



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

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

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TESIS PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA EN
BIOTECNOLOGÍA**

AUTOR: ANDREA CAROLINA MEDINA RODRÍGUEZ

**TEMA: SELECCIÓN DE ACTINOMICETOS AISLADOS DE SUELOS PAPEROS
DE LA PROVINCIA DE LOJA, ANTAGÓNICOS A *Phytophthora infestans*
(Mont.) de Bary Y *Rhizoctonia solani* Kühn, MEDIANTE ENSAYOS *in vitro* Y
PRUEBAS DE INVERNADERO EN *Solanum tuberosum* L.**

DIRECTOR: ALMA KOCH KAISER MC.

CODIRECTOR: ING.-MAT. PEDRO ROMERO.

SANGOLQUÍ, MARZO 2014.

CERTIFICACIÓN

Alma Koch, MC.

Ing.-Mat. Pedro Romero

Certifican:

Que el trabajo titulado SELECCIÓN DE ACTINOMICETOS AISLADOS DE SUELOS PAPEROS DE LA PROVINCIA DE LOJA, ANTAGÓNICOS A *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary Y *Rhizoctonia solani* Kühn, MEDIANTE ENSAYOS *in vitro* Y PRUEBAS DE INVERNADERO EN *Solanum tuberosum* L., ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la Universidad De Las Fuerzas Armadas - ESPE.

El mencionado trabajo consta de (un) documento empastado y (un) disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf). Autorizan a ANDREA CAROLINA MEDINA RODRÍGUEZ que lo entregue a ING. MARÍA AUGUSTA CHÁVEZ, en su calidad de Coordinadora de la Carrera.

Sangolquí, marzo 2014.

Alma Koch, MC.

DIRECTORA

Ing.-Mat. Pedro Romero

CODIRECTOR

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

ANDREA CAROLINA MEDINA RODRÍGUEZ

Declaro que:

El proyecto de grado denominado SELECCIÓN DE ACTINOMICETOS AISLADOS DE SUELOS PAPEROS DE LA PROVINCIA DE LOJA, ANTAGÓNICOS A *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary Y *Rhizoctonia solani* Kühn, MEDIANTE ENSAYOS in vitro Y PRUEBAS DE INVERNADERO EN *Solanum tuberosum* L., ha sido desarrollado en base a una investigación exhaustiva, respetando los derechos intelectuales de terceros, conforme a las citas que constan en el texto cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mi autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, marzo 2014.

AUTORIZACIÓN

ANDREA CAROLINA MEDINA RODRÍGUEZ

Autorizo que:

El proyecto de grado denominado SELECCIÓN DE ACTINOMICETOS AISLADOS DE SUELOS PAPEROS DE LA PROVINCIA DE LOJA, ANTAGÓNICOS A *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary Y *Rhizoctonia solani* Kühn, MEDIANTE ENSAYOS *in vitro* Y PRUEBAS DE INVERNADERO EN *Solanum tuberosum* L.; sea publicado en la biblioteca virtual de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE.

Sangolquí, marzo 2014.

DEDICATORIA

A mi papi Ramiro por esforzarse en su trabajo para que siempre tengamos lo que necesitamos y enseñarme que la vida se vive con alegría.

A mi mami Consuelo por su apoyo, amor infinito y sus consejos maravillosos.

A mis queridos hermanos Juan Sebastián y Priscila por soportar mi mal genio en tiempo de tesis, los amo.

Andrea Carolina Medina Rodríguez

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme salud para poder culminar mi proyecto de tesis.

A mis padres por enseñarme a ser perseverante, paciente y feliz, gracias por todo el esfuerzo que hicieron para que pueda culminar mis estudios.

A mis hermanitos JuanSe y Pris, y mi tía Sonia los quiero con todo el corazón.

A Almita Koch, MC. por ser un pilar fundamental durante mis años de estudios, enseñarme valores, a ser profesional y sobre todo un buen ser humano, gracias por confiar en mí.

Al Ing. Pedrito Romero por su cariño, respaldo y conocimiento aportado al proyecto.

A la Lda. Jessica Maisincho y a los PhD. Soledad Benítez, PhD. Carla Garzón y PhD. Ricardo Oliva por apoyarme a lo largo del proceso de tesis y compartir sus conocimientos.

Al Centro Internacional de la Papa por sus aportes de conocimiento al proyecto y por hacernos sentir parte de su equipo.

A Gaby por ser una amiga verdadera e incondicional, gracias por todos los momentos compartidos desde el primer día de clases de la universidad y el apoyo en el proceso de tesis.

A Edison Z., Jonathan G., José R., Esteban M., Isra N., Eve M., Silvi M., Abi M., gracias amigos por compartir momentos que siempre voy a llevar en el corazón y a Leandro por convertirse en una persona especial que me ha brindado su apoyo incondicional.

Andrea Carolina Medina Rodríguez

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN	i
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD.....	ii
AUTORIZACIÓN	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vi
LISTADO DE TABLAS	ix
LISTADO DE FIGURAS	x
LISTADO DE ANEXOS.....	xii
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1. Justificación del problema.....	3
1.2. Objetivos de la investigación	5
1.2.1. Objetivo general.....	5
1.2.2. Objetivos específicos	5
1.3. Marco teórico	6
1.3.1. Cultivo de papa (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	6
1.3.1.1. Importancia del cultivo.....	6
1.3.1.2. Clasificación botánica.....	8
1.3.1.3. Descripción botánica	8
1.3.2. Tizón tardío o lancha de la papa.....	11
1.3.3. Rhizoctoniasis	20
1.3.4. Actinomicetos.....	26
1.3.5. Control biológico	28
1.3.5.1 Mecanismos de acción del control biológico	29
1.3.6. Control biológico en el Ecuador	32
1.3.7. Control biológico en plantas de papa.....	32
1.4. Hipótesis de investigación	33

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS	34
2.1. Participantes	34
2.2. Zona de estudio	34
2.3. Período de tiempo de investigación.....	35
2.4. Procedimiento	35
2.4.1. Mantenimiento de las cepas de <i>Phytophthora infestans</i>	35
2.4.2. Aislamiento de cepa de <i>Rhizoctonia solani</i>	36
2.4.3. Activación de las cepas de actinomicetos liofilizadas.....	36
2.4.3.1. Hidratación	37
2.4.3.2. Siembra	37
2.4.3.3. Incubación	37
2.4.3.4. Traspaso	38
2.4.4. Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i> para <i>P. infestans</i>	38
2.4.5. Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i> para <i>Rhizoctonia solani</i>	39
2.4.6. Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i> en folíolos de papa de la variedad “uvilla” para <i>P. infestans</i>	40
2.4.6.1. Preparación del inóculo de actinomicetos.....	40
2.4.6.2. Inoculación de actinomicetos en folíolos de papa.....	40
2.4.6.3. Preparación del inóculo de <i>P. infestans</i>	41
2.4.6.4. Inoculación de <i>P. infestans</i> CIP84 en folíolos de papa.....	41
2.4.6.5. Prueba de supervivencia de actinomicetos inoculados en folíolos de papa	42
2.4.7. Pruebas de antagonismo en invernadero para <i>R. solani</i>	42
2.4.7.1. Preparación del inóculo de actinomicetos.....	42
2.4.7.2. Preparación del inóculo de <i>R. solani</i>	43
2.4.7.3. Inoculación de sustrato con <i>R. solani</i> y actinomiceto.....	43
2.4.7.4. Pruebas de supervivencia de actinomicetos	44
2.4.7.5. Pruebas de supervivencia de <i>R. solani</i>	45
CAPÍTULO 3: RESULTADOS	46
3.1. Aislamiento de cepa de <i>Rhizoctonia solani</i>	46
3.2. Activación de las cepas de actinomicetos liofilizadas.....	47
3.3. Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i> para <i>P. infestans</i>	48

3.4.	Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i> para <i>R. solani</i>	53
3.5.	Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i> en folíolos de papa de la variedad "uvilla" contra <i>P. infestans</i>	56
3.6.	Prueba de supervivencia de actinomicetos inoculados en folíolos de papa.....	58
3.7.	Pruebas de antagonismo en invernadero para <i>R. solani</i>	60
3.8.	Pruebas de supervivencia de actinomicetos en ensayos de invernadero.....	64
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN		65
4.1.	Aislamiento de cepa de <i>Rhizoctonia solani</i>	67
4.2.	Activación de las cepas de actinomicetos liofilizadas.....	67
4.3.	Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i> para <i>P. infestans</i> y <i>R. solani</i>	68
4.4.	Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i> en folíolos de papa de la variedad "uvilla" contra <i>P. infestans</i>	71
4.5.	Pruebas de antagonismo en invernadero para <i>R. solani</i>	73
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES.....		77
CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES		78
CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA		79
CAPÍTULO 8: ANEXOS		85

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.1:	Clasificación taxonómica de la especie <i>Solanum tuberosum</i> 8
Tabla 1.2:	Clasificación taxonómica de <i>Phytophthora infestans</i> 14
Tabla 3.1:	Prueba no paramétrica Kruskal Wallis de los PICR de 15 cepas de actinomiceto de la provincia de Loja enfrentados a <i>Phytophthora infestans</i> 49
Tabla 3.2:	Prueba no paramétrica Kruskal Wallis de los PICR de 15 cepas de actinomiceto de la provincia de Loja enfrentados a <i>Rhizoctonia solani</i> 53

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1:	Partes de una planta de papa.....	9
Figura 1.2:	Esporangióforo de <i>Phytophthora infestans</i> con su esporangio.	15
Figura 1.3:	Fotografía del micelio de <i>Phytophthora infestans</i>	15
Figura 1.4:	Esporangios de <i>Phytophthora infestans</i>	16
Figura 1.5:	Ciclo de vida de <i>Phytophthora infestans</i> en la naturaleza.....	16
Figura 1.6:	Plántulas de papa afectadas por <i>Rhizoctonia solani</i>	21
Figura 1.7:	Tubérculos de papa con esclerocios de <i>Rhizoctonia</i> GA3	22
Figura 1.8:	Hifas de <i>Rhizoctonia solani</i> con ramificación en ángulo recto...	23
Figura 1.9:	Ciclo biológico de <i>Rhizoctonia solani</i>	25
Figura 2.1:	Prueba dual entre la cepa de actinomiceto Loja 21 y cepa <i>Phytophthora infestans</i> ESPE1, veintidós días de incubación.....	38
Figura 2.2:	Prueba dual entre la cepa de actinomiceto Loja 21 y cepa <i>Rhizoctonia solani</i> , seis días de incubación.	39
Figura 3.1:	Cultivo purificado de <i>Rhizoctonia solani</i> en medio PDA.....	46
Figura 3.3:	Cepa de actinomiceto de Loja L18 activada en medio YGA.....	36
Figura 3.4:	Tinción Gram de la cepa de actinomiceto de Loja L19. Aumento 100X	48
Figura 3.5:	Pruebas duales en caja Petri entre actinomicetos vs <i>Phytophthora infestans</i> , a y b. cepas de actinomicetos más antagonicas L48 y L21, c. <i>Phytophthora infestans</i> sin presencia de actinomicetos, d. zona de inhibición.....	49
Figura 3.6:	Dispersión y simetría del porcentaje de inhibición de actinomicetos contra <i>Phytophthora infestans</i> . Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).	43
Figura 3.7:	Porcentajes de inhibición de las cepas de actinomicetos de la provincia de Loja L18, L21 y L48 contra <i>Phytophthora infestans</i> CIP84 en pruebas duales en medio YGA.....	52
Figura 3.8:	Cepas de actinomicetos antagonistas a <i>Rhizoctonia solani</i> seleccionadas en las pruebas duales (a,b,c), d. <i>Rhizoctonia solani</i> sin actinomicetos (control).....	53
Figura 3.9:	Dispersión y simetría del porcentaje de inhibición de actinomicetos contra <i>Rhizoctonia solani</i> . Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)	55
Figura 3.10:	Pruebas de antagonismo de la cepa de actinomiceto L21 contra <i>Phytophthora infestans</i> CIP84 en folíolos de papa variedad “uvilla”	56

Figura 3.11: Pruebas de antagonismo de la cepa de actinomiceto L48 contra <i>Phytophthora infestans</i> CIP84 en folíolos de papa variedad “uvilla”.....	57
Figura 3.12: Pruebas de antagonismo de la cepa de actinomiceto L18 contra <i>Phytophthora infestans</i> CIP84 en folíolos de papa variedad “uvilla”.....	57
Figura 3.13: Porcentajes de inhibición de las cepas de actinomicetos de la provincia de Loja L18, L21 y L48 contra <i>Phytophthora infestans</i> en folíolos de papa de la variedad “uvilla”.....	58
Figura 3.14: Crecimientos de inóculos iniciales de actinomicetos de las pruebas de antagonismo en folíolos rociados en medio YGA.....	59
Figura 3.15: Pruebas de supervivencia de las cepas de actinomicetos L18 y L21. despues de 2,4 y 5 días de inoculación en folíolos.....	59
Figura 3.16: Prueba de antagonismo en invernadero de la cepa L37 contra <i>Rhizoctonia solani</i> en plantas de papa de la variedad “superchola”.....	60
Figura 3.17: Prueba de antagonismo en invernadero cepa L41 vs <i>Rhizoctonia solani</i> en plantas de papa variedad “superchola”.....	61
Figura 3.18: Prueba de antagonismo en invernadero de la cepa L18 contra <i>Rhizoctonia solani</i> en plantas de papa de la variedad “superchola”.....	61
Figura 3.19: Brotes de tubérculo de papa variedad “superchola” afectado por <i>Rhizoctonia solani</i>	62
Figura 3.20: Aislamiento de <i>Rhizoctonia solani</i> a partir de tejido infectado de plantas utilizadas en el ensayo de antagonismo en invernadero.....	62
Figura 3.15: Porcentajes de infección por <i>Rhizoctonia solani</i> en plantas de papa variedad “superchola” utilizadas en invernadero.....	63
Figura 3.16: Porcentajes de emergencia de plantas de papa variedad “superchola” utilizadas para las pruebas de antagonismo con actinomicetos y <i>Rhizoctonia solani</i> en invernadero.....	63
Figura 3.17: Aislamiento de actinomicetos de sustrato inoculado en pruebas de antagonismo en ensayo de invernadero con <i>Rhizoctonia solani</i>	64
Figura 3.18: Aislamiento de <i>Rhizoctonia solani</i> de sustrato inoculado en pruebas de antagonismo en ensayo de invernadero.....	64

LISTADO DE ANEXOS

- Anexo A:** Análisis de datos de las pruebas duales *in vitro* de actinomicetos vs *P. infestans* ¡Error! Marcador no definido.
- Anexo B:** Análisis de datos de las pruebas duales *in vitro* de actinomicetos vs *R. solani* ¡Error! Marcador no definido.
- Anexo C:** Características macroscópicas de actinomicetos. ¡Error! Marcador no definido.
- Anexo D:** Síntomas de *R. solani* observados en pruebas antagónicas a nivel de invernadero. ¡Error! Marcador no definido.
- Anexo E:** Teoría estadística. ¡Error! Marcador no definido.0

RESUMEN

El cultivo de papa en el Ecuador es afectado por *Phytophthora infestans*, agente causal del Tizón tardío o lancha que en condiciones favorables puede destruir un sembrío de papa en cuatro días, atacando al follaje. En el País no hay reportes sobre la infección de tubérculos por *P. infestans*, por lo que se ha planteado el estudio de la supresividad de los suelos paperos. Existen varios factores físicos-químicos, ambientales y microbiológicos que pueden estar relacionados con la supresión. El objetivo general del estudio fue seleccionar actinomicetos aislados de suelos paperos de la provincia de Loja, antagónicos a *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary y *Rhizoctonia solani* Kühn, mediante ensayos *in vitro* y pruebas de invernadero en *Solanum tuberosum* L. Se realizaron pruebas duales en cajas Petri enfrentado los actinomicetos a *P. infestans* y *R. solani*, en ambas pruebas existieron diferencias significativas con un valor $p < 0.0001$ en la capacidad de inhibir el crecimiento de los patógenos. Los actinomicetos seleccionados en laboratorio se utilizaron sobre foliolos de papa para antagonizar a *P. infestans*; se obtuvo 100% de inhibición del patógeno. También se probaron cepas de actinomicetos en invernadero contra *R. solani*; no se observó antagonismo y el patógeno colonizó las plantas. La inhibición se debe a que los actinomicetos secretan antibióticos y enzimas líticas que afectan la pared celular de los patógenos. Los resultados obtenidos aportan información sobre la capacidad de biocontrol de los actinomicetos sobre *P. infestans* y *R. solani*.

