



**“Capacidad inhibitoria de extractos crudos de actinomicetos aislados de suelos
paperos de la provincia de Pichincha frente a *Rhizoctonia solani* Kühn mediante ensayos
in vitro y proyección teórica”**

Suquillo Llumiquinga, Nadia Coralía

Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

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

Lic. Koch Kaiser, Alma Rosel, Mgs.

4 de septiembre del 2020



Document Information

Analyzed document	Tesis_SUQUILLO NADIA_urkund.docx (ID78624286)
Submitted	9/4/2020 6:28:00 PM
Submitted by	
Submitter email	fjflores2@espe.edu.ec
Similarity	3%
Analysis address	fjflores2.espe@analysis.arkund.com

Firma:

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Alma Rosel Koch Kaiser", written over a dotted line.

Lic. Koch Kaiser, Alma Rosel, Mgs.
C.C. 1708880792
Directora

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, "**Capacidad inhibitoria de extractos crudos de actinomicetos aislados de suelos paperos de la provincia de Pichincha frente a *Rhizoctonia solani* Kühn mediante ensayos *in vitro* y proyección teórica**" fue realizado por la señorita **Suquillo Llumiquinga, Nadia Coralía** el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 4 de septiembre de 2020

Firma:



Lic. Koch Kaiser, Alma Rosel, Mgs.
C.C. 1708880792



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, **Suquillo Llumiquinga, Nadia Coralía**, con cédula de ciudadanía n° 1723151328, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: "**Capacidad inhibitoria de extractos crudos de actinomicetos aislados de suelos papeiros de la provincia de Pichincha frente a *Rhizoctonia solani* Kühn mediante ensayos *in vitro* y proyección teórica**" es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 4 de septiembre de 2020

Firma:

.....
Suquillo Llumiquinga, Nadia Coralía
C.C. 1723151328



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo, **Suquillo Llumiquinga, Nadia Coralía**, con cédula de ciudadanía n° 1723151328, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **“Capacidad inhibitoria de extractos crudos de actinomicetos aislados de suelos paperos de la provincia de Pichincha frente a *Rhizoctonia solani* Kühn mediante ensayos *in vitro* y proyección teórica”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 4 de septiembre de 2020

Firma:

Suquillo Llumiquinga, Nadia Coralía
C.C. 1723151328

Dedicatoria

A mis padres Héctor y María a mi hermana Carla y a Liliana por darme su amor y llenar de alegría mis días, por ser quienes me han apoyado de manera incondicional durante toda mi vida y nunca han permitido que me rinda ante cualquier adversidad. Los amo con todo mi corazón.

A quien en vida fue el Licenciado Fernando Morejón por ser un gran maestro y amigo incluso hasta un segundo padre, por confiar en mí y enseñarme a ser mejor cada día sin importar las dificultades.

Nadia Coralía Suquillo Llumiyinga

Agradecimientos

A Dios y a la vida por haberme permitido culminar esta etapa con éxito y dejarme conocer a excelentes personas durante el proceso.

A mis padres por sus consejos, paciencia, apoyo y amor incondicional, por todos los valores que me han inculcado y sobre todo por enseñarme día a día a que las cosas siempre se logran con esfuerzo y dedicación.

A mi hermana por ser mi compañera de aventuras y estar a mi lado en cada momento cuidándome y brindándome su ayuda siempre que la necesito.

A Liliana por ser mi amiga y hermana mayor, por ser una guía y ejemplo de superación y a su esposo Luis por su apoyo y ayuda en cada momento.

A Sisa mi pequeñita eres una gran bendición, gracias por llegar a la familia para llenarnos de alegría.

A Almita Koch, Mgs. por todas sus enseñanzas, por ser más que maestra, una amiga y consejera, por estar siempre dispuesta a resolver las dudas que se presentaban a lo largo de la elaboración de este proyecto, gracias por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo.

Al Blanquita Naranjo por su interés y aporte de conocimiento para hacer posible este proyecto.

A mis compañeras y compañeros tesisistas y pasantes Caro, César, Mati, Gaby, Juan, Nico y principalmente a Pris, Susy, Rick y Andrés por brindarme su amistad,

conocimientos y ayuda en este tiempo. A todos gracias por hacer que exista un ambiente agradable y divertido dentro y fuera del laboratorio.

A Diana, Adriana, Gaby y Naty por brindarme su cariño y apoyo y sobre todo por demostrarme que una verdadera amistad puede perdurar a pesar el tiempo y la distancia.

A mis amigas y amigos, especialmente a Adre, Eri, Natt, Sofía, Nenys, Paty, Daniel y Miguel por su constante apoyo y amistad, gracias por hacer de los días en la universidad más divertidos.

A Kari por su ayuda y compañía en momentos difíciles, por cada una de las risas y lágrimas que hemos compartido, gracias por ser una amiga incondicional durante todo este tiempo.

Nadia Coralía Suquillo Llumiyinga

Índice de contenidos

Certificación	3
Responsabilidad de autoría.....	4
Autorización de publicación.....	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimientos.....	7
Índice de contenidos	9
Lista de tablas	11
Lista de figuras	12
Resumen	13
Abstract.....	14
Capítulo I: Introducción	15
Formulación del problema	15
Justificación del problema	16
Objetivos de la investigación	18
Objetivo general	18
Objetivos específicos.....	18
Marco teórico	18
<i>Rhizoctonia solani</i>	18
Actinomicetos.....	26
Cultivo de papa (<i>Solanum tuberosum</i> L.).....	27
Proyección teórica en ciencias biológicas.....	30
Hipótesis.....	31
Capítulo II: Materiales y métodos	32
Participantes	32
Zona de estudio	32
Período de tiempo de investigación	32
Procedimiento	32
Obtención, activación, caracterización y mantenimiento de actinomicetos	32
Aislamiento de <i>Rhizoctonia solani</i>	34
Obtención de extractos crudos a partir de actinomicetos	35
Identificación molecular de las cepas de actinomicetos	37

	10
Proyección teórica.....	41
Capítulo III: Resultados.....	43
Activación de cepas liofilizadas de actinomicetos	43
Caracterización morfológica de actinomicetos.....	43
Aislamiento de <i>Rhizoctonia solani</i>	46
Caracterización morfológica de <i>Rhizoctonia solani</i>	46
Obtención de extractos crudos a partir de actinomicetos.....	47
Identificación molecular de actinomicetos.....	51
Extracción y cuantificación de ADN genómico.....	51
Amplificación del gen 16S de ADN ribosomal.....	51
Proyección teórica	53
Secuenciación y análisis de similitud	53
Prueba de inhibición de los extractos crudos frente a <i>Rhizoctonia solani</i>	53
Capítulo IV: Discusión.....	56
Capítulo V: Conclusiones	66
Capítulo VI: Recomendaciones.....	67
Capítulo VII: Bibliografía	68
Capítulo VIII: Anexos	

Lista de Tablas

Tabla 1	Volúmenes de los reactivos empleados en la PCR para un volumen total de reacción de 25 μ L	39
Tabla 2	Configuración del termociclador para la amplificación del gen 16S con primers 27F y 1492R.....	40
Tabla 3	Peso seco de extractos crudos obtenidos por cada cepa.....	50
Tabla 4	Concentraciones en miligramo de muestra por mililitro de DMSO 5%.....	50
Tabla 5	Concentración y calidad del ADN genómico de cepas de actinomicetos.....	51

Lista de Figuras

Figura 1	<i>Rhizoctonia solani</i> en medio PDA. A) Cinco días de crecimiento. B) Quince días de crecimiento.....	19
Figura 2	Observación microscópica de <i>Rhizoctonia solani</i>	20
Figura 3	Ciclo de la enfermedad causada por <i>Rhizoctonia solani</i>	22
Figura 4	Síntomas causados por <i>Rhizoctonia solani</i> en planta de papa.....	23
Figura 5	Planta de papa (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	29
Figura 6	Observación macroscópica y microscópica de cultivos madre de actinomicetos activados.....	44
Figura 7	Observación macroscópica y microscópica de cultivos puros de actinomicetos	45
Figura 8	Caracterización macroscópica de <i>Rhizoctonia solani</i>	46
Figura 9	Vista microscópica de <i>Rhizoctonia solani</i> , 40X	47
Figura 10	Crecimiento de actinomicetos en medio YGB	48
Figura 11	Identificación Microscópica de actinomicetos cultivados en medio YGB.....	49
Figura 12	Marcador de peso molecular de 100 Kb tipo escalera	52
Figura 13	Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos de PCR del gen 16S.....	52
Figura 14	Análisis no paramétrico de Friedman para los tratamientos aplicados contra <i>Rizoctonia solani</i>	54
Figura 15	Gráfica de puntos para el crecimiento de <i>Rhizoctonia solani</i> en ensayos de inhibición.....	55

Resumen

Rhizoctonia solani es un hongo con un amplio rango de hospederos infecta tallos, hojas y frutos generando pérdidas para los agricultores. En Ecuador la papa es un producto de gran importancia en la economía del país, su rendimiento es afectado por la presencia de varios patógenos, entre ellos *R. solani*. Para su control, se ha utilizado productos químicos, sin embargo, las consecuencias sobre el medio ambiente, la salud de animales y personas, así como el aumento del costo de producción ha generado la necesidad de buscar alternativas de biocontrol. La capacidad de síntesis de compuestos bioactivos de los actinomicetos ha logrado posicionarlos como candidatos para el control de fitopatógenos. En el presente estudio se obtuvieron extractos crudos a partir de actinomicetos aislados en el 2011 y, mediante búsqueda bibliográfica, los datos recolectados permitieron hacer un análisis sobre la posible capacidad inhibitoria frente a *R. solani*. Como resultado, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas con un p-valor < 0,0001 en la capacidad de inhibición de cada tratamiento. El extracto de la cepa P30 mostró fuerte inhibición, el de la cepa P36 expuso moderada capacidad inhibitoria, mientras que los extractos de las cepas P3 y P25 presentaron una inhibición mínima sólo con dos días de duración, P21 y P22 no inhibieron al patógeno. En base a comparaciones morfológicas con otros estudios, las cepas identificadas fueron P21 como *Nocardia sp.* y las restantes como especies del género *Streptomyces*.

Palabras clave:

- **ACTINOMICETOS**
- **EXTRACTOS CRUDOS**
- **RHIZOCTONIA SOLANI**
- **INHIBICIÓN**

Abstract

Rhizoctonia solani is a fungus with a wide host range. It infects stems, leaves and fruits generating losses for farmers. In Ecuador the potato is a large importance product in the economy of the country. Its yield is affected by the presence of several pathogens, including *R. solani*. Chemical products have used against this pathogen, however, the consequences on the environment, health of animals and people, as well as the increase of potato cost production has generated the need to search for biocontrol alternatives. The bioactive compounds production of actinomycetes has led them as candidates to control phytopathogens. In the present study, crude extracts were obtained from strains of actinomycetes isolated in 2011 in the laboratory, through a bibliographic search. The data collected allowed an analysis of the possible inhibitory capacity against *R. solani*. As a result, it was obtained statistically significant difference with a p-value <0.0001 in the inhibition capacity presented by each treatment. The extract of the P30 strain showed a strong inhibition, that of the P36 strain exhibited moderate inhibitory capacity, while the extracts of the P3 and P25 strains showed a minimal inhibition with only two days duration; P21 and P22 did not inhibit the pathogen. Based on morphological comparisons with other studies, the identified strains were P21 as *Nocardia sp.* and the rest as species of the genus *Streptomyces*.

Keywords:

- **ACTINOMYCETES**
- **CRUDE EXTRACTS**
- **RHIZOCTONIA SOLANI**
- **INHIBITION**

Capítulo I: Introducción

Formulación del problema

Rhizoctonia solani es un hongo basidiomiceto saprófito del suelo y su rango de plantas hospederas es muy amplio, infecta principalmente a especies de la familia Solanacea, donde se incluyen a berenjenas, pimientos, tabaco, tomates y papas cultivados en condiciones de invernadero y campo (Gondal et al., 2019). Es el agente causal de enfermedades como la descomposición de las semillas, chancro, pudrición de brotes, raíces y frutos, tizón de hojas y formación de lesiones necróticas en tubérculos (Mohammadi M. et al., 2003).

En Ecuador, el cultivo de papa se ubica entre las principales actividades agrícolas, ya que el tubérculo forma parte de la dieta diaria de la población, constituyéndose como un valioso recurso social y económico de pequeños y grandes agricultores (MAG, 2018); sin embargo, existe una gran pérdida de los cultivares por enfermedades causadas por distintos patógenos en varios estadios de desarrollo (Devaux et al., 2010).

Al realizar el Control Interno de Calidad (CIC) sanitaria de semilla de papa categoría registrada, la presencia de *R. solani* se ha incrementado, puesto que se obtuvieron porcentajes de infección del 81% y 11% para incidencia y severidad, respectivamente, en la variedad INIAP-Fripapa (Cuesta, 2017).

Para el tratamiento de los cultivos frente a fitopatógenos, los agricultores por varios años han utilizado pesticidas; sin embargo, su aplicación intensiva incrementa los costos de producción convirtiendo al producto en poco competitivo (López, n.d.; Yanggen et al., 2003). Además, podrían causar esterilidad en la tierra y resistencia del

patógeno a los productos químicos (Falconín, 2014). Es así que se requiere investigar posibles formas de biocontrol con la finalidad de reducir el uso de agroquímicos.

Con frecuencia la resolución de problemas científicos ha sido limitada involuntariamente por la tecnología, tiempo o falta de recursos disponibles; haciendo que los investigadores no culminen sus proyectos (Galas et al., 2008). Sin embargo, en la actualidad, se discute el uso de una proyección teórica en el ámbito de las ciencias biológicas pues la teoría también es capaz de hacer predicciones que luego pueden ser probadas experimentalmente (Galas et al., 2008; Goldstein, 2018).

Justificación del problema

En el Ecuador, alrededor de 82 000 productores se dedican al cultivo de papa (Samaniego et al., 2020) y hasta el 2019 han sido 19 675 hectáreas de terreno cultivadas, generando un total de 275 346 toneladas (INEC, 2020). La papa se consume comúnmente en estado fresco, pero a nivel industrial, en el mercado nacional e internacional, se lo procesa como papas fritas, a la francesa, congeladas, y enlatadas; incluso del procesamiento de la cáscara se puede obtener almidón, alcohol y celulosa (Andrade et al., 2002).

La papa se ha ubicado como recurso alimenticio y fuente de ingresos importante para las comunidades rurales, así como para la economía nacional, por ende, los agricultores deben asegurar la calidad de su producto. Este tubérculo se ha visto afectado por *Rhizoctonia solani* Kühn, agente causal de la rizoctoniasis o costra negra, enfermedad fúngica que puede acabar con hasta el 25% de un cultivo o la pérdida total de los cultivares si no es controlada a tiempo (Agrios, 2005; I. Castro & Contreras, 2011).

En la actualidad se investigan métodos de control biológico útiles contra las enfermedades de los cultivos para minimizar los problemas relacionados al uso excesivo de pesticidas químicos, pérdida de grandes extensiones de cultivos así como económicas (Yanggen et al., 2003).

Estudios anteriores establecen como una opción de biocontrol a los actinomicetos, especialmente al género *Streptomyces*, ya que estas bacterias se caracterizan por la producción y síntesis de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana frente a ciertos fitopatógenos (Bhatti et al., 2017; Reyes et al., 2015).

La selección, mantenimiento e identificación de actinobacterias productoras de compuestos inhibidores del crecimiento de fitopatógenos sería una alternativa sustentable en actividades de producción agrícola, permitiendo crecer el campo de la agrobiotecnología.

Los enfoques teóricos de problemas biológicos deben reconocerse como un componente importante e integral permitiendo identificar patrones a partir de datos recopilados creando hipótesis, las cuales en un futuro pueden ser la base para el diseño de experimentos logrando un avance en dicha disciplina (Bialek, 2018; Galas et al., 2008).

Por lo tanto, el presente proyecto se centra en determinar la capacidad inhibitoria de extractos crudos obtenidos de cultivos de actinomicetos contra *R. solani* a través de ensayos *in vitro* y proyección teórica, también se argumentará en base a revisión bibliográfica las posibles cepas antagónicas del patógeno.

