/100	1 caja	3,92	3,92
Lámpara de alcohol con mecha 150 ml	1 unidad	4,00	4,00
Mango para asa de inoculación	1 unidad	14,06	14,06
Asa de inoculación acero quirúrgico 5 cm	1 unidad	2,35	2,35
Alcohol industrial/Etílico 96%	4 litros	2,99	11,96
Papel absorbente	1 unidad	4,50	4,50
Papel plástico y papel aluminio	6 unidades	1,00	6,00
Guantes y alcohol	1 paquete + 1L	7,50	7,50

Nota. *Elaboración propia.*

Tabla 20. *Reactivo principal utilizado para cultivo bacteriano.*

Ítem	Cantidad	Precio unitario (USD)	Costo total (USD)
Tryptone Soya Agar 500 g (Oxoid)	1 unidad	85,29	85,29

Nota. *Elaboración propia.*

Tabla 21. *Costos de transporte y logística de campo.*

Ítem	Cantidad	Precio unitario (USD)	Costo total (USD)
Transporte a sitio de muestreo	5 viajes	2,00	10,00

Bolsas estériles, marcador, etiquetas	Varios	10,00	10,00
--	--------	-------	-------

Nota. *Elaboración propia.*

Tabla 22. *Resumen del presupuesto estimado del proyecto.*

Categoría	Costo total (USD)
Materiales de laboratorio	140,03
Reactivos	85,29
Transporte y logística de campo	20,00
Total, general	245,32

Nota. *Elaboración propia*

13. CONCLUSIONES

- Durante el desarrollo de la presente investigación se logró coleccionar 37 muestras, 30 de submuestras edáficas y 7 de material vegetal de las cuales se aisló un total de 23 cepas bacterianas, todas provenientes del suelo. Las muestras vegetales fueron descartadas al no presentar características compatibles con bacterias del género *Bacillus*.
- Se aisló un total de 16 bacterias compatibles con el género *Bacillus*, a partir de submuestras edáficas de las variedades mandarín y novia de rosas de exportación, de estas bacterias aisladas, se seleccionaron 6 cepas para la realización del ensayo de antagonismo in vitro frente a *Botrytis spp.*
- Los análisis morfológicos y microscópicos permitieron identificar que las cepas aisladas del suelo presentaban características compatibles con el género *Bacillus*, como colonias de aspecto seco u opacas, de borde irregular o rugoso, crecimiento moderado a rápido en placas de cultivo AN, presencia de estructuras bacilares observadas en tinción de Gram, posible capacidad de esporulación, catalasa positiva y hemólisis beta o alfa.
- En el ensayo de antagonismo, el crecimiento micelial promedio del testigo *Botrytis spp.* al día 7 fue de 2,54 cm, mientras que los tratamientos bacterianos presentaron valores variables entre 0 y 3,52 cm. Los tratamientos P4, A3 y P6.2 inhibieron completamente el crecimiento micelial del patógeno de su reproducción, donde se obtuvo un registro de 0 cm, lo que corresponde a un 100 % de inhibición en comparación con el testigo. Este comportamiento sugiere que dichas cepas poseen alta

capacidad antagonista, probablemente asociada a la producción de metabolitos antifúngicos, competencia por nutrientes y espacio, así como a la posible secreción de enzimas que afectan la pared celular del hongo, mecanismos comúnmente atribuidos al género *Bacillus spp.* Por su parte, los tratamientos A4.4 y P12 redujeron el crecimiento micelial en 62,99 % y 56,69 %, respectivamente, donde se evidenció un efecto antagonista parcial, lo cual podría estar relacionado con una menor producción de compuestos inhibitorios o con una competencia limitada frente al crecimiento agresivo de *Botrytis spp.* En contraste, el tratamiento A2 presentó un crecimiento micelial superior al testigo, con un valor promedio de 3,52 cm, reflejándose en un porcentaje de inhibición negativo (-38,58 %), lo que indica ausencia de efecto antagonista y sugiere que esta cepa no posee mecanismos efectivos de inhibición o que no logra competir con el patógeno bajo las condiciones del ensayo. En conjunto, estos resultados confirman que la inhibición del crecimiento de *Botrytis spp.* se debe principalmente a la actividad biológica diferencial entre cepas bacterianas, en el cual se destacó a P4, A3 y P6.2 como las más prometedoras para futuros estudios, tanto en condiciones *in vitro* como en evaluaciones de formulación y aplicación en campo.