Palabras claves: Tizón tardío, rhizoctoniasis, microorganismos antagonistas, control biológico.

ABSTRACT

Potato crops in Ecuador are affected by *Phytophthora infestans*, causing late blight or concessional boat that can destroy a crop in four days, attacking the foliage. Ecuador, does not present reports on tuber infection by *P. infestans*, therefore arises the study of suppressiveness in potato growing soils. There are several physical, chemical, microbiological and environmental factors that may be related to suppression. The main objective of the study was to select actinomycetes isolated from potato growing soils from Loja province, antagonistic to *Phytophthora infestans* (Mont) of Bary and *Rhizoctonia solani* Kühn, by in vitro assays and glass house trials in *Solanum tuberosum* L. Dual tests were conducted in Petri boxes faced actinomycetes to *P. infestans* and *R. solani*, in both tests were no significant differences with a value of $p < 0.0001$ in the ability to inhibit the growth of pathogens. Actinomycetes laboratory selected were used on potato leaflets to antagonize *P. infestans*, 100% inhibition of the pathogen was obtained. Actinomycete strains were also tested in the glass house against *R. solani*, no antagonism was observed and the pathogen colonized plants. The inhibition is due to the secretion of antibiotics by actinomycetes and lytic enzymes that affect the cell wall of pathogens . The results provide information about the ability of actinomycetes biocontrol on *P. infestans* and *R. solani*.

Keywords: Late blight, rhizoctoniasis, antagonistic organism, biological control.

CAPÍTULO 1:

Selección de actinomicetos aislados de suelos paperos de la provincia de Loja, antagónicos a *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary y *Rhizoctonia solani* Kühn, mediante ensayos *in vitro* y pruebas de invernadero en *Solanum tuberosum* L.

El cultivo de papa en el Ecuador ha sido durante años un pilar fundamental en la alimentación y economía. Con un valor total bruto de 60 millones de dólares anuales, la papa es una importante fuente de ingresos para las comunidades rurales y un componente fundamental de la economía nacional (Andrade *et al.*, 2002).

La producción de este cultivo dentro del Ecuador se da con mayor proporción en las provincias de Carchi, Chimborazo, Tungurahua, Pichincha, Cañar y Cotopaxi (Herrera *et al.*, 1999). El cultivo ocupa el segundo lugar de la superficie de cultivos en la Sierra y el quinto lugar a nivel nacional (Mancero, 2007).

La papa es susceptible a varias enfermedades. En la gama de patologías del cultivo en el Ecuador existen cambios notables en la sintomatología e incluso enfermedades importantes que no se presentan y que han sido reportadas en países vecinos. (Oyarzún *et al.*, 2002).

Una de las enfermedades que afecta seriamente al cultivo de papa en el país es el tizón tardío o lancha. Se considera de alto riesgo ya que en

condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad, un cultivo sin protección puede ser destruido en una semana o menos. La lancha se presenta entre los 2.800 y los 3.400 msnm y es causada por el *patógeno Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary., el cual posee una alta variabilidad genética y diferentes niveles de virulencia (Oyarzún *et al.*, 2002).

La infección de los tubérculos es inusual en el Ecuador, a diferencia de países andinos del sur donde el tizón causa una pudrición seca de color café oscuro (Oyarzún *et al.*, 2002).

Otra enfermedad que afecta al cultivo de papa es la rhizoctoniasis o costra negra, causada por el hongo *Rhizoctonia solani*. Ha llegado a considerarse un serio problema para los sembríos de papa, pues el hongo tiene una amplia gama de hospederos y puede permanecer en latencia por largos períodos de tiempo como esclerocios. Cuando se presentan las condiciones ambientales adecuadas como alta humedad relativa, temperaturas frías del suelo, alta fertilidad del suelo y pH de 7, los esclerocios germinan y proceden a la infección de los tubérculos, produciendo costras negras, lo que afecta la calidad culinaria y sanitaria de los tubérculos (Allauca, 2004).

Las pérdidas económicas que producen el tizón tardío y la rhizoctoniasis llevan a los agricultores a tomar medidas de prevención, así no se tenga constancia de la presencia de las enfermedades. La provincia de mayor uso de plaguicidas en la sierra ecuatoriana es Carchi. Estudios muestran que los agricultores aplican durante el ciclo de cultivo de papa un promedio de siete

veces una mezcla de tres productos (Oyarzún *et al.*, 2002). La aplicación sin control de plaguicidas podría causar esterilidad en la tierra y resistencia de los patógenos a los productos químicos (Fonseca *et al.*, 2011), es por ello que el presente estudio abrirá un campo de investigación para un posible control biológico de *P. infestans* y *Rhizoctonia solani* con actinomicetos.

1.1. Justificación del problema

En las tierras altas de América del Sur se encuentra la mayor diversidad genética de papa (*Solanum tuberosum* L.). En Ecuador es cultivada en Carchi, Pichincha, Riobamba y Loja. Constituye la principal fuente de alimento para los habitantes de las zonas altas del país, con un consumo que fluctúa según las ciudades: 122 kg en Quito, 80 kg en Cuenca y 50 kg en Guayaquil. Los restaurantes de Quito y Guayaquil consumen alrededor de 16.294 t/año, principalmente de papa frita y a la francesa (Andrade *et al.*, 2002).

El 90% de consumo del tubérculo en el país es en su estado fresco. A nivel industrial, los productos elaborados son papas fritas en formas de “chips”, a la francesa, congeladas, pre fritas y enlatadas. También se obtiene almidón, alcohol y celulosa de la cáscara. Hoy en día las industrias procesadoras utilizan 50.000 t/año, lo cual representa el 10% de la producción nacional (Andrade *et al.*, 2002).

Por lo tanto, la papa se puede considerar un producto importante del Ecuador, sobre todo como alimento de su población y apoyo económico a las

comunidades que la producen. Los agricultores deben garantizar la calidad de su cultivo. La papa es sensible a una amplia gama de enfermedades como la lancha y costra negra que afectan la calidad del tubérculo o pueden causar una pérdida total de los sembríos. Para evitar estas amenazas los productores toman medidas “preventivas” y tratan los suelos con fungicidas así no haya presencia de patógenos que puedan causar daños a la siembra (Andrade *et al.*, 2002).

El uso indiscriminado de fungicidas pueden causar erosión en el suelo dejándolo improductivo y provocar resistencia en los patógenos. Una opción eficiente y amigable con el ambiente es el control biológico de las enfermedades fúngicas en plantas, como una alternativa o complemento de los fungicidas (Vargas, 2006).

Por ello es importante establecer un estudio del antagonismo que presentan cepas de actinomicetos aislados de suelos papeiros de la región andina del Ecuador contra *P. infestans* y *R. solani*, con miras a establecer un control biológico del tizón tardío o lancha y rhizoctoniasis por parte de actinomicetos.

1.2. Objetivos de la investigación

1.2.1. Objetivo general

Seleccionar actinomicetos aislados de suelos paperos de la provincia de Loja, antagónicos a *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary y *Rhizoctonia solani* Kühn, mediante ensayos *in vitro* y pruebas de invernadero en *Solanum tuberosum* L.

1.2.2. Objetivos específicos

- Activar y mantener las cepas liofilizadas de actinomicetos aisladas de los suelos paperos de la provincia de Loja en el 2011.
- Mantener las cepas de *Phytophthora infestans* para los ensayos en laboratorio.
- Aislar *Rhizoctonia solani* de tubérculos comerciales que presenten los síntomas de la enfermedad.
- Realizar pruebas de inhibición de actinomicetos contra *P. infestans* utilizando la técnica dual a nivel de laboratorio.
- Efectuar pruebas antagónicas *in vitro* enfrentando actinomicetos contra *R. solani*.

- Escoger las cepas de actinomicetos que presenten mayor y menor inhibición a los patógenos *P. infestans* y *R. solani*, respectivamente, para los ensayos posteriores.
- Realizar bioensayos antagónicos en folíolos de papa con actinomicetos seleccionados en los ensayos *in vitro* contra *P. infestans*.
- Determinar la capacidad antagónica de actinomicetos contra *P. infestans* en los bioensayos de folíolos.
- Determinar la actividad antagónica de actinomicetos frente a *R. solani* a nivel de invernadero.

1.3. Marco teórico

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

1.3.1.1. Importancia del cultivo

Solanum tuberosum se domesticó en Sudamérica hace 10000 y 7000 años, específicamente en Bolivia, entre los lagos Titicaca y Poopó, aunque los primeros vestigios que tienen una antigüedad de 10,500 años se encontraron en el cañón de Chilca, al sur de Lima en Perú. Se han obtenido evidencias arqueológicas que indican que la papa fue cultivada por varias culturas antiguas, como la Inca, la Tiahuanaco, la Nazca y la Mochica (Contreras, 1999).

A pesar de que América Latina fue el centro de origen de la papa, solo se cultivan aproximadamente 1,1 millones de hectáreas de papa cada año, de las cuales al Ecuador corresponden 66 000 ha. A nivel mundial, la mayor producción papera por área cultivada se da en Holanda, Estados Unidos, Bélgica-Luxemburgo y Canadá. En Latinoamérica, Argentina tiene la mayor producción de papa por área cultivada (22 t/ha), seguida por Chile y Brasil (15 t/ha). Colombia y Venezuela producen los rendimientos más altos (16 t/ha) en la región de los Andes (Andrade *et al.*, 2002).

En el Ecuador, el cultivo de papa es importante porque es fuente de alimento de la población, siendo un aporte nutricional porque posee un alto contenido de carbohidratos. El cultivo se da con mayor producción en las provincias de Chimborazo y Carchi, además es respaldo económico de las comunidades que cultivan papa a lo largo de la región andina del país (Vargas, 2006).

1.3.1.2. Clasificación botánica

La tabla 1.1 corresponde a la clasificación taxonómica de la papa.

Tabla 1.1: Clasificación taxonómica de la especie *Solanum tuberosum* L. (Burton, 1966).

Familia	Solanaceae
Género	<i>Solanum</i>
Subgénero	Potatoe
Sección	Petota
Serie	Tuberosa
Especie	<i>Tuberosum</i>

1.3.1.3. Descripción botánica

La papa es una planta dicotiledónea herbácea anual, que pertenece a la familia de las solanáceas, es una planta perenne debido a que es capaz de reproducirse por tubérculos. Se diferencian varias partes en la planta de papa (figura 1.1):

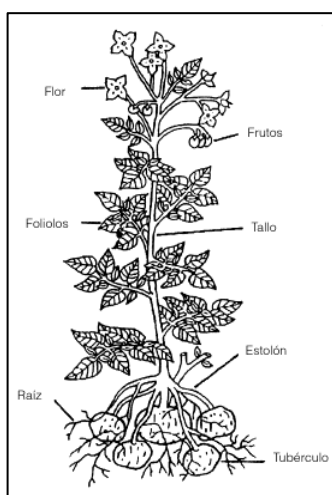


Figura 1.1: Partes de una planta de papa (Alonso, 2002).

Parte aérea

La parte aérea de la papa está compuesta por el tallo, hojas, flores y frutos. Los tallos son fuertes, gruesos, angulosos y de color verde, alcanzan una altura de 0,5 a 1 m en el desarrollo máximo de la planta y se originan en las yemas del tubérculo madre. Los tallos son herbáceos pero en etapas avanzadas del desarrollo, la parte inferior puede ser relativamente leñosa. Los estolones de la papa son tallos laterales, normalmente subterráneos (Alonso, 2002).

Las hojas son imparipinnadas, constan de nueve o más folíolos. Las hojas maduras son compuestas y consisten en un peciolo con un folíolo terminal, folíolos laterales, folíolos secundarios y a veces folíolos terciarios. Hay más estomas en la parte inferior de las hojas que en la superior (Alonso, 2002).

Las flores son pentámeras y los colores son diversos variando desde el blanco al morado; las flores tienen estilo y estigma simples y el ovario es bilocular. La dispersión del polen es llevada a cabo por el viento. El número de flores y frutos depende de la variedad de papa. El fruto maduro es una baya de forma redonda u oval, consta de dos cavidades o lóculos en los que se alojan las semillas, el número de semillas de cada fruto es variable, puede ir desde ninguna hasta más de trescientas. Comercialmente no se cultivan papas desde las semillas verdaderas, porque se produce una gran variabilidad fenotípica (Alonso, 2002).

Raíces

El sistema radicular está formado por raíces adventicias, ramificadas, finas y largas, que se desarrollan a partir del tallo subterráneo, entre el tubérculo semilla y la superficie del suelo. No profundizan más de 40 a 50 centímetros. En las primeras etapas del cultivo, el sistema radicular se limita a la zona superficial del suelo, extendiéndose las raíces hacia abajo después de haberse expandido horizontalmente hasta una cierta distancia (Alonso, 2002).

Tubérculos

Se puede considerar al tubérculo como una parte del tallo que se ha adaptado para almacenar reservas y para la reproducción. El tubérculo se

forma en el extremo del estolón como consecuencia de las reservas que se producen en el desarrollo y división celular (Alonso, 2002).

El consumo del tubérculo aporta más nutrientes que energía al organismo. Es una fuente de vitamina C, proveyendo cerca del 40% de la dosis diaria recomendada, también contiene vitaminas del complejo B. Es rica en algunos minerales, como el potasio. El consumo diario de 150 y 300 g de papa proporciona entre el 4% y 8% de las calorías requeridas para un adulto (Alonso, 2002).