Objetivos de la investigación

Objetivo general

Determinar la capacidad inhibitoria de los extractos crudos de actinomicetos aislados de suelos paperos de la provincia de Pichincha frente a *Rhizoctonia solani* Kühn mediante ensayos *in vitro* y proyección teórica.

Objetivos específicos

- Activar y replicar las cepas liofilizadas de actinomicetos aisladas de suelos paperos de la provincia de Pichincha.
- Aislar y mantener *Rhizoctonia solani* a partir de tubérculos infectados.
- Obtener extractos crudos a partir de cultivos de actinomicetos mediante fermentación y extracción con cloroformo.
- Evaluar la capacidad inhibitoria de los extractos crudos frente a *Rhizoctonia solani* mediante ensayos *in vitro* discutidos teóricamente.
- Argumentar teóricamente la identificación molecular de las cepas de actinomicetos antagónicas frente a *R. solani*.

Marco teórico

Rhizoctonia solani

Generalidades.

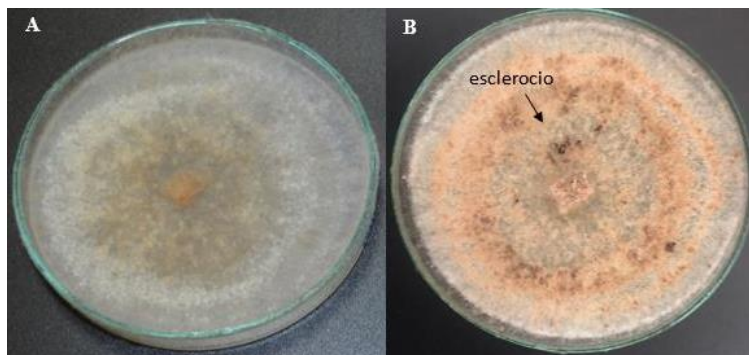
Rhizoctonia solani Khün (forma asexual) es el hongo más frecuente y perjudicial en los suelos paperos del Ecuador (Andrade et al., 2002), agente causal de rizoctoniasis en raíces y tallos y costra negra en tubérculos (Moreno, 2011). Fue descrito

originalmente en papa por Julios Kühn en 1858 y corresponde a la Clase Hyphomycetes. En su forma sexual se lo conoce como *Thanatephorus cucumeris* y pertenece a la Clase Basidiomycetes (Adams, 1988).

De manera natural, *R. solani* presenta reproducción asexual, forma hifas incoloras y mientras maduran pueden llegar a ser amarillas o café (Figura 1). A nivel microscópico el micelio se caracteriza por exhibir células largas multinucleadas ramificadas formando un ángulo recto (90°) con respecto a la hifa principal, también muestra un septo cerca de ella (Agrios, 2005; Albán, 2015; Parmeter & Whitney, 1970), como se observa en la Figura 2. En condiciones especiales, por ejemplo, cuando hay humedad y temperaturas elevadas, producirá esporas sexuales (basidiosporas) (Moreno, 2011).

Figura 1

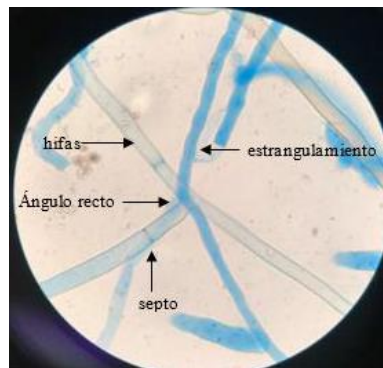
Rhizoctonia solani en medio PDA. A) Cinco días de crecimiento. B) Quince días de crecimiento.



Nota. Tomado de *Crecimiento de Rhizoctonia solani* en medio PDA, de Salazar, 2019.

Figura 2

Observación microscópica de Rhizoctonia solani



Nota. Tomado de *Estructura microscópica de R. solani, (100X)*, de Salazar, 2019.

Este hongo tiene la capacidad de anastomosarse, es decir que forma estructuras de resistencia (esclerocios), hifas agrupadas entrelazadas con superficies duras (Parmeter & Whitney, 1970). Hasta la actualidad se conocen catorce grupos de anastomosis (GA), diferenciándose entre sí por su rango de hospederos, virulencia, características morfológicas, bioquímicas y moleculares (Bienkowski, 2012). Los GA que afectan a la papa son GA2, GA3, GA4, GA5 y GA7 (Edifarm, 2008), siendo el GA3 el causante de formar los esclerocios en la superficie del tubérculo. El GA4 no forma esclerocios, pero es el más patogénico pues soporta temperaturas elevadas (Guzmán, 2014).

Ciclo de la enfermedad.

El proceso de infección inicia por un inóculo, la forma más común de propagación del hongo es mediante esclerocios o micelio presentes en tubérculos-semilla o suelo contaminado (Aqeel et al., 2018). En condiciones favorables los esclerocios inician su geminación al ser estimulados por la presencia de exudados procedentes del crecimiento celular de las plantas (Moreno, 2011). Brotes, estolones, raíces y bases del tallo pueden ser afectados. El micelio adulto comienza a crecer sobre

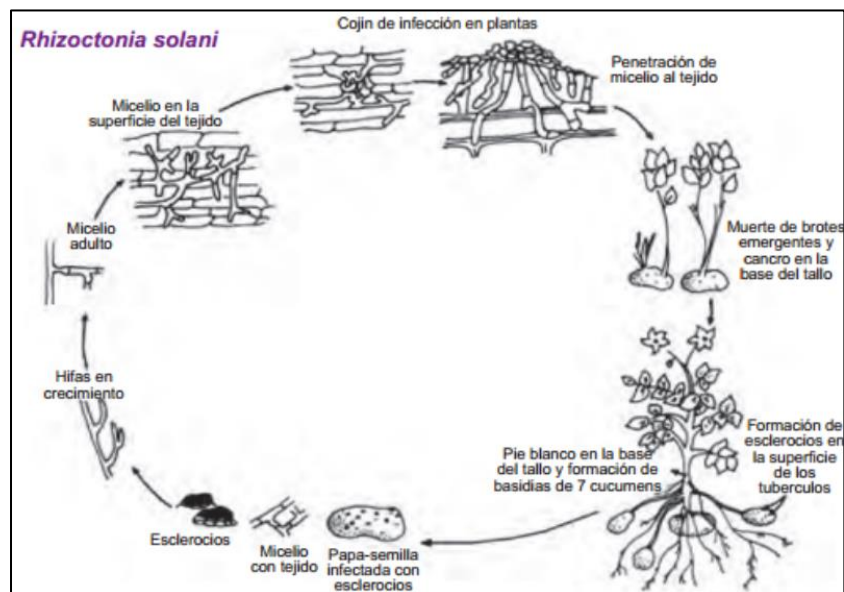
la superficie de la planta, las hifas principales se ramifican en hifas laterales cortas, dando como resultado un agregado hifal o cojín de infección (I. Castro & Contreras, 2011; Keijer, 1996). Bajo este cojín el hongo destruye las células de la capa superficial y penetran el tejido del hospedero. El proceso de infección y penetración es mediado por enzimas extracelulares como cutina, celulosa y pectina (Moreno, 2011).

Las plantas infectadas presentan chancro en la base del tallo y su crecimiento es débil, incluso los brotes emergentes pueden morir. La formación de nuevos esclerocios en los tubérculos se puede dar en cualquier instante, no obstante, su desarrollo es favorecido cuando la planta muere y estos se quedan bajo tierra por un periodo largo de tiempo (Acuña & Araya, 2017; Albán, 2015). Los esclerocios que se mantienen tanto en tubérculos y en el suelo, proporcionan un nuevo inóculo para otro período de crecimiento. El ciclo de la enfermedad se puede observar en la Figura 3.

El hogo se desarrolla favorablemente en un ambiente que presenta una temperatura entre 15 y 18°C, alta humedad y un pH neutro o ácido (Agrios, 2005).

Figura 3

*Ciclo de la enfermedad causada por *Rhizoctonia solani**



Nota. Tomado de Manejo de plagas y enfermedades en el cultivo de papa (p. 28), por I. Castro & Contreras, 2011.

Sintomatología.

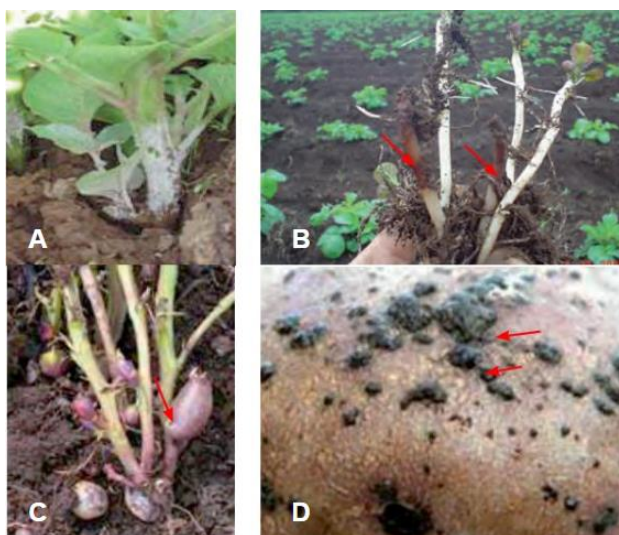
Los síntomas de la enfermedad pueden observarse tanto en la zona aérea como subterránea de la planta (Figura 4) (S. B. Johnson & Leach, 2003).

El hongo ataca a brotes germinales subterráneos generando retraso en la emergencia, si la infección se da cerca o en la punta estos pueden morir (I. Castro & Contreras, 2011). En tallos subterráneos y estolones las lesiones se identifican por su color superficial marrón rojizo. En tubérculos maduros se da la formación de esclerocios, que aparecen como pequeñas costras irregulares negras o marrones sobre la superficie con apariencia de tierra seca (Albán, 2015).

Si la infección es muy severa interferirá con el movimiento del agua y carbohidratos dentro de la planta, causando la formación de tubérculos aéreos y estrangulamiento de los tallos. A medida que avanza la enfermedad, en la línea del tallo se puede observar una mancha blanquecina con apariencia algodonosa o polvorienta (Edifarm, 2008). Respecto a la zona aérea Trujillo & Perera (2009) mencionan que las hojas apicales pueden adquirir una tonalidad púrpura en forma de roseta y enrollarse en dirección del haz, mostrando su envés.

Figura 4

Síntomas causados por Rhizoctonia solani en planta de papa



Nota. Sintomatología de rhizoctoniasis: A) Tallos de papa infectados. B) Cancro en brotes germinales. C) Formación de tubérculos aéreos. D) Esclerocios en la superficie del tubérculo. Tomado de Manejo de plagas y enfermedades en el cultivo de papa (p. 26), por I. Castro & Contreras, 2011.

Métodos de control de la enfermedad.

Con el fin de disminuir o eliminar las poblaciones del hongo, así como las condiciones para su desarrollo y de esta manera reducir el porcentaje de pérdidas producidas se emplean diferentes estrategias. El control químico con fungicidas es el más utilizado por los agricultores, mediante la aplicación directa en el suelo o en el proceso de desinfección de la semilla en etapas de pre-almacenamiento y pre-plantación (Peinado, 2018). Otra opción es el control biológico empleando organismos vivos o sus productos que sean antagonistas al patógeno, dentro de estos se encuentran las cepas de *Trichoderma horizanum.*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas* (Falconín, 2014; Hernández et al., 2018 & Sánchez Pila, 2016).

Para tener mejores resultados junto con el control químico o biológico se debe tener un manejo adecuado del cultivo, es así que se sugiere el uso de semillas certificadas o desinfectadas previamente, rotación de cultivos de al menos 3 a 4 años preferiblemente con gramíneas, realizar la siembra a una profundidad de 8 a 10 cm con el fin de favorecer una rápida emergencia y disminuir los daños en brotes y tallos nuevos (Acuña & Araya, 2017).

Control biológico.

Emplear agroquímicos es uno de los métodos más utilizados debido a su rápida acción frente a fitopatógenos (Peinado, 2018). Villarreal (2013) evaluó la capacidad de diversos pesticidas frente a *Rhizoctonia solani* y *Spongospora subterránea*, obteniendo un 99.76% y 99.26% de tejido sano al aplicar Fludioxonil y Axosistrobin respectivamente. Sin embargo, el uso inadecuado de estos productos puede ocasionar daños graves en el ecosistema así como en la salud de personas y animales por su

toxicidad y persistencia en el medio ambiente (Pérez, 2011). Incluso el patógeno podría generar resistencia debido a la aplicación de dosis no establecidas (Serrano & Galindo, 2007). En la actualidad, se buscan nuevas estrategias, como el uso de alternativas biológicas, para el control de plagas y así fomentar una agricultura sostenible (Falconín, 2014; Franco, 2009).

El control biológico es la utilización de organismos vivos, de origen natural o modificados, o de sus productos para impedir o disminuir los daños y pérdidas causadas por organismos nocivos (Guedez & Castillo, 2009). Entre los mecanismos implicados en el control biológico se encuentran: competencia, antibiosis, secreción de enzimas, resistencia sistémica y parasitismo. El antagonismo se puede dar incluso por la combinación de dos o más vías ya mencionadas (Ferrera & Alarcón, 2010).

Para emplear microorganismos antagonistas de patógenos se requiere cumplir con una serie de estudios. En primer lugar, se seleccionan los posibles microorganismos controladores de fitopatógenos, a continuación, se realiza la identificación de los mecanismos de acción y finalmente se desarrolla una formulación que se pueda producir a gran escala (Pérez, 2005).

Varios microorganismos aislados de la rizósfera han sido identificados, multiplicados y formulados para su comercialización. Entre estos se encuentran *Trichoderma spp.*, *Gliocladium spp.*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* y *Actinomyces* (Andrade et al., 2002).

Actinomicetos

Generalidades.

Los actinomicetos forman parte del filo de las Actinobacterias, son bacilos Gram positivos caracterizados por desarrollar un micelio filamentososo que puede ser aéreo o del sustrato, su genoma presenta un elevado contenido en guaninas y citosinas (51-78% G+C) (Bhatti et al., 2017; Guevara, 2017; Romero, 2014; Sharma et al., 2014).

Anteriormente se creía que estos microorganismos pertenecían a los hongos, pero tras varios estudios se pudo comprobar y agruparlos en el dominio bacteria (Anandan et al., 2016) debido a que su pared celular está conformada por péptidoglicano, el diámetro de las hifas es menor al de los hongos (0.5 a 2.0 μm) y muestran resistencia a los antifúngicos, pero son sensibles a los antimicrobianos (Barka et al., 2016; Bergey et al., 2000; Franco, 2008).

Su distribución es amplia, se encuentran en el suelo y ambientes acuáticos, especialmente en los sedimentos debido al alto contenido de materia orgánica (Bhatti et al., 2017; Quiñones et al., 2016). Pueden ser aerobios y otros anaerobios, la mayoría son mesófilos y crecen a temperaturas entre 20 y 35°C, son poco resistentes a la acidez, presentando un óptimo desarrollo a pH 6.5 a 8 (Barka et al., 2016; Franco, 2008). Los géneros aislados más frecuentemente del suelo son: *Streptomyces* con un porcentaje de 70 al 90 %, *Nocardia* con un 10 a 30 % y un 1 a 15% corresponde a *Micromonospora* (Quiñones et al., 2016). Algunas especies del género *Streptomyces*, se caracterizan por su olor típico a tierra húmeda, debido a la producción de geosmina y 2-metilsoborneol (Sharma et al., 2014).

Importancia de los actinomicetos.

Este grupo de bacterias juega un papel importante debido a la producción de una amplia gama de metabolitos secundarios bioactivos.

Entre los actinomicetos, aproximadamente 7 600 compuestos son producidos por especies de *Streptomyces*. Varios de estos metabolitos secundarios son antibióticos potentes, como estreptomicina, gentamicina, rifamicina y eritromicina. Por tal motivo han sido reconocidos como los principales organismos productores de antibióticos en la industria farmacéutica (Sharma et al., 2014).