- Los resultados obtenidos permiten evidenciar que, si existió inhibición, convirtiendo estos datos en una base científica para futuras investigaciones orientadas a la caracterización, validación y evaluación de estas bacterias en condiciones de invernadero y campo, así como para su posible aplicación en estrategias de manejo sostenible de enfermedades causadas por *Botrytis spp.*

14. RECOMENDACIONES

- Continuar la evaluación de las bacterias P4, A3 y P6.2 en estudios posteriores, ya que presentaron 100 % de inhibición del crecimiento micelial de *Botrytis spp.*, en condiciones *in vitro*, lo que evidencia su potencial como agentes de control biológico.
- Realizar ensayos adicionales bajo condiciones de invernadero y campo, con el fin de confirmar la eficacia antagonista observada en laboratorio y evaluar el comportamiento de las bacterias seleccionadas en condiciones ambientales reales
- Realizar la identificación molecular de las bacterias con mayor efecto antagonista, con el objetivo de conocer su taxonomía, facilitar su caracterización científica y evaluar su posible registro como agentes de control biológico

- Finalmente, se recomienda fomentar investigaciones complementarias que analicen las propiedades funcionales de las cepas identificadas, tales como la producción de metabolitos antimicrobianos o su capacidad promotora del crecimiento vegetal, con el fin de desarrollar estrategias sostenibles para el manejo fitosanitario en floricultura.

15. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, L. A. (2021). *Cultivo dual in vitro de cepas nativas de Trichoderma spp. frente a Botrytis sp. patógeno de Passiflora ligularis Juss* . *Revista de Investigación Agropecuaria Ciencia y Biotecnología* . Obtenido de <https://doi.org/10.25127/riagrop.20214.720>
- Agrios, G. (2005). *Fitopatología, colaborador en la traducción, Manuel Guzmán Ortiz, Segunda edición, México, Editorial Limusa S. A., 838 p.*
- Agrios, N. (2007). *Fitopatología (2da ed., Vol. 1). México: Limusa Noriega Editores.*
- AGROCALIDAD. (2018). *INSTRUCTIVO INT/SFA/10. Muestreo para analisis de suelo.* Obtenido de <https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2020/05/agua8.pdf>. Recuperado el 24 de junio del 2025.
- Altieri, V., Rossi, V., & Fedele, G. (2023). *Biocontrol de Botrytis cinerea según la influencia de las etapas de crecimiento de la vid y las condiciones ambientales. Plants* . Obtenido de <https://doi.org/10.3390/plants12193430>
- Álvarez. (2012). *Efecto del manejo nutricional del calcio en la expresión de Botrytis cinérea en flores y tallos de Rosa sp (en línea). s.l.,* Obtenido de Universidad Nacional de Colombia. 256 p.: Disponible en <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/20628>.
- Álvarez, M. (2001). *Agrotecnia de los rosales, en la floricultura. Redalyc, 17–23.*
- Amaya, E. (2021). *Control de botrytis (Botrytis cinerea), con fungicidas en pos cosecha de rosas, en la empresa Royal Flowers - Mulaló. UTC. Latacunga* . Obtenido de <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/7620>
- Arcos, M. (2011). *Obtención y evaluación de cepas nativas de Trichoderma spp. en el biocontrol de Botrytis cinerea en el cultivo de rosas (en línea). s.l.,* . Obtenido de Universidad Politecnica del Ejercito. 154 p. : Disponible en <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/4653/1/T-ESPE-IASA I-004568.pdf>.