Los otros constituyentes básicos de la papa son: azúcares, ácido ascórbico y vitaminas. El contenido de agua en un tubérculo fresco varía entre 63% a 87%; de hidratos de carbono, 13% a 30%, contenido de fibra 0.17% a 3.48%, de proteínas 0.7% a 4.6%; de grasas entre 0.02% a 0.96%; y de cenizas, 0.44% a 1.9% (CIP, 1999).

1.3.2. Tizón tardío o lancha de la papa

La lancha o tizón tardío es una enfermedad que afecta a los cultivos de papa en el Ecuador. En condiciones favorables al tizón, un cultivo sin protección puede ser destruido en una semana o menos. Los agricultores hacen inversiones considerables para proteger sus cultivos de la enfermedad (Oyarzún *et al.*, 2002).

La lancha se desarrolla en temperaturas entre 12 y 18°C, estas condiciones son favorables en la Sierra, además de alta humedad, lluvias matinales y sol intenso por las tardes, la siembra de papa durante todo el año beneficia al patógeno. El uso de variedades de papa susceptibles al patógeno agrava la situación (Oyarzún *et al.*, 2002).

Se consideran dos tipos de resistencia genética al tizón tardío. La resistencia diferencial es gobernada por pocos genes y funciona para ciertos rasgos del patógeno, al contrario de la resistencia general que está gobernada por varios genes con efectos continuos. En el caso del tizón tardío, la resistencia diferencial ha sido efímera, debido a que el patógeno fácilmente puede evitarla. Cuando una variedad tiene resistencia diferencial, puede ser difícil medir su nivel de resistencia general (Oyarzún *et al.*, 2002).

Síntomas

La infección de *P. infestans* inicialmente se presenta como manchas húmedas circulares e irregulares de color verde oscuro que por lo general están en las puntas o bordes de las hojas. En tiempo húmedo se expanden rápidamente, formando lesiones necróticas de color café oscuro. Cuando las lesiones llegan al tallo pueden acabar rápidamente con la planta (Ferrera y Alarcón, 1995; Oyarzún *et al.*, 2002).

En los límites de las lesiones, en el envés de las hojas, se puede observar crecimiento fungoso cuando hay suficiente humedad y es común observar un halo que va del amarillo al verde claro. Las lesiones infectan todo el folíolo y, más tarde, todos los folíolos de la hoja mueren y se hacen flácidos (Ferrera y Alarcón, 1995).

Para identificar que el cultivo está infectado con *P. infestans* es necesario confirmar la presencia de esporangios a través de la observación directa o luego de un periodo de incubación del tejido enfermo en cámara húmeda (Oyarzún *et al.*, 2002).

La infección del tubérculo no es común en Ecuador, pero en los países andinos del sur, la lancha afecta al tubérculo. En un principio, aparecen manchas irregulares de un color pardusco o entre negro y púrpura y al final, provoca una pudrición seca de color café oscuro (Ferrera y Alarcón, 1995).

Agente causal

El patógeno que causa la lancha en la papa es *Phytophthora infestans* (Mont) De Bary, su nombre deriva de dos voces griegas: Phyto = planta y phthora = destructor, se encuentra dentro del Reino de los Chromista, porque la pared celular tiene celulosa, son diploides, el micelio no tiene septas y son bisexuales (CIP, 1999).

Su clasificación taxonómica se detalla en la tabla 1.2:

Tabla 1.2: Clasificación taxonómica de *Phytophthora infestans* (Van De Peer, *et al.*, 1997).

TAXON	NOMBRE
Super- Reino	Eukaryota
Reino	Chromista
Phylum	Oomycota
Orden	Peronosporales
Familia	Peronosporaceae
Género	<i>Phytophthora</i>
Especie	<i>infestans</i>

El micelio de *P. infestans* está compuesto por filamentos hialinos. Segmentos especiales del micelio son llamados esporangióforos (figura 1.2), son estructuras ramificadas de crecimiento indeterminado. En las puntas se forman los esporangios papilados que tienen la forma de un limón (Erwin y Ribeiro, 1996).



Figura 1.2: Esporangióforo de *P. infestans* con su esporangio (Rivas, 2010).

El diámetro del micelio (figura 1.3) depende de las características físicas y químicas del medio donde se desarrolla, por lo general se encuentra entre los 5 y 8 μm (Erwin y Ribeiro, 1996; Kamoun, 2003).



Figura 1.3: Fotografía del micelio de *Phytophthora infestans* (Rivas, 2010).

Los esporangios (figura 1.4) son estructuras asexuales. Cuando se desprenden, germinan en zoosporas a temperaturas menores de 12 y 15°C. A temperaturas mayores de 15°C, germinan directamente produciendo un tubo germinal. Se producen de 3 a 8 zoosporas por esporangio, las cuales son diseminadas cuando se rompe la pared esporangial a nivel de su papila. Las zoosporas tienen forma periforme (forma de pera) y presentan dos flagelos para su locomoción (Ferrera y Alarcón, 1995).



Figura 1.4: Esporangios de *P. infestans* (Woloshuk *et al.*, 1991).

La reproducción del patógeno también se puede dar de forma sexual. El chromista requiere un par de tipos de compatibilidad A1 y A2. En la mayoría de los países, como en Ecuador, solo se ha reportado un tipo de compatibilidad. Sin embargo, en México es común encontrar oosporas de *P. infestans*. Cuando los dos tipos de compatibilidad crecen uno cerca del otro, la hifa femenina crece en dirección del anteridio joven y forma un oogonio, que al ser fecundado por el anteridio se desarrolla en una oospora dura y de pared gruesa. Las oosporas germinan por medio de un tubo germinal, el cual produce un esporangio u otras veces forma directamente un micelio. El ciclo de vida de *P. infestans* se puede observar en la figura 1.5.

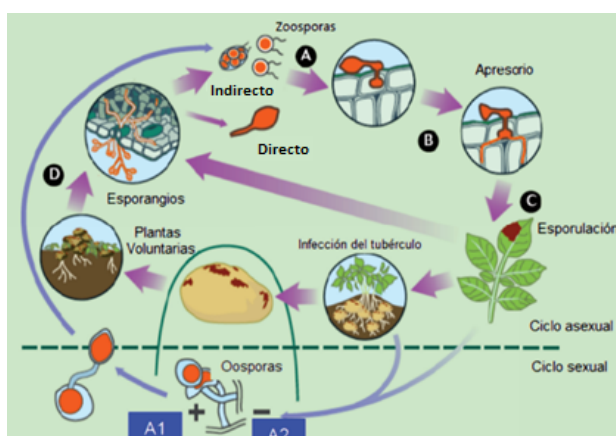


Figura 1.5: Ciclo de vida de *P. infestans* en la naturaleza (Neumann & Lundstedt, 2012).

Ciclo de la enfermedad

La presencia de micelio del patógeno en tubérculos infectados que no fueron eliminados o no se cosecharon porque el campo fue destruido por la enfermedad, hace posible que *P. infestans* sobreviva de un cultivo a otro. Bajo condiciones favorables, el micelio produce esporangios, los cuales se diseminan por el aire o con la neblina a otros campos de papa en desarrollo (CIP, 1999).

El micelio se puede encontrar en el interior de tubérculos aparentemente sanos, cuando el productor siembra dichos tubérculos, la enfermedad puede invadir el interior de los tallos. En este caso, los síntomas se presentan en uno o algunos tallos de la planta, aun cuando las condiciones ambientales no sean favorables para el desarrollo del patógeno (CIP, 1999).

El patógeno constituye un foco de infección para otros campos de cultivo cuando se incrementa en las plantas infectadas, luego invade plantas del mismo campo y posteriormente se desplaza por el aire, neblina y agua (CIP, 1999).

Control

El control de la lancha o tizón tardío se puede lograr con la combinación de varias medidas sanitarias, cultivo de variedades resistentes a la

enfermedad y aspersiones con compuestos químicos aplicadas en la temporada adecuada (Ferrera y Alarcón, 1995).

Algunas variedades poseen “resistencia de campo”, que es eficaz contra algunas razas del patógeno. Sin embargo, se necesita proteger al cultivo con un fungicida porque en condiciones favorables, la enfermedad puede atacar al cultivo a pesar de que sea resistente (Ferrera y Alarcón, 1995).

Las aspersiones químicas con fungicidas, casi siempre mantienen bajo control al tizón tardío. Se deben llevar a cabo cuando las plantas de papa tengan una altura de 15 a 30 centímetros o, por lo menos, 10 días antes de la fecha en que aparezca el tizón tardío en la zona de cultivo. Cuando el tiempo es húmedo, lluvioso, brumoso y las noches moderadamente frías, las aspersiones químicas se deben realizar cada 5-10 días (Ferrera y Alarcón, 1995).

La protección del follaje reciente y anterior es esencial para que las plantas sean protegidas de la enfermedad. Una vez que se ha establecido el tizón, es extremadamente difícil controlarlo, a menos de que las condiciones medioambientales se vuelvan desfavorables. Los compuestos químicos que se utilizan para el control de la enfermedad son mancozeb, metalaxyl, captafol, clorotalonil, polyram y el hidróxido de fentina (Ferrera y Alarcón, 1995).

Control genético

El control genético se enfoca en obtener variedades de plantas de papa resistentes a la lancha modificando su material genético. Los estudios son continuos debido a que el patógeno tiene la capacidad de saltar la resistencia de las plantas con razas más agresivas. En la actualidad se reconocen dos tipos de resistencia: la resistencia vertical y la resistencia horizontal (CIP, 1999).

Las plantas de papa con resistencia vertical solo son invulnerables a un cierto número de razas del patógeno, está gobernada por genes mayores conocidos como genes R. Las plantas sucumben ante la aparición de nuevas razas del patógeno, por lo que este tipo de resistencia tiene corta duración en el campo (CIP, 1999).

La resistencia horizontal está gobernada por genes menores y otras características de la planta que inhiben el crecimiento del patógeno, es estable en el tiempo y espacio. Las plantas con esta resistencia se infectan con el patógeno pero los síntomas son menores que en plantas susceptibles. Cuando el ambiente es favorable para el patógeno, la planta pierde la resistencia y se comporta como susceptible, pero cuando las condiciones vuelven a ser desfavorables para el desarrollo de la enfermedad, la variedad vuelve a comportarse como resistente (CIP, 1999).

1.3.3. Rhizoctoniasis

Rhizoctoniasis o costra negra es una enfermedad fúngica que se encuentra en los suelos paperos del Ecuador. Es causada por *Rhizoctonia solani*, un hongo resistente que es difícil de eliminar porque puede formar esclerocios y permanecer en estado latente hasta que las condiciones ambientales sean adecuadas para la germinación (Oyarzún *et al.*, 2002).

El ataque moderado del hongo puede causar pérdidas del 20% de la producción. El hongo ataca a una amplia gama de plantas, pero se ha encontrado que existe una clara especialización dentro de la población por determinados huéspedes. Existen formas no-patógenas del hongo que eventualmente actúan como antagonistas de las formas patógenas (Oyarzún *et al.*, 2002).

Síntomas

Los síntomas más comunes de la enfermedad por *R. solani*, en la mayoría de las plantas, son el ahogamiento de las plántulas y la pudrición de las raíces, así como la pudrición y cancrrosis del tallo de las plantas adultas y en proceso de crecimiento, además afecta a los tubérculos de papa formando esclerocios (Ferrera y Alarcón, 1995).

El ahogamiento se produce principalmente en suelos fríos y húmedos, las plántulas jóvenes pueden morir antes o poco después que hayan emergido del suelo, esto se da porque el hongo mata el ápice de crecimiento. En los brotes de los tubérculos de papa se pueden observar puntas muertas y lesiones marcadas de color café antes de su muerte. Las plántulas que lograron emerger presentan tallos aguanosos y blandos, incapaces de sostener a la plántula causando su muerte (Ferrera y Alarcón, 1995).

Las plántulas maduras también son atacadas por el hongo, este invade los tejidos corticales externos y produce grandes lesiones de color que va de canela a café rojizo (figura 1.6), las lesiones rodean todo el tallo y la plántula muere (Ferrera y Alarcón, 1995).



Figura 1.6: Plántulas de papa afectadas por *Rhizoctonia solani* (CIP, 1999).

En estadios más avanzados de las plantas, la infección de las raíces y tallos por *Rizhoctonia*, se expresa en la parte aérea como un enrollamiento de las hojas hacia su cara superior en la región del tope. Como los tallos se estropean, no se puede transportar azúcares a los tubérculos, provocando la formación de tubérculos aéreos (CIP, 1999).

El ataque de *Rhizoctonia* en los tubérculos causa deformaciones. Se los conoce como tubérculos “formas de muñecas”. Los esclerocios o costras negras en la superficie de los tubérculos (figura 1.7) se forman cuando el follaje madura y muere. No pueden ser eliminados mediante el lavado y son estructuras que permiten que el hongo se mantenga en los campos de cultivo (CIP, 1999).



Figura 1.7: Tubérculos de papa mostrando esclerocios de *Rhizoctonia* GA3 (CIP, 1999).

Agente causal

La enfermedad es causada por el hongo *Rhizoctonia solani* Khün. (fase asexual), *Thanatephorus cucumeris* (Frank.) Donk (fase sexual). *R. solani* en su etapa inicial forma un micelio incoloro, pero conforme madura se torna de un color amarillo o café claro. El micelio tiene ramificaciones que forman un ángulo recto con respecto a la hifa principal (figura 1.8), se estrechan ligeramente a nivel de la bifurcación y poseen un septo cerca de ella, estas características son las más comunes para poder identificar al hongo (Ferrera y Alarcón, 1995).

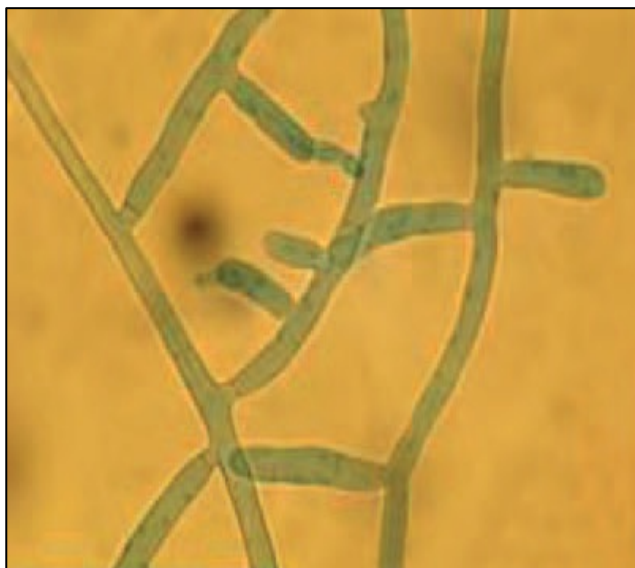


Figura 1.8: Hifas de *Rhizoctonia solani* con ramificación en ángulo recto (Castro y Conteras, 2011).

