



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE:**

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

**TEMA: “Selección de actinomicetos aislados de suelos paperos de la
provincia de Pichincha por su grado de antagonismo a *Rhizoctonia solani*
Kühn, mediante ensayos *in vitro*”.**

AUTOR: SALAZAR PALACIOS, ANA BELEN

DIRECTORA: LIC. KOCH KAISER, ALMA ROSEL MSc.

SANGOLQUÍ

2019



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, **“SELECCIÓN DE ACTINOMICETOS AISLADOS DE SUELOS PAPEROS DE LA PROVINCIA DE PICHINCHA POR SU GRADO DE ANTAGONISMO A *Rhizoctonia solani* Kühn, MEDIANTE ENSAYOS *IN VITRO*”**, fue realizado por la señorita **Salazar Palacios, Ana Belén** el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 30 de mayo de 2019

Alma Koch Kaiser, MSc.

C.C. 1708880792



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

ii

DEPARTAMENTO CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, **Salazar Palacios, Ana Belén**, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“Selección de actinomicetos aislados de suelos paperos de la provincia de Pichincha por su grado de antagonismo a *Rhizoctonia solani* Kühn, mediante ensayos *in vitro*”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Consecuentemente el contenido de la investigación mencionada es veraz.

Sangolquí, 30 de mayo de 2019.

Ana Belén Salazar Palacios

C.C.: 1720985777



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

III

DEPARTAMENTO CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN

Yo, **Salazar Palacios, Ana Belén** autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **“Selección de actinomicetos aislados de suelos paperos de la provincia de Pichincha por su grado de antagonismo a *Rhizoctonia solani* Kühn, mediante ensayos *in vitro*”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 30 de mayo 2019.

Ana Belén Salazar Palacios

C.C.: 1720985777

DEDICATORIA

A mis padres Marcelo y Charito por entenderme, aconsejarme y brindarme su apoyo a lo largo de toda la carrera y nunca dejarme sola ante cualquier adversidad.

A mi querida hermana Ana Gabriela por ser un pilar fundamental en mi vida y por ser mi ejemplo a seguir.

Les amo con todo mi corazón.

Ana Belén Salazar Palacios

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme llegar hasta donde estoy y poder terminar mi proyecto de titulación.

A mis padres por todos los esfuerzos que han realizado día a día para que logre culminar mis estudios, por enseñarme que las cosas se logran con esfuerzo y sacrificio, pero sobre todo por inculcarme buenos valores porque gracias a ellos soy la persona que soy.

A Gaby, porque no solo es mi hermana sino también mi mejor amiga, gracias por siempre estar a mi lado en todo momento y nunca dejar que me rinda.

A Almita Koch, MSc. por ser un pilar fundamental a lo largo de mi vida universitaria, por enseñarme desde las cosas más sencillas hasta las más complejas, gracias por darme la oportunidad de trabajar con usted y transmitirme esa energía positiva cada día.

Al Ing. Andrés Izquierdo PhD. por su interés, dedicación y aportes de conocimiento para hacer posible este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio, principalmente a Jesy porque desde un inicio me brindó su ayuda, además de que compartió sus conocimientos, los cuales aportaron a este proyecto.

A mi mejor amiga Andrea, por ser esa persona incondicional desde el primer día en la universidad, gracias por cada risa, llanto, consejo y ánimo durante toda esta etapa.

Ana Belén Salazar Palacios

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN	i
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD	ii
AUTORIZACIÓN	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vi
LISTADO DE FIGURAS	xi
LISTADO DE TABLAS	xiii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xv
CAPÍTULO I	1
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Formulación del problema	1
1.2 Justificación del problema	3
1.3 Objetivos de la investigación	4
1.3.1 Objetivo general	4
1.3.2 Objetivos específicos	4
1.4 Marco teórico	5

1.4.1 Cultivo de papa (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	5
1.4.1.1 Generalidades.....	5
1.4.1.2 Importancia agrícola.....	7
1.4.1.3 Afectaciones al cultivo de papa.....	8
1.4.2 Rhizoctoniasis o costra negra	9
1.4.2.1 Descripción de <i>Rhizoctonia solani</i>	10
1.4.2.2 Ciclo de vida de <i>Rhizoctonia solani</i>	12
1.4.2.3 Síntomas de la enfermedad	13
1.4.2.4 Métodos de control de la enfermedad	14
1.4.3 Control biológico	15
1.4.3.1 Agentes de biocontrol	15
1.4.3.2 Actinomicetos	16
1.4.3.2.1 Características generales	17
1.4.3.2.2 Condiciones de crecimiento	18
1.4.3.2.3 Ciclo de vida	18
1.4.3.2.4 El rol de los actinomicetos en plantas	19
1.3.2 Hipótesis	20
CAPÍTULO II	21
2. MATERIALES Y MÉTODOS	21

2.1	Participantes.....	21
2.2	Zona de estudio.....	21
2.3	Período de investigación.....	21
2.4	Procedimiento.....	22
2.4.1	Origen de las muestras.....	22
2.4.2	Aislamiento de nuevas cepas de actinomicetos.....	22
2.4.2.1	Siembra.....	22
2.4.2.2	Selección de colonias.....	23
2.4.2.3	Caracterización morfológica de actinomicetos.....	23
2.4.2.3.1	Caracterización Macroscópica.....	23
2.4.2.3.2	Caracterización Microscópica.....	23
2.4.2.4	Conservación de nuevas cepas de actinomicetos.....	24
2.4.3	Activación de cepas de actinomicetos liofilizadas.....	24
2.4.3.1	Hidratación.....	24
2.4.3.2	Siembra.....	25
2.4.3.3	Caracterización morfológica y conservación de cepas activadas.....	25
2.4.4	Aislamiento de <i>Rhizoctonia solani</i>	25
2.4.4.1	Preparación y siembra de tubérculos.....	26
2.4.4.2	Caracterización morfológica de <i>R. solani</i>	26

2.4.4.2.1	Caracterización Macroscópica de <i>R. solani</i>	26
2.4.4.2.2	Caracterización Microscópica de <i>R. solani</i>	27
2.4.4.3	Identificación Molecular de <i>R. solani</i>	27
2.4.4.3.1	Extracción de DNA	27
2.4.4.3.2	Amplificación de fragmentos de DNA	28
2.4.4.3.3	Electroforesis.....	29
2.4.4.4	Conservación de <i>R. solani</i>	30
2.4.5	Pruebas de antagonismo Actinomicetos vs <i>R. solani</i>	30
2.4.6	Análisis Estadístico.....	31
CAPÍTULO III		33
3.	RESULTADOS	33
3.1	Aislamiento y activación de cepas de actinomicetos.....	33
3.1.1	Caracterización morfológica.....	34
3.2	Aislamiento de <i>Rhizoctonia solani</i>	35
3.2.1	Caracterización morfológica.....	35
3.2.2	Caracterización molecular de <i>R. solani</i>	37
3.2.2.1	Extracción de DNA	37
3.2.2.2	Amplificación de fragmentos de DNA	37
3.3	Pruebas de antagonismo Actinomicetos vs <i>R. solani</i>	38

CAPÍTULO IV43

4. DISCUSIÓN43

CAPÍTULO V50

5. CONCLUSIONES50

CAPÍTULO VI51

6. RECOMENDACIONES51

CAPÍTULO VII.....52

7. BIBLIOGRAFÍA52

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Planta de papa (<i>Solanum tuberosum</i> L.) y sus partes.	7
Figura 2. <i>Rhizoctonia solani</i> aislada de papa (<i>Solanum tuberosum</i> L.) vista en el microscopio (40x).....	11
Figura 3. Descripción del ciclo de vida de <i>R. solani</i>	12
Figura 4. Cancros en brotes de papa causados por <i>R. solani</i>	13
Figura 5. Signos de <i>R. solani</i> . A) Tallo de planta de papa estrangulado y formación de tubérculos aéreos. B) Esclerocios en superficie de papa.	14
Figura 6. Ciclo de vida de los actinomicetos, género <i>Streptomyces</i>	19
Figura 7. A) Activación de actinomicetos liofilizados, cepa P36 en medio YGA. B) Cultivo de cepas de actinomicetos a partir de suelo papero, cepa D4 en medio AICC.....	34
Figura 8. Valoración microscópica de actinomicetos. A) Cepa P36 reactivada. B) Cepa D4 aislada de suelo papero, 100X.	35
Figura 9. Crecimiento de <i>Rhizoctonia solani</i> en medio PDA. A) Ausencia de esclerocios. B) Presencia de esclerocios.	36
Figura 10. Estructura microscópica de <i>Rhizoctonia solani</i> , (100X).	36
Figura 11. Patrones de bandas amplificadas por PCR de aislados de <i>R. solani</i> obtenidos de tubérculos de papa con primers ITS1/ITS4. CN: control negativo, CP: control positivo cepa de <i>Ilyonectria</i>	38

Figura 12. Pruebas de antagonismo en medio YGA: actinomicetos vs <i>R. solani</i> , cepa P25 (A), cepa P30 (B), cepa P40 (C), control (D).....	39
Figura 13. Pruebas de antagonismo en medio AICC: actinomicetos vs <i>R. solani</i> , cepa P37 (A), cepa P22 (B), cepa P30 (C), control (D).....	39
Figura 14. Gráfico de barras pruebas de antagonismo: actinomicetos vs <i>R. solani</i> en medio YGA.	40
Figura 15. Gráfico de barras pruebas de antagonismo: actinomicetos vs <i>R. solani</i> en medio AICC.....	40
Figura 16. Prueba de Tukey para la interacción Cepa*Medio	41
Figura 17. Gráfica de dispersión del PICR en pruebas de antagonismo en medio YGA y AICC.....	42

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1 <i>Clasificación taxonómica de Rhizoctonia solani</i> Kühn	10
Tabla 2 <i>Secuencias de primers ITS</i>	29
Tabla 3 <i>Configuración del termociclador para reacción de PCR con primers ITS1/ITS4</i>	29
Tabla 4 <i>Concentración y pureza de muestras de DNA de R. solani</i>	37

RESUMEN

La papa (*Solanum tuberosum* L.), es el cuarto cultivo más importante. Se considera un alimento básico a nivel internacional gracias a su alto contenido nutricional, ha sido motivo de estudio debido a su adaptabilidad, variabilidad y elevada productividad. En Ecuador, el cultivo de papa juega un rol trascendental en la dieta de los ecuatorianos y en la economía del país, siendo la provincia de Pichincha una de las mayores productoras. Su rendimiento es relativamente bajo debido a enfermedades causadas por hongos. La rhizoctoniasis ocasionada por *Rhizoctonia solani*, destruye tallos, estolones y tubérculos. Los actinomicetos especialmente del género *Streptomyces*, constituyen una alternativa biológica puesto que producen metabolitos secundarios como los antibióticos, permitiendo controlar el ataque del cultivo por fitopatógenos. El objetivo general del estudio fue seleccionar actinomicetos aislados de suelos paperos de la provincia de Pichincha por su grado de antagonismo a *Rhizoctonia solani* Kühn, mediante ensayos *in vitro*. Los resultados obtenidos de las pruebas de enfrentamiento dual, indican que existen diferencias estadísticamente significativas con un p-valor < 0,0001 en la capacidad de inhibir el crecimiento del patógeno, influenciada por la interacción entre el medio y la cepa. En base al análisis del porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR), se encontró que la cepa P21 es la más antagónica con un 69,90% y la menos antagónica es P8 con 8,08% en medio YGA. Por otro lado, en AICC se tuvo que las cepas con mayor y menor capacidad antifúngica fueron D4 con 43,80% y P40 con 18,62%.

PALABRAS CLAVE:

- **ACTINOMICETOS**
- *R. solani*
- **ANTAGONISMO**
- **CONTROL BIOLÓGICO**

ABSTRACT

The potato (*Solanum tuberosum* L.) is the fourth most important crop. It is considered a staple food at the international level thanks to its nutritional content, it has been a subject of study due to its adaptability, variability and high productivity. In Ecuador, the cultivation of potatoes plays a transcendental role in the diet of the Ecuadorians and in the economy of the country, being the province of Pichincha one of the largest producers. Its yield is relatively low due to diseases caused by fungi. The rhizoctoniasis caused by *Rhizoctonia solani*, destroys stems, stolons and tubers. The specific principles of the genre, therapeutic results, antibiotic methods, antibiotics, side effects and phytopathogens. The general objective of the study was to select actinomycetes from the soils of the province of Pichincha for their degree of antagonism to *Rhizoctonia solani* Kühn, by means of in vitro tests. The results of the tests of dual confrontation, indicate that there are statistically significant differences with a p-value <0.0001 in the ability to inhibit the growth of the pathogen, influenced by the interaction between the medium and the strain. In the analysis of the percentage of inhibition of radial growth (PICR), it was found that strain P21 is the most antagonistic with 69,90% and the least antagonistic is P8 with 8,08% in YGA medium. On the other hand, in AICC, it was necessary to have the strains with greater and less antifungal capacity that were D4 with 43,80% and P40 with 18,62%.