- Arranz, M., Eslava, A., & Benito, E. (2000). *[Pathogenicity factors in Botrytis cinerea]*. (en línea). Obtenido de Revista iberoamericana de micología 17(1):S43-6.: Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15762781>.
- Atlas, R. M. (2010). *Handbook of Microbiological Media (4ª ed.)*. CRC Press. Obtenido de <https://www.taylorfrancis.com/books/mono/10.1201/EBK1439804063/handbook-microbiological-media-ronald-atlas>.
- Banco Central del Ecuador. (2025). *Producto Interno Bruto por Industria*. Obtenido de <https://contenido.bce.fin.ec/home1/estadisticas/bolmensual/IEMensual.html> . Consultado el 01 junio del 2025.
- Barón Gamboa, F. (2019). *Evaluación del efecto de la aplicación en postcosecha del fungicida Pyraclostrobin sobre la vida en florero de la Rosa (Rosa sp.), variedad Vendela. s.l.,.* Obtenido de Universidad Nacional de Colombia. 2–100 p.
- Caballero Pascual. (26 de Junio de 2005). *Pruebas bioquímicas de identificación de bacterias*. Obtenido de https://www2.ulpgc.es/hege/almacen/download/35/35729/pruebas_bioquimicas_de_identificacion_de_bacterias.pdf
- Cadena & López., A. (2021). *IDENTIFICACIÓN DE HONGOS CON POTENCIAL BIOCONTROLADOR DE Colletotrichum sp., EN CULTIVO DE TOMATE DE ÁRBOL (Solanum betaceum), EN LA PROVINCIA DE TUNGURAHUA. UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA.*
- Cajas Pacheco, D. (2017). *Utilización de fundas de pilielileno, papel y tela como medida preventiva para el control de la pudrición gris (Botrytis cinerea) en la florícola Diamond Roses, JoseGuango Bajo - Cotopaxi (en línea). s.l.,.* Obtenido de Universidad Técnica De Cotopaxi. 101 p.: <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/4501/1/PI-000727.pdf>
- Calvo, J. R. (2012). *Aislamiento y evaluación in vitro de antagonistas de Botrytis cinerea en mora. Agronomía Mesoamericana.* . Obtenido de <https://www.scielo.sa.cr/pdf/am/v23n2/a01v23n2.pdf>
- Canna. (11 de noviembre de 2016). *Botrytis cinerea - Plagas y Enfermedades.* . Obtenido de <https://www.canna.es/botrytis-cinerea-plagas-enfermedades>

- Casasola, M. J. (2022). *La importancia de realizar una correcta tinción de Gram en la identificación bacteriana*. . Obtenido de Revista Del Colegio de Microbiólogos y Químicos Clínicos de Costa Rica, 27(2), 89-98.: <https://revista.microbiologos.cr/articulo/la-importancia-de-realizar-una-correcta-tincion-de-gram-en-la-identificacion-bacteriana/>
- Castro-Acosta, B. L.-M. (2024). *Estudio de Benchmarking como herramienta de optimización estratégica de las exportaciones de rosas ecuatorianas*. *Economía y Negocios*. Obtenido de <https://doi.org/10.29019/eyn.v15i1.1270>
- Chancusig Kevin. (2024). *EVALUACIÓN DE BIOESTIMULANTES A DIFERENTES DOSIFICACIONES EN EL CULTIVO DE ROSA (Rosa sp.) DE LA VARIEDAD MONDIAL® EN LA ZONA DE PUPANA NORTE, SAQUISILI, COTOPAXI 2023 – 2024*. Obtenido de <https://repositorio.utc.edu.ec/server/api/core/bitstreams/2ad9827f-9035-46bf-9f01-8891c7ff0d8d/content>
- Chavarro, J. (2021). Obtenido de Evolución y desafíos de la floricultura ecuatoriana en el futuro próximo. METROFLOR. 67: <https://www.metroflorcolombia.com/evolucion-y-desafios-de-la-floriculturaecuatoriana-en-el-futuro-proximo/>
- Donaldo Gutierrez, A. (2017). *Diseño de un modelo de clasificación de rosa en el cultivo y postcosecha en la empresa Elite Flowers Farmers S.A.S. s.l.*, . Obtenido de Universidad pedagógica y tecnológica de Colombia. 9–15 p.
- Ecuador, B. C. (2025). *Producto Interno Bruto por Industria*. . Obtenido de <https://www.bce.fin.ec/estadisticas-economicas/>. Consultado el 20 de junio del 2025.
- Errigton, J., & Aart., L. T. (11 de Mayo de 2020). *Microbiology Society*. Obtenido de Microbe Profile: Bacillus subtilis: model organism for cellular development, and industrial workhorse.: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.000922>
- Espinosa de los Monteros, M. (2006). *Estudio de la variabilidad genética y organización cromosómica en el hongo fitopatógeno Botrytis cinerea (en línea)*. s.l., . Obtenido de Universidad de Cádiz. 1–223 p. : Disponible en <https://rodin.uca.es/bitstream/handle/10498/15678/MCarbuEspinosa.pdf;jsessi>
- Fainstein, R. (2000). *Manual para el cultivo de rosas en Latinoamérica*. Rosal, 5, 7-12.