Rara vez se puede observar el estado perfecto de basidiomiceto del hongo (*Thanatephorus cucumeris*), esto solo ocurre cuando hay suficiente humedad, y tiene aspecto de un mildiu fino que se desarrolla sobre el suelo, hojas y tallos infectados que se encuentran por arriba de la superficie del suelo. En las provincias de Carchi, Tungurahua y Chimborazo se ha encontrado al hongo en su fase sexual. Los basidios tienen forma de barril, se forman sobre una capa membranosa de micelio y tiene cuatro esterigmas, cada uno de los cuales produce una basidiospora ovoide (Ferrera y Alarcón, 1995; Oyarzún *et al.*, 2002).

Una particularidad del hongo es que pertenece a un grupo de anastomosis (GA). Estos GA se diferencian entre sí morfológica, fisiológica y serológicamente. Se conocen ocho grupos de anastomosis de *R. solani*, de los cuales cinco afectan a la papa, (GA2, GA3, GA4, GA5 y GA7), los más importantes son GA3 que forma esclerocios en la superficie de los tubérculos

y soporta temperaturas bajas. GA4, es el más patogénico y soporta temperaturas altas (CIP, 1999).

El patógeno permanece como micelio y esclerocios en el suelo, en plantas perennes infectadas o en órganos de propagación como los tubérculos de papa. Se encuentra presente en la mayoría de los suelos y una vez que se ha establecido en un campo, permanece por tiempo indefinido. El hongo se disemina por la lluvia, el riego o por aspersión por inundación y a través de órganos de propagación infectados o contaminados (Ferrera y Alarcón, 1995).

Ciclo de la enfermedad

El hongo se mantiene de un año a otro mediante esclerocios (GA3) y micelio (GA4) en residuos de cosecha. En condiciones favorables de humedad, los esclerocios germinan y el micelio se desarrolla infectando los brotes, tallos, raíces y estolones. En los nuevos tubérculos, se forman esclerocios en condiciones de suficiente humedad y temperatura óptima de 18°C, sin embargo, el máximo desarrollo de esclerocios se produce cuando los tubérculos que se encuentran listos para ser cosechados se mantienen en el campo por un tiempo prolongado. El ciclo de vida del hongo se observa en la figura 1.9.

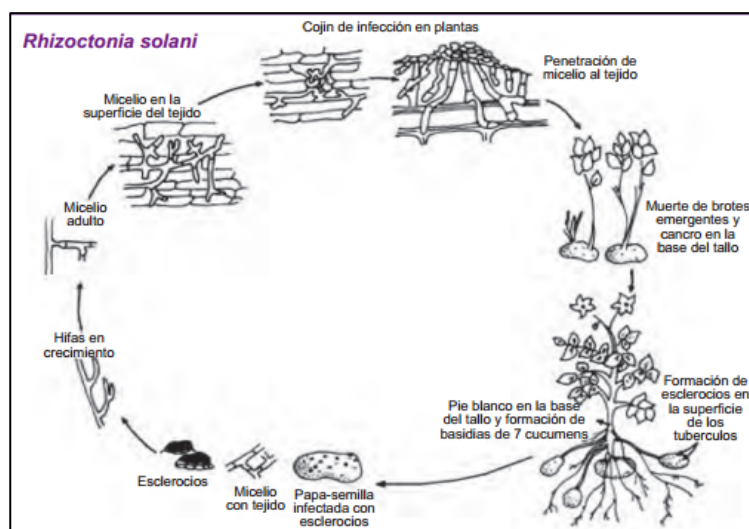


Figura 1.9: Ciclo biológico de *Rhizoctonia solani* (Castro y Contreras, 2011)

Control

La prevención de la enfermedad empieza con el uso de semillas libres de esclerocios o desinfectadas con tratamientos químicos antes de ser plantadas. Se debe realizar una rotación apropiada de cultivos, 2 a 3 años de preferencia con gramíneas (Castro y Conteras, 2011).

La incidencia del hongo en la planta disminuye con el desarrollo del follaje, por eso es recomendable realizar prácticas que favorezcan a la rápida emergencia de los tallos como: sembrar en suelos temperados, sobre los 15°C, realizar una irrigación previa en suelos secos, plantar superficialmente las semillas (8-10 cm) y usar semillas prebrotadas (Castro y Conteras, 2011). Además, sembrar en suelos con buen drenaje y minimizar el período de permanencia de los tubérculos en el suelo una vez cortado el follaje. Por último, eliminar o quemar los restos de cosecha. Esta práctica es válida para

eliminar el micelio del hongo que se encuentra en restos de tallos y estolones infectados en el campo después de la cosecha (CIP, 1999).

1.3.4. Actinomicetos

Los actinomicetos son bacterias Gram positivas, aerobias y algunos anaerobias, contienen un alto contenido de Guanina y Citosina (51 a 78%). Pertenecen al orden de los Actinomycetales, por lo que presentan formas bacilares y se caracterizan por su capacidad de formar filamentos, comprenden 63 géneros constituyendo, aproximadamente 20-60% de la población microbiana del suelo (Franco, 2008; Mariano, 2009).

La palabra actinomiceto deriva del griego aktis que significa rayo y miktis que significa hongo, debido a que presentan morfologías y patrones de crecimiento similares a los hongos, como la formación de micelio y crecimiento lento. En la actualidad están clasificados dentro de las bacterias, debido a que presentan una pared celular compuesta por peptidoglicanos y no por quitina o celulosa como en los hongos, además carecen de núcleo verdadero (Sánchez *et al.*, 2005). El diámetro de sus hifas es de alrededor de 0.7 μm , son sensibles a los antibióticos, y son resistentes a los antifúngicos (Mariano, 2009).

Los actinomicetos poseen un ciclo de vida complejo, incluye el desarrollo de hifas y esporas. Cuando crece en sustratos sólidos forman una red de

hifas, las hifas se pueden desarrollar por encima del sustrato formando el micelio aéreo, que es el encargado de formar esporas usualmente en respuesta a la falta de nutrientes, las esporas no son termo resistentes pero soportan bien la desecación, por lo que tienen un gran valor adaptativo. Las hifas también se pueden desarrollar dentro del sustrato para captar los nutrientes del medio (Willey *et al.*, 2008).

Se pueden encontrar aparte del suelo en ambientes acuáticos, dulces y marinos. Participan activamente en la degradación de la materia orgánica y el ciclo del carbono. Los actinomicetos producen geosmina, metabolito que les da la característica particular del olor a suelo húmedo. Adicionalmente producen metabolitos secundarios, como antibióticos, pigmentos y enzimas extracelulares (Franco, 2008).

La mayoría de los actinomicetos son mesófilos, crecen a temperaturas entre 20 y 35°C, pero algunos presentan sistemas complejos tanto bioquímicos como genéticos, que les han permitido tener mecanismos especiales de adaptación a ambientes extremos, como salinos y alcalinos (Mariano, 2009).

Existen tres factores que influyen en la actividad de los actinomicetos en el suelo: el pH, la temperatura y el tipo de suelo. Suelos alcalinos y neutros, con cantidades mayores de materia orgánica, estimulan la multiplicación y actividad de los actinomicetos. El pH óptimo para el desarrollo y actividad de estas bacterias es de 6,5 a 8. Los actinomicetos se incrementan con la

profundidad del suelo. Los géneros *Streptomyces*, *Nocardia* y *Micromonospora* se encuentran con más frecuencia en el suelo (Franco, 2008).

1.3.5. Control biológico

Las enfermedades de plantas ligadas a patógenos del suelo, por lo general, son difíciles de controlar y sumado a esto, la demanda de seguridad alimentaria por la sociedad, ha llevado a que los productores, en su intento de controlar las plagas, apliquen grandes cantidades de productos químicos, de amplio espectro y de alta toxicidad a las especies y al hombre. Políticas de restricción al uso de pesticidas se impusieron en todo el mundo, lo que provocó un impulso de buscar nuevas alternativas, entre ellas el control biológico (Oyarzún, 2004).

Se entiende por biocontrol la disminución de las actividades productoras de enfermedades de un patógeno sobre la planta, lograda mediante la manipulación del ambiente, del hospedero o de los antagonistas del patógeno o plaga que se quiere controlar. Existen tres vías para el control biológico: exploración en el propio medio de los agentes de biocontrol, introducción o liberación masiva de agentes de control y manipulación del ambiente para favorecer el desarrollo de los antagonistas naturales presentes en el mismo (Ezziyani *et al.*, 2005).

El concepto complejo de control biológico por parte de microorganismos antagonistas, surge a partir del principio natural de que algunas especies de microorganismos se alimentan, viven y reproducen a costa de otros organismos, en los diferentes ecosistemas (Oyarzun, 2004). También se sabe que las interacciones microbio-microbio, son clave en el desarrollo y función de la rizosfera y que las poblaciones de microorganismos pueden interaccionar de manera sinérgica o bien antagónica (Ezziyyani *et al.*, 2005). El control biológico como sistema complejo incorpora las diferentes formas de control genético, físico, cultural, microbial, mecánico y químico para el manejo integrado de agentes nocivos (Oyarzun, 2004).

1.3.5.1. Mecanismos de acción del control biológico

Los mecanismos detrás del antagonismo son: antibiosis, competencia por nutrientes, ocupación física del hábitat y parasitismo (Oyarzun, 2004).

Antibiosis

La antibiosis se define como la inhibición del metabolismo o el crecimiento de un organismo por la acción de una sustancia a bajas concentraciones, producida por otro organismo (Jacas *et al.*, 2005). Los antibióticos son el mecanismo más estudiado de antagonismo, pueden producir lisis celular a bajas concentraciones y afectan en el crecimiento de las células, son producidos por parte de un microorganismo competidor de antibióticos (Rubio

y Fereres, 2005). La producción de antibióticos depende de la disponibilidad de nutrientes y por lo general se ve favorecida por aportes suplementarios de compuestos orgánicos (Jacas *et al.*, 2005).

Un ejemplo de antibiosis es *Gliocladium virens* activo agente usado en biocontrol contra patógenos de suelo como *Pythium ultimum* y *Rhizoctonia solani*. *G. virens*; produce gliotoxinas y gliovirinas que son tóxicas e inhiben el crecimiento de los patógenos (Rubio y Fereres, 2005).

Competencia

La competencia sucede cuando al menos dos microorganismos necesitan el mismo requerimiento y el uso por uno reduce la cantidad disponible para el otro. La competencia puede ser por los sitios de infección, donde la ocupación de dichos sitios por un microorganismo impide la colonización por otro o bien por determinados nutrientes competencia (Rubio y Fereres, 2005).

Competencia por nutrientes: El mecanismo de competencia por nutrientes está demostrado en cuanto a las fuentes de carbono y nitrógeno, también es posible para otros requerimientos como oxígeno, hierro y en el caso de autótrofos por la luz. Si hay un exceso del nutriente, de forma que hay para todos, no hay competencia (Rubio y Fereres, 2005).

Competencia por espacio: sucede cuando un microorganismo cubre la superficie vegetal sin dejar que otro se desarrolle. En este caso es importante la relación entre la velocidad de crecimiento del patógeno y la del antagonista.

La competencia por espacio se da principalmente en patógenos que penetran por heridas o que necesitan una concentración inicial para penetrar (Jacas *et al.*, 2005).

Parasitismo

Es un tipo de interacción directa con el patógeno y el antagonista, consiste en la utilización del patógeno como alimento del microorganismo antagonista. Generalmente están implicadas enzimas extracelulares como glucanasas, quitinasas, celulasas y proteasa, que van a romper las estructuras de los patógenos parasitados evitando su desarrollo (Larrea, 2001).

Control biológico por actinomicetos

Los actinomicetos tienen significancia ecológica, son los habitantes primarios en el suelo y están distribuidos ampliamente, pueden degradar en cantidad distintos componentes orgánicos. Se pueden utilizar como agentes biológicos, por la capacidad de producir enzimas biodegradativas como quitinasas, glucanasas, peroxidasas y otras. Según investigaciones, el género *Streptomyces* es capaz de ejercer biocontrol sobre hongos fitopatógenos, además de ser considerado promotor del crecimiento vegetal por promover la nodulación y ayudar a los bacteroides de *Rhizobium* a la asimilación del hierro en la fijación de nitrógeno en leguminosas (Sanz, 2005).

1.3.6. Control biológico en el Ecuador

En el Ecuador existen reportes de control eficiente de algunas plagas introducidas y de importancia económica mediante el control biológico clásico entre los que pueden mencionarse: el control del pulgón lanígero del manzano en 1937, el parasitoide *Aphytis lepidosaphes* para el control de la escama de los cítricos (1958), el control de *Ctenaritanina eucalipti*, plaga que ataca a los brotes de eucalipto, realizado por una avispa parásita de la familia Scelionidae, en 1998 (Tigrero, 2004).

El control biológico en el Ecuador no ha tenido un desarrollo importante y sostenido, salvo el caso de control biológico que es utilizado en forma integrada en los principales ingenios azucareros como San Carlos en la costa e IANCEN en el Valle del Chota (Tigrero, 2004).

1.3.7. Control biológico en plantas de papa.

El principal método de manejo de plagas y enfermedades del cultivo de la papa ha sido el control químico pero el efecto negativo que conlleva el uso de agentes químicos ha conducido a la búsqueda y desarrollo del control biológico. En algunos países ya se comercializa productos para el biocontrol de enfermedades de la papa, por ejemplo en Colombia la empresa Biológicos y Ecológicos de Colombia comercializan *Trichoderma*, que tiene como agente activo *Trichoderma harzianum* 50 % con concentración de 9×10^8

esporas/gramo y puede actuar contra *R. solani* (Biológicos y Ecológicos de Colombia, 2014).

Dentro de los estudios que se realizan para el control biológico de plagas de la papa se encuentra el uso del virus granulovirus o PhopGV, es un agente eficaz para controlar polillas de la papa *Phthorimaea operculella* y *Tecia solanivora* que perjudican el cultivo y el almacenamiento del tubérculo en países en desarrollo, el virus es considerado como el componente principal de los programas de manejo integrado desarrollados para controlar estas plagas (Zeddám *et al.*, 2003). En México se destaca el estudio realizado en campo por Virgen-Calleros *et al.*, 1996, donde lograron cierto control de *R. solani* con la aplicación de *Bacillus subtilis* (Zavaleta, 1999).

1.4. Hipótesis de investigación

Las cepas de actinomicetos aislados de suelos paperos de la provincia de Loja tienen actividad antagónica significativa contra los patógenos *Phytophthora infestans* y *Rhizoctonia solani*.

CAPÍTULO 2:

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Participantes

El trabajo de tesis fue ejecutado por Andrea Medina, con la dirección de Alma Koch Kaiser, MC. y codirección del Ing. Mat. Pedro Romero Saker.