KEY WORDS:

- **ACTINOMYCETES**
- *R. solani*
- **ANTAGONISM**
- **BIOLOGIC CONTROL**

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema

El Ecuador es uno de los países megadiversos en el mundo. Su clima variado ha permitido el desarrollo de ecosistemas con una amplia gama de flora y fauna, pero también ha ayudado al hombre a involucrarse en el ámbito de la agricultura. Debido a las constantes lluvias y suelos fértiles, es catalogado como un paraíso para cultivar papa. Se sabe que en el país existen 88 mil personas dedicadas a la producción y comercialización del tubérculo, actividad que se practica desde tiempos ancestrales y que resulta esencial para la economía (Torres, 2017).

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es un tubérculo nativo de la región andina, se considera un alimento básico de la población, con una fuente rica en calorías, proteínas y micronutrientes, por lo que es el cuarto cultivo de mayor importancia a nivel mundial después del maíz, trigo y arroz (Pérez et al., 2015).

En Ecuador, el cultivo de papa ocupa el séptimo lugar (Monteros, 2016). Según datos registrados por el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), en 1994 se encontraron 400 diferentes tipos de papas entre *andígena* y *phureja*, siendo las variedades Gabriela y Superchola las más representativas (INIAP-CIP, 2002).

En comparación con Colombia y Perú, el rendimiento del cultivo de papa en nuestro país es relativamente bajo, esto se debe en gran parte a enfermedades causadas por hongos y plagas que atacan a los cultivos, conjuntamente con el desconocimiento y la falta de controles de los agricultores. *Solanum tuberosum* L. es afectado por varios hongos fitopatógenos, siendo uno de ellos *Rhizotocnia solani*, el cual es capaz de ocasionar malformaciones, necrosis o grietas en tubérculos, causando pérdidas del rendimiento que varía entre el 20% y 30% (Navarrete et al., 2017).

Una alternativa para disminuir el uso de los fungicidas químicos, son los actinomicetos, capaces de proporcionar defensas contra los fitopatógenos (Singh et al., 2017). El género de actinomicetos mejor caracterizado es *Streptomyces*, con alrededor de 600 especies y responsable de la producción de la mitad de todos los antibióticos existentes. Debido a que son productores de una gran cantidad de metabolitos secundarios, hoy en día se los emplea en la salud humana, la biotecnología y hasta en la agricultura (Van der Meij et al., 2017).

A nivel mundial se tienen grandes avances enfocados al control de hongos fitopatógenos. Sin embargo, en el país los trabajos de investigación que se han realizado son escasos. Por tanto, el presente estudio sugiere que este tipo de bacterias se pueden utilizar para mejorar significativamente el crecimiento de los cultivos de papa y combatir el ataque por *R. solani*.

1.2 Justificación del problema

La mayor diversidad genética de la papa (*Solanum tuberosum* L.) se encuentra en América del Sur, específicamente en la zona de los Andes. En Ecuador, la superficie plantada en el año 2014, fue alrededor de 49 000 hectáreas en 12 provincias, siendo Carchi, Pichincha, Chimborazo y Loja, las de mayor producción (Monteros, 2016).

La papa es uno de los tubérculos más importantes de la región andina, puesto que además de ser una fuente de alimento gracias a su valor nutricional, también contribuye a la economía del país. Según el Centro Internacional de la Papa (CIP), en Ecuador, cada persona consume al año cerca de 24 kilos, es decir que el 10% de la cosecha está destinada al autoconsumo, mientras que el resto a la comercialización (INIAP-CIP, 2002).

Se sabe que los cultivos de papa son susceptibles a una gran variedad de enfermedades causadas por hongos; la rhizoctoniasis es una de ellas, ocasionada por *Rhizoctonia solani*, disminuye la productividad y calidad del tubérculo (Simson et al., 2017), o causa la pérdida total en tan solo días después de la infección (Arcos & Zúñiga, 2015).

El método más frecuente para reducir la infección por hongos es el químico. Sin embargo, su uso excesivo puede ocasionar erosión del suelo, disminución de la productividad y generar efectos negativos en el medio ambiente. De ahí la importancia de emplear controles biológicos presentes en la naturaleza, los cuales pueden ser una alternativa para reducir el uso indiscriminado de fungicidas (Pérez et al., 2015).

Un enfoque prometedor para el manejo de *R. solani*, es el control a través de actinomicetos (Caro, 2016). Estudios anteriores a nivel *in vitro*, han demostrado que este tipo de microorganismos empleados como biocontroladores fitopatógenos, son una medida de bajo costo, de larga acción y no causan contaminación ni alteraciones ecológicas, además que contribuyen a la fertilidad del suelo (Van der Meij et al., 2017).

Por tanto, el aislamiento, mantenimiento y selección de cepas de actinomicetos con mayor potencial antagonico frente a *R. solani*, pueden ser de gran ayuda para los agricultores, permitiéndoles aumentar la productividad de los cultivos y obtener un producto de mejor calidad.

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general

Seleccionar actinomicetos aislados de suelos paperos de la provincia de Pichincha por su grado de antagonismo a *Rhizoctonia solani* Kühn, mediante ensayos *in vitro*.

1.3.2 Objetivos específicos

1. Aislar y mantener cepas de actinomicetos de muestras de suelo de cultivo de papa de la provincia de Pichincha.

2. Activar y mantener las cepas liofilizadas de actinomicetos aisladas de suelos paperos de la provincia de Pichincha en el 2011.
3. Aislar y mantener *Rhizoctonia solani* de tubérculos que presentan la enfermedad.
4. Efectuar pruebas de antagonismo de actinomicetos contra *R. solani* mediante técnica de cultivo dual a nivel de laboratorio.
5. Determinar las cepas de actinomicetos que muestran una mayor y menor inhibición al patógeno *R. solani*.

1.4 Marco teórico

1.4.1 Cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.)

1.4.1.1 Generalidades

La papa es una planta herbácea, dicotiledónea perteneciente a la familia Solanácea, género *Solanum*, especie *Solanum tuberosum* L. Está conformada por dos sistemas: uno aéreo que incluye tallo, hojas, flores y frutos; y uno subterráneo, en donde se encuentran la raíz, estolones y tubérculos (Figura 1) (Caro, 2016).

Según Inostroza et al., (2009) el sistema de tallos está formado por tallos, estolones y tubérculos. Si la planta viene de una semilla verdadera, posee un tallo principal; si proviene de un tubérculo, produce varios.

El tallo se caracteriza por ser leñoso, erecto, en su mayoría de color verde y en ocasiones marrón; su altura varía entre 70 cm y 80 cm (Gómez, 2014).

Los estolones o tallos laterales crecen bajo el suelo, se desarrollan a partir de yemas que se forman en el tallo y en algunas ocasiones dan lugar a la formación de tubérculos por el agrandamiento de su extremo terminal (Inostroza et al., 2009).

Los tubérculos son tallos modificados de forma redonda u ovalada, poseen dos extremos: uno denominado basal o talón, unido al estolón; y, otro conocido como apical o distal ubicado al externo opuesto (Inostroza et al., 2009).

Las hojas son compuestas, debido al raquis central y varios folíolos, son de forma lanceolada, bifaciales, con pelos o tricomas en su superficie y se disponen en forma de espiral sobre el tallo (Zepada & Menjivar, 2016).

La inflorescencia, se origina en el extremo terminal del tallo, sus flores son bisexuales y el número puede variar entre 7 y 15 (Inostroza et al., 2009).

El fruto es una baya que puede ser redonda, alargada, ovalada o cónica, con un diámetro entre 1 cm y 3 cm con numerosas semillas. Habitualmente el color es verde con ciertas pigmentaciones blancas; el número de semillas varía según la fertilidad de cada especie. Las semillas por lo general son pequeñas, aplanadas y en forma de riñón. La planta se reproduce de dos maneras, una sexual

por medio de semillas; y la otra asexual, a través de la plantación del tubérculo, siendo esta última la que predomina en los cultivos (Zepada & Menjivar, 2016)

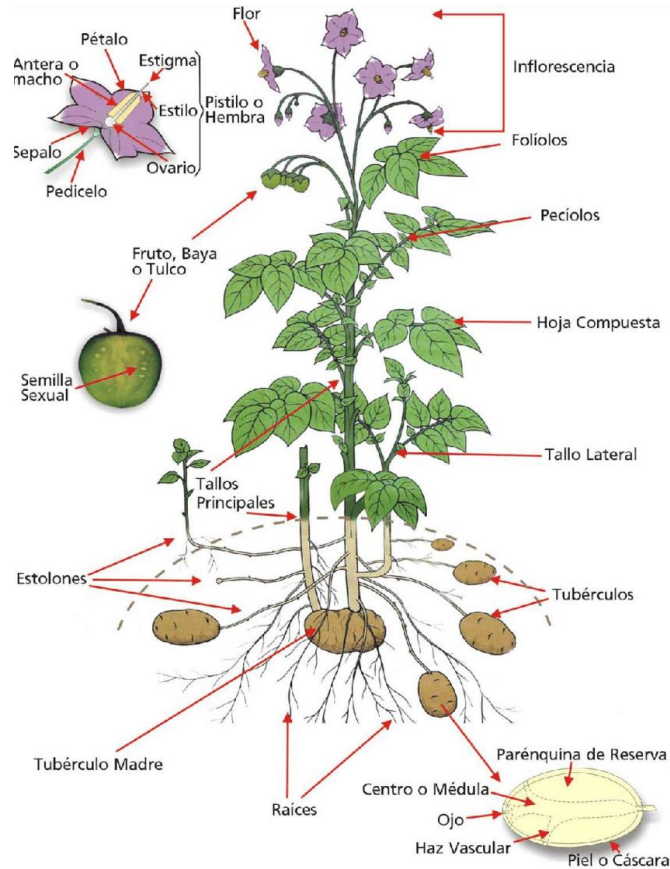


Figura 1. Planta de papa (*Solanum tuberosum* L.) y sus partes.

Fuente: (Huarte & Capezio, 2013)

1.4.1.2 Importancia agrícola

La papa es una planta alimenticia procedente de las culturas prehispánicas, a las cuales se les atribuye los primeros procesos de domesticación y procesamiento artesanal (Caro, 2016). Actualmente, se cultivan más de 2 000 especies en todo el mundo (DANE, 2014), siendo parte de

la dieta diaria y de mayor consumo de la población, debido a su alto contenido nutricional, adaptabilidad y su elevada productividad, lo que ha permitido realizar investigaciones a nivel local, nacional e internacional, para obtener mejores características de calidad, agronómicas y agroindustriales (Kromann et al., 2017).

En el Ecuador, la producción en condiciones óptimas se presenta en zonas templadas y frías, con una temperatura que varía entre los 9 °C y 11 °C en alturas comprendidas entre los 2 700 m a 3 400 m sobre el nivel del mar. Registros indican que, en 2015, la producción de papa fue de 345 900 t en una superficie de 49 371 ha, siendo la región Sierra, la de mayor área de siembra con 98,56%, seguida de la Costa con 1,11% y la Amazonía con 0,33% (Bolaños, 2015).

Según datos del INEC, aproximadamente 42 000 familias ecuatorianas se dedican a la producción de papa, generando fuentes de trabajo e ingresos económicos para el país (Lagua, 2013).

1.4.1.3 Afectaciones al cultivo de papa

La papa es el principal tubérculo en la dieta de los ecuatorianos y de la población en general. Desafortunadamente es atacada por numerosas plagas y enfermedades, a más de que el desconocimiento de los productores sobre problemas fitosanitarios y la falta de estudios de las características del suelo previo a la siembra, agravan las pérdidas de los cultivos (ICA, 2011; Albán, 2015).

Las mayores afecciones de los cultivos de papa se deben a plagas como: gusano blanco (*Premnotrypes vorax*), babosa (*Deroceras* sp.) pulguilla (*Epitrix* spp.), polilla guatemalteca (*Tecia solanivora*) entre otras; así mismo, las enfermedades más comunes son: marchitez bacteriana (*Ralstonia solanacearum*), tizón temprano (*Alternaria solani*), tizón tardío (*Phytophthora infestans*) y rhizoctoniasis o costra negra (*Rhizoctonia solani*) (ICA, 2011).

Para disminuir la pérdida de cultivos, es primordial usar semillas certificadas o tratadas con insecticidas biológicos o químicos (DANE, 2014). Sin embargo, estos últimos constituyen un problema, ya que el uso inadecuado podría llevar a la resistencia genética de los microorganismos y producir efectos desfavorables tanto en el ambiente como en humanos (Pérez et al., 2015).

1.4.2 Rhizoctoniasis o costra negra

La rhizoctoniasis es una enfermedad persistente, afecta al cultivo desde la siembra hasta la cosecha, es ocasionada por el hongo *Rhizoctonia solani* y ataca aproximadamente a 250 especies de plantas perennes y anuales (Arcos & Zúñiga, 2015). En Ecuador está presente en los sembríos de papa, destruye tallos, estolones y tubérculos, causando daños cuantitativos y cualitativos así como severas pérdidas económicas a los agricultores (Pozo, 2013).