- Finca de Rosas. (2025). *Florícola de rosas en Ecuador*. Obtenido de <https://fincasderosas.com/rosadas/rosa-novia/>
- Flores, E. (2015). *Respuesta del Cultivo de Rosa (Rosa sp.), a tres fuentes de fosfitos en aplicación al suelo y follaje como inductores de resistencia y calidad de Flor. Ayora, Pichincha*. Obtenido de <https://www.dspace.uce.edu.ec/server/api/core/bitstreams/2d46179e-665e-4919-b2d2-1b202413b965/content>
- Fuhrman, J. y. (1998). *Microbial community structure in the ocean: a molecular approach.* *Nature*. . Obtenido de <https://doi.org/10.1038/31100>
- Gibson, M. (2000). *Guías Jardín BLUME*. . Rosales, Ediciones.
- Gómez, T. (2014). *Caracterización de aislamientos de Botrytis cinerea de rosa en la Sabana de Bogotá*. Obtenido de [Tesis doctoral]. Universidad Nacional de Colombia.: <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/50427/07790832.2014.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- González-León, Y. O.-B.-R.-F. (2022). *Bacillus subtilis y Trichoderma: Características generales y su aplicación en la agricultura. TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 25. . Obtenido de <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2022.520>
- Grijalva, D. (2018). *“EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE TRES BIOESTIMULANTES EN EL CULTIVO DE ROSA (Rosa sp.) VARIEDADES FREEDOM Y ÁMSTERDAM EN EL CANTÓN PEDRO MONCAYO PROVINCIA DE PICHINCHA” [UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE]*. Obtenido de http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/8142/1/03_AGP_231_TRABAJO_DE_GRADO.pdf.
- Harkema, H., Mensink, M., Somhorst, D., Pedreschi, R., & Westra, E. (2013). *Reduction of Botrytis cinerea incidence in cut roses (Rosa hybrida L.) during long term transport in dry conditions (en línea)*. *Postharvest Biology and Technology* 76:135–138. DOI: . Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.10.003>.
- Hernández, N. B. (2007). *Uso de microorganismos antagonistas en el control de enfermedades postcosecha en frutos*. *Revista Mexicana de Fitopatología*. Obtenido de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext

- Herrera Romero, J. (2015). *Evaluación de recubrimientos y fungicidas naturales para el control postcosecha de Botrytis cinerea en rosas (Rosa sp .) variedad Vendela. s.l., .* Obtenido de Universidad San francisco de Quito. 104 p.: <https://repositorio.utc.edu.ec/server/api/core/bitstreams/51582537-bf18-49fb-8dad-f217c7d4ee91/content>
- Husqvarna. (07 de Julio de 2019). *Botrytis, una de las enfermedades más comunes de los cultivos hortícolas.* Obtenido de. Obtenido de <https://www.todoqusqvarna.com/blog/botrytis/>
- Hygiene. (s.f.). *Pruebas fiables de seguridad alimentaria con extracción de ADN/ARN a medida para la detección por PCR . Recuperado el 23 de junio del 2025, de .* Obtenido de https://www.hygiene.com/es/centro-de-aprendizaje/guia-de-tecnologia/extraccion-de-adn-arn-personalizada-para-pruebas-fiables-de-pcr-en-tiempo-real-de-seguridad-alimentaria?_gl=1*ckibpq*_up*MQ..*_ga*MTM1NzYyNDM2Ny4xNzUxNzY3MDc4*_ga_N1ZFCTH78J*cZE3NTE3NjcwN
- ICA. (2018). *ICA importación y exportación (en línea, sitio web).* Consultado 14 jun. 2025. Obtenido de Disponible en <https://www.ica.gov.co/importacion-y-exportacion.aspx>.
- ITIS. (2021). *Integrated Taxonomic Information System (en línea, sitio web).* Obtenido de Consultado 14 jun. 2025. Disponible en <https://www.itis.gov/>.
- Janda, J. M. (s.f.). *16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. Journal of clinical microbiology, 45(9), 2761-2764.*
- Järvinen, A. K. (2009). *Rapid identification of bacterial pathogens using a PCR- and microarray-based assay. BMC microbiology, 9(1), 161.*
- Jim Frost. (2019). *Statistics By Jim.* Obtenido de <https://statisticsbyjim.com/anova/post-hoc-tests-anova/>
- Johansson, E. K.-E., & Hansson, I. (20 de Diciembre de 2017). *VetBact.* Obtenido de Pruebas bioquímicas. Universidad Sueca de Ciencias Agrícolas - Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia: <https://www.vetbact.org/biochemtest/1/#id30>
- José. (16 de diciembre de 2020). *Botrytis cinerea: características, taxonomía, síntomas .* Obtenido de control.: Obtenido de <https://www.lifeder.com/botrytis-cinerea/>