2.2. Zona de estudio

El trabajo de tesis fue continuación del proyecto financiado por la ESPE “Caracterización de factores de supresividad presentes en suelos andinos a *Phytophthora infestans* y a otros oomicetos” realizado en el 2009, por Ma. Soledad Benítez, PhD y Alma Koch Kaiser, MC. Se ejecutaron tres tesis tituladas: “Estudio de supresión a *P. infestans* por poblaciones microbianas aisladas de suelos paperos de la provincia de Chimborazo en dos diferentes tiempos de muestreo” (Mogrovejo, 2010); “Análisis de comunidades bacterianas relacionadas con la supresividad a *P. infestans* en suelos paperos de las provincias de Carchi y Loja (Orquera, 2010) y “Capacidad de infección de *P. infestans* en suelos paperos, procedentes de las provincias de Carchi, Pichincha, Chimborazo y Loja, y su inhibición por actinomicetos nativos” (Villamarín, 2011). Una de las contribuciones del proyecto fue un banco de más de 100 cepas de *Bacillus*, *Pseudomonas* y actinomicetos. Para este

estudio se utilizaron 15 cepas de actinomicetos liofilizados aislados de la provincia de Loja (Villamarín, 2011).

El proyecto se desarrolló en el laboratorio de Microbiología Ambiental del Centro de Investigaciones Científicas (CEINCI) de la ESPE - Campus Sangolquí, y en el Centro Internacional de la Papa (CIP) ubicado en Cutuglagua.

2.3. Período de tiempo de investigación

El proyecto de tesis se desarrolló entre los meses de febrero y diciembre del 2013.

2.4. Procedimiento

2.4.1. Mantenimiento de las cepas de *Phytophthora infestans*.

Se utilizaron dos cepas de *P. infestans*: “ESPE1” que se obtuvo del proyecto financiado por la ESPE 2012-2013 “Aislamiento, caracterización y diversidad genética de *P. infestans* en suelos papeiros de la provincia de Carchi y potencial de infección del inóculo en hojas y tubérculos”, realizado en los laboratorios de Microbiología-ESPE por Mera (2013) y CIP84 que corresponde al banco de cepas del Centro Internacional de la Papa, aislada

de folíolos en el año 2012. Las cepas se mantuvieron en cajas petri con agar centeno a temperatura ambiente (Paz y Miño, 1998).

2.4.2. Aislamiento de cepa de *Rhizoctonia solani*.

El aislamiento del hongo *Rhizoctonia solani* se realizó a partir de siembras de tubérculos de papas dañados por este patógeno en el medio papa dextrosa-agar (PDA). Las papas se lavaron con agua corriente y se cortaron en trozos pequeños para ser desinfectados con hipoclorito de sodio al 10%, alcohol al 70% y cloranfenicol. Posteriormente se lavaron tres veces con agua destilada estéril para eliminar los desinfectantes y se secaron con papel toalla estéril. Los trozos se colocaron en el medio de cultivo y se incubaron a 28°C por 8 d (Castillo, 2004). Se reconoció al hongo tanto microscópica como macroscópicamente y se purificó en el medio PDA modificado por (Vargas, 2006).

La conservación de *R. solani* se realizó en medio PDA (Brown, 2001).

2.4.3. Activación de las cepas de actinomicetos liofilizadas

Se utilizaron 15 cepas liofilizadas de actinomicetos aislados de la provincia de Loja por Villamarín (2011) en su tema de tesis titulado: “Capacidad de infección de *P. infestans* en suelos paperos, procedentes de las provincias de Carchi, Pichincha, Chimborazo y Loja, y su inhibición por

actinomicetos nativos”, el cual, formó parte del proyecto financiado por la ESPE “Caracterización de factores de supresividad presentes en suelos andinos a *Phytophthora infestans* y a otros oomicetos” realizado en el 2009, por Ma. Soledad Benítez, PhD y Alma Koch Kaiser, MC.

2.4.3.1. Hidratación

Las muestras se suspendieron en agua peptonada estéril 0.1% p/v, durante 1 h (Franco *et al.*, 2009).

2.4.3.2. Siembra

El medio de cultivo que se utilizó para la siembra fue Caldo Glicerol Extracto de Levadura (YGB) contenido en matraces de 100 mL.

Pasado el tiempo de suspensión, se realizó una agitación en vórtex al vial que contenía el actinomiceto e inmediatamente se colocó una gota de la suspensión en el matraz con el medio de cultivo.

2.4.3.3. Incubación

Los matraces se dispusieron en una incubadora con agitación a 25°C, 150 rpm, por un periodo de 10 d.

2.4.3.4. Traspaso

Transcurridos los 10 d, se traspasó una alícuota del crecimiento obtenido en el matraz al medio de cultivo Agar Glicerol Extracto de Levadura (YGA) según Brown (2001) y se incubó a 25°C por 10 d.

2.4.4. Pruebas de antagonismo *in vitro* para *P. infestans*

Las pruebas de antagonismo se realizaron mediante la técnica dual (Venner y Martin, 2009). Consistieron en enfrentar a cada cepa de actinomiceto contra la cepa de *P. infestans*, bajo condiciones controladas de temperatura (20 °C).

El procedimiento se realizó en cajas Petri en medio YGA. El actinomiceto y el patógeno se colocaron en la caja Petri al mismo tiempo como se muestra en la figura 2.1 y los resultados se evaluaron a los 22 d de incubación (Villamarín, 2011).

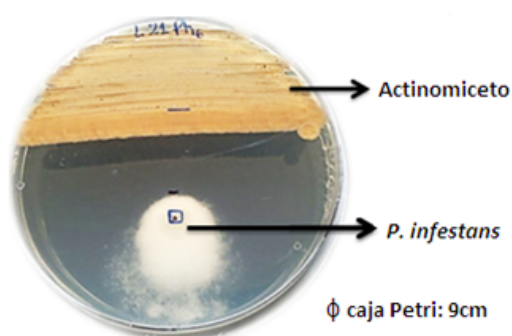


Figura 2.1: Prueba dual en caja Petri entre la cepa de actinomiceto Loja 21 y cepa *P. infestans* ESPE1, 22 d de incubación.

2.4.5. Pruebas de antagonismo *in vitro* para *Rhizoctonia solani*.

Las pruebas de inhibición a *Rhizoctonia sp.* se realizaron mediante la técnica dual, a condiciones controladas de temperatura (20°C). Se enfrentó cada cepa de los actinomicetos con la cepa de *Rhizoctonia solani*, aislada anteriormente. El actinomiceto se colocó en medio YGA. (Brown, 2001). Después de 76 h de incubación (Villamarín, 2011), se sembró el patógeno (figura 2.2).

Los resultados se evaluaron a los cuatro días de inoculación del patógeno (Villamarín, 2011).

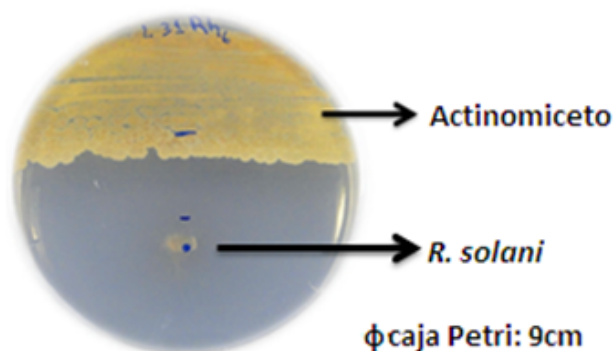


Figura 2.2: Prueba dual entre la cepa de actinomiceto Loja 21 y cepa *R. solani*, 6 d de incubación. Fuente: Medina (2013).

El diseño experimental para las pruebas duales con los dos patógenos fue un diseño completamente al azar (DCA) con seis repeticiones por cada cepa de actinomiceto. El análisis de datos se realizó con el programa estadístico InfoStat versión 2012. Se hizo un análisis de varianza no paramétrico Kruskal Wallis. La unidad experimental fue una caja Petri con el actinomiceto y el

patógeno. La variable dependiente a evaluar fue el crecimiento de *P. infestans* y *R. solani*, respectivamente.

2.4.6. Pruebas de antagonismo *in vitro* en folíolos de papa de la variedad “uvilla” para *P. infestans*.

2.4.6.1. Preparación del inóculo de actinomicetos

Para el inóculo de actinomicetos se sembraron las cepas en medio YGB y se incubaron por 9 d a 25°C, la biomasa se extrajo por centrifugación a 3000 RPM por 10 min (El-Tarabily *et al.*, 2008). Se ajustó el peso a 2 g de biomasa húmeda por cada cepa de actinomiceto y se resuspendió en 9 mL de solución salina. La solución se colocó en un aspersor de 50 mL.

2.4.6.2. Inoculación de actinomicetos en folíolos de papa

Se utilizaron folíolos de la zona media de plantas de papa de un mes de edad. Se sumergieron en agua destilada estéril por 1 h para que se hidraten. Se secaron con papel toalla y se colocaron en la tapa de la caja Petri con medio agar agua (Maila, 2010). Los actinomicetos se inocularon en forma de aerosol por el envés de la hoja con un aspersor manual. Cada folíolo fue inoculado con 1 mL de la solución de los actinomicetos y se dejaron secar por 2 h en la cámara de flujo (Lozoya *et al.*, 2006).

2.4.6.3. Preparación del inóculo de *P. infestans*

Se utilizó como inóculo la cepa *P. infestans* CIP84. Se realizó un lavado con agua destilada estéril de dos cajas Petri colonizadas por el oomicete y se ajustó la solución a 2×10^4 esporangios/mL (Andrade-Piedra *et al.*, 2005; Lozoya *et al.*, 2006), mediante la cámara de Neubauer (CIP, 2001).

2.4.6.4. Inoculación de *P. infestans* CIP84 en folíolos de papa

Después de dos horas de la aplicación de los actinomicetos en los folíolos, se procedió a inocular con una gota de 40 μ L de la solución de esporangios de *P. infestans*. La gota se colocó por el envés y cerca de la nervadura principal de los folíolos. Se incubó a 18°C por 5 d (Andrade-Piedra *et al.*, 2005; Maila, 2010).

La unidad experimental fue la caja Petri que contenía un folíolo de papa, la variable a evaluar fue la presencia o ausencia de la infección por *P. infestans*. Se realizaron tres repeticiones del experimento con diez réplicas. Las gráficas descriptivas de los datos se efectuaron en el programa Microsoft Office Excel 2007 y el análisis comparativo con el software estadístico InfoStat.

2.4.6.5. Prueba de supervivencia de actinomicetos inoculados en folíolos de papa

Se realizaron pruebas de supervivencia de los actinomicetos en el inóculo inicial, a los 2, 4 y 5 d a partir de la aplicación de los actinomicetos en los folíolos de papa. La prueba inicial consistió en una aspersión del inóculo en una caja Petri con medio YGA, se incubó por 7 d a 25°C.

Para las siguientes pruebas se realizaron tres cortes de 1 cm² de los folíolos inoculados con las tres cepas de actinomicetos, respectivamente. Los trozos se colocaron en medio YGA y se incubaron por 7 d a 25°C (De Araújo *et al*, 2000).

2.4.7. Pruebas de antagonismo en invernadero para *R. solani*

Las pruebas de antagonismo en invernadero consistieron en enfrentar a cada una de las tres cepas de actinomicetos seleccionados en el ensayo de laboratorio contra *R. solani* en sustrato estéril, para observar si se presentaba signos de la enfermedad producida por el patógeno en plantas de papa.

2.4.7.1. Preparación del inóculo de actinomicetos

El inóculo de las tres cepas de actinomicetos se preparó, respectivamente, según la modificación de la metodología propuesta por (El-

Tarabily *et al.*, 2008). La biomasa húmeda se ajustó a 11 g y se resuspendió en 40 mL de solución salina. La solución fue colocada homogéneamente en 2000 g de sustrato estéril (tierra zanja, pomina y humus) y se dejó que los actinomicetos se establezcan por 24 h (Jayasinghe & Parkinson, 2008).

2.4.7.2. Preparación del inóculo de *R. solani*

El inóculo de *R. solani* se realizó en semillas de avena autoclavada. Las semillas de avena se aforaron en una probeta de 500 mL hasta llegar a 250 mL, después se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 1 L y se agregó 250 mL de agua. Los matraces se autoclavaron dos veces por 90 min en 2 d consecutivos y se sembraron con 10 trozos (4-5 mm) de un cultivo de una semana de *Rhizoctonia solani* en PDA. Los matraces se agitaron una vez por semana y se incubaron a temperatura ambiente por cuatro semanas. Las semillas colonizadas se extendieron sobre papel absorbente, se dejaron secar por dos días bajo una cámara de flujo laminar. El inóculo se almacenó a 4°C hasta su uso (Paulitz y Schroeder, 2005).

2.4.7.3. Inoculación de sustrato con *R. solani* y actinomiceto

Se colocó 20 g del inóculo con *R. solani* en 1250 g de sustrato estéril (Farah *et al.*, 2008), se homogenizó y se traspasó a una maceta de 8 plg. Por maceta se sembró un tubérculo de papa certificado de la variedad “superchola” y se cubrió con 250 g del inóculo de actinomicetos.

Las macetas se regaron con agua corriente y se cubrieron con una funda plástica por 12 días. El ensayo permaneció por 45 días en el invernadero (Bains y Bisht, 1995).

La unidad experimental fue la maceta que contenía un tubérculo de papa, la variable a evaluar fue la presencia o ausencia de la infección por *R. solani*. Se realizaron dos repeticiones del experimento con ocho réplicas. Las gráficas descriptivas de los datos se efectuaron en el programa Microsoft Office Excel 2007 y el análisis comparativo se realizó con el software estadístico InfoStat

2.4.7.4. Pruebas de supervivencia de actinomicetos

Las pruebas de supervivencia de actinomicetos se hicieron en tres etapas, al inicio, mitad y final del experimento. Para la prueba inicial se sembró el inóculo de actinomicetos por gota directa en medio YGA.

En la etapa media y final se realizaron diluciones seriadas en solución salina 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , de una muestra de sustrato del ensayo. Se sembró 1 mL de las tres últimas dilución en medio YGA, se incubó por 14 d a 27°C (Villamarín, 2011).

2.4.7.5. Pruebas de supervivencia de *R. solani*

La supervivencia de *R. solani* en el sustrato se realizó mediante la técnica de palillos. Consistió en colocar en una maceta pequeña cubierta con gasa 300 g del sustrato inoculado con el hongo, se humedeció el suelo y se dejó reposar por una noche. Al día siguiente, se colocaron 10 palillos de dientes estériles a una profundidad de 5 cm espaciados uniformemente. Las macetas se incubaron a temperatura ambiente durante 48 h (Paulitz y Schroeder, 2005), pasado las 48 h se sacaron los palillos y se colocaron dos palillos por caja Petri con medio PDA modificado por Vargas (2006).

CAPÍTULO 3:

RESULTADOS

3.1. Aislamiento de cepa de *Rhizoctonia solani*

El aislamiento de *R. solani* a partir de tubérculos infectados se logró en medio de cultivo PDA en caja Petri (figura 3.1). Para obtener un cultivo puro sin contaminantes microbianos fue necesario realizar varios repiques sucesivos en medio PDA modificado por Vargas (2006).



Figura 3.1: Cultivo purificado de *R. solani* en medio PDA en caja Petri. Fuente: Medina (2013).

Se pudo observar bajo microscopio la morfología del hongo con una tinción con azul de lactofenol (figura 3.2) para comprobar que era *R. solani* (Sneh *et al.*, 1991).