Las pérdidas cuantitativas se relacionan con la infección de los órganos de la planta anteriormente mencionados, afectando su rendimiento en la producción de tubérculos. Por otra

parte, las pérdidas cualitativas se refieren al tamaño, deformación de tubérculos y el apareamiento de esclerocios en su superficie (Tsrer, 2010), por lo que se han realizado estudios ecológico, patológico y de control biológico, para combatir la enfermedad y mejorar la calidad del producto (González-Hernández, 2002).

1.4.2.1 Descripción de *Rhizoctonia solani*

Rhizoctonia solani Kühn en su fase asexual, se considera la especie más importante de la familia *Rhizoctonia*, pertenece a la Clase Hyphomycetes (Tabla 1). Sus hifas tienen la peculiaridad de fusionarse, por lo que han sido divididas en grupos de anastomosis (GA), los cuales se diferencian por su morfología y fisiología (Montero-Tavera et al., 2013). Se han determinado 14 GA en *R. solani*, siendo GA2, GA3, GA4, GA5 Y GA7 los que afectan a la papa, donde GA3 es el causante de esclerocios en el tubérculo (Beltrán et al., 2011).

Tabla 1
Clasificación taxonómica de Rhizoctonia solani Kühn

Taxonomía	
Reino:	Fungi
Filo:	Basidiomycota
Clase:	Hyphomycetes
Orden:	Agonomycetales
Género:	Agonomycetaceae
Familia:	<i>Rhizoctonia</i>
Especie:	<i>Rhizoctonia solani</i> Kühn

Fuente: (Agrios, 2007)

La fase asexual es patógena y se caracteriza por la producción nula de esporas, más bien, se da la formación de micelio de color marrón. A nivel microscópico, se puede observar cómo las ramificaciones crecen formando un ángulo recto con la hifa principal y un septo cerca de ella, según la figura 2 (Castro & Contreras, 2011); además, las hifas poseen varios núcleos (Epifanio, 2017).

Cuando existe humedad y elevadas temperaturas, el hongo entra en fase sexual y se lo conoce como *Thanatephorus cucumeris* dando lugar a la formación de basidioesporas, aunque esto no ocurre a menudo (Robalino, 2018).

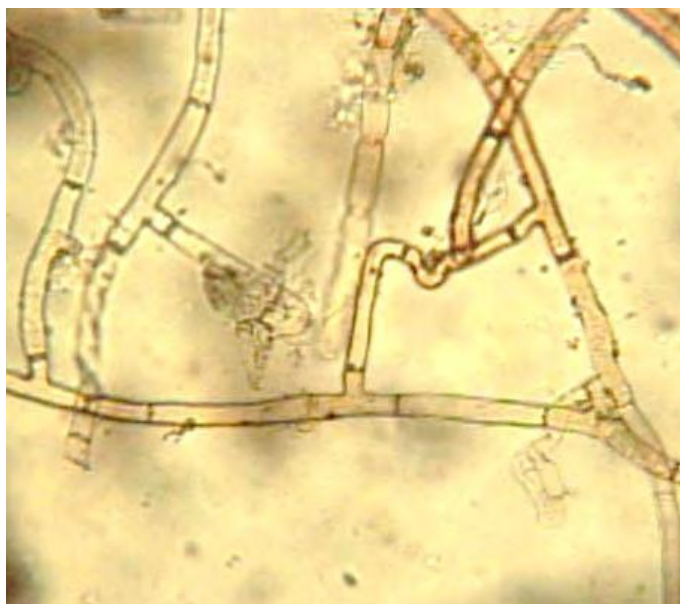


Figura 2. *Rhizoctonia solani* aislada de papa (*Solanum tuberosum* L.) vista en el microscopio (40x).

Fuente: (Figueroa & Ruano, 2013)

1.4.2.2 Ciclo de vida de *Rhizoctonia solani*

El ciclo biológico de *R. solani*, presenta dos fases (Figura 3). La primera sucede en la etapa de crecimiento donde infecta a tallos, brotes y estolones a través de alguna herida, dando lugar a la formación de canchros y estrangulamiento (Acuña & Araya, 2017). En la segunda fase, los tubérculos son atacados por los esclerocios presentes en el suelo; este proceso se da gracias a diferentes enzimas extracelulares que degradan pectina, cutina y celulosa de la pared celular, destruyendo así las células del vegetal y colonizando el tejido marchito (Beltrán et al., 2011).

Las condiciones óptimas para su crecimiento son la alta humedad del suelo y una temperatura de 18°C, siendo la mínima 8°C y la máxima 35°C; es de fácil propagación mediante agua de riego, suelo y tubérculos contaminados (Acuña & Tejada, 2018).

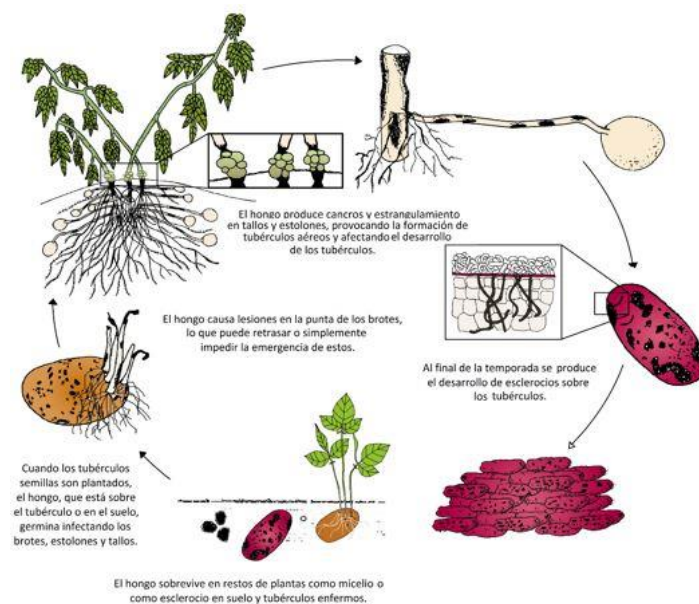


Figura 3. Descripción del ciclo de vida de *R. solani*.

Fuente: (INIA-Remehue, 2017)

1.4.2.3 Síntomas de la enfermedad

Se pueden observar varios síntomas a causa de la enfermedad denominada rhizoctoniasis o costra negra, que ataca a los brotes, tallos, raíces y estolones (Pozo, 2013).

Uno de los síntomas es la necrosis o canchros de color marrón en la base de los brotes, que dependiendo del grado de la lesión, originan el debilitamiento de la planta y el retraso de su desarrollo, adicionalmente, produce la formación de tubérculos aéreos y hojas enroscadas de coloración púrpura (Figura 4) (Acuña & Araya, 2017).



Figura 4. Canchros en brotes de papa causados por *R. solani*.

Fuente: (INIA-Remehue, 2017)

En tallos y estolones las lesiones son similares, se observan canchros café con hendiduras, que conforme van creciendo producen estrangulamiento (Figura 5A). En el caso de los estolones, al ser infectados en etapa temprana, producen deformaciones del tubérculo, e incluso no se alcanza la formación de estos (Acuña & Tejada, 2018).

En tubérculos, los síntomas son evidentes, se observa esclerocios o costras negras de forma irregular localizadas en la superficie (Figura 5B). Los esclerocios son masas de hifas entrelazadas que dan lugar a la formación del micelio (Castro & Contreras, 2011). Una vez que la enfermedad ha atacado a la raíz, se produce el encarrujamiento de las hojas apicales (Torres, 2002).



Figura 5. Signos de *R. solani*. A) Tallo de planta de papa estrangulado y formación de tubérculos aéreos. B) Esclerocios en superficie de papa.

Fuente: (INIA-Remehue, 2017)

1.4.2.4 Métodos de control de la enfermedad

El más utilizado es el químico, que corresponde al uso de fungicidas para combatir la enfermedad, si bien esto no incrementa el rendimiento, ayuda a mejorar la calidad sanitaria de los tubérculos; otro método es el biológico, a través del uso de microorganismos que actúan como enemigos de *R. solani*, entre ellos están *Trichoderma harzianum*, *Rhizoctonia binucleada* y *Verticillium biguttatum* (Torres, 2002).

Para prevenir la proliferación de enfermedades, se propone utilizar semillas certificadas o previamente tratadas, rotar los cultivos de 3 a 4 años con otros que no sean susceptibles a

rhizoctoniasis, por ejemplo, la siembra de cereales. Las plantaciones poco profundas también ayudan al desarrollo temprano de la papa evitando daños en brotes y tallos nuevos. Por el contrario, los suelos con mucha materia orgánica favorecen el desarrollo de la enfermedad (Acuña & Araya, 2017).

La aplicación de varias medidas de prevención ayudan a evitar el ataque del fitopatógeno, obteniéndose mejores productos y mayores réditos económicos (ICA, 2011).

1.4.3 Control biológico

1.4.3.1 Agentes de biocontrol

Como se mencionó anteriormente, uno de los principales problemas en el cultivo de papa es la susceptibilidad a los fitopatógenos, lo que influye en su producción (Pérez et al., 2015). Normalmente los agricultores utilizan fungicidas y otros químicos para combatir la enfermedad, no obstante, cuando se usan sin moderación, los microorganismos se vuelven resistentes, a más de que se produce daño al medio ambiente y a la salud (Tarazona, 2017).

En la actualidad, una de las alternativas más empleadas (Beltrán et al., 2011) para contrarrestar el ataque por hongos en plantas, es el control biológico o biocontrol, que se define como la disminución del agente infeccioso o de la enfermedad originada por este, a través del uso de antagonistas naturales (Beltrán et al., 2011), considerados una de las herramientas más eficientes

y poco destructivas para el medio ambiente, logrando una agricultura sostenible (Pérez et al., 2015).

El antagonismo se define como la interacción entre microorganismos, donde el uno interfiere con el otro, reduciendo la actividad de alguno de ellos (Robles, 2014). Varios estudios han reportado su uso demostrando la disminución de enfermedades causadas por oomicetos y hongos de los géneros *Phytophthora*, *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Sclerotium*, entre otros (Pérez et al., 2015).

Para que un microorganismo sea considerado un agente de biocontrol, no debe ser perjudicial para hombres, animales y plantas; tener la capacidad de colonizar y persistir en su interior cuando sea inoculado en vegetales; capaz de adquirir mayor cantidad de nutrientes que el patógeno; fácil de reproducir; y, conservarse a nivel *in vitro*. Adicionalmente, es importante su estabilidad genética, así como su efectividad a bajas concentraciones (Epifanio, 2017).

Los agentes de control biológico de mayor uso en los cultivos son las bacterias, puesto que se encuentran de forma natural en el suelo e inhiben a microorganismos fitopatógenos, a través de mecanismos como: competencia por espacio o sustrato, producción de metabolitos o antibióticos y secreción de enzimas, lo que permite el crecimiento y desarrollo de las plantas (Robles, 2014).

1.4.3.2 Actinomicetos

1.4.3.2.1 Características generales

Los actinomicetos son bacterias aerobias Gram positivas, pertenecen a la familia Actinomycetaceae, habitan en suelos y en cuerpos de agua dulce o salada (Van der Meij et al., 2017). Se consideran microorganismos saprofitos, es decir que se alimentan de materia orgánica en descomposición (Parada et al., 2017).

A nivel morfológico, son similares a los hongos con células alargadas, ramificadas, filamentosas o de tipo hifa; sin embargo, al ser organismos procariontes carecen de núcleo verdadero, su pared celular posee peptidoglicano y el genoma dispone de un alto contenido de guanina y citosina (Singh et al., 2018). Su olor característico es a tierra húmeda que proviene de la geosmina, un metabolito secundario producido por ellos mismos (Cisneros, 2016).

Existen aproximadamente 100 géneros y 1000 especies que habitan en diferentes tipos de suelos, incluidos los agrícolas. El mejor caracterizado es *Streptomyces*, porque es fácil de aislar y produce más de los dos tercios de los antibióticos ya existentes (Singh et al., 2018).

Los actinomicetos desempeñan un papel vital en el crecimiento de las plantas, el control de enfermedades, la putrefacción de materia orgánica, así como la producción de metabolitos secundarios de interés comercial. Esta última característica en conjunto con los compuestos antimicrobianos que generan, les ha conferido capacidades de control biológico contra patógenos en plantas, aumentando el rendimiento (Singh et al., 2015).

1.4.3.2.2 Condiciones de crecimiento

El crecimiento de los actinomicetos es influenciado por factores como temperatura, tipo de suelo y pH. La mayor parte de las especies son mesófilas, es decir que se desarrollan a temperaturas que varían entre 25°C y 30°C. Por otra parte, estos microorganismos viven en suelos poco húmedos y con un alto contenido de materia orgánica, caso contrario su crecimiento se reduce; al ser bacterias aerobias se encuentran a una profundidad entre 2 y 15 cm; además, dada su intolerancia a la acidez, el suelo debe tener un pH neutro, aunque pueden crecer en un rango de 5.0 a 9.0 (González, 2010; Cisneros, 2016).