- L. López-Jácome., M. H.-D.-C.-P.-G. (2014). *Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. Investigación en Discapacidad Medigraphic*, 3(1), 10-18. . Obtenido de <http://medigraphic.com/rid>.
- Lasken, R. S., & McLean, J. S. (2014). *Recent advances in genomic DNA sequencing of microbial species from single cells. Nature Reviews Genetics*, 15(9), 577-584.
- Leboffe, M. J., & Pierce, B. E. (2020). *A Photographic Atlas for the Microbiology Laboratory (5ª ed.)*. Obtenido de <https://archive.org/details/photographicatla0000lebo>
- Llanos Melo, A. (2018). *Control de Botrytis cinerea Pers. en Fresa (Fragaria x ananasa Duch.) cv. Aaromas mediante fungicidas biológicos y químicos en Huaral (en línea). s.l.* . Obtenido de Universidad Nacional Agraria La Molina Universidad Nacional Agraria “La Molina”. 195 p. : Disponible en <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/3018/H20-L44-T.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
- Maldonado, R. C. (2018). *Elaboración de una bebida fermentada a base de quinoa (Chenopodium quinoa) Production of a fermented drink based on quinoa (Chenopodium quinoa). Enfoque UTE*, 9(3).
- MARRODMIR. (2023). *El laboratorio de Marrodmir. La Tinción de Gram*. Obtenido de <https://marrodmir.com/tincion-de-gram/>. Recuperado el 25 de mayo del 2025.
- Martínez, C. R., & Zhurbenko, R. (2018). Manual de medios de cultivo. En BIOCEN. Impreso en la República de Cuba.
- Mc Spadden, G. (2004). *Ecología de Bacillus y Paenibacillus spp. en sistemas agrícolas. Fitopatología*. 94:1252-1258. Obtenido de <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.11.1252>
- Merchán, J., Ferrucho, R., & Álvarez, J. (2014). *Efecto de dos cepas de Trichoderma en el control de Botrytis cinerea y la calidad del fruto en fresa (Fragaria sp.)*. Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2011-2173201400010000.
- Muñoz, C. (2008). *Identificación rápida de distintas razas de Botrytis cinerea*. . Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/284545598_Identificacion_rapida_de_distintas_razas_de_Botrytis_cinerea

- Naranjo Roses. (2025). *Naranjo Natural Seduction. Rosetafolio. Recuperado el 01 de julio 2025 de:* . Obtenido de <https://naranjoroses.com/rosetafolio/>
- Nuero, O. M. (1993). *Study of β -1,3-glucanase activity during autolysis of *Aspergillus nidulans* by FPLC ion-exchange chromatography. Letters in Applied Microbiology, 17(3).* . Obtenido de <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1993.tb01435.x>
- Nuñez Lara, R. M., & Vinueza Páez, A. S. (2023). *Bacterias Del Género Bacillus Como Agentes De Control Biológico In Vitro Del Hongo Fitopatógeno Alternaria Sp [Universidad Politécnica Salesiana].* Obtenido de <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/25311>
- Ordoñez, P. (2019). *Respuesta del cultivo de rosa sp. var. Freedom a la aplicación de un bioestimulante. In Universidad Central Del Ecuador.* Obtenido de <https://www.dspace.uce.edu.ec/server/api/core/bitstreams/2d46179e-665e-4919-b2d2-1b202413b965/content>
- Orellana, E. (2011). *Análisis de la interacción Rosa spp.- Botrytis cinerea Pers. :sintomatología, análisis de la expresión de genes de resistencia "in planta" y proceso de infeccioso del patógeno. (Tesis de licenciatura).* Obtenido de Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito.
- Ornamentales Syngenta Colombia. (27 de abril de 2018). *Botrytis, biología del patógeno: la base de un control químico eficiente. Obtenido de.* Obtenido de <https://www.syngentaornamentales.co/news/articulo/botrytis-biologia-del-patogeno-la-base-de-un-control-quimico-eficiente>
- Padrón, S. I. (2020). *Cultivo de Tejidos Vegetales., Montería Colombia,,: Fondo Editorial Universidad de Córdoba.,.*
- Palomino & Ccoa, D. (2022).). *Efectos de la agricultura intensiva y el cambio climático sobre la biodiversidad. Revista de Investigaciones Altoandinas -.* Obtenido de Journal Of High Andean Research.: Research. <https://doi.org/10.18271/ria.2022.328>
- Parker, J., Outland, L., & Dr. Wilson, G. (2022). *VUMIE.* Obtenido de Intuitive Systems, Inc. Pruebas bioquímicas. Hemólisis en agar sangre.: <https://vumicro.com/docs/hemolysis-on-blood-agar/>