Figura 3.2: Hifa de *R. solani* teñida con azul de lactofenol. Vista microscópica aumento 40X. Fuente: Medina (2013).

3.2. Activación de las cepas de actinomicetos liofilizadas

La metodología de Franco *et al.*, 2009, permitió activar 15 cepas de actinomicetos liofilizados pertenecientes al banco de cepas del Laboratorio de Microbiología-Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, aislados de suelos paperos de la provincia de Loja y liofilizadas en el año 2011 por (Villamarín, 2011). La figura 3.3 muestra una cepa de actinomiceto en medio YGA.

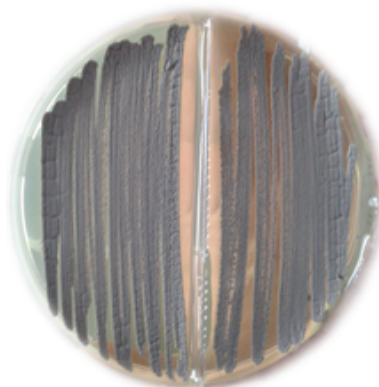


Figura 3.3: Cepa de actinomiceto de Loja L18 activada en medio YGA, en caja Petri. Fuente: Medina (2013).

Los actinomicetos tuvieron una coloración azul en la tinción Gram y se observó formación de hifas, que corresponden a las características comunes de estas bacterias (figura 3.4)

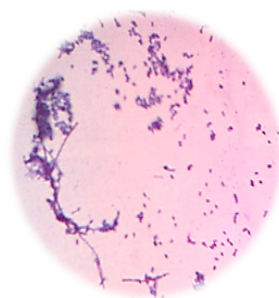


Figura 3.4: Tinción Gram de la cepa de actinomiceto de Loja L19. Vista microscópica aumento 100X. Fuente: Medina (2013).

3.3. Pruebas de antagonismo *in vitro* para *P. infestans*

Los ensayos de antagonismo se realizaron mediante la prueba dual, enfrentando al actinomiceto contra *P. infestans* con condiciones controladas de temperatura como se describió en la metodología. La figura 3.5 muestra la interacción entre los actinomicetos y el patógeno donde se puede observar claramente la zona de inhibición.

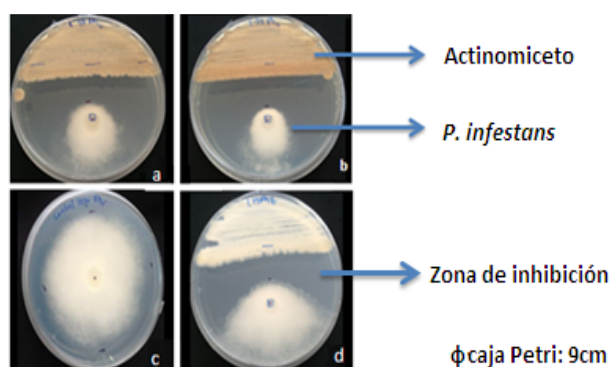


Figura 3.5: Pruebas duales en caja Petri entre actinomicetos vs *P. infestans*, **a** y **b.** cepas de actinomicetos más antagónicas L48 y L21, **c.** *P. infestans* sin actinomicetos, **d.** zona de inhibición.

Se evaluó la capacidad de inhibición de 15 cepas a los 22 días de incubación, midiendo el crecimiento influenciado del oomicete. Se calculó el porcentaje de crecimiento radial con la fórmula 3.1 (Srividya *et al.*, 2012):

$$PCIR = \frac{\text{crecimiento libre} - \text{crecimiento influenciado}}{\text{crecimiento libre}} \times 100$$

Dónde:

Crecimiento libre: crecimiento de *P. infestans* sin la presencia del actinomiceto.

Crecimiento influenciado: crecimiento de *P. infestans* con la presencia del actinomiceto.

A los datos se les realizó una prueba de normalidad (Shapiro-Wilks) y Homocedasticidad, lo que determinó que no tienen una distribución normal (anexo A), por lo tanto se efectuó un análisis no paramétrico Kruskal Wallis,

para los 15 tratamientos. El resultado que se obtuvo demostró que existen diferencias significativas ($p < 0.0001$) en la capacidad de los actinomicetos en inhibir el crecimiento de *P. infestans*. La cepa de actinomiceto que tuvo el mayor porcentaje de inhibición según la categorización de Kruskal Wallis fue L48 con 77,65% como se observa en la tabla 3.1.

Tabla 3.1: Prueba no paramétrica Kruskal Wallis de los PICR de 15 cepas de actinomiceto de la provincia de Loja enfrentados a *P. infestans*. Fuente: Medina (2013).

Trat.	N	Medias	D.E.	H	p	Trat.	Categorías
L13	6	65.55	3.38	77.64	<0.0001	L18	9 A
L14	6	16.2	0			L14	9 A
L18	6	16.2	0			L40	9 A
L19	6	48.79	6.29			L19	23.83 A B
L21	6	75.33	4.48			L6	25.25 A B
L22	6	65.55	6.53			L34	34.7 A B
L23	6	66.95	2.1			L31	41.33 B C
L31	6	62.76	4.89			L13	46.75 B C D
L34	5	59.22	5.79			L22	49.67 B C D
L37	5	73.18	4.24			L23	50.17 B C D
L40	5	16.2	0			L9	65.17 C D E
L41	6	72.07	0			L41	68 C D E
L48	6	77.65	2.5			L37	69 C D E
L6	6	49.72	7.9			L21	74.92 D E
L9	6	71.6	3.71			L48	81 E

La selección de dos cepas más antagónicas y de una cepa menos antagónica a *P. infestans*, se la realizó observando la categorización de la prueba Kruskal-Wallis. Las cepas marcadas con las mismas letras no indican una diferencia significativa como se indica en la figura 3.6, por lo tanto, se tomó como criterio de selección adicional que también sean antagónicas a *R. solani*. Las cepas seleccionadas con mayor antagonismo a *P. infestans* fueron L48 y L21 con porcentajes de antagonismo de 77.65% y 75.33%, respectivamente. La cepa de actinomiceto con menor antagonismo fue L18 con un porcentaje de 16.2%.

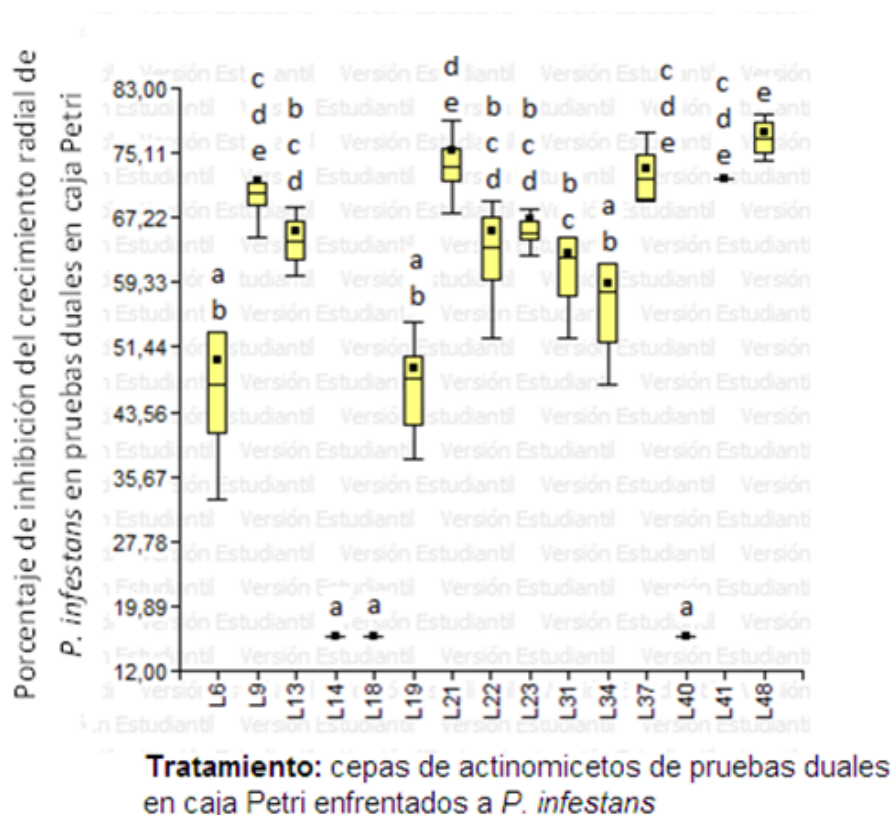


Figura 3.6: Dispersión y simetría del porcentaje de inhibición de actinomicetos vs *P. infestans* en pruebas de antagonismo en caja Petri. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Fuente: Medina (2013).

La cepa de *P. infestans* ESPE1 utilizada para la prueba dual fue aislada de suelos papeiros de la provincia de Carchi. Con las tres cepas de actinomicetos seleccionadas anteriormente se realizó una segunda evaluación contra una cepa de *P. infestans* CIP84 aislada de folíolos de papa, para observar el comportamiento de los actinomicetos frente a una cepa del oomicete aislada de folíolos. Los resultados obtenidos concuerdan con la prueba dual anterior. La cepa L18 fue la menos antagónica frente al patógeno con 65.55% de inhibición, las cepas L21 y L 48 con 100 y 90% de inhibición respectivamente (figura 3.7).

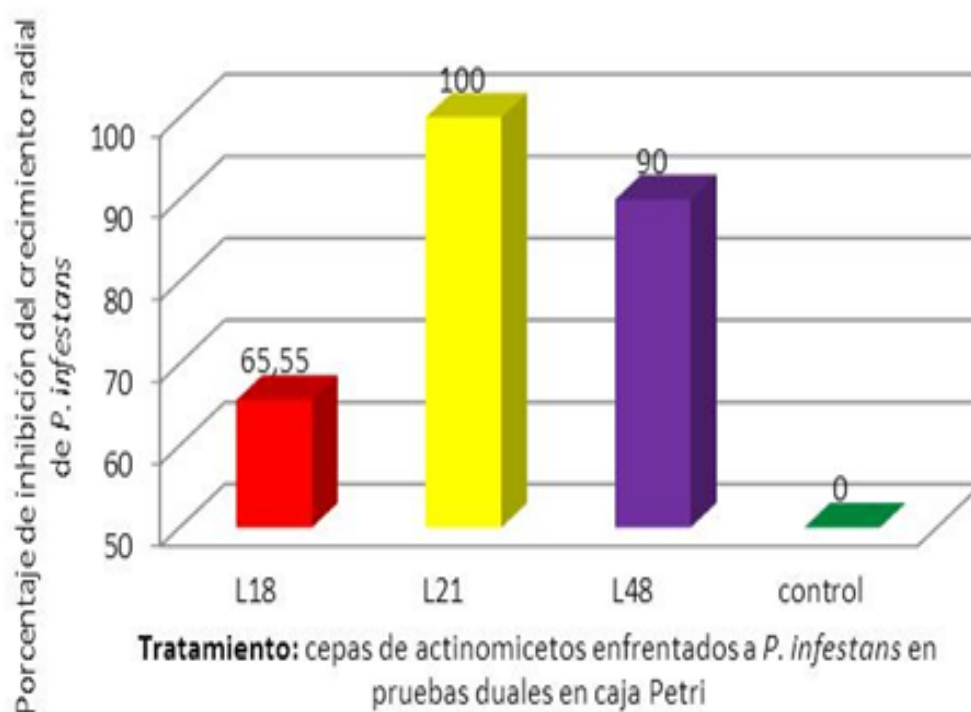


Figura 3.7: Porcentajes de inhibición de las cepas de actinomicetos de la provincia de Loja L18, L21 y L48 contra *P. infestans* CIP84 en pruebas de antagonismo en caja Petri. Fuente: Medina (2013).

3.4. Pruebas de antagonismo *in vitro* para *R. solani*

Los ensayos de antagonismo se realizaron mediante la prueba dual, enfrentando al actinomiceto contra *R. solani* con condiciones controladas de temperatura como se describe en la metodología. Se evaluó la capacidad de inhibición de 15 cepas a los seis días de incubación. Midiendo el crecimiento influenciado del hongo, se calculó el porcentaje de crecimiento radial con la fórmula 3.1.

La figura 3.8 corresponde a algunas cepas de actinomicetos enfrentados a *R. solani*, se puede observar los halos de inhibición que se generaron en la prueba dual.

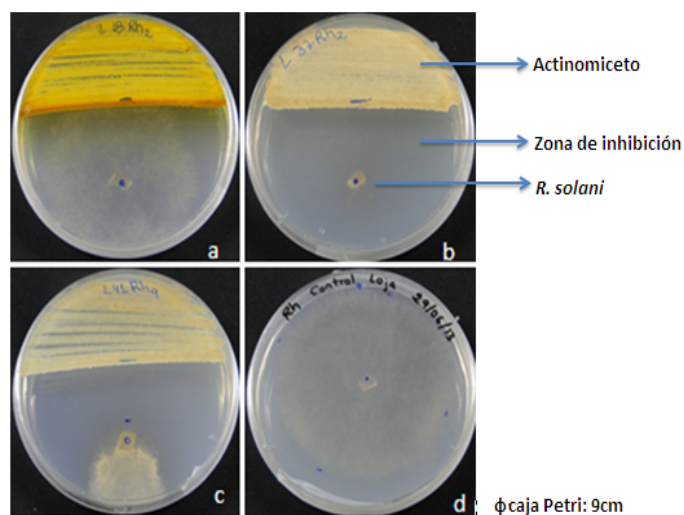


Figura 3.8: Cepas de actinomicetos antagonistas a *R. solani* seleccionadas en las pruebas duales en caja Petri (a,b,c), d. *R. solani* sin actinomicetos (control).

Los datos obtenidos en las pruebas duales fueron analizados con una prueba de normalidad (Shapiro-Wilks) y la prueba de homocedasticidad, lo

que determinó que no tienen una distribución normal (anexo B), por lo tanto se efectuó un análisis no paramétrico Kruskal Wallis para los 15 tratamientos. El resultado que se obtuvo demostró que existen diferencias significativas ($p < 0.0001$) en la capacidad de los actinomicetos en inhibir el recimiento de *R. solani*. Según la categorización de Kruskal Wallis la cepa de actinomiceto L37 tuvo mayor porcentaje de inhibición con 100% como se observa en la tabla 3.2.

Tabla 3.2: Prueba no paramétrica Kruskal Wallis de los PICR de 15 cepas de actinomiceto de la provincia de Loja enfrentados a *R. solani*. Fuente: Medina (2013).