En el campo de la agricultura también han presentado un gran beneficio en el desarrollo de las plantas o como agentes de biocontrol frente a fitopatógenos (Bhatti et al., 2017). Los actinomicetos producen fitohormonas, por ejemplo las auxinas o sideróforos, dichos compuestos ayudan al crecimiento y desarrollo de raíces u optimizan la absorción de nutrientes, por ello se las considera bacterias promotoras del crecimiento vegetal (Franco & Chavarro, 2016; Khamna et al., 2009). También, pueden sintetizar enzimas extracelulares derivadas de rutas metabólicas, como celulasa, β -1,3-glucanasa y quitinasa, quienes participan en la lisis involucrada en la digestión de paredes celulares, debilitando la integridad estructural y viabilidad de microorganismos patógenos (Patil et al., 2010).

Cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.)

Descripción botánica y morfología.

La papa es una planta herbácea, dicotiledónea, anual que pertenece a la familia vegetal de las Solanáceas, género *Solanum*, especie *S. tuberosum* L. (Andrade et al.,

2002; Padmanabhan et al., 2016). Está provista por dos sistemas: el sistema aéreo conformado por el tallo, hojas, flores y fruto y el sistema subterráneo que incluye la raíz, estolones y tubérculos como se observa en la Figura 5 (Huarte & Capezio, 2013).

La reproducción de la planta de papa puede ser mediante una semilla verdadera o un tubérculo. Al venir de una semilla sexual, forma una raíz axonomorfa ramificada y un tallo aéreo principal. Si se utiliza un tubérculo como semilla vegetativa, la planta presentará raíces adventicias ramificadas que nacen de cada brote y posteriormente de los nudos de los estolones, además producirá varios tallos (Monroy, 2005; Venturini, 2003).

El tallo es leñoso y grueso, puede ser hueco o meduloso, generalmente verde o rojo púrpura y su follaje logra alcanzar alturas entre 0.60 a 1.50 m (Andrade et al., 2002).

Los tallos subterráneos laterales o estolones se originan a partir de las yemas de los tallos que están por debajo del suelo, en ocasiones dan lugar a tubérculos debido al ensanchamiento del extremo terminal (Padmanabhan et al., 2016).

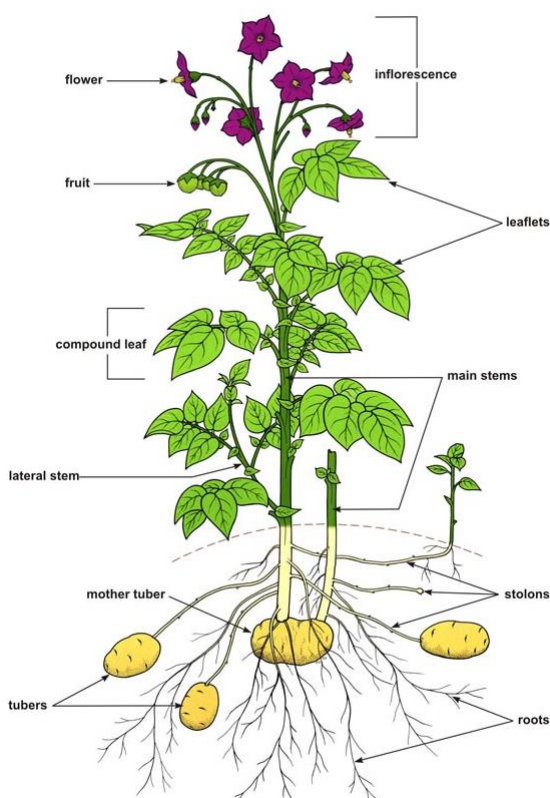
El tubérculo es morfológicamente un tallo modificado carnoso con yemas, cejas (axilas de hojas escamosas) y ojos. La forma y el tamaño del tubérculo cambia según las variedades comerciales de papa, puede ser redondo, oblongo, ovalado o irregular y normalmente pesan 300 g (Monroy, 2005).

Las hojas compuestas y pinnadas se distribuyen a lo largo del tallo alternadamente, la inflorescencia de la planta de papa presenta varias flores dispuestas en cima o en umbela. Las flores son bisexuales y los pétalos pueden ser de color blanco, amarillo, púrpura o azul (Venturini, 2003).

El fruto es una baya carnosa que contiene a las semillas sexuales, su longitud varía entre 1 a 4 cm. Presenta diferentes formas, generalmente es redonda pero también puede ser alargada, ovalada o cónica (Inostroza, 2009).

Figura 5

Planta de papa (Solanum tuberosum L.)



Nota. Tomado de *Cómo crecen las papas*, por Centro Internacional de la Papa, 2019, (<https://cipotato.org/es/lapapa/como-crecen-las-papas/>)

Importancia del cultivo.

La papa (*Solanum tuberosum L.*) forma parte de la dieta básica de la población a nivel mundial debido a su alto contenido de agua (80%) y materia seca conformada por carbohidratos, proteínas, celulosa, minerales, vitaminas A, C y complejo B (Molina, J.

Santos, B. Aguilar, 2004; Samaniego et al., 2020). Se ha ubicado dentro los productos más importantes, tanto por su aporte nutricional como por su tasa de consumo y ocupa el cuarto lugar después del maíz, el trigo y el arroz (Devaux et al., 2010).

La papa es uno de los tubérculos más importantes en la región interandina. En Ecuador, el 97% de la producción tiene lugar en la Sierra ya que predomina el tipo de suelo negro andino, principalmente en la zona norte (Carchi, Pichincha) con 60%, y en la zona central (Chimborazo, Tungurahua, Cotopaxi) con 25%, donde se siembra casi todo el año (Cuichán et al., 2019). Al ser un cultivo básico, se constituye como una fuente de ingreso para pequeños y grandes productores (Andrade et al., 2002; Devaux et al., 2010).

Según el Ministerio de Agricultura en Ecuador el consumo anual es aproximadamente de 30 Kg por persona (MAG, 2018), representado apenas por el 20% de la cosecha, mientras que el porcentaje restante (80%) es comercializado (Samaniego et al., 2020). En el 2019, datos del comercio exterior reportados por el Banco Central indican que las exportaciones del tubérculo (en estado fresco) crecieron en el período octubre – diciembre, llegando a una cifra de 72.6 toneladas, con un valor de 76.2 miles USD; siendo mayor a las 50.2 toneladas exportadas en similar período del año 2018 (BCE, 2020).

Proyección teórica en ciencias biológicas

Una manera de definir la teoría en proyectos de investigación relacionados a ciencias biológicas es como una recopilación de modelos. La mayoría de sistemas biológicos pueden utilizar modelos visuales, matemáticos o físicos para representar aspectos de la naturaleza con fines particulares (Galas et al., 2008).

Para abordar una pregunta de investigación, generalmente los investigadores se basan en modelos conceptuales donde se informa todo el proceso científico, desde las herramientas empleadas, los experimentos realizados, la presentación hasta el análisis de resultados (Galas et al., 2008).

Sin embargo, hay que tener en cuenta que el rol de la teoría también está íntimamente relacionado con las predicciones, las cuales a veces pueden ser erróneas, permitiendo así desarrollar nuevos enfoques y traducirlo a un proceso investigativo con aplicaciones prácticas y a su vez nuevas predicciones (Goldstein, 2018; Shou et al., 2015). Este ciclo debería resultar en una teoría más firme y cuantitativa y en conjunto conformar un sello distintivo en cualquier disciplina científica (Shou et al., 2015).

Hipótesis

Los extractos crudos de los actinomicetos aislados de suelos paperos de la provincia de Pichincha tienen capacidad inhibitoria estadísticamente significativa frente a *Rhizoctonia solani* en ensayos *in vitro* y proyección teórica.

Capítulo II: Materiales y métodos

Participantes

El trabajo de titulación fue realizado por la señorita Nadia Coralía Suquillo Llumiquina, bajo la dirección de la licenciada Alma Koch Kaiser, Mgs. y codirección del ingeniero Andrés Izquierdo PhD.

Zona de estudio

El proyecto se ejecutó en el Laboratorio de Microbiología de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología, ubicado en el Bloque G 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.

Período de tiempo de investigación

El proyecto de titulación se desarrolló entre los meses septiembre 2019 y septiembre 2020.

Procedimiento

Obtención, activación, caracterización y mantenimiento de actinomicetos

Obtención de las muestras.

Las cepas de actinomicetos liofilizadas aisladas de suelos paperos de la provincia de Pichincha en el 2011 fueron proporcionadas por el Laboratorio de Microbiología de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología.

Activación de cepas de actinomicetos liofilizadas.

El proceso de activación de cepas consta de tres etapas, hidratación, siembra e incubación. Se trabajó con cepas de actinomicetos aisladas en el año 2011 de suelos paperos de la provincia de Pichincha.

El proceso de hidratación se probó con dos soluciones. En tubos eppendorf de 1.5 mL se colocó 1 000 μ L de agua peptonada estéril 0.1% p/v o solución salina 0.9% p/v, a continuación se resuspendió cada cepa liofilizada y se las mantuvo en reposo por 2 h (Modificado de: Franco et al., 2009; Pérez, León, & Galindo, 2015).

Una vez que las cepas fueron hidratadas, la siembra se realizó en medio de cultivo Agar Almidón Caseína (AAC) con pH 6.8 (Modificado de: Pérez, León, & Galindo, 2015). Cada tubo que contenía la muestra fue agitado en un vórtex durante 30 segundos (Robalino, 2018). A continuación, se colocó 50 μ L de la suspensión en el centro de la caja Petri y se esparció con un triángulo de vidrio por toda la superficie del medio de cultivo. Las cajas Petri se incubaron por 11 días a 25 °C (Modificado de: Franco et al., 2009).

Caracterización morfológica de actinomicetos.

Para corroborar que el cultivo no presentaba contaminación, se analizaron las características macroscópicas; tomando en cuenta tamaño, color, forma y textura de las colonias, así como las características microscópicas mediante tinción Gram para verificar que se trataba de bacilos e hifas Gram positivos (Sheik et al., 2017).

Replicación y mantenimiento de actinomicetos.

Los cultivos puros fueron refrescados mediante siembra por estriado compuesto cada 30 días en el mismo medio de cultivo e iguales condiciones de incubación (Robalino, 2018).

Aislamiento de Rhizoctonia solani

Desinfección y siembra de la muestra.

El hongo *Rhizoctonia solani* fue aislado de tubérculos de papa que presentaban síntomas típicos (esclerocios en la superficie) de la enfermedad.

Para la desinfección, los tubérculos fueron lavados con agua corriente hasta retirar el exceso de tierra, se cortaron en trozos pequeños y se esterilizaron con solución de hipoclorito de sodio al 3% durante 3 min, seguido fueron lavados con agua destilada estéril tres veces, retirando así residuos de cloro y se secaron con papel toalla estéril (Castillo, 2004).

Finalmente, los trozos que presentaban mayor cantidad de esclerocios fueron sembrados en el centro de las cajas Petri con medio agar papa dextrosa (PDA), suplementado con antibiótico cloranfenicol 0.1 g/L y se incubaron a temperatura del laboratorio de 25 ± 2 °C (Aqeel et al., 2018).

Cuando el micelio mostró crecimiento, se tomó un implante de 25 mm² y se lo sembró en una nueva caja Petri, incubándolo en iguales condiciones. Se repitió este procedimiento hasta conseguir cultivos puros (Salazar, 2019).

Caracterización de *Rhizoctonia solani*.

La identificación macroscópica del hongo se realizó en base a los caracteres detallados previamente por Parmeter & Whitney (1970), para esto se tomó en cuenta el color, forma y textura del micelio y presencia o ausencia de esclerocios.

Para la caracterización a nivel microscópico, se utilizó la tinción de hongos con azul de lactofenol. Con un pedazo de cinta adhesiva transparente se tomó una muestra del micelio para luego adherirla sobre un portaobjetos que contenía una gota del colorante (Guzmán, 2014). La observación de las placas se hizo mediante un microscopio con un aumento de 40X.

Replicación y mantenimiento de *Rhizoctonia solani*.

Para la replicación de *Rhizoctonia solani* se colocó implantes de 25 mm² del micelio en medio de cultivo PDA con Cloranfenicol y se incubó a temperatura de 25 ± 2 °C (Rodríguez et al., 2014).

El mantenimiento del hongo consistió en la resiembra cada cuatro semanas en el mismo medio de cultivo e iguales condiciones de incubación que la replicación.

Obtención de extractos crudos a partir de actinomicetos

Fermentación.

El proceso de fermentación para la obtención de los extractos crudos se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 40 mL de medio de cultivo caldo glicerol extracto de levadura (YGB). Los matraces fueron inoculados con cada cepa de actinomiceto y cubiertos con papel aluminio. Se incubaron durante 10 días a

28°C con agitación de 230 rpm (Gutiérrez, 2017). Se realizaron dos repeticiones para cada cepa.

Preparación de los extractos crudos.

Después del tiempo de incubación establecido para descartar contaminación de los cultivos, se realizó una tinción Gram.

A continuación se procedió con la obtención de los extractos siguiendo la metodología de Gutiérrez (2017) teniendo en cuenta ciertas modificaciones. Primero los cultivos puros fueron transferidos a tubos falcon estériles de 50 mL y se centrifugaron a 4000 rpm durante 25 min y 4 °C, luego el sobrenadante fue separado mediante filtración con gasa estéril y filtro Millipore en nuevos tubos falcon estériles de 50 mL para su procesamiento.

El sobrenadante se colocó en un embudo de separación, luego se añadió cloroformo en proporción 1:1 v/v, se agitó vigorosamente y se dejó reposar una noche. La fase inferior (fase orgánica) fue recuperada en balones previamente pesados y concentrada en un Rotavapor. Se realizaron dos lavados adicionales con cloroformo para recuperar y concentrar la mayor cantidad de la fase orgánica. A continuación, se pesaron nuevamente los balones, por último, los extractos fueron resuspendidos en 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) al 5% y transferidos a tubos Eppendor de 1.5 mL. Los extractos permanecieron almacenados a 4 °C para posteriores ensayos.

Cálculo de la concentración del extracto obtenido.

De acuerdo a lo descrito por Romero (2014), para obtener una concentración aproximada de los extractos se pesaron los balones utilizados para el rotavapor, antes

(balón vacío) y después (balón + extracto) de este proceso, permitiendo calcular el peso seco del extracto de cada cepa sobre mililitro de DMSO 5%, (Formula 1).

$$\text{Concentración del extracto} = \frac{(\text{balón + extracto})(\text{mg}) - \text{balón vacío (mg)}}{1 \text{ mL DMSO}_{5\%}}$$

$$(1) \quad \text{Concentración del extracto} = \text{peso extracto (mg)} / \text{mL DMSO}_{5\%}$$

Identificación molecular de las cepas de actinomicetos

Extracción y cuantificación de ADN genómico.

Para la extracción de ADN, las cepas de actinomicetos fueron cultivadas en tubos de ensayo con 5 mL de medio caldo glicerol extracto de levadura (YGB) durante 14 días a 27 °C. Los tubos se colocaron en posición horizontal dentro de la incubadora y fueron agitados manualmente una vez cada día (Modificado de: Caro, 2016).

Luego de cumplir con el tiempo de incubación se comprobó la pureza de los cultivos mediante tinción Gram y se procedió con el protocolo de extracción CTAB propuesto por Navarrete (2019).

Los tubos de ensayo fueron homogenizados y se transfirió 1.5 mL del contenido a microtubos Eppendorf de 2 mL con tres perlas de ebullición, se centrifugó a 14 500 rpm por 5 minutos y se desechó el sobrenadante. Este procedimiento se repitió hasta agotar el total del cultivo del tubo de ensayo, obteniendo así un pellet de biomasa del actinomiceto. A continuación, se colocó 1 mL de buffer de extracción (Anexo A) y se agitó en un vórtex durante 4 min, observando la formación de espuma. Luego en cada tubo Eppendorf se añadió 400 µL de cloroformo:isoamil-alcohol (24:1), se homogenizó en un vórtex por 2 min y se llevó a incubación durante 30 min a 50°C y 300 rpm en un

termobloque, agitando los tubos manualmente cada 10 min. Se dejó reposar los tubos por 10 min a temperatura ambiente y luego se centrifugó a 14 000 rpm durante 10 min, consiguiendo así la formación de tres fases. La fase superior fue transferida a un nuevo tubo Eppendor sin perlas, evitando topar la interfase. Se agregó isopropanol frío en una proporción 1:1, se invirtió suavemente para homogenizar y se llevó a -20 °C por una hora para precipitar el ADN.