- Pedraza-Herrera, L. A.-C. (2020). *Mecanismos de acción de Bacillus spp. (Bacillaceae) contra microorganismos fitopatógenos durante su interacción con plantas*. *Acta Biológica Colombiana*, 25(1). . Obtenido de <https://doi.org/10.15446/abc.v25n1.75045>.
- Pimentel-Silva, E. (2022). *Actividad antifúngica mediada por lipopéptidos y policétidos producidos por cepas del género Bacillus*. [Tesis de Grado]. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- PROECUADOR. (2020). *Ficha Técnica de Ecuador- PRO ECUADOR*. Obtenido de Recuperado el 20 de julio del 2025, de <https://www.proecuador.gob.ec/ficha-tecnica-de-ecuador/>
- QIAGEN. (2020). *Cuantificación de ADN y gel de agarosa*. Recuperado el 24 de junio del 2025 de: . Obtenido de <https://www.qiagen.com/us/knowledge-and-support/knowledge-hub/bench-guide/dna/analysing-dna/quantification-of-dna#:~:text=El%20an%C3%A1lisis%20en%20gel%20de,tinci%C3%B3n%20con%20bromuro%20de%20etidio>.
- Rebollar Alviter, A. (2011). *Manejo del mildiú y el moho gris de la zarzamora en Michoacán (en línea)*. 1ra edición. Rosales, T (ed.). Chapingo, DR c. Universidad Autónoma Chapingo. 36 p. Obtenido de Disponible en https://www.ecured.cu/Moho_gris.
- Rivera-Méndez, W. B.-M.-V. (2019). *Laboratorio de Biocontrol: Investigación vinculada con la producción agrícola*. *Revista Tecnología En Marcha*. . Obtenido de <https://doi.org/10.18845/tm.v32i9.4640>
- Rodríguez, P. A., & Arenas, R. (Abril-Junio de 2018). *Hans Christian Gram y su tinción*. Obtenido de Sección de Micología, Hospital General Dr. Manuel Gea González, Calzada de Tlalpan 4800, C.P. 14080, Ciudad de México.: [https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2018/dcm182n.pdf#:~:text=Se%20llama%20bacterias%20Gram%20positivas%20a%20aquellas,de%20ambos%20tipos%20de%20bacterias%20\(tabla%201\)](https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2018/dcm182n.pdf#:~:text=Se%20llama%20bacterias%20Gram%20positivas%20a%20aquellas,de%20ambos%20tipos%20de%20bacterias%20(tabla%201)).
- Salud, O. P. (2020). *Manual de bioseguridad en laboratorios*. *Incubación de muestras microbiológicas" Págs. 38–40*. Obtenido de <https://iris.paho.org/handle/10665.2/429>.
- Sambrook, J., & Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Obtenido de <https://www.cshlpress.com/pdf/sample/2013/MC4/MC4FM.pdf>