1.4.3.2.3 Ciclo de vida

El ciclo de vida de las actinobacterias ocurre mediante esporulación. Cuando las condiciones son adecuadas, una spora brota y forma uno o dos tubos germinales capaces de desarrollarse hasta constituirse en hifas que crecen por ramificaciones, dando lugar a un micelio vegetativo y liberando enzimas extracelulares descomponedoras de la quitina y la celulosa para la obtención de nutrientes. Cuando estos son escasos, se da el proceso de esporulación, en donde el micelio vegetativo sufre una autodegradación con el objeto de proveer de alimento al micelio aéreo, como se observa en la figura 6; a su vez, la fase inicial de la esporulación está relacionada con la producción de metabolitos secundarios bioactivos, con actividad contra bacterias, hongos, virus, insecticidas y otros (Van der Meij et al., 2017).

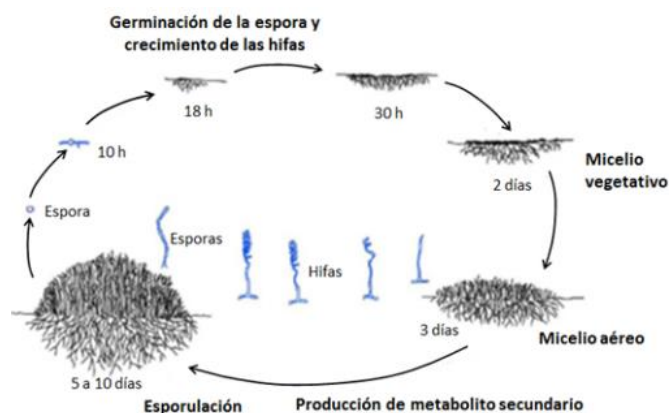


Figura 6. Ciclo de vida de los actinomicetos, género *Streptomyces*

Fuente: (Van der Meij et al., 2017)

1.4.3.2.4 El rol de los actinomicetos en plantas

Los actinomicetos residen en la rizosfera de las plantas e influyen en su desarrollo fisiológico, gracias a la producción de fitohormonas como auxinas y giberelinas, y a su capacidad para solubilizar el fósforo, necesario para el desarrollo de primordios o partes reproductoras de las plantas. Varios reportes señalan que estos microorganismos juegan un papel importante en el crecimiento vegetal de cultivos de frejol, algodón, trigo y arroz. Así mismo, se ha visto que diferentes cepas de actinomicetos mejoran la formación de micorrizas conducente al desarrollo de las plantas (Singh et al., 2018).

Otra de las razones por la cual los actinomicetos han sido motivo de estudio, es la producción de compuestos bioactivos; entre ellos, antibióticos con actividad antagonista. Los primeros antibióticos fueron aislados en 1940, a partir del género *Streptomyces* (Van der Meij et al., 2017), por ejemplo, actinomicetina, micetona, actinomicina, proactinomicina y estreptomycinina,

compuestos con diferencias en cuanto a estructura, propiedades químicas, capacidad antimicrobiana y toxicidad (Singh et al., 2018).

A nivel *in vitro*, se ha demostrado que estas bacterias son capaces de suprimir el crecimiento de diferentes hongos y oomicetos fitopatógenos tales como *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia* sp. y *Phytophthora* (González, 2010). De igual manera, se conoce que las enzimas, quitinasa y β -1,3-glucanasa presentan funciones de tipo antifúngicas y biocontroladoras, limitando o eliminando la propagación de la enfermedad (Pérez et al., 2015). Por tales razones, estos microorganismos se presentan como una alternativa ecológica para disminuir el uso de agroquímicos.

1.3.2 Hipótesis

Las cepas de actinomicetos aisladas de suelos paperos de la provincia de Pichincha, muestran actividad antagónica estadísticamente significativa contra el patógeno *Rhizoctonia solani* mediante ensayos *in vitro*.

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Participantes

El trabajo de tesis fue realizado por Ana Belén Salazar Palacios, con la guía de la licenciada Alma Koch Kaiser, MSc. y la codirección del ingeniero Andrés Izquierdo PhD.

2.2 Zona de estudio

El proyecto se desarrolló en el laboratorio de Microbiología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE – Campus Sangolquí y fue una continuación del proyecto financiado por la ESPE “Caracterización de factores de supresividad presentes en suelos andinos a *Phytophthora infestans* y otros oomicetes” ejecutado en 2009.

2.3 Período de investigación

El proyecto de tesis se ejecutó durante los meses de marzo a junio de 2019.

2.4 Procedimiento

2.4.1 Origen de las muestras

Se utilizaron 11 cepas de actinomicetos liofilizadas aisladas de suelos paperos de la provincia de Pichincha en 2011; además de una muestra actualizada de suelo de papa de la misma provincia.

2.4.2 Aislamiento de nuevas cepas de actinomicetos

Para el aislamiento de las cepas de actinomicetos, se pesó 10 g de suelo de papa y se los colocó en un frasco con 90 ml de agua destilada estéril, agitando durante 30 min a 70°C. De la mezcla se tomaron 10 ml y se los pasó a un tubo de ensayo obteniendo la dilución 10^{-1} g/ml, a partir de la cual se transfirió nuevamente 1 ml a otro tubo previamente esterilizado con 9 ml de agua destilada. Se realizaron diluciones seriadas hasta obtener una dilución final de 10^{-6} g/ml (Caro, 2016).

2.4.2.1 Siembra

Antes de hacer las siembras, los tubos fueron agitados, con el fin de homogenizar la muestra; inmediatamente se colocó 100 μ l de cada dilución en un extremo de las cajas Petri con medio de cultivo sólido agar glicerol extracto de levadura (YGA) y con la ayuda de un triángulo de siembra, se esparció por toda el área. Seguido, se dejó incubar las cajas en posición invertida a 28°C durante cuatro días (Cisneros, 2016). Se realizó el mismo procedimiento utilizando el medio de cultivo agar infusión cerebro corazón (AICC).

2.4.2.2 Selección de colonias

Pasado el tiempo de incubación, se realizó un recuento de colonias. Se escogieron las cajas con colonias que presentaban características de actinomicetos (Caro, 2016). Luego, con un asa esterilizada, se procedió a sembrar la colonia en ambos medios mediante técnica de estriado, incubándose a las condiciones antes mencionadas.

2.4.2.3 Caracterización morfológica de actinomicetos

2.4.2.3.1 Caracterización Macroscópica

El análisis macroscópico se lo realizó en las mismas cajas Petri, en donde se observó características fenotípicas, tales como: tamaño, forma, textura, elevación y pigmentación (Pérez et al., 2015).

2.4.2.3.2 Caracterización Microscópica

El análisis microscópico se realizó mediante tinción Gram. Para ello, sobre un portaobjeto, se colocó una gota de agua destilada y con la ayuda de un asa esterilizada, se tomó muestra de los aislados crecidos en las cajas Petri, haciendo un frotis sobre el portaobjeto. Se dejó secar la placa al ambiente y luego se flameó cuatro veces para fijar la muestra (Rodríguez & Arenas, 2018).

Inmediatamente, se tiñó la placa con cristal violeta, se esperó un minuto y se enjuagó con agua destilada; el mismo procedimiento se realizó con lugol. Luego se agregaron cinco gotas de decolorante, se esperó 30 segundos y se procedió a lavar con agua destilada. A continuación, se realizó la tinción de contraste añadiendo safranina, se esperó por un minuto y se lavó nuevamente con agua destilada, para retirar el exceso de colorante (López-Jácome et al., 2013). Una vez secas las placas, la visualización se realizó mediante el microscopio Olympus a un lente de 100X.

2.4.2.4 Conservación de nuevas cepas de actinomicetos

Se hizo el mantenimiento de las cepas cada 20 días y se las almacenó a una temperatura de 4°C, controlando su pureza (Caro, 2016).

2.4.3 Activación de cepas de actinomicetos liofilizadas

Para la activación se utilizaron 11 cepas de actinomicetos liofilizadas, aisladas de suelos paperos de la provincia de Pichincha por Villamarín en 2011 y nombradas como P3, P8, P12, P21, P, 22, P25, P30, P32, P36, P37, P40.

2.4.3.1 Hidratación

Se colocó 1 000 µl de agua peptonada estéril 0,1% p/v en tubos viales de 1,5 ml. A continuación, las muestras fueron suspendidas en cada tubo durante una hora aproximadamente (Gómez, 2014).

2.4.3.2 Siembra

Una vez hidratadas las muestras, se las agitó mediante vortex, con el fin de homogenizar el contenido en cada uno de los 11 tubos (Robalino, 2018). Seguidamente, se colocó 10 µl de muestra resuspendida en un extremo de las cajas Petri y con la ayuda de un asa bacteriológica se sembró por estriado en medio YGA y en agar infusión cerebro corazón (AICC), incubando a 28°C durante cuatro días (Franco-Correa et al., 2009).

2.4.3.3 Caracterización morfológica y conservación de cepas activadas

La caracterización se efectuó de forma macroscópica y microscópica, siguiendo el procedimiento anteriormente mencionado en las cepas de actinomicetos aisladas directamente de suelo papero. Los cultivos se almacenaron a 4°C, con el fin de mantenerlos puros.

2.4.4 Aislamiento de *Rhizoctonia solani*

El aislamiento del hongo *R. solani* se realizó a partir de tubérculos que presentaban formación de esclerocios en su superficie.

2.4.4.1 Preparación y siembra de tubérculos

A los tubérculos se les sometió a un proceso de desinfección, el cual consistió en lavar las papas tres veces con agua corriente, para eliminar cualquier tipo de suciedad; posteriormente fueron cortados en pequeños trozos y desinfectados con una solución de hipoclorito de sodio al 3% por 3 min, luego se los lavó tres veces con agua destilada estéril, eliminando así el exceso de cloro y se los secó con papel toalla estéril (Castillo, 2004).

A continuación, los trozos de papa fueron inoculados en el centro de las cajas Petri con medio agar papa dextrosa (PDA) cloranfenicol y se incubó a temperatura de laboratorio 25°C durante cuatro días.

Cada vez que el micelio presentó crecimiento, se tomó una muestra y se repitió el procedimiento hasta obtener cultivos puros (Albán, 2015).

2.4.4.2 Caracterización morfológica de *R. solani*

2.4.4.2.1 Caracterización Macroscópica de *R. solani*

La caracterización a nivel macroscópico se efectuó en las cajas Petri, en donde se evaluaron características típicas del hongo como son: coloración, textura, presencia o ausencia de esclerocios (Albán, 2015).

2.4.4.2.2 Caracterización Microscópica de *R. solani*

A nivel microscópico, se realizaron pruebas con tinción de azul de lactofenol. La prueba consistió en tomar una pequeña cantidad de micelio con cinta adhesiva transparente y pegarla sobre una gota del colorante antes mencionado en el portaobjeto (Gómez, 2014). La visualización de las placas se realizó mediante el microscopio Olympus a un lente de 100X.

2.4.4.3 Identificación Molecular de *R. solani*

2.4.4.3.1 Extracción de DNA

Para la extracción de DNA se cultivó micelio puro en medio líquido dextrosa de peptona de levadura (YPD) durante ocho días. Con la ayuda de una gasa estéril, se filtró el micelio y colocó en un tubo eppendorf de 2 ml, se añadió a la muestra 500 µl del buffer de extracción (140 mM sorbitol, 220 mM Tris HCl pH=8,0; 22 mM EDTA, 800 mM NaCl; 0,8 % (p/v) CTAB, 1% sarkosyl,) y 1 000 µl de mercaptoetanol para proceder a macerar con un micropistilo. Se agregó 500 µl de cloroformo:isoamilalcohol en proporción 24:1 y se lo invirtió levemente para homogeneizar la muestra; se incubó a 55°C durante 30 min en el termobloque ProvoCell, agitando el tubo manualmente cada 10 min.

Una vez, enfriado el tubo, se centrifugó a 14 000 rpm por 10 min, se extrajo el sobrenadante y se transfirió a uno nuevo, teniendo precaución de no topar la interfase. Al sobrenadante resultante,

se le agregó 750 μ l de isopropanol, se mezcló suavemente y se llevó a -20°C durante 30 min. Después de este tiempo, se centrifugó nuevamente la muestra a 14 000 rpm por 10 min.

Descartado el sobrenadante, se lavó por duplicado el pellet o DNA con etanol al 70% y se colocó el tubo en posición invertida durante 25 min dentro de la cámara de flujo laminar; a continuación, se resuspendió el pellet en 50 μ l de agua ultrapura más 2 μ l de RNAsa y se incubó a 37°C durante 30 min.

La concentración de DNA fue medida en el nanodrop Genova nano Jenway; la muestra se ajustó a una concentración de 40 ng/ μ l y fue almacenada a -20°C para ser usada en posteriores reacciones de PCR (Albán, 2015). El mismo procedimiento se realizó para todos los aislados obtenidos.