Trat.	N	Medias	D.E.	H	p	Trat.	Categorías
L13	6	64.81	3	82.6	<0.0001	L18	4.5 A
L14	6	16.79	2.2			L14	8.67 A B
L18	6	14.41	0			L40	15.83 A B C
L19	6	43.41	6.1			L9	28.67 A B C D
L21	6	67.67	6.2			L34	30.33 A B C D
L22	6	48.17	9.1			L6	35 B C D
L23	6	45.79	1.8			L19	40.33 C D E
L31	6	80.03	3.1			L22	44.83 C D E
L34	6	40.09	4.4			L23	45.17 C D E
L37	6	100	0			L48	52.5 D E F
L40	6	24.39	5.3			L13	65.25 E F G
L41	6	83.83	9			L21	67.25 E F G
L48	6	52.92	7.2			L31	78.17 F G
L6	6	42.94	0			L41	79 F G
L9	6	38.66	5.3			L37	87 G

Se realizó la selección de dos cepas más antagónicas y de una cepa menos antagónica a *R. solani*, observando la categorización de la prueba Kruskal-Wallis. Las cepas con las mismas letras no indican una diferencia significativa como se muestra en la figura 3.9, por lo tanto, se tomó como criterio de selección adicional que también sean antagónicas a *P. infestans*. Las cepas seleccionadas con mayor antagonismo a *R. solani* fueron L 37 y L41 con porcentajes de antagonismo de 100% y 83.83%, respectivamente. La cepa de actinomiceto con menor antagonismo fue L18 con un porcentaje de 14.41%.

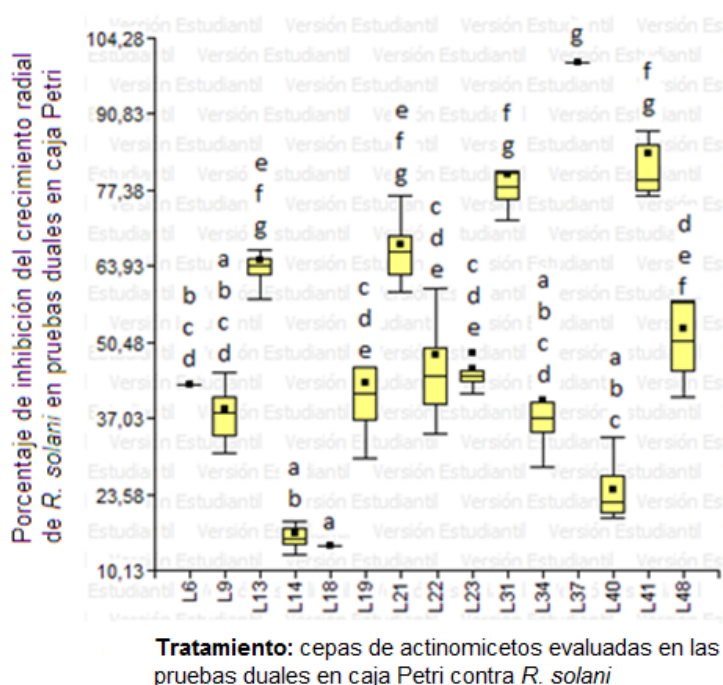


Figura 3.9: Dispersión y simetría del porcentaje de inhibición de actinomicetos contra *R. solani*. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Fuente: Medina (2013).

3.5. Pruebas de antagonismo *in vitro* en folíolos de papa de la variedad “uvilla” contra *P. infestans*

Los resultados obtenidos en las pruebas de antagonismo en folíolos fueron los esperados. Al igual que en las pruebas duales en medio de cultivo YGA, los actinomicetos inhibieron el crecimiento de *P. infestans*, evitando que los folíolos se infecten por el oomicete. La figura 3.10 muestran la inhibición de *P. infestans* por la cepa de actinomiceto L21.

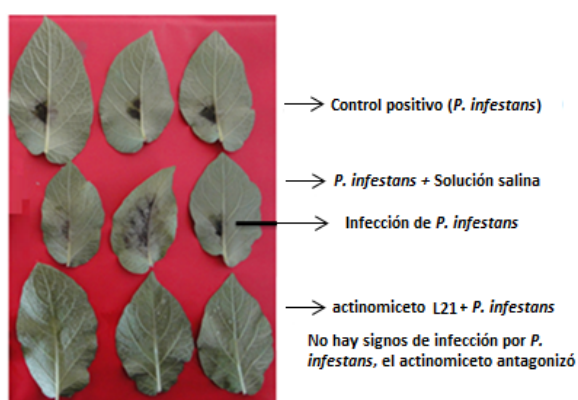


Figura 3.10: Pruebas de antagonismo en folíolos de papa variedad “uvilla”: actinomiceto L21 vs *P. infestans* CIP84. Fuente: Medina (2013).

La cepa de actinomiceto L48 también inhibió al patógeno evitando que infecte los folíolos (figura 3.11). Para afirmar que no existió infección, se realizó una comparación entre los folíolos controles positivos (folíolo+*P. infestans*) que presentaban la infección y los folíolos antagonismo (folíolo+*P. infestans*+actinomiceto). Además, se realizó una observación bajo el estereomicroscopio y no se encontró esporangios de *P. infestans*.

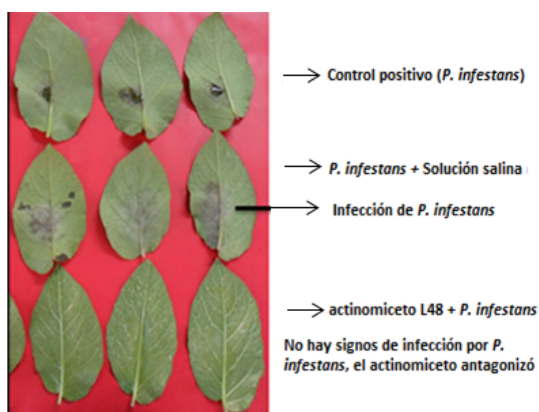


Figura 3.11: Pruebas de antagonismo en folíolos de papa variedad “uvilla”: actinomiceto L48 vs *P. infestans* CIP84. Fuente: Medina (2013).

La figura 3.12 corresponde a la cepa de actinomiceto L18 que es el control negativo de los actinomicetos, como se observa el actinomiceto no inhibió el crecimiento de *P. infestans*.

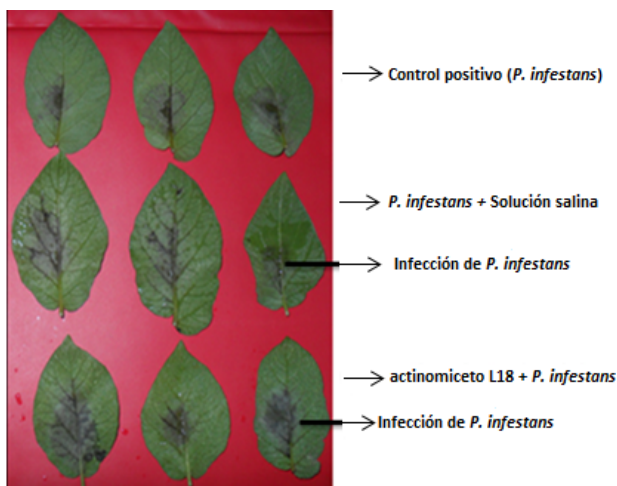


Figura 3.12: Pruebas de antagonismo en folíolos de papa variedad “uvilla”: actinomiceto L18 vs *P. infestans* CIP84. Fuente: Medina (2013).

La figura 3.13 corresponde a los porcentajes de inhibición a *P. infestans* de las cepas de actinomicetos en folíolos. Se observa que las cepas L48 y L21 seleccionados en las pruebas duales *in vitro* inhibieron en 100% a *P. infestans* de un total de 30 observaciones realizadas para el experimento,

respectivamente. El control negativo del actinomiceto cepa L18 no inhibió al patógeno, las 30 observaciones se infectaron por el oomicete.

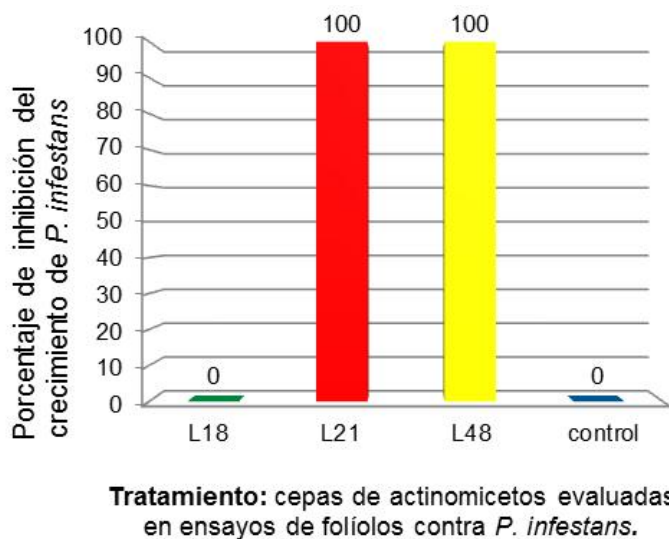
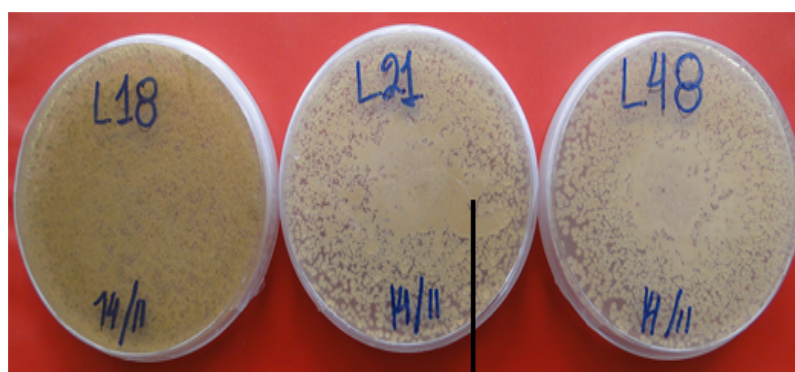


Figura 3.13: Porcentajes de inhibición de las cepas de actinomicetos de la provincia de Loja L18, L21 y L48 contra *P. infestans* en pruebas antagónicas con folíolos de papa de la variedad “uvilla”. Fuente: Medina (2013).

3.6. Prueba de supervivencia de actinomicetos inoculados en folíolos de papa

Los actinomicetos estuvieron viables en el momento del ensayo, la aspersion que se hizo del inóculo inicial en medio YGA dio como resultado un crecimiento masivo de los actinomicetos. Las cepas de actinomicetos presentaron las características macro y microscópicas propias de cada una (figura 3.14).



Crecimiento masivo de actinomicetos

Figura 3.14: Prueba de supervivencia de inóculos iniciales de actinomicetos en folíolos rociados en medio YGA. Fuente: Medina (2013).

Se recuperaron las cepas de actinomicetos en las pruebas de supervivencia que se realizaron al segundo, cuarto y quinto día después de la aplicación como se observa en la figura 3.15. Se realizaron tinciones Gram para comprobar los resultados, las bacterias se tiñeron de azul corroborando que son Gram positivas y se observó formación de filamentos.

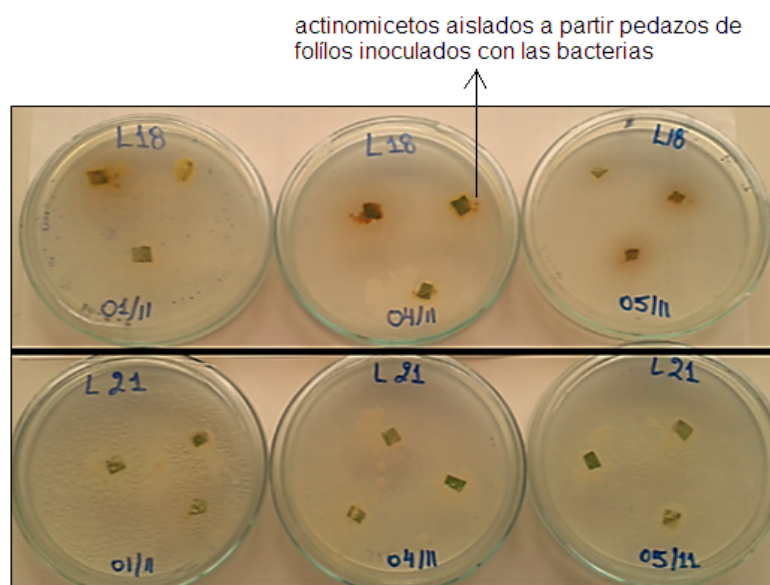


Figura 3.15: Pruebas de supervivencia de las cepas de actinomicetos L18 y L21 después de 2,4 y 5 días de inoculación en folíolos. Fuente: Medina (2013).

3.7. Pruebas de antagonismo en invernadero para *R. solani*

La cepa de actinomiceto L37 (figura. 3.16) seleccionada *in vitro* con el mayor porcentaje de antagonismo a *R. solani*, no inhibió al hongo en las pruebas antagónicas de invernadero. Se realizó comparaciones del ensayo de antagonismo (planta+actinomiceto+*R. solani*) con el control positivo (planta+*R. solani*), y se observó que la infección que presentaban las plantas en el tallo tenía características similares en las 16 plantas por cada cepa utilizadas en el experimento.

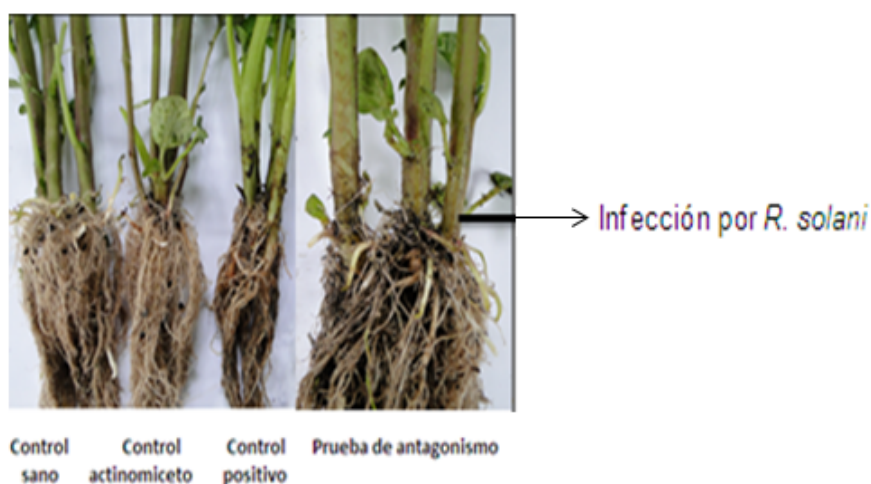


Figura 3.16: Prueba de antagonismo en invernadero de la cepa L37 contra *R. solani* en plantas de papa de la variedad “superchola”. Fuente: Medina (2013).

La cepa L41 no mostró antagonismo a *R. solani* en los ensayos de invernadero. Como se observa en la figura 3.17 los tallos de las plantas del ensayo de antagonismo (planta+actinomiceto+*R. solani*) fueron colonizados por el patógeno.