Después de este tiempo las muestras fueron centrifugadas a 14 500 rpm durante 5 min y se descartó el sobrenadante. El lavado del pellet de ADN se realizó por duplicado, para ello se colocó 500 µL de etanol al 70% filtrado, se centrifugó a 14 000 rpm por 3 min y se descartó el sobrenadante. Posteriormente los tubos se colocaron en posición invertida cerca del mechero durante una hora. Finalmente, el pellet fue resuspendido en 50 µL de agua ultrapura más 2 µL de RNAsa y se incubó en un termobloque a 37°C durante 30 minutos.

La concentración de ADN de cada aislado fue medida en un nanodrop; cada muestra se ajustó a una concentración de 100 ng/µL y fueron almacenadas a -20°C para análisis posteriores.

Amplificación del gen 16S del ADN ribosomal.

La amplificación del gen 16S del ADN ribosomal se realizó mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) empleando el par de cebadores universales 27 F (5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3') y 1492 R (5' CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT 3') (Weisburg et al., 1991) .

La preparación de la mezcla de reacción se realizó dentro de la cámara de flujo laminar, se utilizó el reactivo GoTaq® Green Master Mix (Promega) siguiendo las

especificaciones del manual para un volumen de 25 μL (Tabla 1). Cada reacción se trabajó con un control negativo (en lugar de ADN se añadió 0.5 μL de agua de PCR) y un control positivo (ADN de un aislado de *Bacillus licheniformis*).

Tabla 1

Volúmenes de los reactivos empleados en la PCR para un volumen total de reacción de 25 μL

Reactivo/Concentración	Volúmenes por reacción (μL)
GoTaq® Green Master Mix (2X)	12.5
Cebador Reverse (10 μM)	1.25
Cebador Forward (10 μM)	1.25
ADN (100 ng μL^{-1})	0.5
Agua libre de RNAsa	9.5
Volumen total de reacción	25.0

Nota. Tomado de *Usage Information*. Promega, 2017.

Las muestras fueron colocadas en el termociclador, la amplificación se ejecutó en 30 ciclos. El programa de PCR se detalla en la Tabla 2.

Tabla 2

Configuración del termociclador para la amplificación del gen 16S con primers 27F y 1492R

Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
94 °C	5 min	1
94 °C	30 s	30
57 °C	45 s	
72 °C	3 min 30 s	
72 °C	7 min	1
4 °C	10 min	1

Nota. Tomado de “Production of endoglucanase by a novel strain *Streptomyces* sp. TKJ2 and its optimization under submerged fermentation” (p.20), por A. Bettache et al., 2015, *BioTechnology an Indian Journal*.

Electroforesis.

Los productos de PCR se visualizaron mediante una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.5% preparado con 40 mL de tampón TAE 1X y 2 µL de SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen). El gel se cargó con 3 µL del marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen), a continuación, cada pocillo fue cargado con un volumen total de 7 µL, el cual consistía en la mezcla de 3 µL del producto de PCR más 4 µL del Buffer de carga GoTaq Green. Una vez cargadas las muestras se corrió el gel a 90V por 35 min (Modificado de: Robalino, 2018).

Finalizada la electroforesis se reveló el gel en un transiluminador permitiendo observar el tamaño de las bandas de la región amplificada.

Proyección teórica

A continuación, se detalla la metodología que se hubiera realizado experimentalmente, pero que no pudo ser completada debido a la emergencia sanitaria COVID-19, a las medidas de suspensión laboral presencial y restricción de circulación peatonal, así como vehicular decretada por el Gobierno Nacional a partir del día 17 de marzo de 2020 por cinco meses.

Secuenciación y análisis de similitud.

Los productos de PCR de interés se envían a Korea de Sur a la empresa Macrogen Inc. para su secuenciación. Una vez recibidas las secuencias de cada aislado, se ensamblan mediante el software GENEIOUS, a continuación, se realiza el alineamiento de las secuencias consenso en formato FASTA usando la herramienta BLAST de la base de datos del NCBI (*National Centre for Biotechnology Information*) (Robalino, 2018).

Prueba de inhibición de los extractos crudos frente a *Rhizoctonia solani*.

Para las pruebas de inhibición se aplica un diseño experimental en bloques completos al azar (DBCA) con seis repeticiones por cada tratamiento donde se incluye a un control el que permite evaluar la viabilidad y crecimiento de *Rhizoctonia solani* sin influencia del extracto.

La actividad inhibitoria de las muestras se evalúa utilizando el método de difusión en pocillos. En cajas Petri, con medio PDA y con la ayuda de un sacabocados de 5 mm, se realizan tres pocillos equidistantes (forma de triángulo) a 3 cm de distancia desde el centro de la caja. A continuación, con una micropipetra se coloca 50 µL del

tratamiento correspondiente. Los tratamientos empleados son los extractos crudos de cada cepa de actinomiceto a una concentración de 4 mg/mL y como tratamiento control se emplea DMSO 5%. Por último, en el centro de la caja se siembra un implante de 25 mm² del fitopatógeno y se incuba a 25 °C, durante 10 días (Modificado de: Guzmán, 2014).

Para obtener los valores del crecimiento radial del hongo, con un calibrador digital se mide a partir del implante, en línea recta, hacia el centro del pocillo; estas medidas se toman diariamente (Modificado de: Guzmán, 2014).

Análisis estadístico de datos.

Mediante revisión bibliográfica se recolectaron resultados de ensayos de inhibición contra *Rhizoctonia solani* presentados en otros estudios, los cuales permitieron construir en Excel 2010 de Microsoft una base de datos tomando en cuenta los siguientes parámetros: Tratamiento, Tiempo de incubación en días y Crecimiento del patógeno en milímetros.

La parte estadística de la base de datos generada se realizó con ayuda del programa InfoStat-Statistical Software para Windows. Se aplicó la prueba de bondad de ajuste de Kolmogorov para conocer si los datos ($n > 50$) siguen una distribución normal y la prueba de Levene para saber si las varianzas son homogéneas, luego se realizaron los análisis no paramétricos de Friedman y Kruskal Wallis para determinar la existencia de diferencias significativas en los tratamientos y su interacción con los días de incubación (Romaina, 2012).

Capítulo III: Resultados

Activación de cepas liofilizadas de actinomicetos

Trascurrido los once días correspondientes al tiempo de incubación de los liofilizados se revisaron las placas de Agar Almidón Caseína (AAC) observando colonias secas, fuertemente adheridas al agar y de apariencia rugosa, granulosa o polvosa, con o sin producción de pigmento, estas fueron evaluadas microscópicamente (Figura 6) y sembradas por estriado compuesto en cajas con el mismo medio de cultivo obteniendo así cultivos puros.

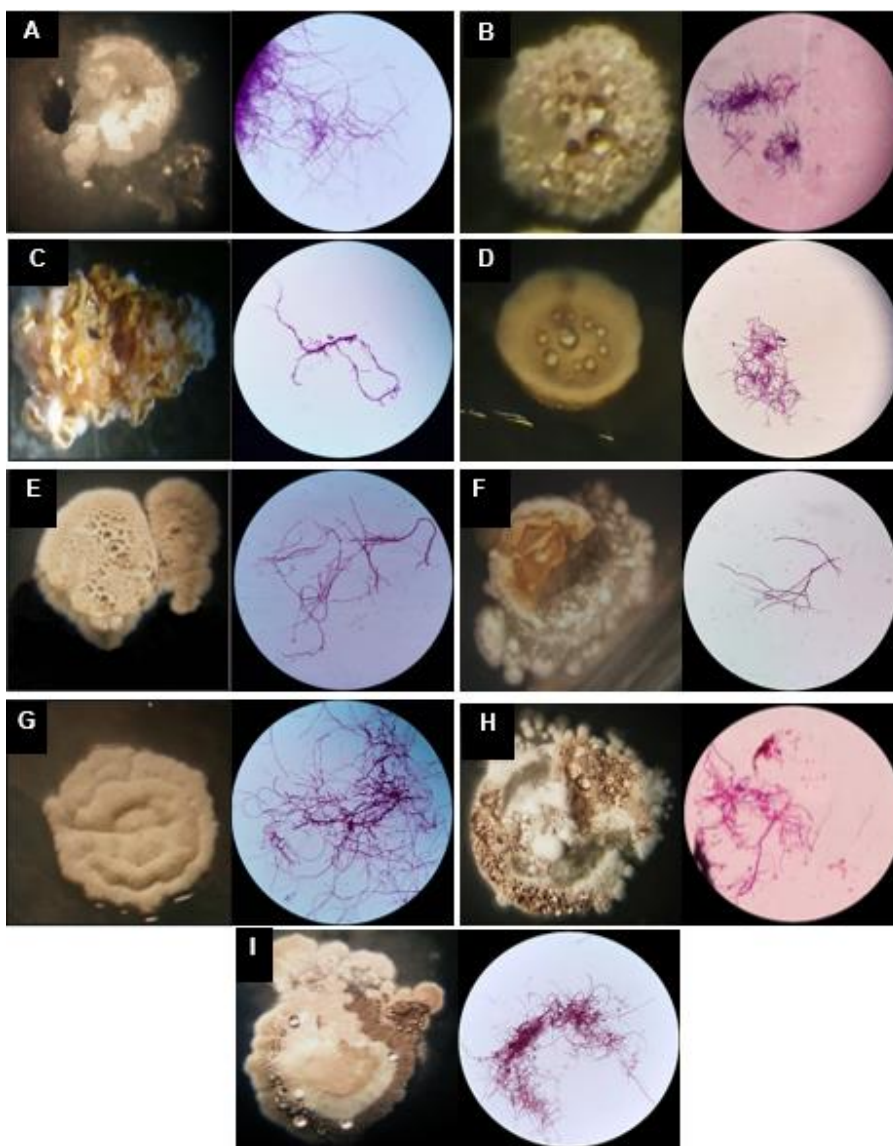
Caracterización morfológica de actinomicetos

A nivel macroscópico se observó crecimiento con bordes y elevación irregular, consistencia áspera, algunas cepas presentaron exudado a manera de gotas pequeñas sobre las colonias. Los aislados exhibieron una variedad de colores, predominando el blanco grisáceo, también se pudo notar la producción de pigmentos debido al cambio de coloración en el medio (Figura 7). Las características de cada cepa se detallan en el Anexo B. De todos los cultivos se pudo percibir el olor a tierra húmeda.

Respecto a la identificación microscópica, mediante tinción Gram se pudo observar bacterias Gram positivas en forma de bacilos, presencia de hifas ramificadas y esporas teñidas como se muestran en la Figura 7.

Figura 6

Observación macroscópica y microscópica de cultivos madre de actinomicetos activados

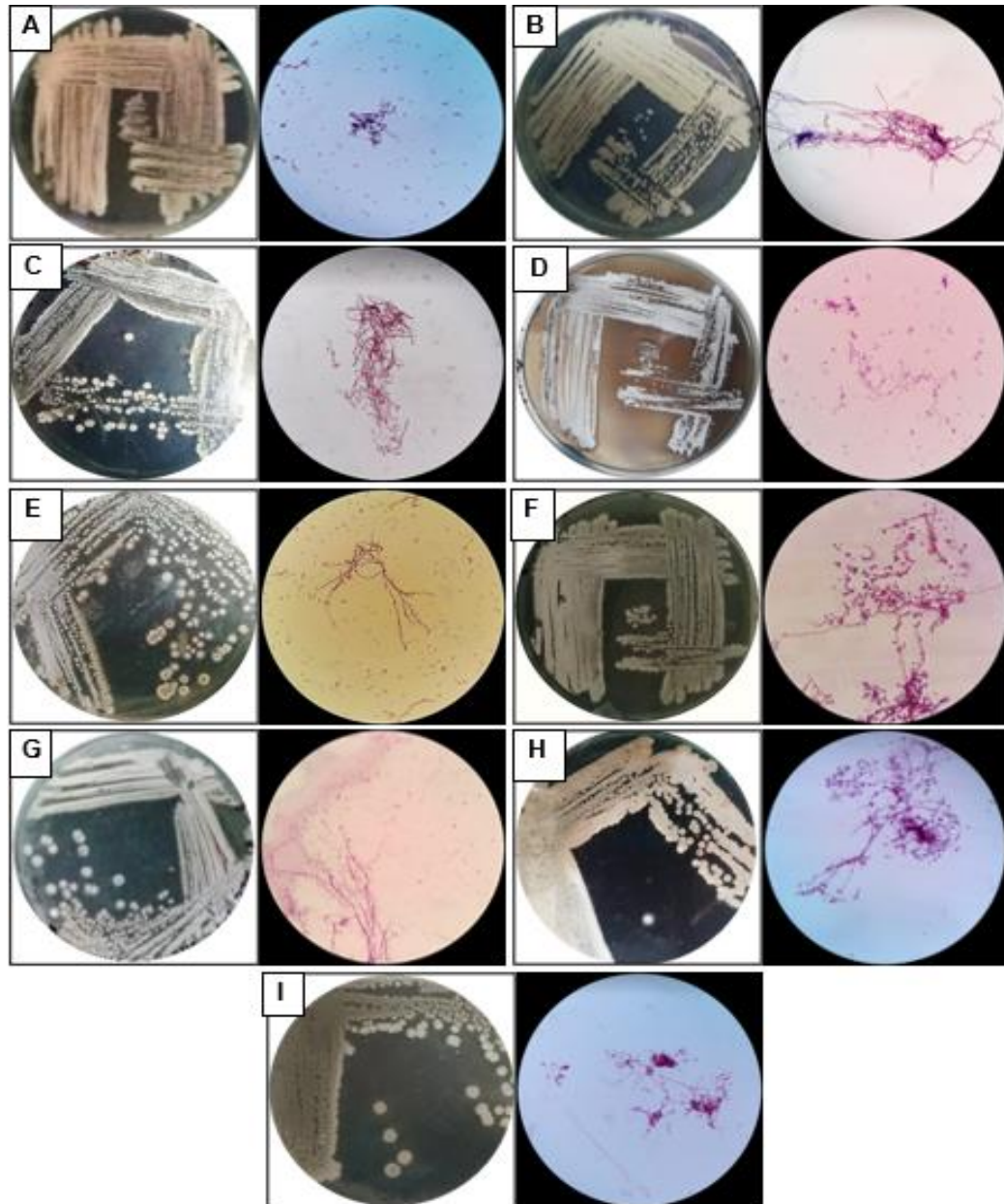


Nota. Vista bajo estereomicroscopio de colonias de actinomicetos y su respectiva tinción Gram vista con aumento de 100X luego de 11 días de incubación en medio AAC.

Cepas: A) P3, B) P8, C) P21, D) P22, E) P25, F) P30, G) P36, H) P37 Y I) P40. Fotos de S. Almeida; C. Constante; N. Suquillo, 2019.

Figura 7

Observación macroscópica y microscópica de cultivos puros de actinomicetos



Nota. Siembra por estriado compuesto de actinomicetos en medio AAC y tinción Gram con aumento de 100X tras 11 días de crecimiento. Cepas: A) P3, B) P8, C) P21, D) P22, E) P25, F) P30 G) P36, H) P37, I) P40. Fotos de S. Almeida; C. Constante; N. Suquillo, 2020.