2.4.4.3.2 Amplificación de fragmentos de DNA

Para la amplificación de los fragmentos de DNA, se emplearon los primers ITS1 e ITS4 (Tabla 2). La preparación del master mix se realizó en la cámara de flujo laminar para un volumen final de 25 μ l (Díaz et al., 2014).

Se ejecutó un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en el que se utilizaron cuatro reacciones: dos muestras de DNA de *R. solani*, un control negativo con cada componente de la PCR a excepción del DNA (para verificar que no exista contaminación) y un control positivo consistente en DNA de aislados de *Ilyonectria* (Albán, 2015).

En cada reacción se agregó 9 μ l de agua de PCR, 1 μ l de cada uno de los primers ITS, 13 μ l de la enzima Green GoTaq Mix y 2 μ l de DNA. La amplificación se realizó por 35 ciclos (Tabla 3) en un termociclador multigene (Albán, 2015).

Tabla 2
Secuencias de primers ITS

Primers	Secuencias	Tamaño (pb)
ITS 1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	500 – 900
ITS 4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	

Fuente: (Díaz et al., 2014)

Tabla 3
Configuración del termociclador para reacción de PCR con primers ITS1/ITS4

Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
94°C	5 min	1
95°C	30 seg	35
58°C	30 seg	35
72°C	1 min	35
72°C	10 min	1
4°C	5 min	1

Fuente: (Díaz et al., 2014)

2.4.4.3.3 Electroforesis

La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 1,5% con 40 ml de tampón TAE 1X y 2 μ l de bromuro de etidio; después se cargó en el gel 4 μ l del marcador *GeneRuler* de 100 pb (Thermo scientific) y 4 μ l de producto de PCR. Las muestras se corrieron a 100 V durante 30 min (Robalino, 2018).

Una vez finalizada la corrida, con la ayuda del transiluminador se pudo observar el tamaño de las bandas. Los 21 μ l restantes del producto de PCR fueron enviados al sistema de secuenciación de *Macrogen*. A partir de los resultados, se ensamblaron las secuencias mediante el software GENEIOUS, seguido del alineamiento usando la herramienta BLAST del NCBI (Díaz et al., 2014).

2.4.4.4 Conservación de *R. solani*

La conservación de las cepas de *R. solani* se realizó mediante sub-cultivos en medio PDA cada 20 d y se las mantuvo a 4°C.

2.4.5 Pruebas de antagonismo Actinomicetos vs *R. solani*

Las pruebas de antagonismo frente a *R. solani* fueron realizadas mediante la técnica de cultivo dual a una temperatura de 25°C (Pérez et al., 2015), en medio agar glicerol extracto de levadura (YGA) y en agar infusión cerebro corazón (AICC).

Para ello, en uno de los extremos de la caja Petri, se colocó un trozo de agar con actinomiceto de aproximadamente 5 mm. Al cabo de dos días, se procedió a la inoculación del fitopatógeno al lado opuesto de la caja con un pedazo de la misma medida que la bacteria. Se realizaron cinco repeticiones en los citados medios; además, el patógeno fue sembrado en el centro de cuatro cajas

Petri, para ser utilizado como control, pudiendo evaluar la viabilidad del crecimiento radial (Gómez, 2014).

El porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR), se realizó luego de cuatro días de haber sido inoculado el hongo, mediante la siguiente fórmula, y con un calibrador digital (Rios et al., 2016):

$$PICR = \frac{(R1 - R2)}{R1} \times 100$$

Donde:

R1: Crecimiento radial del patógeno libre (control)

R2: Crecimiento radial del patógeno influenciado (cultivo dual)

2.4.6 Análisis Estadístico

De las pruebas de antagonismo en medio agar glicerol extracto de levadura (YGA) y en agar infusión cerebro corazón (AICC), se realizaron cinco repeticiones de cada cepa, aplicando un diseño experimental completamente al azar (DCA).

Los datos del PICR, se analizaron en el programa InfoStat versión estudiante 2018e. Para determinar si los valores seguían una distribución normal se usó la prueba de Shapiro-Wilks; además se efectuó un ANOVA, en donde los factores fueron medio-cepa y la variable dependiente

el porcentaje de inhibición radial del patógeno influenciado por la bacteria. Adicionalmente se hicieron comparaciones múltiples de medias con la prueba de Tukey.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS

3.1 Aislamiento y activación de cepas de actinomicetos

En la primera parte de este trabajo se realizó el aislamiento de nuevas cepas de actinomicetos a partir de suelo papero. Al cabo de tres días de incubación, se obtuvo crecimiento en 8 de 12 cajas Petri sembradas con las diluciones seriadas. Cuatro de ellas, corresponden al medio agar glicerol extracto de levadura (YGA), y las cuatro restantes, al medio agar infusión cerebro corazón (AICC).

En las tres primeras diluciones (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) se observó crecimiento masivo y en las dos últimas (10^{-5} , 10^{-6}) no se evidenció cambios, por lo que, se eligió la dilución 10^{-4} g/ml a la que se denominó D4 para posteriores ensayos, debido a que el número de colonias fue significativo en los dos medios y presentaban posibles características de actinomicetos.

La obtención de cultivos puros de la muestra seleccionada se logró a través de varias repeticiones mediante técnica de estriado.

Por otro lado, utilizando la metodología propuesta por Correa-Franco et al. (2009) se activaron 10 de las 11 cepas de actinomicetos, que inicialmente se encontraban liofilizadas, observándose crecimiento a partir de los cuatro días de incubación, en medio YGA y en AICC.

3.1.1 Caracterización morfológica

Macroscópicamente, las colonias presentaron diferente tamaño y forma, siendo circulares, filamentosas, convexas o planas, con textura seca, opaca y áspera, pero todas emitían un olor a tierra húmeda, características propias de los actinomicetos que se presentaron en los dos sustratos.

En lo que a coloración se refiere, las cepas que crecieron en medio YGA, en su mayoría fueron blancas y cremas; en medio AICC se desarrollaron con pigmentaciones café-amarillento (Figura 7).

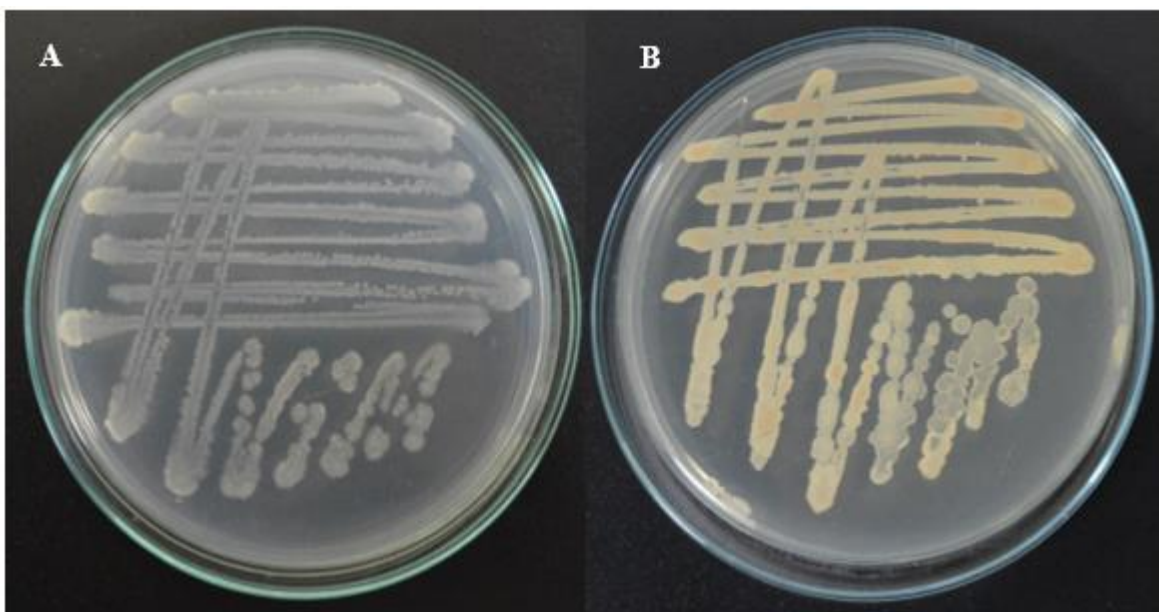


Figura 7. A) Activación de actinomicetos liofilizados, cepa P36 en medio YGA. B) Cultivo de cepas de actinomicetos a partir de suelo papero, cepa D4 en medio AICC.

Fuente: (Salazar, 2019)

En cuanto a evaluación microscópica, la tinción Gram permitió el reconocimiento de bacterias Gram positivas de color morado en forma de bacilos, individuales o en pareja con filamentos delgados y ramificados, formando cadenas cortas o largas (Figura 8).

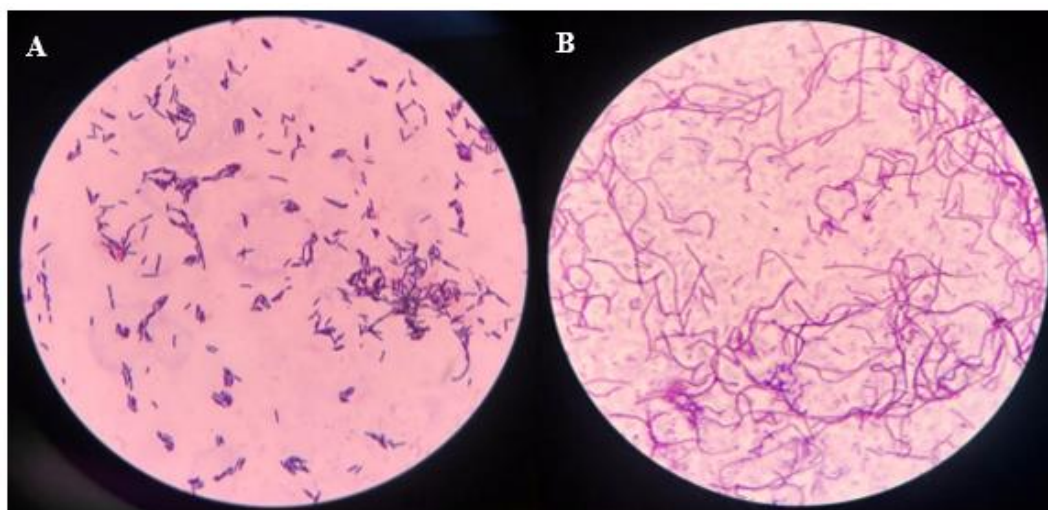


Figura 8. Valoración microscópica de actinomicetos. A) Cepa P36 reactivada. B) Cepa D4 aislada de suelo papero, 100X.

Fuente: (Salazar, 2019)

3.2 Aislamiento de *Rhizoctonia solani*

El aislamiento de *Rhizoctonia solani* se logró a partir de tubérculos de papa que presentaron posibles síntomas de la enfermedad rhizoctoniasis o costra negra.

Para ello, se sembró en medio PDA pequeños trozos de papa que contenían esclerocios en su superficie lo que permitió obtener varios aislados del fitopatógeno.

3.2.1 Caracterización morfológica

Luego de tres días de incubación, se observó el crecimiento de hifas de coloración blanco y de textura algodonosa. Sin embargo, a medida que trascurrieron los días, el micelio se tornó café e inclusive en algunas cajas se evidenció la formación de esclerocios (Figura 9).

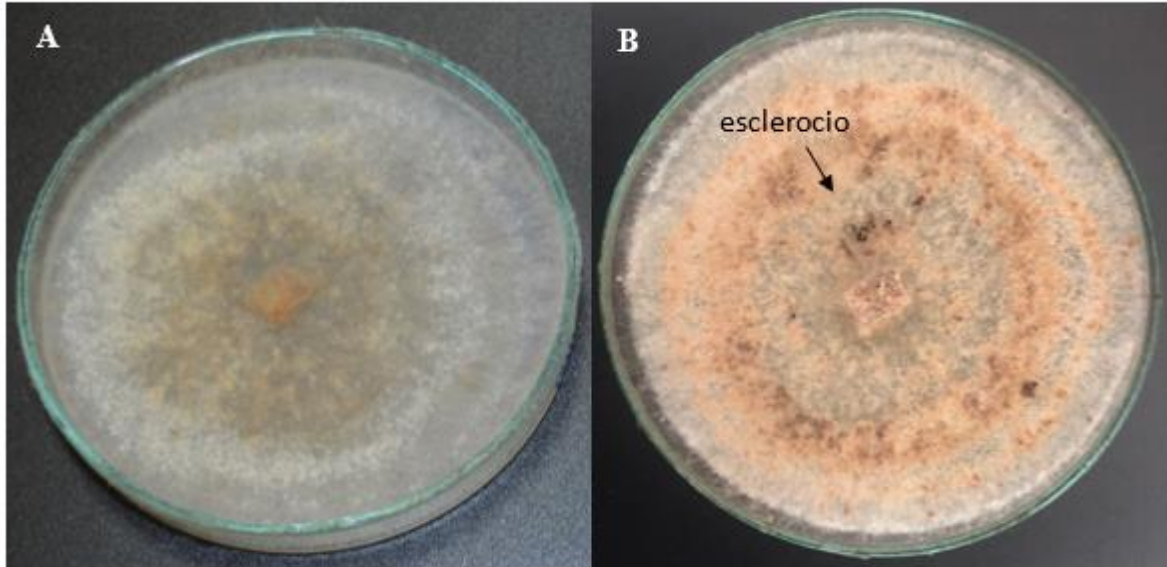


Figura 9. Crecimiento de *Rhizoctonia solani* en medio PDA. A) Ausencia de esclerocios. B) Presencia de esclerocios.