- Sanz Cervera Susana A. (2011). *Prácticas de Microbiología, Universidad de la Rioja. pag 20-21*. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/descarga/libro/100835.pdf>
- Senasica. Servicio Nacional de Sanidad, I. y. (2020). *Ficha Técnica: Aislamiento de bacterias fitopatógenas y pruebas de patogenicidad [Versión 1.0]*. . Obtenido de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/728771/1._FT._Aislamiento_de_bacterias_fitopat_genas_y_pruebas_de_patogenicidad_1.0_2020.pdf
- Soto Plancarte, A. R. (octubre de 2017). *Scielo.org*. Obtenido de Protocolos de aislamiento y diagnóstico de *Phytophthora* SPP. enfoque aplicado a la investigación. : <https://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v8n8/2007-0934-remexca-8-08-1867.pdf>
- Sura A. Abdulateef, Hasan A. Aal Owaif, & Noora A. Hadi. (Mayo de 2023). *International Journal of Research Publication and Reviews*. Obtenido de Molecular Identification Techniques of Bacteria: A Review, Vol 4, no 5, pp 388-393: <https://ijrpr.com/uploads/V4ISSUE5/IJRPR12669.pdf>
- Tejera-Hernández B, R.-B. M.-P. (2011). *Potencialidades del género Bacillus en la promoción del crecimiento vegetal y el control de hongos fitopatógenos. Revista CENIC Ciencias Biológicas. 42:131-138. Disponible en línea:.* Obtenido de <http://www.redalyc.org/pdf/1812/181222321004.pdf>
- Téllez, J. (2022). *Botrytis spp.: estado actual del biocontrol.* . Obtenido de <https://expeditiorepositorio.utadeo.edu.co/bitstream/handle/20.500.12010/30992/T%C3%A9lez%20J.%202022.%20Botrytis%20spp.-%20estado%20actual%20del%20biocontrol..pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Terrones J., Nieto, D., & Nava, C. T. (2019). *Botrytis cinerea causante del moho gris en frutos de zarzamora en México. Revista Mexicana de Fitopatología.* Obtenido de <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1906-1>
- Toral-Navarro, L. (2019). *Control biológico de Botrytis por la cepa Bacillus sp. e implicaciones en la producción de plantas de interés agrícola [Tesis Doctoral Industrial]. Universidad de Granada.*
- Tupe, O. (2019). *Alternativas para el control de mildiu veloso (Peronospora sparsa) en el cultivo de rosa (Rosa sp) variedad Explorer.* Obtenido de <https://www.dspace.uce.edu.ec/server/api/core/bitstreams/2d46179e-665e-4919-b2d2-1b202413b965/content>

- Vidalie, H. (2001). *La producción de flor cortada, en producción de flores y plantas ornamentales [UNIVERSIDAD PÓLITECNICA SALESIANA ECUADOR]*. Obtenido de <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/9827/1/YT00244.pdf>
- Viera-Arroyo, W. F.-T.-S.-S.-P.-Q.-V.-C.-C. (2020). *Control Biológico: Una herramienta para una agricultura sustentable, un punto de vista de sus beneficios en Ecuador. Journal of the Selva Andina Biosphere*, 8(2), 128–149. . Obtenido de <https://doi.org/10.36610/J.JSAB.2020.080200128>
- Villarreal-Delgado, M. F.-R.-C.-A.-C.-V. (2018). *The genus Bacillus as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 36(1).
- Vinchira-Villarraga, D., & Moreno-Sarmiento, N. (2019). *Control biológico: Camino a la agricultura moderna Biological control: Path to modern agriculture. Revista Colombiana de Biotecnología*, 21(1).
- Weyler, E., & Kusery, W. (2001). *Propagation of roses from cuttings. Hort Sciencie*, 85–86.
- White T., B. T. (1990). *PCR - Protocols and Applications - A Laboratory Manual*. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/223397588_White_T_J_T_D_Bruns_S_B_Lee_and_J_W_Taylor_Amplification_and_direct_sequencing_of_fungal_riboso
- Yanchapaxi, F. (2010). *Elaboración de un manual técnico-práctico del cultivo de Rosas (Rosa sp.)*. UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR.
- Yanet-Suárez, L., & Cabrales, C. P. (2016). *Identificación de especies de cepas nativas de Trichoderma sp. y Bacillus sp. y evaluación de su potencial antagonista in vitro frente al hongo fitopatógeno nativo Moniliophthora roreri en el departamento de Norte de Santander.Respuestas*, 13(1). Obtenido de <https://doi.org/10.22463/0122820x.553>
- Yong, A. (2004). *El Cultivo Del Rosal Y Su Propagación*. Obtenido de *Cultivos Tropicales*, 25(2), 53–67: <http://www.redalyc.org/pdf/1932/193217832008.pdf>
- Zhang, N. W. (2023). *Biocontrol mechanisms of Bacillus: Improving the efficiency of green agriculture. In Microbial Biotechnology (Vol. 16, Issue 12, pp. 2250–2263)*. John Wiley and Sons Ltd. . Obtenido de <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14348>

Zhou, Y. e. (2023). Biological control of *Botrytis cinerea* using antagonistic bacteria: Mechanisms and field applications. En Mechanisms and field applications. . *Frontiers in Microbiology* , pág 14.