Aislamiento de *Rhizoctonia solani*

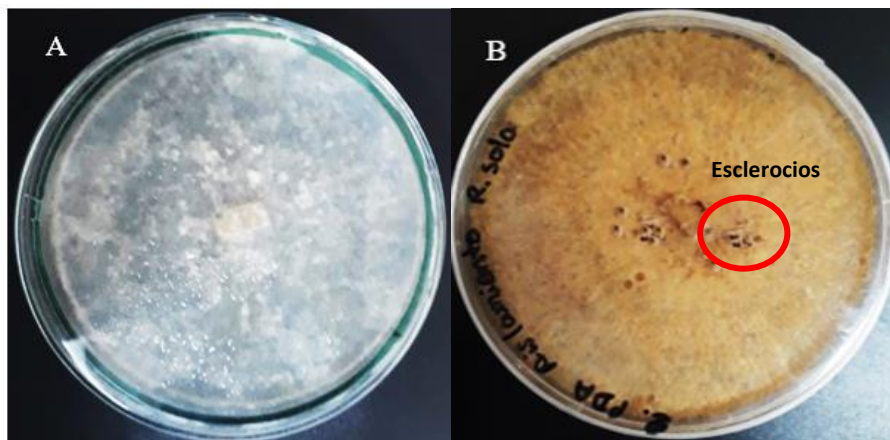
El aislamiento del hongo *Rhizoctonia solani* fue realizado a partir de tubérculos de papa que presentaban esclerocios en la superficie. Pequeños trozos fueron sembrados en cajas con medio PDA, permitiendo así obtener cultivos puros del patógeno.

Caracterización morfológica de *Rhizoctonia solani*

Luego de diez días de incubación, se observó el crecimiento de micelio de color blanco con textura algodonosa. Sin embargo, a medida que trascurrieron los días, las hifas se tornaron café e inclusive en algunas cajas se evidenció la presencia de esclerocios, mostrándose como gránulos de color café oscuro y textura dura (Figura 8).

Figura 8

*Caracterización macroscópica de *Rhizoctonia solani**

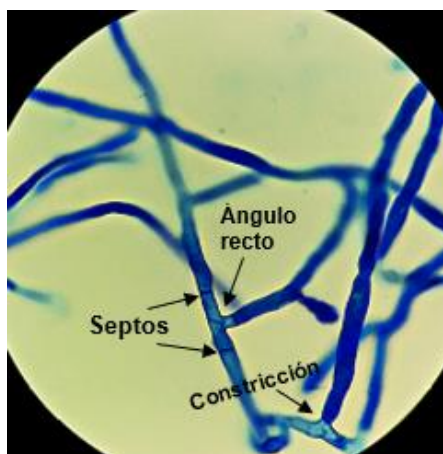


Nota. La imagen permite observar el crecimiento de *R. solani* en medio PDA: A) Luego de diez días de crecimiento. B) Luego de veinte días de crecimiento con presencia de esclerocios.

Para la observación microscópica, se realizó una tinción del hongo con azul de lactofenol. Se pudo observar la ramificación de las hifas formando un ángulo de 90°, la constricción o estrangulamiento y presencia de septos a una corta distancia del punto de origen de las ramas hifales, como se muestra en la Figura 9, permitiendo confirmar que los aislados correspondían a *R. solani*.

Figura 9

Vista microscópica de Rhizoctonia solani, 40X



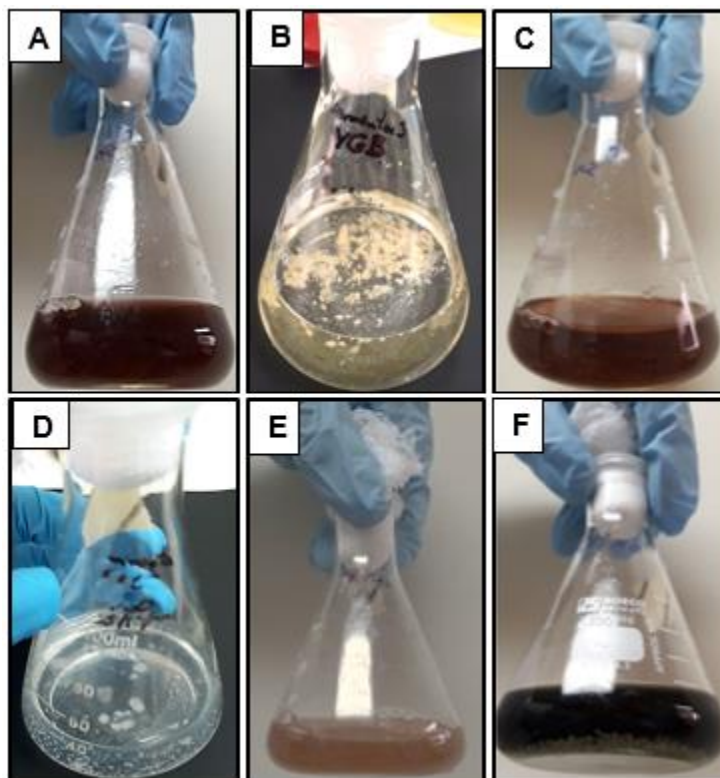
Obtención de extractos crudos a partir de actinomicetos

La obtención de extractos se realizó mediante el proceso de fermentación de cada cepa de actinomiceto durante 10 días en matraces con medio Caldo Glicerol Extracto de Levadura (YGB).

Una vez cumplido con el tiempo de incubación, se pudo observar crecimiento a manera de agregados en el fondo de los matraces, en algunos casos también existió el cambio de coloración del medio líquido (Figura 10).

Figura 10

Crecimiento de actinomicetos en medio YGB

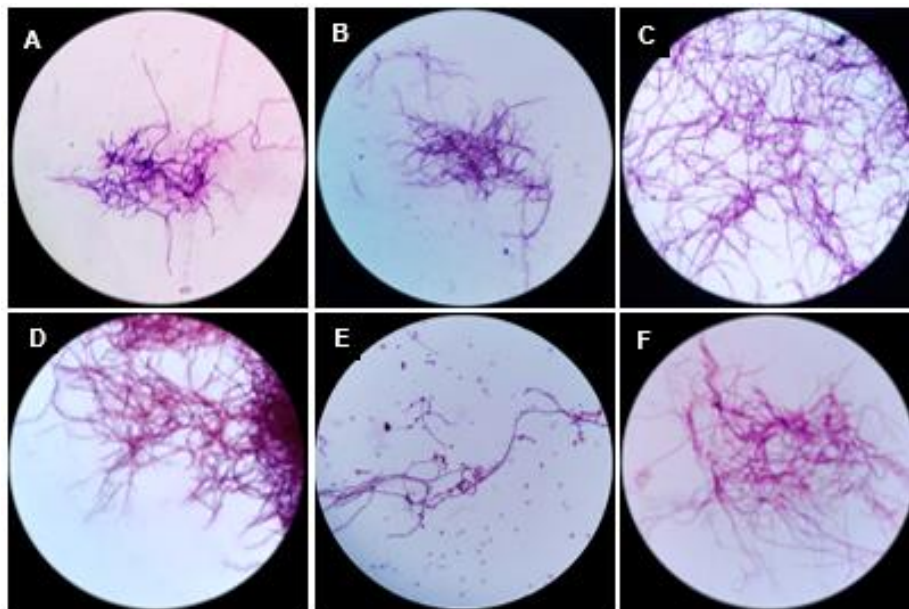


Nota. Crecimiento de las cepas de actinomicetos en medio líquido. Cepas: A) P3, B) P21, C) P22, D) P25, E) P30 y F) P36.

Para asegurarse de que los cultivos estaban puros, se realizó una tinción Gram. Se observó bacilos Gram positivos, formación de hifas alargadas y en algunos casos presencia de esporas (Figura 11).

Figura 11

Identificación microscópica de actinomicetos cultivados en medio YGB



Nota. Tinción Gram de actinomicetos vista bajo microscopio con aumento de 100X.

Cepas: A) P3, B) P21, C) P22, D) P25, E) P30 y F) P36.

Luego de descartar los cultivos contaminados, se realizó la centrifugación, filtración, maceración en cloroformo y concentración del metabolito mediante rotaevaporación. La cantidad obtenida de los extractos, así como su concentración se detalla en las Tabla 3 y 4 respectivamente.

Como se puede ver, la mayor cantidad en gramos de peso seco y concentración por cada mililitro de DMSO corresponde a la cepa P30, seguida por las cepas P3 y P36.

Tabla 3*Peso seco de extractos crudos obtenidos por cada cepa*

Muestras	Balón vacío (g)	Balón con extracto (g)	Peso seco (g)
P3	69.132	69.145	0.013
P21	67.312	67.319	0.007
P22	73.674	73.678	0.004
P25	58.714	58.723	0.009
P30	73.674	73.701	0.027
P36	60.732	60.745	0.013

Tabla 4*Concentraciones en miligramo de muestra por mililitro de DMSO 5%*

Muestra	Peso seco (mg)	DMSO 5% (mL)	Concentración (mg/mL)
P3	13	1	13
P21	7	1	7
P22	4	1	4
P25	9	1	9
P30	27	1	27
P36	13	1	13

Identificación molecular de actinomicetos

Extracción y cuantificación de ADN genómico

Mediante el protocolo CTAB se extrajo ADN de seis cepas de actinomicetos. La cuantificación y análisis de calidad del ADN extraído se realizó por espectrofotometría obteniendo así los valores que se detallan en la Tabla 5.

Tabla 5

Concentración y calidad del ADN genómico de cepas de actinomicetos

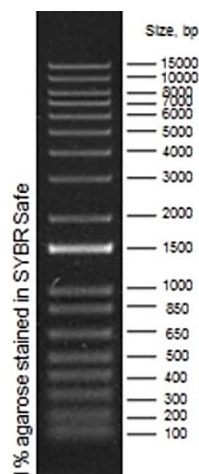
Muestras	Concentración ng/μL	Absorbancia 260/280
P3	257.7	1.88
P21	146.6	1.89
P22	650	1.9
P25	889	1.92
P30	1660	1.95
P36	821	1.86

Amplificación del gen 16S de ADN ribosomal

El gen 16S de las cepas de actinomicetos fue amplificado empleando los primers universales 27F y 1492R. Los productos de PCR fueron revelados en gel de agarosa al 1.5% y según el marcador molecular utilizado, 1 Kb Pluss DNA Ladder de Invitrogen (Figura 12), las bandas observadas muestran un tamaño de 1 500 pares de bases como se indica en la Figura 13.

Figura 12

Marcador de peso molecular de 100 Kb tipo escalera



Nota. Recuperado de *1 Kb Plus DNA Ladder*, por Invitrogen by ThermoFisher Scientific, (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/10787018#/10787018>)

Figura 13

Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos de PCR del gen 16S



Nota. La imagen muestra el patrón de bandas amplificadas por PCR con un tamaño de 1500 pb. CP: Control positivo, aislado de *Bacillus licheniformis*, CN: Control negativo.

Proyección teórica

A partir de aquí, los resultados presentados se basarán en otras investigaciones relacionadas con el tema de este estudio, ya que no pudieron ser obtenidos experimentalmente debido a la emergencia sanitaria COVID-19, a las medidas de suspensión laboral presencial y la restricción de circulación peatonal, así como vehicular decretada por el Gobierno Nacional a partir del día 17 de marzo de 2020.

Secuenciación y análisis de similitud

Para finalizar con el proceso de identificación molecular, los productos de PCR son secuenciados y por último se realiza un análisis de similitud de las secuencias obtenidas con bases de datos empleando herramientas bioinformáticas como BLAST, la cual permitirá identificar los organismos a nivel de especie.

En base a estudios anteriores, los actinomicetos que se encuentran en el tipo de suelo Negro Andino pueden ser los siguientes: *Streptomyces clavifer*, *Streptomyces griseochromogenes*, *Streptomyces anulatus*, *Streptomyces hygroscopicus*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces pactum*, *Streptomyces sampsonii* y *Nocardia sp.*

Prueba de inhibición de los extractos crudos frente a Rhizoctonia solani

Los ensayos de inhibición se realizan mediante la técnica de difusión en pocillos, permitiendo analizar el crecimiento radial de *Rhizoctonia solani* durante diez días en medio PDA.

La tabla de valores del desarrollo del patógeno frente a cada tratamiento (Anexo C) fue creada en referencia a resultados reportados en otros estudios, tomando un rango base para cada día y eligiendo números aleatorios dentro de este.

A los datos obtenidos se les aplicó un test de normalidad (Anexo D) y de homogeneidad de varianzas (Anexo E). Al no cumplir con dichas condiciones, se realizó un test no paramétrico de Friedman con un nivel de significancia $\alpha=0.05$. Los resultados indican que entre los tratamientos existen diferencias significativas ($p < 0.0001$) respecto a la capacidad de inhibir el crecimiento del del hongo (Figura 14), donde el mejor tratamiento es el extracto crudo de la cepa P30, seguido del tratamiento P36. El crecimiento del hongo frente a los tratamientos P21 y P22 no presenta diferencias estadísticamente significativas respecto al control.

Figura 14

Análisis no paramétrico de Friedman para los tratamientos aplicados contra Rizoctonia solani

Prueba de Friedman

P3	P21	P22	P25	P30	P36	CONTROL	T ^a	p
4,05	5,38	5,18	3,75	1,62	2,34	5,68	80,14	<0,0001

Tratamiento	Suma (Ranks)	Media (Ranks)	n	
P30	97,00	1,62	60	A
P36	140,50	2,34	60	B
P25	225,00	3,75	60	C
P3	243,00	4,05	60	C D
P22	311,00	5,18	60	E
P21	322,50	5,38	60	E F
CONTROL	341,00	5,68	60	F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,050$)

Para determinar cómo influyen los tratamientos en el desarrollo del hongo, cada uno de los días, se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis con particiones de la variable Tiempo de incubación (ANEXO F), la cual corrobora la información obtenida en la prueba de Friedman. Indica también que los extractos crudos de las cepas P30 y P36 muestran capacidad inhibitoria a partir del día 3 manteniéndose presentes hasta el décimo día creando un halo de inhibición de 21.83 mm y 18.92 mm, respectivamente.

Capítulo IV: Discusión

En la actualidad, el desarrollo de estrategias para el manejo de enfermedades en campos de cultivo usando bacterias antagonistas o sus productos es una de las alternativas más atractivas en relación a los fungicidas químicos (E. Castro, 2017). Los actinomicetos se han destacado en el área de la agricultura por ser productores de enzimas extracelulares y metabolitos secundarios capaces de actuar frente a fitopatógenos (Saadoun et al., 2015; Sharma et al., 2014). Sin embargo, en el país son pocos los estudios sobre sus beneficios y aplicaciones.

En la parte inicial de este proyecto se reactivó cepas liofilizadas de actinomicetos aislados de suelos paperos en el año 2011.

Según Grauer et al. (2015), el proceso de recuperación de células viables puede ser afectado por diferentes parámetros como el volumen de rehidratación, el pH, la temperatura y principalmente por la osmolaridad de la solución utilizada, sugiriendo emplear de forma estandarizada solución salina, agua peptonada o buffer fosfato ya que el shock osmótico de un ambiente diluido puede causar estrés en la membrana citoplasmática, de tal manera que en el presente trabajo para la rehidratación del liofilizado se utilizó agua peptonada y solución salina.

La siembra de las suspensiones del liofilizado, así como el mantenimiento de las cepas activadas se realizó en medio de cultivo Agar Almidón Caseína (AAC). Varios autores sugieren el uso de medios selectivos o enriquecidos para el aislamiento de actinomicetos ya que son bacterias con una tasa de crecimiento lento y los cultivos pueden ser invadidos por bacterias contaminantes (Bergey et al., 2000; Forbes et al., 2009; Jiang et al., 2016; Sharma et al., 2014). Es por ello que en trabajos anteriores se

ha empleado dicho medio debido a su composición (Leon et al., 2007; Pinto et al., 2010; Salaria et al., 2016; Salim et al., 2017), donde el almidón sirve como fuente de carbono, la caseína como fuente de nitrógeno y las sales mantienen el equilibrio osmótico permitiendo así el completo desarrollo del micelio con esporas y producción de pigmentos (Bergey et al., 2000; Jiang et al., 2016).

Tras once días de incubación a 25°C se observaron colonias que presentaban el crecimiento característico de actinomicetos. Según Bergey et al. (2000) la presencia de colonias de actinomicetos en medios de cultivo sólidos se puede apreciar a partir de los tres o cuatro días, pero el desarrollo de micelio aéreo maduro con esporas toma entre siete y 14 días de incubación; incluso en algunas especies tarda más de un mes.