Fuente: (Salazar, 2019)

Microscópicamente, en las muestras teñidas con azul de lactofenol, se confirmó que los aislados correspondían a *R. solani*, puesto que se observó la fusión de hifas, el ángulo recto formado entre ellas, así como el estrangulamiento y el septo cerca de la ramificación principal (Figura 10).

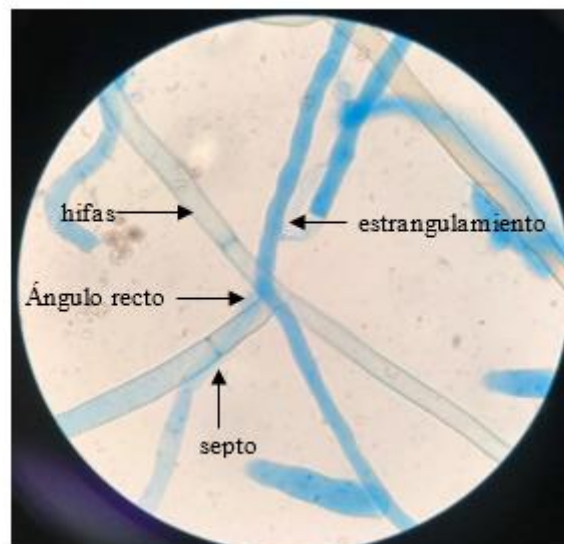


Figura 10. Estructura microscópica de *Rhizoctonia solani*, (100X).

Fuente: (Salazar, 2019)

3.2.2 Caracterización molecular de *R. solani*

3.2.2.1 Extracción de DNA

A través de la maceración de las muestras con micropistilos se logró la ruptura de la membrana celular. Mediante el protocolo de extracción empleado se obtuvieron buenos resultados en cuanto a calidad y concentración de DNA de los aislados (Tabla 4).

Tabla 4
Concentración y pureza de muestras de DNA de R. solani

Muestras	Concentración <i>ng/μl</i>	Absorbancia 260/280	Absorbancia 260/230
<i>R. solani</i> (M1)	1301,7	1,86	1,03
<i>R. solani</i> (M2)	1450,7	1,94	1,17

3.2.2.2 Amplificación de fragmentos de DNA

La amplificación de fragmentos de DNA extraídos a partir de los aislados identificados de manera macro y microscópica como *R. solani*, reveló una banda de 700 pb aproximadamente (Figura 11). Adicionalmente, en el análisis de las secuencias de nucleótidos se obtuvo un 99,56% de identidad con la región ITS de la especie esperada perteneciente al grupo de anastomosis GA3 (Anexo D).

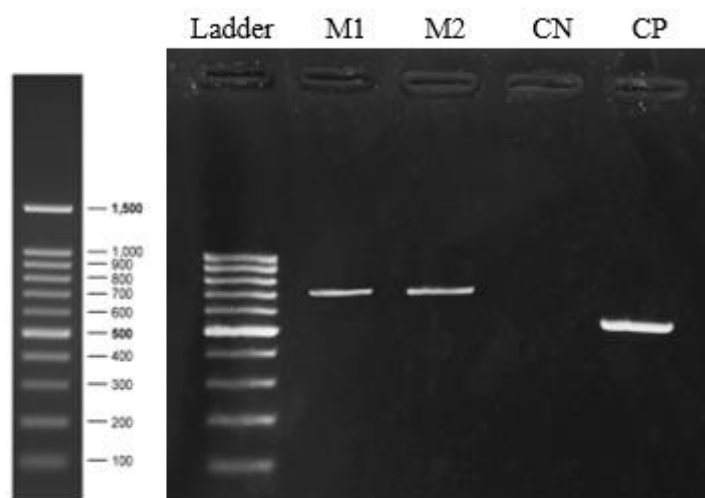


Figura 11. Patrones de bandas amplificadas por PCR de aislados de *R. solani* obtenidos de tubérculos de papa con primers ITS1/ITS4. CN: control negativo, CP: control positivo cepa de *Ilyonectria*.

Fuente: (Salazar, 2019)

3.3 Pruebas de antagonismo Actinomicetos vs *R. solani*

Las pruebas se realizaron mediante la técnica de cultivo dual, la cual permitió calcular el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) en los medios empleados, obteniéndose un total de 11 cepas con diferente capacidad inhibitoria (Anexo A).

En las figuras 12 y 13 se observan algunos ejemplares de las cepas de actinomicetos enfrentadas a *R. solani* en YGA y AICC respectivamente, evidenciándose halos de inhibición tras los ensayos de antagonismo.

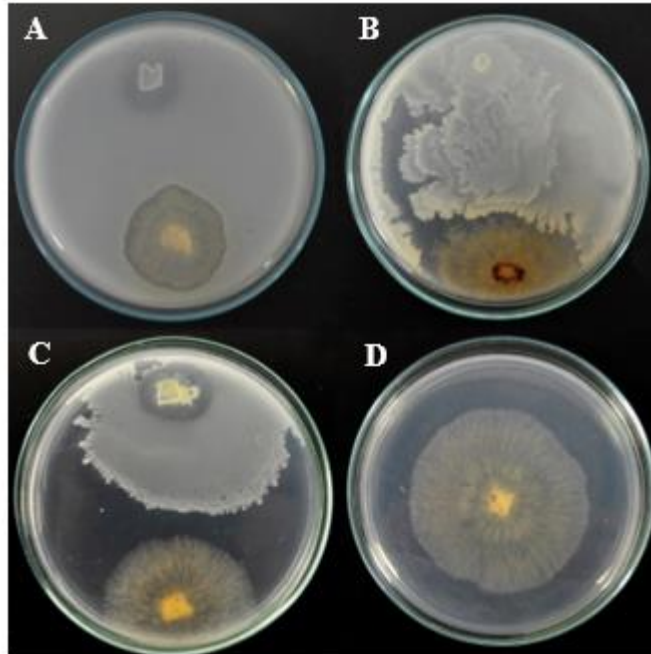


Figura 12. Pruebas de antagonismo en medio YGA: actinomicetos vs *R. solani*, cepa P25 (A), cepa P30 (B), cepa P40 (C), control (D).

Fuente: (Salazar, 2019)

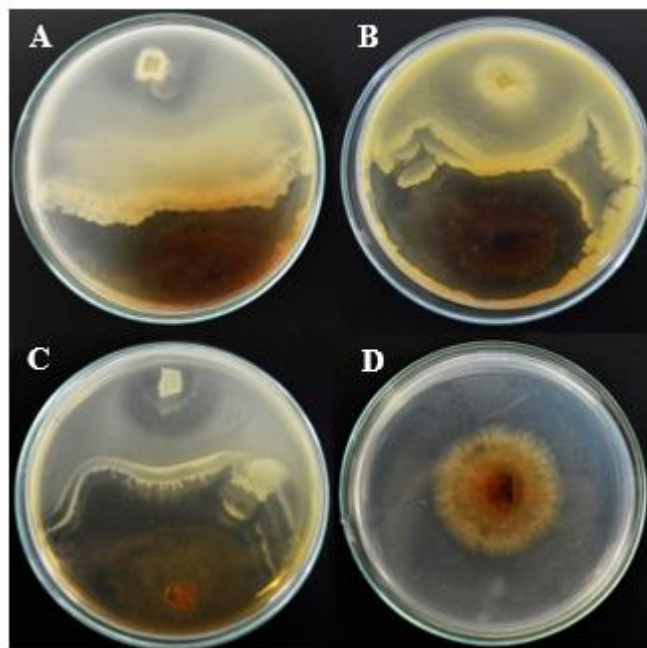


Figura 13. Pruebas de antagonismo en medio AICC: actinomicetos vs *R. solani*, cepa P37 (A), cepa P22 (B), cepa P30 (C), control (D).

Fuente: (Salazar, 2019)

La figura 14 muestra el diagrama de barras de las pruebas de antagonismo en medio YGA. Se evidencia que el crecimiento de *R. solani* frente a la cepa P8 (8,08%), no presentó diferencias estadísticamente significativas de inhibición, mientras que en las cepas P21, P37 y D4, los PICR fueron: 69,90%, 68,98% y 68,90% respectivamente, siendo las más antagonicas.

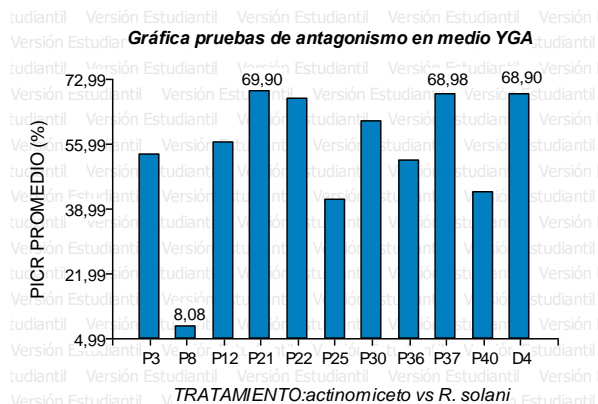


Figura 14. Gráfico de barras pruebas de antagonismo: actinomicetos vs *R. solani* en medio YGA.

Fuente: (Salazar, 2019)

En medio AICC la cepa que menos inhibió fue P40 (18,62%); por el contrario, la comparación de medias, indica que los mejores tratamientos se lograron con las cepas D4 (43,80%), P37 (40,77%) y P36 (39,89%) (Figura 15).

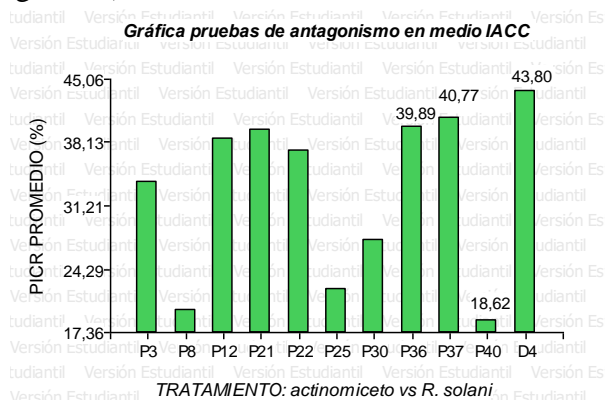


Figura 15. Gráfico de barras pruebas de antagonismo: actinomicetos vs *R. solani* en medio AICC.

Fuente: (Salazar, 2019)

Para el análisis estadístico, se realizó una prueba de normalidad conocida como Shapiro-Wilks, la cual determinó que los 11 tratamientos siguen una distribución normal en los dos sustratos (Anexo B). Posteriormente se efectuó un ANOVA de doble vía, los resultados expresan que las medias poblacionales de los factores son significativamente diferentes ($p < 0,0001$) y su interacción influye en el porcentaje de inhibición (Anexo C).

Considerando la diferencia significativa entre el medio y la cepa, se hizo una comparación múltiple de medias de Tukey (Figura 16) en donde las cepas más antagónicas son P21 (69,91%) en medio YGA y D4 (43,80%) en AICC, y, las menos inhibitorias P8 (8,08%) y P40 (18,62%) en el mismo orden.

Adicionalmente, en la figura 17 se puede observar que los tratamientos en medio YGA no son muy dispersos como en AICC; además, para este último la capacidad de inhibición no supera el 50%.

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=14,10095
 Error: 36,1679 gl: 88

Cepa	Medio	Medias	n	E.E.	
P8	YGA	8,08	5	2,69	A
P40	AICC	18,62	5	2,69	A B
P8	AICC	19,79	5	2,69	A B C
P25	AICC	22,16	5	2,69	A B C
P30	AICC	27,45	5	2,69	B C D
P3	AICC	33,76	5	2,69	C D E
P22	AICC	37,29	5	2,69	D E
P12	AICC	38,54	5	2,69	D E F
P21	AICC	39,61	5	2,69	D E F G
P36	AICC	39,89	5	2,69	D E F G
P37	AICC	40,77	5	2,69	D E F G
P25	YGA	41,34	5	2,69	D E F G
P40	YGA	43,50	5	2,69	E F G H
D4	AICC	43,80	5	2,69	E F G H
P36	YGA	51,83	5	2,69	F G H I
P3	YGA	53,16	5	2,69	G H I
P12	YGA	56,20	5	2,69	H I J
P30	YGA	61,90	5	2,69	I J
P22	YGA	67,98	5	2,69	J
D4	YGA	68,90	5	2,69	J
P37	YGA	68,98	5	2,69	J
P21	YGA	69,91	5	2,69	J

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Figura 16. Prueba de Tukey para la interacción Cepa*Medio

Fuente: (Salazar, 2019)

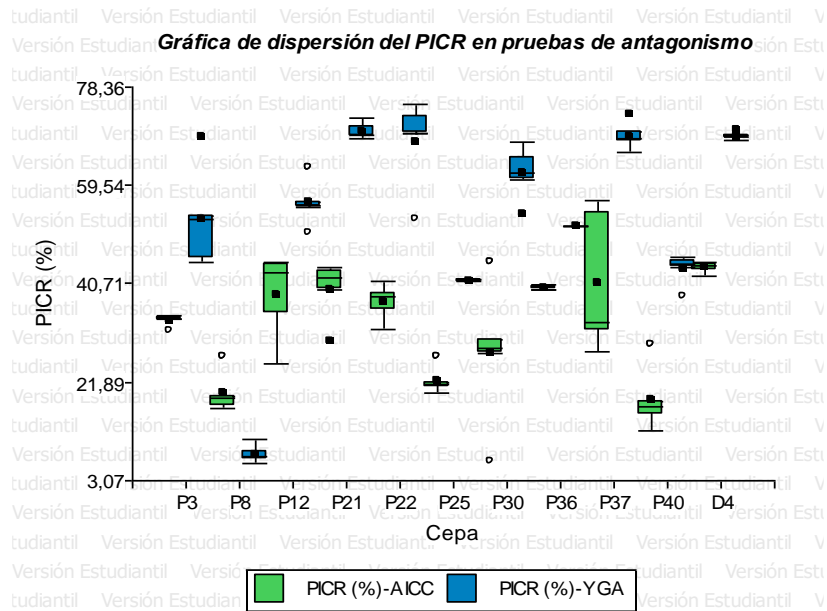


Figura 17. Gráfica de dispersión del PICR en pruebas de antagonismo en medio YGA y AICC.

Fuente: (Salazar, 2019)

CAPÍTULO IV

4. DISCUSIÓN

Pese a que en la actualidad los actinomicetos son reconocidos como productores de la mayoría de antibióticos y enzimas extracelulares, en nuestro país son pocos los estudios realizados sobre los beneficios capaces de proporcionar en la agricultura, entre ellos, su uso como controladores biológicos.

La primera parte de este trabajo consistió en aislar nuevas cepas de actinomicetos provenientes de suelo papero, lo cual se logró a partir de la dilución 10^{-4} g/ml. Según Pelez (2014), para que un recuento sea significativo, el número de colonias debe ser entre 30 y 300, lo que concuerda con la muestra seleccionada.

Como estrategia para el aislamiento y reactivación de los actinomicetos, se vio la necesidad de emplear dos sustratos. Según Forbes (2009), los actinomicetos aerobios, en su mayoría no necesitan de requerimientos complejos para su crecimiento, por lo cual se emplean medios comunes como agar nutritivo, agar sangre de carnero y agar infusión cerebro corazón (AICC), entre otros. Sin embargo, este tipo de bacterias son de crecimiento lento y los cultivos pueden ser invadidos por otros microorganismos; por dicha razón, se utilizó un medio selectivo como es el agar glicerol extracto de levadura (YGA), a más del AICC.

El uso de los dos medios de cultivo resultó ser viable para aislar y activar actinomicetos, obteniéndose un total de 11 cepas después de cuatro días de ser inoculadas. Según Pineda (2015), las colonias se pueden observar a los tres o cuatro días de incubación; sin embargo, para el desarrollo del micelio aéreo maduro se necesitó de siete a 14 días.

Caicedo (2012), en su estudio también aisló actinomicetos de la rizosfera de leguminosas; para ello, utilizó el medio YGA, obteniendo cultivos puros a los 14 días, aduciendo especificidad para las citadas bacterias, ya que permite una buena esporulación o pigmentación, a más de que el glicerol sirve como fuente de carbono. De igual manera, Pacheco (2016), reactivó actinomicetos a los siete días, empleando el mismo medio en similares condiciones ambientales a las de este estudio.

Caro (2016) menciona que dentro del Orden Actinomycetales, puede existir una gran variedad; no obstante, los métodos habituales de aislamiento han demostrado que alrededor del 95% de los actinomicetos aislados del suelo son del género *Streptomyces*.

La caracterización morfológica de los aislados se realizó en base al crecimiento en dos medios, en donde no se observaron diferencias significativas en cuanto a forma, textura, y olor, pero si en pigmentación, ya que en el medio AICC las colonias fueron café-amarillento, mientras que en medio YGA se presentaron de color blanco-crema; esto se corrobora con varias investigaciones, en donde se han aislado actinomicetos, encontrando en su mayoría colonias con pigmentos blanco, gris, crema y amarillo (Sirisha et al., 2013).

A nivel microscópico, las cepas presentaron características semejantes a otros estudios, por ejemplo, Paz (2016), realizó tinción Gram a una bacteria resultando ser bacilos Gram positivos, más tarde identificada como *Streptomyces acidiscabies*. Así mismo, González (2013), menciona que las colonias en medio AICC producen filamentos que se fragmentan formando cadenas cortas; mientras Pineda (2015) describe a las colonias con poco crecimiento micelial, no fragmentado y presencia de esporas, en un medio diferente al empleado en este trabajo. Tarazona (2017) acota que las características varían dependiendo de la disponibilidad de nutrientes en el medio y de las condiciones ambientales. Por tanto, con los resultados de las características macroscópicas y microscópicas, las 11 cepas se consideraron como pertenecientes al género *Streptomyces*.

La provincia de Pichincha es una de los mayores productoras de papa en Ecuador; sin embargo, sus cultivos son invadidos por organismos patógenos como *R. solani*, que destruye tallos, estolones y tubérculos (Pozo, 2013).

En este estudio, *R. solani* se aisló a partir de tubérculos de papa con síntomas de la enfermedad, como son los esclerocios en la superficie. Para lograr el aislamiento y posterior reproducción del fitopatógeno, se inocularon pequeños trozos de tejido dañado en medio selectivo agar papa dextrosa (PDA), cuya importancia radica en su composición. Según Cañedo & Ames (2004), los medios utilizados para el crecimiento de los hongos deben tener los nutrientes necesarios que faciliten su desarrollo. El PDA es el más empleado para aislar hongos y levaduras, se obtiene a partir de infusión de papa y dextrosa; normalmente se añaden antibióticos para inhibir el crecimiento de bacterias contaminantes; en este caso, el medio fue suplementado con 0,1 gramos de cloranfenicol, fármaco efectivo frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas.

A partir de los resultados obtenidos, el patógeno aislado presentó características macroscópicas y microscópicas correspondientes a *R. solani*.

Fenotípicamente, el color, la textura y la forma del micelio, así como la formación de esclerocios coinciden con lo reportado por Díaz et al., (2014), quienes aislaron *R. solani* de frutos de calabaza pipiana. No obstante, existieron diferencias en la coloración del micelio entre los aislados, siendo unos más oscuros que otros. Resultados similares se obtuvieron en el estudio de Giovannini et al., (2005), mencionando la posibilidad de encontrar individuos con características morfológicas distintas dentro de una misma población y en una zona definida.

Así mismo, el patógeno mostró hifas ramificadas en ángulo recto con un septo cerca del origen, células nucleadas y no esporuladas, corroborándose lo descrito por Figueroa & Ruano (2013) y Montero-Tavera et al., (2013) en sus trabajos con esta misma especie.

El protocolo de extracción utilizado resultó exitoso, permitiendo obtener una buena concentración y pureza del DNA de los aislados.

Según datos tomados del Banco Nacional de DNA Carlos III, la concentración de DNA se calcula con su absorbancia máxima de 260 nm, mientras que para estimar la pureza se utiliza la relación 260/280 y 260/230.

Con el primer coeficiente se determina el contenido de proteína en la muestra. Cuando los valores varían entre 1,8-2,0, el DNA tiene una pureza óptima (Sambrook & Russell, 2001). Las concentraciones que se reportan en la tabla 4 están dentro del rango establecido, es decir que las muestras no presentaron contaminación por proteínas y el proceso de extracción y purificación fue realizado de manera correcta.

Por otra parte, a 230 nm se evalúan contaminantes como sales, carbohidratos, compuestos fenólicos y RNA. Para este caso, el DNA se considera puro en un rango de 1,5-2,2 (Sambrook & Russell, 2001). Según los datos presentados en la tabla 4, para una absorbancia 260/230 todas las muestras presentaron contaminación, debido a su ratio menor a 1,55. Solano-Flórez et al., (2009) mencionan varios factores que inciden en la concentración y pureza del DNA, tales como: el método de extracción, cantidad de tejido, condiciones del material sea fresco, congelado o fijado, entre otros. Con base en lo anterior, los resultados obtenidos pudieron atribuirse a un mal filtrado del micelio, porque se encontraba fuertemente adherido al agar, haciendo difícil la separación.

A pesar de que los resultados obtenidos para la absorbancia de 230 no fueron los esperados, estos no influyeron en posteriores ensayos.

Anteriormente, la identificación de un microorganismo estaba basada únicamente en su morfología. En la actualidad, existen técnicas moleculares como la PCR y posterior secuenciación de sus productos que brindan una mayor precisión (Sánchez-García et al., 2017).

Para la identificación molecular de los aislados, es primordial realizar un análisis de identidad de secuencias de rDNA de las regiones ITS. Su estudio ha sido de gran interés porque son pequeñas, altamente variables, fáciles de amplificar y alinear, además de haber demostrado utilidad en la identificación de grupos de anastomosis de *R. solani* (Avendaño et al., 2015).

En el presente estudio, el producto de PCR combinado con los primers universales ITS1 e ITS4 reveló una banda de 700 pb aproximadamente, coincidiendo con lo reportado por Díaz et al., (2014); de igual manera, Albán (2015) obtuvo una talla de banda de 650 pb en su trabajo de investigación.

En cuanto al alineamiento de las secuencias realizadas en el programa bioinformático BLAST, el porcentaje de similitud fue del 99,56%, concordando con las secuencias de *R. solani* del GenBank y confirmando la presencia del grupo anastomótico AG3. Sin embargo, Montealegre et al., (2003) manifiestan que no son los únicos grupos que se pueden encontrar, en su estudio concluyó que de cinco cepas de *R. solani* aisladas de tomate, cuatro corresponden al GA4 y una al GA2-1, ratificándose con lo indicado por Fernández (2011), quien identificó grupos GA2-2, GA4 y G5 en suelos papeiros de Sinaloa.

Todas las cepas de actinomicetos presentaron capacidad antagónica, ya sea mínima, frente a *R. solani* en los dos sustratos. Rojas et al., (2017), indican que estos microorganismos producen metabolitos secundarios como los antibióticos, los cuales, en determinadas situaciones de competencia por espacio o nutrientes, han demostrado inhibir el crecimiento frente a varias especies de fitopatógenos. Así, Pérez et al., (2015) evaluaron 85 cepas de actinomicetos de suelos

paperos, de las cuales 52 expresaron actividad antifúngica a *R. solani*, 22 a *Fusarium* sp., y 11 a *P. infestans*. Resultados similares reporta Caro (2016), quien encontró un 55,1% de los actinomicetos aislados de suelos con antagonismo a *R. solani*.

En los ensayos de enfrentamiento realizados en esta investigación, el medio YGA resultó ser más efectivo que el AICC, puesto que, de 11 cepas utilizadas, ocho superaron el 50% de PICR, siendo la cepa P21 (69,90%) la más antagónica. Por el contrario, en AICC, el mayor porcentaje de inhibición fue de la cepa D4, alcanzando solo el 43,80%. Cabe mencionar que la coloración del patógeno en el último medio fue más oscura. Pérez-Corral et al., (2015) mencionan a la melanina como escudo del hongo, proporcionándole resistencia a diversas agresiones por otros microorganismos; en consecuencia, esto pudo influenciar en los resultados, obteniéndose una menor efectividad. Además, con la prueba de ANOVA realizada, se corrobora que la interacción entre los factores es significativa, en donde cada cepa puede tener diferente mecanismo de acción dependiendo de las condiciones.

Varios autores señalan que gracias a la actividad de los actinomicetos, se han elaborado productos de uso agrícola disponibles en el mercado, consiguiendo resultados positivos en el control de ciertas especies de hongos patógenos (Fonseca, Castellanos, & León, 2011).

CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES

1. Se aislaron cepas de actinomicetos procedentes de suelo papero de la provincia de Pichincha, identificadas morfológicamente como *Streptomyces* y con capacidad antagónica a *R. solani*.
2. De 11 cepas liofilizadas, se consiguió activar a 10 del género *Streptomyces*, y se las mantuvo en medio agar glicerol extracto de levadura (YGA) y agar infusión cerebro corazón (AICC).
3. Los aislados de *R. solani* se obtuvieron a partir de tubérculos de papa infectados con esclerocios en la superficie; su caracterización morfológica y molecular permitió confirmar la especie esperada, obteniéndose un 99,56% de similitud con las secuencias del GenBank.
4. De acuerdo a las pruebas de antagonismo *in vitro*, todas las cepas de actinomicetos presentaron actividad antifúngica frente a *R. solani* en los dos medios empleados, comprobándose la hipótesis. La variación del PICR, estuvo influenciada por la interacción entre el medio y la cepa.
5. Las cepas de menor inhibición fueron la P8 (8,08%) y P40 (18,62%) en medio YGA y AICC respectivamente, mientras que la P21 (69,90%) y D4 (43,80%) presentaron mayor capacidad antagónica respectivamente, siendo esta última, aislada en 2019 y las restantes en 2011.