La caracterización macroscópica se basó en los resultados descritos por Villamarín en el 2011 y en el manual de Bergey permitiendo reconocer colonias de diferentes colores con aspecto polvoriento o rugoso, presencia de exudados y pigmentos en el medio. El exudado sobre las colonias se debe a la secreción de compuestos químicos como metabolitos secundarios, enzimas extracelulares o pigmentos (Gómez, 2014). Jiang et al. (2016) mencionan que los pigmentos pueden ser de dos tipos, los solubles en agua y los no solubles, los primeros son aquellos que se difunden en el medio de cultivo, mientras que los segundos dan color a la colonia. También se pudo percibir el olor a tierra húmeda, siendo este característico de especies de *Streptomyces* que habitan en el suelo por la producción de compuestos volátiles como la geosmina y 2-metilsoborneol (Becher et al., 2020; L. Sánchez et al., 2019).

El análisis microscópico dio lugar a observaciones propias de actinomicetos, es decir, células Gram positivas alargadas, hifas finamente ramificadas con numerosas

esporas alrededor (Sharma et al., 2014). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Sheik et al. (2017) en donde sus nueve aislados muestran similares rasgos a los observados en este estudio, los cuales posteriormente fueron identificados como *Strptomycetes spp* y *Nocardia spp*.

Los campos de cultivo de papa pueden ser atacados por fitopatógenos como: *Rhizoctonia solani*, *Fusarium sp.* y *Phytophthora infestans* (Castillo, 2004). *R. solani* es uno de los hongos más patogénicos que puede diseminarse a diferentes regiones principalmente a través de tubérculos de papa contaminados (Aqeel et al., 2018; I. Castro & Contreras, 2011).

En este trabajo el aislamiento de *Rhizoctonia.solani* se logró a partir de tejido dañado de tubérculos de papa, el cual fue sembrado en medio agar papa dextrosa (PDA) suplementado con cloranfenicol. El análisis macroscópico y microscópico permitió identificar al patógeno como *R. solani*. Los datos correspondientes a la forma, textura, coloración y tamaño del micelio así como la presencia de esclerocios concuerdan con lo reportado por Aqeel et al., (2018) quien consiguió ocho aislados a partir de tubérculos de papa provenientes de mercados locales de Najaf y Karbala, identificándolos luego molecularmente como *R. solani*.

Respecto a la observación microscópica Al-Fadhal et al. (2019); Salazar (2019); Albán (2015) y El Khaldi et al. (2016) quienes han trabajado con el mismo microorganismo, describen características como la tradicional ramificación de las hifas en ángulo recto, presencia de septos y estrangulamiento cerca del punto de origen, así como la ausencia de esporas; las mismas que coinciden con los resultados obtenidos en el presente estudio, corroborando que el hongo aislado se trata de *R. solani*.

Actualmente la búsqueda de nuevos compuestos con actividad biológica ha ido en aumento, estos son generalmente productos del metabolismo secundario de diferentes organismos (plantas, hongos, bacterias) (Solecka et al., 2012; Tarazona, 2017). La obtención de los metabolitos secundarios potenciales de bacterias requiere el uso de métodos que se han venido aplicando en el aislamiento de productos naturales (Zeid & Mahmoud, 1975). Según lo mencionado por Charcosset (2011) dichas sustancias se consiguen bajo fermentación y se recuperan de sus caldos a través de pasos convencionales: filtración (eliminación de biomasa), extracción con solventes (aislamiento), purificación y posterior cristalización.

La fermentación de los aislados para la obtención de los extractos crudos se dio en medio de cultivo caldo glicerol extracto de levadura (YGB) durante 10 días de incubación con agitación de 250 rpm, presentando un crecimiento en forma de esferas o agrupaciones filamentosas en el fondo de los matraces. Similares resultados se obtuvieron en el trabajo de Gutiérrez (2017). Bergey et al. (2000) mencionan que el crecimiento de actinobacterias en medios líquidos estacionarios se observa como una película algodonosa en la parte superficial, dejando el medio de cultivo transparente. Por tal motivo, para tener un crecimiento disperso se recomienda mantener una agitación de 200 a 250 rpm proveyendo aireación al caldo y permitiendo que las esporas de actinomicetos o un pedazo de micelio germinen, se alarguen entrelazándose y crezcan en forma de pellets siendo esta una buena fuente para la esporulación y producción de compuestos bioactivos (Jiang et al., 2016).

El tiempo de incubación es importante el cual depende del compuesto que se dese conseguir y del microorganismo con que se esté trabajando, generalmente la síntesis de los metabolitos secundarios no se da en el transcurso del desarrollo

vegetativo (fase logarítmica) sino que empieza a medida que el crecimiento bacteriano se ralentiza y entra en fase estacionaria al mismo tiempo en que los nutrientes son parcialmente limitados (Hopwood, 2007; Q. Li et al., 2016). Romero (2014) en su estudio indica que *Streptomyces* sp. alcanza la fase estacionaria a los seis días de incubación, sin pasar por fase de latencia ya que la inoculación en caldos se hizo a partir de cultivos de 48 horas de crecimiento. Por otro lado, Henao et al. (2012) mencionan que la fase de latencia de sus aislados de actinomicetos fue alrededor de 24 horas, por ende, para la obtención de los metabolitos la fermentación debe durar al menos ocho días.

La obtención de compuestos con actividad biológica a partir de cultivos filtrados se ha venido realizando con el uso de solventes orgánicos (Tarazona, 2017). Respecto a la extracción de metabolitos secundarios de actinomicetos varios autores han probado diferentes solventes según su polaridad como son: acetato de etilo, acetato de butilo, etanol, cloroformo, n-hexano (Arasu et al., 2014; Gutiérrez, 2017; Guzmán, 2014). En el presente estudio se empleó cloroformo, el cual fue elegido debido a la viabilidad de conseguirlo, obteniendo concentraciones del extracto similares a las presentadas en los estudios de Alam & Singh (2011) y Guzmán (2014), siendo estas útiles para ensayos de inhibición.

Identificar las especies candidatas para la producción de compuestos con actividad biológica es importante para posibles ensayos a futuro, dicha identificación se puede realizar mediante caracteres fenotípicos, sin embargo, estos no pueden ser tan precisos requiriendo respaldo de una caracterización molecular (Amin et al., 2020; Chen et al., 2016). Las técnicas moleculares basadas en PCR son las que más se utilizan actualmente por su especificidad, sensibilidad, rapidez y reproductibilidad (Buszewski et

al., 2017; Rainey & Stackebrandt, 2000), siendo el punto de partida la extracción de ADN (Chen et al., 2016; Woo et al., 2008). El protocolo empleado permitió conseguir concentraciones de ADN entre 257.7 y 1660 ng/ μ L y radios de absorbancia $A_{260/280}$ entre 1.86 y 1.95 nm, correspondiendo a valores óptimos para poder ser empleados en ensayos posteriores según lo indicado por Ning et al. (2009) y Olson & Morrow (2012), quienes mencionan que el mejor indicador para pruebas de PCR es la relación de absorbancia $A_{260/280}$ la cual evalúa la contaminación de la muestra con proteínas y ARN, y su valor debe estar en un rango de 1.8 y 2.0 para considerar como ADN puro.

Se realizó la amplificación del gen 16S ADNr de cada cepa de actinomicetos. Estudios de amplificación y secuenciación de dicho gen han permitido la identificación y análisis filogenético de bacterias con crecimiento lento, difíciles de cultivar o con fenotipos inusuales (Elbendary et al., 2018; Robalino, 2018; Soler, 2012; Woo et al., 2008), ya que este presenta zonas específicas altamente conservadas con baja tasa de mutación (Buszewski et al., 2017; Herrera, 2005). Los resultados fueron revelados en gel de agarosa al 1.5% donde se observaron bandas de aproximadamente 1500 pb, coincidiendo con lo reportado por Robalino (2018) y Soler (2012) quienes trabajaron con muestras de actinomicetos aislados de suelos paperos y fangos activos, respectivamente.

Los productos de PCR deben ser secuenciados y dichas secuencias obtenidas, a su vez deben ser analizadas y comparadas con una base de datos. BLAST es un programa que realiza comparaciones entre pares de secuencias encontrando regiones con similitud local (Pertsemlidis, 2001), por tal motivo al comparar secuencias de consulta con bases de datos de aislados globales permite la identificación de organismos a nivel de especie (M. Johnson et al., 2008). Para esto hay que considerar

que el alineamiento presente un porcentaje de cobertura mayor al 70% y un porcentaje de identidad superior a 98% (Schroeder & Martin, 2013).

En base a comparaciones morfológicas de los aislados con resultados reportados en otros estudios Arocha et al. (2017); Barke et al. (2010); Cordovez et al. (2015); Polpass & Jebakumar (2012); Robalino (2018) y Ventorino et al. (2017) y en el análisis ARDRA realizado por Villamarín (2011) para sus aislados de actinomicetos en el cual ocupó como control secuencias de *Streptomyces coelicolor* y *S. avermitilis*, obteniendo de resultado que cinco de las cepas empleadas en el presente estudio se encontraban dentro del mismo grupo que los controles, mientras que la cepa P21 se ubicaba en un grupo aparte. Se establece que la cepa P21 corresponde a *Nocardia sp.* mientras que las cepas restantes de actinomicetos pertenecen al género *Streptomyces*.

Paz (2016) y Robalino (2018) quienes trabajaron con cepas de actinomicetos aislados de suelos paperos de Carchi, Chimborazo y Loja lograron identificar una variedad de especies del género *Streptomyces* dentro de las cuales están *S. clavifer*, *S. griseochromogenes*, *S. anulatus*, *S. hygroscopicus* y *S. avermitilis*. Caro et al., (2019) también logró aislar y caracterizar actinomicetos rizosféricos de campos peruanos de cultivos de papa encontrando así dos especies diferentes *S. sampsonii* y *S. pactum*.

Varios autores han demostrado el poder que tienen los actinomicetos de contrarrestar el desarrollo de hongos fitopatógenos (Ahsan et al., 2017; Paz, 2016; Rodríguez et al., 2014) ya que sintetizan enzimas extracelulares como quitinasa, celulasa, amilasa y β -1,3-glucanasa y metabolitos secundarios como polioxinas B y D y validamicina A. Dichos compuestos actúan sobre las paredes celulares o en rutas importantes del patógeno (Anandan et al., 2016; Barka et al., 2016; Patil et al., 2010).

Estudios de microscopía electrónica han detallado el efecto que tienen los actinomicetos sobre la estructura de las hifas de *Rhizoctonia solani*, demostrado que sin necesidad de que exista contacto entre el antagonista y el patógeno objetivo hay un reducido crecimiento apical de las hifas, a la vez que estas exhiben un rizado y deformaciones irregulares en sus puntas. También, se ha observado la presencia de poros en la superficie del micelio causando extrusión citoplasmática, atribuyendo que el antagonismo va a ser proporcionado por compuestos secretados capaces de difundirse o volatilizarse en el medio (S. Li et al., 2018; Patil et al., 2010; Prapagdee et al., 2008).

Mediante revisión bibliográfica de estudios sobre actinomicetos con capacidad antagonica y ensayos de inhibición de sus extractos frente a *Rhizoctonia solani* se logró generar datos para un posible comportamiento de los extractos crudos empleados en este trabajo contra el mencionado hongo.

Como resultados se obtuvieron capacidades inhibitorias variables, clasificando a los tratamientos en cuatro grupos según lo mencionado por Goudjal et al. (2014). P30 de capacidad inhibitoria fuerte (halo >20 mm), P36 con inhibición moderada (halo de 11-19 mm), P3 y P25 con mínima inhibición la cual duró dos días (halo de 6-10 mm), mientras que P21 y P22 sin inhibición (halo < 5 mm). Según Potgieter & Alexander (1966) el grado de inhibición va a depender del organismo antagonista y de la conformación de las hifas del fitopatógeno. *Rhizoctonia solani* es un hongo que en las paredes de sus células contiene quitina y β -1,3- glucano (Fujikawa et al., 2012) y al encontrarse frente a diferentes actinomicetos ha mostrado diversos niveles de crecimiento miceliar (González & Robles, 2009; Zhao et al., 2013).

El comportamiento del extracto de la cepa P30 es similar a los resultados obtenidos por Golińska & Dahm (2013) y Kunova et al. (2016) quienes evaluaron la capacidad antagónica de diferentes especies de *Streptomyces* frente a *R. solani* y otros fitopatógenos. Dentro de las cepas evaluadas se encontraba *S. anulatus*, en ambos estudios dicha especie presentó alta capacidad antagónica contra *R. solani*. Mientras que los resultados del extracto de P36 coinciden con el estudio de Saleh et al. (2013) donde se menciona que *S. pactum* tiene mediana capacidad inhibitoria al enfrentarse con *R. solani*. Ambos aislados son capaces de sintetizar quitinasas y β -glucanasas (Zhao et al., 2013), incluso se ha visto que dichas especies podrían producir metabolitos que contienen azufre como tiazol, tiopéptidos, tiolutina y péptidos cíclicos como oxazol, los cuales inhibirían el desarrollo de levaduras y hongos al contrarrestar el proceso de síntesis de ARN (El-wafa et al., 2013).

P3 y P25 muestran inhibición a partir del día 6 la cual disminuye en el día 8, momento en que el hongo empieza a crecer, dichos resultados coinciden con lo expuesto en el estudio de E. Rodríguez, (2014) quien trabajó con actinomicetos de la provincia de Chimborazo, siendo estos identificados como *Streptomyces clavifer*. Otro grupo de investigadores R. Rodríguez et al. (2014) también reportan resultados similares ya que la cepa evaluada, CP-5, identificada como *S. platensis* pierde su capacidad inhibitoria luego de 24 horas de haber inhibido el crecimiento de *R. solani*, concluyendo que este tipo de comportamiento se debe a un efecto fungistático y no fungicida. La disminución en el grado de inhibición corresponde a la presencia de compuestos volátiles en el extracto, o por la disminución de la concentración de compuestos no volátiles difusibles en el medio a medida que avanza el tiempo (Prapagdee et al., 2008; R. Rodríguez et al., 2014).

Los tratamientos que no muestran inhibición son los extractos de las cepas P21 y P22, pues según lo observado por Villamarín, (2011) dichas cepas inhiben el crecimiento de *Phytophthora infestans* pero no de *R. solani*.

P21 identificada morfológicamente como *Nocardia sp.* no inhibe el crecimiento del patógeno tal como lo demuestran Gangwar et al. en sus estudios del año 2008 y 2012, esto puede ser causa de la falta de producción de enzimas líticas. Dhakal et al., (2019) y Potgieter & Alexander (1966) establecen que aislados de *Nocardia sp.* producen solo trazas de quitina, corroborando lo mencionado anteriormente.

Por otro lado, P22 podría tratarse de *Streptomyces hygrosopicus* pues concuerda con lo expuesto en el trabajo de Kim et al. (2015) donde el antagonismo de los extractos obtenidos luego de nueve días de fermentación contra *R. solani* es nula. Según Prapagdee et al. (2008), esta especie de *Streptomyces* alcanza una buena producción de quitinasas y β -1,3- glucanasas en la etapa de crecimiento exponencial, demostrando que los extractos recuperados en dicho periodo mostraron mayor porcentaje de inhibición a diferencia de los extractos recuperados en la etapa estacionaria.

Lo mencionado para ambas cepas coincide con los resultados de la parte de obtención de extractos crudos pues fueron las cepas con menor peso seco de extracto recuperado luego de 10 días de fermentación.

Sobre la base de los resultados obtenidos mediante proyección teórica, se puede suponer que los extractos crudos de las cepas P30 y P36 de actinomicetos desempeñan un papel importante en la inhibición del crecimiento fúngico de *R. solani*, siendo buenos candidatos para emplearlos como métodos de biocontrol en cultivos.

Capítulo V: Conclusiones

1. Se activaron en el laboratorio nueve cepas liofilizadas de actinomicetos aislados de suelos paperos de la provincia de Pichincha en el año 2011 y se las mantuvo en medio de cultivo agar almidón caseína (AAC).
2. *Rhizoctonia solani* fue aislada a partir de tubérculos de papa de la provincia de Pichincha que presentaban signos de la enfermedad e identificada mediante criterios macroscópicos y microscópicos.
3. Los extractos crudos de actinomicetos se consiguieron a través de un proceso de fermentación continua y extracción con cloroformo.
4. Mediante revisión bibliográfica y clave morfológica macroscópica y microscópica se identificó a la cepa P21 como *Nocardia* sp. y a las cepas restantes como *Streptomyces* spp.
5. El análisis estadístico de los datos proyectados teóricamente determinó diferencias estadísticamente significativas de la inhibición de los extractos de actinomicetos sobre *Rhizoctonia solani*.
6. Los extractos de las cepas de actinomicetos P30 y P36 podrían presentar mayor capacidad inhibitoria frente a *Rhizoctonia solani*, seguido de P3 y P25, mientras que P21 y P22 no inhibirían al patógeno.

Capítulo VI: Recomendaciones

1. Concluir con la parte experimental pendiente, para comprobar los resultados obtenidos mediante proyección teórica.
2. Utilizar otros solventes en la obtención de extractos, con el fin de conseguir mayor cantidad.
3. Realizar ensayos para conocer la Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos crudos de actinomicetos frente al patógeno.
4. Identificar los metabolitos presentes en los extractos crudos de actinomicetos empleados.
5. Realizar ensayos de inhibición in vivo para saber si los extractos crudos de actinomicetos mantienen su capacidad inhibitoria frente al patógeno.
6. Emplear marcadores moleculares específicos de actinomicetos para una mejor identificación.

Capítulo VII: Bibliografía

- Acuña, I., & Araya, M. (2017). Rizoctoniasis de la papa. *Inia-Chile*, 52(Foto 1), 1–2.
<https://doi.org/10.1038/nrn2590>
- Adams, G. (1988). *Thanatephorus cucumeris* (*Rhizoctonia solani*), a Species Complex of Wide Host Range. In *Advances in Plant Pathology* (pp. 535–552).
- Agrios, G. N. (2005). Fitopatología. *Limusa*, 819.
<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Ahsan, T., Chen, J., Zhao, X., Irfan, M., & Wu, Y. (2017). Extraction and identification of bioactive compounds (eicosane and dibutyl phthalate) produced by *Streptomyces* strain KX852460 for the biological control of *Rhizoctonia solani* AG-3 strain KX852461 to control target spot disease in tobacco leaf. *AMB Express*, 7(1).
- Al-Fadhal, F. A., AL-Abedy, A. N., & Alkhafije, D. A. (2019). Isolation and molecular identification of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani* isolated from cucumber (*Cucumis sativus* L.) and their control feasibility by *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 29(1).
<https://doi.org/10.1186/s41938-019-0145-5>
- Alam, J., & Singh, A. (2011). Extraction and purification of antibacterial metabolites from *Actinomycetes* spp. isolated from soil sample. *IJPRD*, 3(0974), 63–71.
- Albán, A. (2015). *Identificación, aislamiento, caracterización y evaluación de la capacidad de infección en tubérculos de Rhizoctonia solani de suelos paeros de la provincia de Carchi*. Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE.
- Amin, D. H., Abdallah, N. A., Abolmaaty, A., Tolba, S., & Wellington, E. M. H. (2020). Microbiological and molecular insights on rare *Actinobacteria* harboring bioactive prospective. *Bulletin of the National Research Centre*, 44(1).
<https://doi.org/10.1186/s42269-019-0266-8>
- Anandan, R., Dharumadurai, D., & Manogaran, G. P. (2016). An Introduction to *Actinobacteria*. In D. Dhanasekaran & Y. Jiang (Eds.), *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*. ExLi4EvA.

- Andrade, H., Bastidas, O., & Sherwood, S. (2002). *El cultivo de la papa en Ecuador* (M. Pumisacho & S. Sherwood (eds.)).
- Aqeel, N., Fadhal, A., Malik, H., Zeinah, A.-M., & Sajad, A. (2018). Genetic variability of different isolates of *Rhizoctonia solani* Kühn isolated from Iranian imported potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). *International Journal of Agricultural and Statistical Sciences*, *14*, 587–598.
https://www.researchgate.net/publication/328031842_Genetic_variability_of_different_isolates_of_rhizoctonia_solani_kuhn_isolated_from_iranian_imported_potato_tubers_solanum_tuberosum_l
- Arasu, M. V., Rejiniemon, T. S., Al-Dhabi, N., Duraipandiyan, V., & Agastian, P. (2014). In vitro antimicrobial potential of organic solvent extracts of novel actinomycetes isolated from forest soil. *African Journal of Biotechnology*, *13*(18), 1891–1897.
- Arocha, H. F., Castillo, R., Eguiarte, L. E., & Souza, V. (2017). High diversity and suggested endemism of culturable Actinobacteria in an extremely oligotrophic desert oasis. *PeerJ*, *2017*(5), 1–21. <https://doi.org/10.7717/peerj.3247>
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Nathalie Gaveau-Vaillant, C. J., Klenk, H.-P., Clément, C., Ouhdouch, Y., & P. van Wezel, G. (2016). Taxonomy, Physiology *American Society for Microbiology*, *80*(1), 1–43.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.00019-15.Address>
- Barke, J., Seipke, R. F., Grünschow, S., Heavens, D., Drou, N., Bibb, M. J., Goss, R. J. M., Yu, D. W., & Hutchings, M. I. (2010). A mixed community of actinomycetes produce multiple antibiotics for the fungus farming ant *Acromyrmex octospinosus*. *BMC Biology*, *8*. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-8-109>
- BCE. (2020). *Reporte de Coyuntura Sector Agropecuario*.
http://www.economia.gob.mx/files/comunidad_negocios/industria_comercio/informacionSectorial/minero/reporte_coyuntura_mineria_nacional_0514.pdf
- Becher, P. G., Verschut, V., Bibb, M. J., Bush, M. J., Molnár, B. P., Barane, E., Al-Bassam, M. M., Chandra, G., Song, L., Challis, G. L., Buttner, M. J., & Flärdh, K. (2020). Developmentally regulated volatiles geosmin and 2-methylisoborneol attract

- a soil arthropod to Streptomyces bacteria promoting spore dispersal. *Nature Microbiology*, 5(6), 821–829. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0697-x>
- Bergey, J., Hendricks, D., & Holt, J. (2000). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Ninth). Editorial Lippincott Williams & Wilkins.
- Bettache, A., Messis, A., & Boufassa, L. (2015). Production of endoglucanase by a novel strain Streptomyces sp. TKJ2 and its optimization under submerged fermentation Azzeddine. *BioTechnology an Indian Journal*, 11(1), 18–25.
- Bhatti, A. A., Haq, S., & Bhat, R. A. (2017). Actinomycetes benefaction role in soil and plant health. *Microbial Pathogenesis*, 111, 458–467. <https://doi.org/10.1016/j>
- Bialek, W. (2018). Perspectives on theory at the interface of physics and biology. *Reports on Progress in Physics*, 81(1). <https://doi.org/10.1088/1361-6633/aa995b>
- Bienkowski, D. (2012). *Biological control of Rhizoctonia diseases of potato*. Lincoln University.
- Buszewski, B., Rogowska, A., Pomastowski, P., Złoch, M., & Railean-Plugaru, V. (2017). Identification of microorganisms by modern analytical techniques. *Journal of AOAC International*, 100(6), 1607–1623. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0207>
- Caro, J., Mateo, C., Cisneros, J., Galindo Cabello, N., & León Quispe, J. (2019). Isolation and selection of rhizospheric actinomycetes with antagonistic activity against potato phytopathogens (*Solanum tuberosum* spp. andigena) Junior. *Ecología Aplicada*, 18(2), 101. <https://doi.org/10.21704/rea.v18i2.1329>
- Castillo, C. (2004). Efectividad de Actinomicetos Aislados de la Rizósfera de Papa sobre *Rhizoctonia solani* Kühn in vitro. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22(2), 203–207.
- Castro, E. (2017). Endophytic bacteria controlling *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani* in *Solanum tuberosum*. *European Journal of Physical and Agricultural Sciences*, 5(2), 87. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Castro, I., & Contreras, A. (2011). *Manejo de plagas y enfermedades en el cultivo de*

papa.

- Charcosset, C. (2011). Antibiotic Production. In *Comprehensive Biotechnology* (2nd ed., pp. 603–618).
- Chen, X., Jiang, Y., Li, Q., Han, L., & Jiang, C. (2016). Molecular Phylogenetic Identification of Actinobacteria. In H. Dhanasekaran & Y. Jiang (Eds.), *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*. ExLi4EvA.
- Cordovez, V., Carrion, V. J., Etalo, D. W., Mumm, R., Zhu, H., van Wezel, G. P., & Raaijmakers, J. M. (2015). Diversity and functions of volatile organic compounds produced by *Streptomyces* from a disease-suppressive soil. *Frontiers in Microbiology*, 6(OCT), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01081>
- Cuesta, X. (2017). *Potato quality traits : variation and genetics in Ecuadorian potato landraces*. Wageningen University.
- Cuichán, M., Márquez, J., & Orbe, D. (2019). Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua, 2018. In *Boletín Técnico N° 01-2018- ESPAC*. https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac-2018/Boletin_tecnico.pdf
- Devaux, A., Ordinola, M., Hibon, A., & Flores, R. (2010). *El sector papa en la región andina : diagnóstico y elementos para una visión estratégica (Bolivia, Ecuador y Perú)*.
- Dhakal, D., Rayamajhi, V., Nguyen, T., Poudel, B., & Sohng, K. (2019). Complete Genome Sequence of *Nocardia* sp. Strain CS682, a Producer of Antibacterial Compound Nargenicin A1. *Microbiology Resource Announcements*, October, 1–2.
- Edifarm. (2008). *Manual del Cultivo de papa (Solanum tuberosum L.)*.
- El-wafa, W. M. A., Sharaf, S., & Ahmed, F. (2013). Effect of Nutritional Requirements and Environmental Conditions on Production of Antifungal antibiotic produced by *Streptomyces pactum*-S131. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 297–315.
- El Khaldi, R., Daami-Remadi, M., & Cherif, M. (2016). Biological Control of Stem Canker

- and Black Scurf on Potato by Date Palm Compost and its Associated Fungi. *Journal of Phytopathology*, 164(1), 40–51. <https://doi.org/10.1111/jph.12423>
- Elbendary, A. A., Hessain, A. M., El-Hariri, M. D., Seida, A. A., Moussa, I. M., Mubarak, A. S., Kabli, S. A., Hemeg, H. A., & El Jakee, J. K. (2018). Isolation of antimicrobial producing Actinobacteria from soil samples. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(1), 44–46. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.05.003>
- Falconín, C. (2014). Control biológico de enfermedades de plantas en Ecuador. In W. Bettioli, M. Rivera, P. Mondino, J. Montealegre, & Y. Colmenárez (Eds.), *Control biológico de enfermedades de plantas en América Latina y el Caribe* (Issue February 2014, p. 404).
- Ferrera, R., & Alarcón, A. (2010). *Microbiología agrícola: Hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico y planta-microorganismo*.
- Forbes, B., Sahm, D., & Weissfeld, A. (2009). *Bailey & Scott; Diagnóstico Microbiológico* (12th ed.). Médica Panamericana.
- Franco, M. (2008). *Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas* (E. de la U. de Granada (ed.)).
- Franco, M. (2009). Use of actinomycetes in processes biofertilization. *Rev. Peru. Biol*, 16(162), 239–242.
<http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/biologia/biologiaNEW.htm>
- Franco, M., & Chavarro, V. (2016). Actinobacteria as Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. In *Actinobacteria: Basics and Biotechnological Applications*.
- Franco, M., Gómez, D., Castro, N., & Rendón, M. (2009). Polihidroxicanoatos en actinomicetos nativos de suelos colombianos. *Rev. Peru. Biol*, 16(161), 115–118.
<http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/biologia/biologiaNEW.htm>
- Fujikawa, T., Sakaguchi, A., Nishizawa, Y., Kouzai, Y., Minami, E., Yano, S., Koga, H., Meshi, T., & Nishimura, M. (2012). Surface α -1,3-Glucan Facilitates Fungal Stealth Infection by Interfering with Innate Immunity in Plants. *PLoS Pathogens*, 8(8).

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002882>

Galas, D., Bergstrom, C., & Chandler, V. (2008). The role of theory in advancing 21st century biology: Catalyzing transformative research. In *The Role of Theory in Advancing 21st Century Biology: Catalyzing Transformative Research*.

<https://doi.org/10.17226/12026>

Gangwar, M., Rani, S., & Sharma, N. (2012). Diversity of Endophytic Actinomycetes from Wheat and its Potential as Plant Growth Promoting and Biocontrol Agents. *Journal of Advanced Laboratory Research in Biology*, 3(1), 13–19. [https://e-journal.sospublication.co.in/index.php/jalrb/article/view/89%0Ahttp://files/503/Gangwar et al. - 2012 - Diversity of Endophytic Actinomycetes from Wheat a.pdf](https://e-journal.sospublication.co.in/index.php/jalrb/article/view/89%0Ahttp://files/503/Gangwar%20et%20al.%20-%202012%20-%20Diversity%20of%20Endophytic%20Actinomycetes%20from%20Wheat%20a.pdf)

Goldstein, R. E. (2018). Are theoretical results “Results”? *ELife*, 7, 1–9.

<https://doi.org/10.7554/eLife.40018>

Golińska, P., & Dahm, H. (2013). Antagonistic properties of *Streptomyces* isolated from forest soils against fungal pathogens of pine seedlings. *Dendrobiology*, 69(January 2013), 87–97. <https://doi.org/10.12657/denbio.069.010>

Gómez, J. (2014). *Selección de actinomicetos aislados de suelos paperos de la provincia de Carchi, antagónicos a Phytophthora infestans (Mont.) de Bary y Rhizoctonia solani Kühn, mediante ensayos in vitro y pruebas de invernadero en Solanum tuberosum L.* Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE.

Gondal, A. S., Rauf, A., & Naz, F. (2019). Anastomosis Groups of *Rhizoctonia solani* associated with tomato foot rot in Pothohar Region of Pakistan. *Scientific Reports*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40043-5>

González, A., & Robles, L. (2009). Actinomycetes as biological control agents of phytopathogenic fungi. *Technociencia Chihuahua*, III(2), 64–73.

Goudjal, Y., Toumatia, O., Yekkour, A., Sabaou, N., Mathieu, F., & Zitouni, A. (2014). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off and promotion of tomato plant growth by endophytic actinomycetes isolated from native plants of Algerian Sahara. *Microbiological Research*, 169(1), 59–65.

- Gowrinath, K., & Sugandhi, P. (2009). Pleural Nocardiosis. *Indian Journal of Chest Diseases & Allied Sciences*, 51(3), 169–171.
- Grauer, A., Zardo, S., & Grunberg, K. (2015). *Puesta a punto de un protocolo de liofilización para la creación de bancos bacterianos* [Universidad ORT Uruguay]. <https://bibliotecas.ort.edu.uy/bibid/81392/file/1920>
- Guedez, C., & Castillo, C. (2009). " Biological control " a tool for sustaining and sustainable development. *ACADEMIA*, 13(January), 50–74.
- Guevara, B. L. L. (2017). *Aislamiento y caracterización morfológica de cepas nativas de actinomicetos y su actividad antagónica contra Ralstonia solanacearum, Escherichia coli, Staphylococcus aureus y Salmonella sp.* Zamorano.
- Gutiérrez, C. (2017). *Aislamiento , caracterización y evaluación de la capacidad antimicrobiana de actinomicetos asociados a hormigas cortadoras de hojas (Formicidae : Myrmicinae : Attini)*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Guzmán, C. (2014). *Antibiosis del extracto crudo de actinomicetos aislados de suelos papeiros de Loja a Rhizoctonia solani Kühn y al consorcio de hongos de las provincias de Carchi y Chimborazo*. Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE.
- Henao, C. P. S., Grimaldos, N. A. G., & Diaz, J. C. Q. (2012). Producción de ácido clavulánico por fermentación de Streptomyces clavuligerus: Evaluación de diferentes medios de cultivo y modelado matemático. *DYNA (Colombia)*, 79(175), 158–165.
- Hernández, D., Díaz, M., Quiñones, R., Santos, R., Portal, N., & Herrera, L. (2018). Control de Rhizoctonia solani en frijol común con rizobacterias y productos naturales. In *Centro Agrícola* (Vol. 45, Issue 2, pp. 55–60). http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-57852018000200008
- Herrera, M. (2005). *Filogenia bacteriana mediante el análisis del rRNA 16S*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Hopwood, D. A. (2007). How do antibiotic-producing bacteria ensure their self-resistance before antibiotic biosynthesis incapacitates them? *Molecular Microbiology*, 63(4),

937–940. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05584.x>

Huarte, M. A., & Capezio, S. B. (2013). *Cultivo de papa*.