CAPÍTULO VI

6. RECOMENDACIONES

1. Realizar caracterización molecular de las cepas con mayor capacidad antagónica frente a *R. solani*, para corroborar su identificación en el género *Streptomyces*.
2. Utilizar otras especies de fitopatógenos en las pruebas de enfrentamiento dual, para establecer los diferentes mecanismos de acción de los actinomicetos.
3. Realizar pruebas de antagonismo *in vivo*, para comprobar si los actinomicetos efectivamente actúan como controladores biológicos de fitopatógenos en plantas.

CAPÍTULO VII

7. BIBLIOGRAFÍA

Acuña, I., & Araya, M. (2017). Rizoctoniasis de la papa. Instituto de investigaciones agropecuarias - INIA.

Acuña, I., & Tejada, P. (2018). Enfermedades causadas por hongos. Manual interactivo de la papa INIA-CHILE.

Agrios, G. (2007). Fitopatología. México: Limusa.

Albán, A. (2015). Identificación, Aislamiento, Caracterización y Evaluación de la capacidad de infección en tubérculos de *Rhizoctonia solani* de suelos paperos de la provincia de Carchi . Sangolquí, Pichincha, Ecuador.

Arcos, J., & Zúñiga, D. (2015). Efecto de rizobacterias en el control de *Rhizoctonia solani* en el cultivo de papa. Ecología Aplicada.

Avendaño et al. (2015). Nucleotide sequences of ITS region in S1 and PL families of polyembryonic maize. Rev. Mex. Cienc. Agríc vol.6 no.3 Texcoco.

Beltrán et al. (2011). *Trichoderma koningiopsis* Th003, alternativa biológica para el control de *Rhizoctonia solani* en el cultivo de papa. Bogotá: Corporación Colombiana de Investigación, Agropecuaria, Corpoica.

Bolaños, A. (2015). Evaluación de diferentes orígenes de semilla de papa (*Solanum tuberosum* L.) provenientes de tres sistemas de producción en dos localidades de la sierra ecuatoriana.

- Caicedo, R. (2012). Producción de compuestos bioactivos de actinomicetos aislados de la rizósfera y rizoplano del trébol blanco (*Trifolium repens* L.) para el control de hongos fitopatógenos, bacterias y levaduras. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, Ambato-Ecuador.
- Cañedo, V., & Ames, t. (2004). Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú.
- Caro, J. (2016). Capacidad antagonista de actinomicetos aislados de la rizósfera de la papa (*Solanum tuberosum* sp. andigena) para el control de hongos fitopatógenos de importancia agrícola.
- Castillo, E. (2004). Efectividad de Actinomicetos Aislados de la Rizósfera de Papa sobre *Rhizoctonia solani* Kühn *in vitro*. Revista Mexicana de Fitopatología.
- Castro, I., & Contreras, A. (2011). Manejo de plagas y enfermedades en el cultivo de papa (Segunda ed. ed.). Chile: Imprenta Austral.
- Cisneros, J. (2016). Aislamiento y selección de actinomicetos rizosféricos con potencial aplicación como bioinoculante en el cultivo de *Solanum tuberosum* sp. andigena (Papa). Lima, Perú.
- DANE. (2014). El cultivo de la papa, *Solanum tuberosum* alimento de gran valor nutritivo, clave en la seguridad alimentaria mundial. Sistema de información de precios y abastecimiento del sector agropecuario.
- Díaz et al. (2014). Identificación Morfológica y por PCR de *Rhizoctonia solani* kühn a partir de frutos de calabaza y pipiana y su manejo en invernadero. Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud.
- Epifanio. (2017). Biocontrol de *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* con bacterias endófitas en papa y su efecto en la inducción de resistencia y promoción de crecimiento.

- Fernández, L. (2011). Identificación molecular de grupos de anastomóticos de *Rhizoctonia solani* Kühn asociados a la costra negra y cancro del tallo en el cultivo de papa en Sinaloa. Instituto Politécnico Nacional.
- Figuerola, L., & Ruano, O. (2013). Evaluación de la sensibilidad del patógeno *Rhizoctonia solani* aislado de papa (*Solanum tuberosum* L.) frente al aceite esencial de orégano silvestre *Lippia origanoides* H.B.K, y determinación de la fracción más activa a nivel *in vitro*. Universidad de Nariño.
- Fonseca, Y., Castellanos, S., & León, T. (2011). Efecto Antagónico *in vitro* de Actinomicetos Aislados de Purines de Chipaca (*Bidens pilosa* L.) Frente a *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary. *Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín, Volumen 64, Número 2*.
- Forbes, A. (2009). Bailey & Scott Diagnóstico Microbiológico. Madrid: Editorial Médica Panamericana S.A.
- Franco-Correa et al. (2009). Polihidroxicanoatos en actinomicetos nativos de suelos colombianos. *Revista Peruna de Biología* .
- Giovannini et al. (2005). Caracterización morfológica y patogénica de *Rhizoctonia solani* Kühn a partir de tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L) provenientes de diferentes predios de la X Región de Chile. *Idesia*,13-18.
- Gómez, J. (2014). Selección de actinomicetos aislados de suelos paperos de la provincia de Charchi, antagónicos a *Phytophthora infestans* (Mont). de Bary y *Rhizoctonia solani* Kühn, mediante ensayos *in vitro* y pruebas de invernadero en *Solanum tuberosum* L. Sangolquí, Pichincha, Ecuador.
- González, D. (2013). Manual electrónico de actinomicetos. Universidad Nacional Autónoma de México.

- González, Y. (2010). Los actinomicetos: Una revisión como promotores de crecimiento vegetal. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana .
- González-Hernández, D. (2002). Estado actual de la taxonomía de *Rhizoctonia solani*. Departamento de Sistemática Vegetal, Instituto de Ecología, A.C. Apdo.
- Huarte, M., & Capezio, S. (2013). Cultivo de Papa. Adaptado del Centro Internacional de la Papa.
- ICA. (2011). Manejo fitosanitario del cultivo de papa. Instituto Agropecuario Colombiano.
- INIAP-CIP. (2002). Cultivo de papa en Ecuador.
- INIA-Remehue. (2017). Enfermedades en el cultivo de papa. Evaluación de riesgo sanitario. Chile: Fundación para la innovación agraria.
- Inostroza el at. (2009). Manual de papa para La Araucanía: Manejo y Plantación . INIA Carillanca.
- Kromann et al. (2017). VII Congreso Ecuatoriano de la papa, adaptación al cambio climático. Memorias del evento.
- Lagua, L. (2013). Evaluación de tres tipos de inducción a la madurez en la producción de semilla de papa (*Solanum tuberosum* L.) Var. Friepapa en la ESPOCH, cantón Riobamba . *Escuela Politécnica de Chimborazo*.
- López-Jácome et al. (2013). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. Laboratorio de Infectología, Centro Nacional de Investigación y Atención a Quemados (CENIAQ).
- Medina, A. (2014). Selección de actinomicetos aislados de suelos paperos de la provincia de Loja, antagonicos a *Phytophthora infestans* (Mont). de Bary y *Rhizoctonia solani* Kühn, mediante ensayos *in vitro* y pruebas de invernadero en *Solanum tuberosum* L.
- Montealegre et al. (2003). Identificación de grupos de anastomosis de cepas de *Rhizoctonia solani* kühn aisladas de tomates en la v región de chile. Boletín micológico Vol. 18:47-51.

- Monteros, A. (2016). Rendimientos de papa en el Ecuador. Coordinación General del Sistema de Información Nacional Ministerio de Agricultura, Gandería, Acuacultura y Pesca.
- Montero-Tavera et al. (2013). Genetic diversity of *Rhizoctonia solani* isolates (Kuhn) from pepper in Mexico. *Rev. Mex. Cienc. Agríc* vol.4 no.7 .
- Navarrete et al. (2017). Potato crop health quality and yield losses in Ecuador. *Revista Latinoamericana de la Papa*.
- Pacheco, S. (2016). Determinación de la capacidad biofertilizante de actinomicetos en presencia de metales pesados. *Universidad Peruana, Cayetano Heredia*.
- Parada et al. (2017). Aislamiento y caracterización parcial de actinomicetos de suelos con actividad antimicrobiana contra bacterias multidrogo-resistentes. *Rev. Colomb. Biotecnol*.
- Paz, I. (2016). Capacidad inhibitoria de extractos crudos de los actinomicetos L37, CH50, C92, frente a *Phytophthora infestans*, *Rhizoctonia solani*, y *Fusarium* sp. . Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE, Sangolquí.
- Pelez, G. (2014). Aislamiento y estudio de la diversidad de las poblaciones de actinobacterias presentes en muestras de compost. Facultad de Ciencias Agrarias y Ambientales, Salamanca-España .
- Pérez et al. (2015). Actinomicetos aislados del compost y su actividad antagonista a fitopatógenos de la papa (*Solanum tuberosum* sp. andigena Hawkes). *Revista mexicana de fitopatología*.
- Pérez-Corral et al. (2015). Isolation of actinomycetes associated to apple trees rhizosphere antagonistic to *Fusarium equiseti*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* Vol.6 Núm.7.
- Pineda, L. (2015). Aislamiento y caracterización de actinomicetos recolectados en ambientes marinos y su potencial antimicrobiano. Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador.

- Pozo, V. (2013). Evaluación de dos fungicidas para control de *Rhizoctonia solani* en papa (*Solanum tuberosum*). Carchi- Ecuador. Universidad Politécnica Estatal de del Carchi.
- Rios et al. (2016). Identification and antagonistic activity *in vitro* of *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp. isolates against common phytopathogenic fungi. *Revista Mexicana de Fitopatología*.
- Robalino, A. (2018). Identificación molecular de especies de estreptomicetos aislados de suelos papeiros de las provincias de carchi y chimborazo. Quito, Pichincha, Ecuador.
- Robles, A. (2014). Uso de microorganismos antagonistas y sustancias naturales como una alternativa ecológica en el control de enfermedades en cultivos. Centro de Biotecnología, Universidad Nacional de Loja .
- Rodríguez, P., & Arenas, R. (2018). Hans Christian Gram y su tinción. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*. Volumen 16 / Número 2.
- Rojas et al. (2017). Antagonism of *Bacillus* against fungi of the genus *Fusarium*, pathogens of vegetables. *Revista de Protección Vegetal*. Laboratorio de Ecología Microbiana, Dpto. de Microbiología y Virología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba.
- Sambrook, J., & Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3^a ed. Ed.
- Sánchez-García el at. (2017). Identificación molecular y evaluación antagónica *in vitro* de cepas nativas de *Trichoderma* spp. sobre hongos fitopatógenos de raíz en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Montcalm. *Agrociencia* vol.51 no.1 México .
- Simson et al. (2017). The effect of different pre-crops on *Rhizoctonia solani* complex in potato. *Agronomy Research*.
- Singh et al. (2015). Antagonistic Actinomycetes Mediated Resistance in *Solanum lycopersicon* Mill. Against *Rhizoctonia solani* Kühn. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*.

- Singh et al. (2017). Antagonistic Actinomycetes Mediated Resistance in *Solanum lycopersicon* Mill. Against *Rhizoctonia solani* Kühn. Springer.
- Singh et al. (2018). Actinomycetes as Potential Plant Growth-Promoting Microbial Communities. Crop Improvement Through Microbial Biotechnology.
- Sirisha et al. (2013). Bioactive Compounds from marine actinomycetes isolated from the sediments of bay of bengal. International Journal of Pharmaceutical, chemical and biological sciences.
- Solano-Flórez et al. (2009). Optimización de la extracción de ADN de *Passiflora ligularis* para el análisis por medio de marcadores moleculares. Facultad de Ciencias Básicas, Pontificia Universidad Javeriana.
- Tarazona, U. (2017). Caracterización de actinomicetos de sedimento marino y su potencial actividad antagonista frente a *Vibrio* sp. aislados de *Litopenaeus vannamei*. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas.
- Torres. (2002). Manual de las enfermedades de la Papa en el Perú. Lima: Centro Interacional de la Papa.
- Torres, W. (2017). La papa es el tercer cultivo transitorio más importante del Ecuador.
- Tsrer, L. (2010). Biology, Epidemiology and Management of *Rhizoctonia solani* on Potato. Journal of Phytopathology, 158(10), 649–658.
- Van der Meij et al. (2017). Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes. FEMS Microbiology Reviews.
- Zepada, M., & Menjivar, W. (2016). Evaluación de tres variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.) multiplicadas in vitro en dos volúmenes de sustrato para la producción de mini tubérculos bajo invernadero.