INEC. (2020). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (ESPAC) 2019*.

Inostroza, J. (2009). *Manual de papa para la Araucanía: manejo y plantación* (N. Gaete (ed.)).

Jiang, Y., Li, Q., Chen, X., & Jiang, C. (2016). Isolation and Cultivation Methods of Actinobacteria. *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*. <https://doi.org/10.5772/61457>

Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., Merezhuk, Y., McGinnis, S., & Madden, T. L. (2008). NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Research*, 36(Web Server issue), 5–9. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn201>

Johnson, S. B., & Leach, S. (2003). Rhizoctonia Disease on Potatoes. *Small*, 1–5.

Keijer, J. (1996). The Initial Steps of the Infection Process in Rhizoctonia Solani. *Rhizoctonia Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control*, 149–162. https://doi.org/10.1007/978-94-017-2901-7_13

Khamna, S., Yokota, A., & Lumyong, S. (2009). Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils: Diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(4), 649–655. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9933-x>

Kim, Y. S., Lee, I. K., & Yun, B. S. (2015). Antagonistic effect of Streptomyces sp. BS062 against Botrytis diseases. *Mycobiology*, 43(3), 339–342. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2015.43.3.339>

Kunova, A., Bonaldi, M., Saracchi, M., Pizzatti, C., Chen, X., & Cortesi, P. (2016). Selection of Streptomyces against soil borne fungal pathogens by a standardized dual culture assay and evaluation of their effects on seed germination and plant growth. *BMC Microbiology*, 16(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0886-1>

- Leon, J., Liza, L., Soto, I., Cuadra, D., Patino, L., & Zerpa, R. (2007). Bioactives actinomycetes of marine sediment from the central coast of Peru. *The Peruvian Journal of Biology*, 14(2), 259–270.
- Li, Q., Chen, X., Jiang, Y., & Chenglin, J. (2016). Cultural, Physiological, and Biochemical Identification of Actinobacteria. In *Actinobacteria: Basics and Biotechnological Applications*. ExLi4EvA.
- Li, S., Zhang, B., Zhu, H., & Zhu, T. (2018). Cloning and expression of the Chitinase Encoded by ChiKJ406136 from *Streptomyces Sampsonii* (Millard & Burr) Waksman KJ40 and its antifungal effect. *Forests*, 9(11), 1–18.
<https://doi.org/10.3390/f9110699>
- López, M. (n.d.). *Evaluación del Efecto del Inoculo de Actinomicetos en Solanum tuberosum sp . papa var . Alpha en Campo*. Instituto Politécnico Nacional.
- MAG. (2018). Informe De Rendimientos De Papa En El Ecuador 2017. *Ministerio de Agricultura y Ganadería*, 7–9.
http://sipa.agricultura.gob.ec/descargas/estudios/rendimientos/papa/rendimiento_papa_2017.pdf
- Mohammadi, M., Banihashemi, M., Hedjaroude, G. A., & Rahimian, H. (2003). Genetic diversity among Iranian isolates of *Rhizoctonia solani* Kühn anastomosis group1 subgroups based on isozyme analysis and total soluble protein pattern. *Journal of Phytopathology*, 151(3), 162–170. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2003.00691.x>
- Molina, J. Santos, B. Aguilar, L. (2004). Guía MIP en el Cultivo de la Papa. In *INTA-Managua.: Vol. 1ra Edició*. <https://doi.org/10.1051/oivconf/201405005>
- Monroy, E. (2005). *Manual Técnico del Cultivo de Papa bajo Buenas Prácticas Agrícolas*. https://conectarural.org/sitio/sites/default/files/documentos/MANUAL_PAPA_0.pdf
- Moreno, C. A. (2011). *Trichoderma koningiopsis Th003 alternativa biológica para el control de Rhizoctonia solani en el cultivo de papa*.

- Nacional, U., San, M. D. E., & Parasitología, E. A. P. D. E. M. Y. (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 Para optar el Título Profesional de Biólogo Microbiólogo.*
- Navarrete, K. (2019). *Identificación molecular de bacilos gram positivos aislados de muestras de leche de vacas con mastitis, en la cooperativa de producción agropecuaria “El Salinerito”, Provincia Bolívar-Ecuador.* Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE.
- Ning, J., Liebich, J., Kästner, M., Zhou, J., Schäffer, A., & Burauel, P. (2009). Different influences of DNA purity indices and quantity on PCR-based DGGE and functional gene microarray in soil microbial community study. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(5), 983–993. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1912-0>
- Olson, N. D., & Morrow, J. B. (2012). DNA extract characterization process for microbial detection methods development and validation. *BMC Research Notes*, 5. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-668>
- Padmanabhan, P., Sullivan, J. A., & Paliyath, G. (2016). Potatoes and Related Crops. In *Encyclopedia of Food and Health* (1st ed.). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00556-0>
- Parmeter, J., & Whitney, H. (1970). Taxonomy and Nomenclature of the imperfect state. In J. Parmeter (Ed.), *Rhizoctonia solani Biology and Pathology*.
- Patil, H. J., Srivastava, A. K., Kumar, S., Chaudhari, B. L., & Arora, D. K. (2010). Selective isolation, evaluation and characterization of antagonistic actinomycetes against *Rhizoctonia solani*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(12), 2163–2170. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0400-0>
- Paz, I. (2016). *Capacidad inhibitoria de extractos crudos de los actinomicetos L37, Ch50 y C92 frente a Phytophthora infestans, Rhizoctonia solani y Fusarium sp.* Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE.
- Peinado, S. (2018). *Efecto in vitro de doce aceites esenciales sobre el crecimiento*

micelial de Rhizoctonia solani y Sclerotinia sclerotiorum y la germinación de esclerocios de Sclerotinia sclerotiorum. Universidad de Almería.

- Pérez, F., León, J., & Galindo, N. (2015). Actinoycetes isolated from compost and antagonistic activity against potato phytopathogens (*Solanum tuberosum* spp. andigena Hawkes). *Revista Mexicana de Fitopatología, Mic*, 116–139.
- Pérez, L. (2005). Bases moleculares del control biológico de fitopatógenos. Experiencia Chilena. In *Control biológico e integrado de enfermedades y nematodos en frutales y hortalizas* (pp. 10–15).
- Pérez, V. (2011). Control Biológico De Plagas Y Enfermedades Vegetales. In *Universidad de Alicante*. <https://sgitt-otri.ua.es/es/empresa/documentos/ot-0811-control-biologico-de-plagas.pdf>
- Pertsemliadis, A. (2001). Tutorial Having a BLAST with bioinformatics (and avoiding BLASTphemy). *Genome Biology*, 2. <https://doi.org/10.1148/radiol.2293031482>
- Pinto, S., Mann, M. B., Campos, F. S., Franco, A. C., Germani, J. C., & van der Sand, S. T. (2010). Preliminary characterization of some *Streptomyces* species isolated from a composting process and their antimicrobial potential. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(10), 1847–1856.
- Polpass, J. A., & Jebakumar, S. R. D. (2012). Phylogenetic diversity of actinomycetes cultured from coastal multipond solar saltern in Tuticorin, India. *Aquatic Biosystems*, 8(1), 1. <https://doi.org/10.1186/2046-9063-8-23>
- Potgieter, H. J., & Alexander, M. (1966). Susceptibility and resistance of several fungi to microbial lysis. *Journal of Bacteriology*, 91(4), 1526–1532. <https://doi.org/10.1128/jb.91.4.1526-1532.1966>
- Prapagdee, B., Kuekulvong, C., & Mongkolsuk, S. (2008). Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygroscopicus* against phytopathogenic fungi. *International Journal of Biological Sciences*, 4(5), 330–337.
- Promega. (2017). *GoTaq Green Master Mix Protocol*. Rapid Food Analysis and Hygiene Monitoring. https://doi.org/10.1007/978-3-642-58362-9_35

- Quiñones, E., Evangelista, Z., & Rincón, G. (2016). Los actinomicetos y su aplicación biotecnológica. In *Elementos* (Vol. 101).
- Rainey, F. A., & Stackebrandt, E. (2000). rDNA Amplification: Application of 16S rDNA-Based Methods for Bacterial Identification. *Nonradioactive Analysis of Biomolecules*, 396–406. https://doi.org/10.1007/978-3-642-57206-7_34
- Reyes, A., Rincón, G., López, L., Evangelista, Z., & Quiñones, E. (2015). Lucha entre microbios: una herramienta para el control de enfermedades de plantas. *Revista Digital Universitaria UNAM*, 16(11), 1–15.
- Robalino, S. (2018). *Identificación molecular de especies de estreptomicetos aislados de los suelos paperos de Carchi y Chimborazo*. Universidad de las Américas.
- Rodríguez, R., Peña, I., Fernandez, E., Almeyda, H., Hernández, I., & Acosta, E. (2014). Antagonismo e identificación genética de un actinomiceto con potencial para el biocontrol de *Phytophthora capsici* Leonian (Peronosporales: PYTHIACEAE). *Vedalia*, 15(1), 1–5. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Romana, J. C. (2012). *ESTADÍSTICA EXPERIMENTAL Herramientas para investigación* (Primera). UPT-PERÚ.
- Romero, D. (2014). *Cuantificación de la producción de metabolitos secundarios de Streptomyces sp., bajo estrés inducido por peróxido de hidrógeno, mediante HPLC-DAD*. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Saadoun, I., Al-joubori, B., & Al-khoury, R. (2015). Testing of Production of Inhibitory Bioactive Compounds by Soil Streptomyces as Preliminary Screening Programs in UAE for Anti-Cancer and Anti-Bacterial Drugs. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(3), 446–459.
- Salaria, N., Sharma, S., & Sharma, S. (2016). Isolation and Screening of Actinomycetes from Soil Sample of Dal Lake (Kashmir) Against Selected Pathogens. *Intl J Engg Sci Adv Research*, 2(1), 51–54.
- Salazar, B. (2019). *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. Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE.

- Saleh, E., El-Samman, M., El-Wafa, W. M. ., & Sharaf, M. (2013). Biocontrol of damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani* in some medicinal plants using local strain of *Streptomyces pactum*. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 7(2).
- Salim, F. M., Sharmili, S. A., Anbumalarmathi, J., & Umamaheswari, K. (2017). Isolation, molecular characterization and identification of antibiotic producing actinomycetes from soil samples. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7(9), 69–75.
<https://doi.org/10.7324/JAPS.2017.70909>
- Samaniego, I., Espin, S., Cuesta, X., Arias, V., Rubio, A., Llerena, W., Angós, I., & Carrillo, W. (2020). Analysis of environmental conditions effect in the phytochemical composition of potato (*Solanum tuberosum*) cultivars. *Plants*, 9(7), 1–13.
<https://doi.org/10.3390/plants9070815>
- Sánchez, F. E. (2016). Importance of *Bacillus subtilis* lipopeptides in the biological control of diseases in crops of high economic value. *Bionatura*, 1(3), 135–138.
<https://doi.org/10.21931/rb/2016.01.03.7>
- Sánchez, L., Singh, K. S., Avalos, M., Van Wezel, G. P., Dickschat, J. S., & Garbeva, P. (2019). Phylogenomic analyses and distribution of terpene synthases among *Streptomyces*. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 15, 1181–1193.
<https://doi.org/10.3762/bjoc.15.115>
- Schroeder, K., & Martin, F. (2013). Molecular Detection and Quantification of *Pythium* Species: Evolving Taxonomy, New Tools, and Challenges. *Plant Disease*, 97.
- Serrano, L., & Galindo, E. (2007). Control biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario. *Revista de La Academia Mexicana de Ciencias*.
<https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/index.php/36-vol-58-num-1-enero-marzo-2007/comunicaciones-libres34/81-control-biologico-de-organismos-fitopatogenos-un-reto-multidisciplinario>
- Sharma, M., Dangi, P., & Choudhary, M. (2014). Actinomycetes : Source , Identification , and Their Applications. *International Journal of Current Microbiology and Applied*

- Sciences*, 3(2), 801–832.
- Sheik, G. B., Maqbul, M. S., S., G. S., & MS, R. (2017). Isolation and Characterization of Actinomycetes From Soil of Ad-Dawadmi, Saudi Arabia and Screening Their Antibacterial Activities. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 9(10), 276. <https://doi.org/10.22159/ijpps.2017v9i10.15402>
- Shou, W., Bergstrom, C. T., Chakraborty, A. K., & Skinner, F. K. (2015). Theory, models and biology. *ELife*, 4(JULY 2015), 1–4. <https://doi.org/10.7554/eLife.07158>
- Solecka, J., Zajko, J., Postek, M., & Rajnisz, A. (2012). Biologically active secondary metabolites from Actinomycetes. *Central European Journal of Biology*, 7(3), 373–390. <https://doi.org/10.2478/s11535-012-0036-1>
- Soler, A. (2012). *Biodiversidad de actinomicetos aislados de plantas depuradoras de aguas residuales. Estudio de la capacidad de biodegradación de compuestos tóxicos*. file:///C:/Users/Equipo2015/Downloads/tesisUPV3760.pdf
- Tarazona, U. (2017). *Caracterización de actinomicetos de sedimento marino y su potencial actividad antagonista frente a Vibrio sp. aislados de Litopenaeus vannamei*. UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS.
- Trujillo, E., & Perera, S. (2009). Plagas y enfermedades de la papa . Identificación y control . In *Agrocabildo (Servicio Técnico de agricultura y desarrollo rural área de aguas y agricultura de Tenerife)* (Vol. 20).
- Ventorino, V., Ionata, E., Birolo, L., Montella, S., Marcolongo, L., de Chiaro, A., Espresso, F., Faraco, V., & Pepe, O. (2017). Lignocellulose-adapted endo-cellulase producing streptomyces strains for bioconversion of cellulose-based materials. *Frontiers in Microbiology*, 7(DEC). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02061>
- Venturini, G. (2003). *Solanum tuberosum*. In *Monaco Nature Encyclopedia Discover the biodiversity*. <https://www.monaconatureencyclopedia.com/solanum-tuberosum/?lang=en>
- Villamarín, D. (2011). *Capacidad de infección de Phytophthora infestans (Mont) de Bary en suelos paperos procedentes de las provincias de Carchi, Pichincha, Chimborazo*

y Loja , y su inhibición por actinomicetos nativos. UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS -ESPE.

- Villarreal, A. (2013). *Evaluación de fungicidas alternativos (Fludioxonil y Azoxystrobin), para el control de costra negra (Rhizoctonia solani Kuhn) y roña (Spongospora subterránea) de suelo en el cultivo de papa (Solanum tuberosum L.), Carchi - Ecuador*. Universidad Politécnica Estatal del Carchi.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697–703.
- Weising, K., Hilde, N., Kirsten, W., & Günter, K. (2005). *DNA fingerprinting in plants and fungi; Principles, methods, and applications*.
- Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Teng, J. L. L., Tse, H., & Yuen, K. (2008). Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*, 10(14), 908–934. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02070.x>
- Yanggen, D., Crissman, C., & Espinosa, P. (2003). *Los plaguicidas Impactos en producción, salud y medio ambiente en Carchi, Ecuador*.
- Zeid, A., & Mahmoud, A. (1975). Actinomycetes producing antibiotics. *Zentralblatt Fur Bakteriologie Parasitenkunde Infektionskrankheiten Und Hygiene Zweite Abteilung*, 130(6), 541–555. [https://doi.org/10.1016/s0044-4057\(75\)80042-6](https://doi.org/10.1016/s0044-4057(75)80042-6)
- Zhao, J., Xue, Q. H., Niu, G. G., Xue, L., Shen, G. H., & Du, J. Z. (2013). Extracellular enzyme production and fungal mycelia degradation of antagonistic Streptomyces induced by fungal mycelia preparation of cucurbit plant pathogens. *Annals of Microbiology*, 63(2), 809–812. <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0507-7>