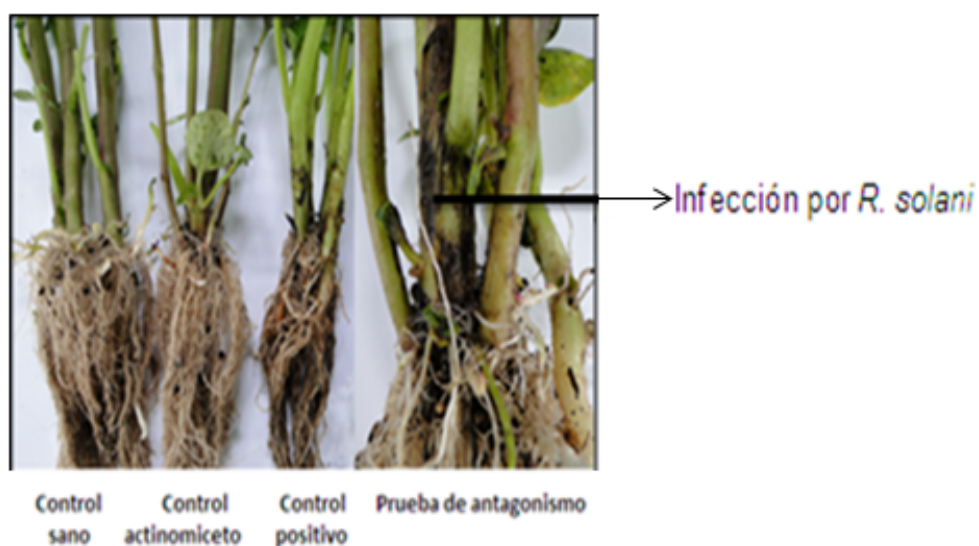


Figura 3.17: Prueba de antagonismo en invernadero cepa L41 vs *R. solani* en plantas de papa variedad “superchola”. Fuente: Medina (2013).

La cepa control de actinomicetos L18 (figura 3.18) seleccionada en las pruebas duales en caja Petri por inhibir en menor porcentaje a *R. solani*, no inhibió al patógeno en los ensayos de invernadero.

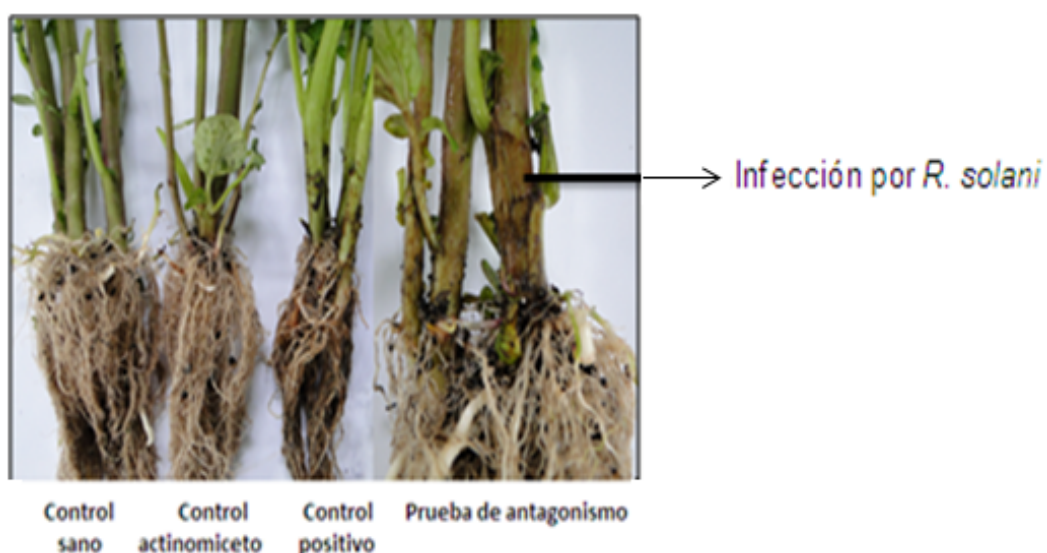


Figura 3.18: Prueba de antagonismo en invernadero de la cepa L18 contra *R. solani* en plantas de papa de la variedad “superchola”. Fuente: Medina (2013).

El hongo atacó a los brotes del tubérculo, evitando que algunas plantas emerjan (figura 3.19).

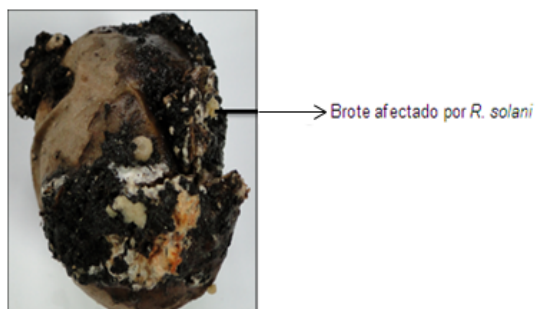


Figura 3.19: Brotes de tubérculo de papa variedad “superchola” afectado por *R. solani*. Fuente: Medina (2013).

Las plantas de controles sanos (planta+agua) crecieron normalmente y plantas control de actinomicetos (plantas+actinomicetos) no mostraron signos de pudrición por parte de los actinomicetos.

Se realizaron siembras del tejido infectado de los tallos de las plantas y de los brotes que no emergieron en medio de cultivo PDA. Al tercer día se pudo observar crecimiento característico de *R. solani* como se puede ver en la figura 3.20.

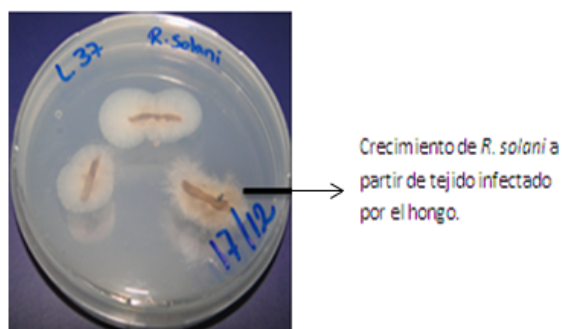


Figura 3.20: Aislamiento de *R. solani* a partir de tejido infectado de plantas utilizadas en el ensayo de antagonismo en invernadero. Fuente: Medina (2013).

Los porcentajes de infección por *R. solani* fue de 100% para todas las cepas de actinomiceto L37, L41 y L18 (figura 3.15).

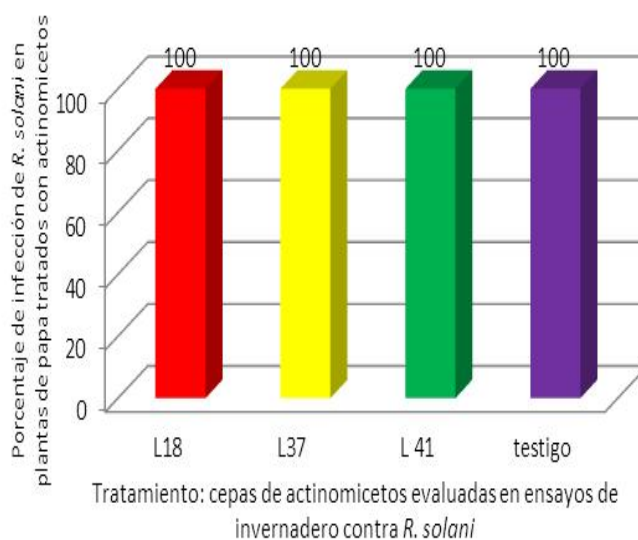


Figura 3.15: Porcentajes de infección de *R. solani* en plantas de papa variedad “superchola” en pruebas de antagonismo de *R. solani* vs. actinomicetos a nivel de invernadero. Fuente: Medina (2013).

El porcentaje de emergencia fue 81.0, 69.0, 75.0 y 69.0% para los tratamientos L18, L37, L41 y control positivo, respectivamente (figura. 3.16).

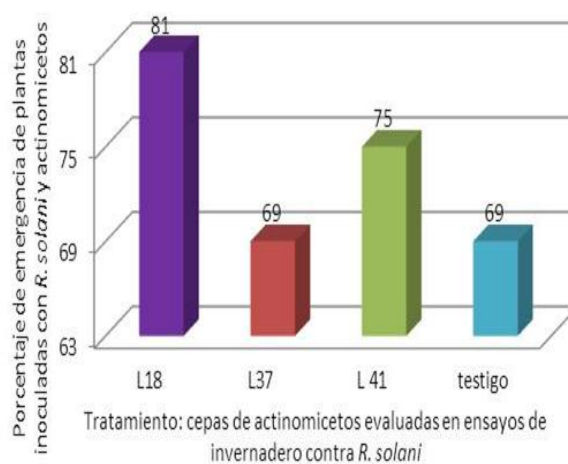


Figura 3.16: Porcentajes de emergencia de plantas de papa variedad “superchola” utilizadas para las pruebas de antagonismo con actinomicetos y *R. solani* en invernadero.

3.8. Pruebas de supervivencia de actinomicetos en ensayos de invernadero

Las cepas de actinomicetos inoculadas en el sustrato en los ensayos de invernadero fueron aisladas en la etapa media y final del experimento como se observa en la figura 3.17.

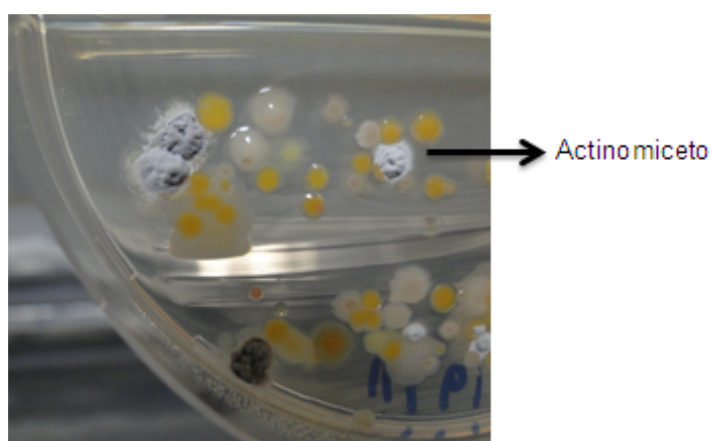


Figura 3.17: Aislamiento de actinomicetos de sustrato inoculado en pruebas de antagonismo en ensayo de invernadero con *R. solani*.

De igual manera *R. solani* fue aislada mediante la técnica de los palillos como se describe en la metodología (figura 3.18).

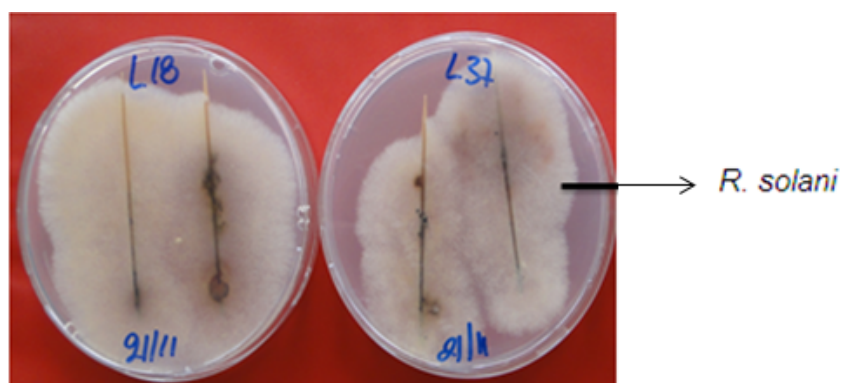


Figura 3.18: Aislamiento de *R. solani* de sustrato inoculado en pruebas de antagonismo en ensayo de invernadero con *R. solani*.

CAPÍTULO 4:

DISCUSIÓN

Garzón (1999) reportó que seis suelos andinos tenían propiedades supresivas sobre *P. infestans* y que esta supresión se debía tanto a factores biológicos como físico-químicos de los suelos. Siguiendo la línea de investigación en el 2009, Ma. Soledad Benítez, PhD y Alma Koch Kaiser, MC realizaron el estudio titulado: “Caracterización de factores de supresividad presentes en suelos andinos a *Phytophthora infestans* y a otros oomicetos”, en la ESPE en conjunto con el Centro Internacional de la Papa. El proyecto abarcó tres tesis de grado que fueron realizadas por:

Orquera (2010) con el tema titulado: “Análisis de comunidades bacterianas relacionadas con la supresividad a *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary en suelos paperos de las provincias de Carchi y Loja” donde evaluó los factores bióticos y abióticos de suelos de las provincias de Carchi, Pichincha y Loja involucrados en la supresión a *P. infestans* en tubérculos, y estudió las comunidades microbianas de *Pseudomonas fluorescentes* presentes en los suelos, la investigación reveló una disminución de la infección, con un aumento de lisis del patógeno en suelos no desinfectados, por lo que, se deduce que las provincias de Carchi, Pichincha y Loja poseen suelos supresores debido a la actividad específica de uno o pocos

microorganismos antagonistas o a la acción colectiva de miembros de la comunidad microbiana.

Mogrovejo (2010) desarrolló el tema: “Estudio de supresión a *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary por poblaciones microbianas aisladas de suelos paperos de la provincia de Chimborazo en dos diferentes tiempos de muestreo”, en el cual realizó ensayos similares para observar la supresividad con suelo de la provincia de Chimborazo, el estudio arrojó que el comportamiento de supresión de la infección con *P. infestans* en rodajas de papa es similar que en las provincias de Carchi, Pichincha y Loja, además evaluó 32 colonias bacterianas formadoras de esporas que presentaron actividad supresora contra *P. infestans*.

Villamarín (2011), realizó el tema titulado: “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” donde determinó que los suelos paperos provenientes de las provincias de las cuatro provincias tuvieron capacidad supresora de origen biótico a *P. infestan*, demás estudió las comunidades de actinomicetos de los suelos obteniendo actinomicetos con actividad inhibitoria a *P. infestans* bajo condiciones controladas de laboratorio, los actinomicetos se mantuvieron liofilizados y fueron activados para evaluarlos en el presente estudio.

4.1. Aislamiento de cepa de *Rhizoctonia solani*

R. solani fue aislada a partir de tubérculos de papa que tenían esclerocios del hongo. Los esclerocios permiten obtener una masa micelial abundante, lo que limita el desarrollo de otros microorganismos disminuyendo la contaminación del medio de aislamiento (Basaúl, 2005).

Según Ferrera y Alarcón (1995), *R. solani* se presenta con un micelio transparente a los cuatro días de ser sembrado en medio de cultivo; el micelio se torna a un color café claro o a amarillo conforme madura; y microscópicamente las ramificaciones forman un ángulo recto con respecto a la hifa principal, con un septo cerca de la bifurcación. De acuerdo a estos criterios, el aislamiento se identificó como *R. solani* y las determinaciones microscópicas realizadas sobre su morfología concordaron con las características descritas en las claves de identificación (Sneh *et al.*, 1991). El aislamiento fue confirmado como *R. solani* por la Dra. María Luisa Insuasti, especialista en *R. solani* del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Estación Experimental Santa Catalina.

4.2. Activación de las cepas de actinomicetos liofilizadas

Se activaron 15 cepas de actinomicetos liofilizados. Las cepas mostraron características microscópicas propias de los actinomicetos, bacterias Gram-positivas, formadoras de racimos de filamentos estables o fragmentados y

propágulos solos, en parejas o formando cadenas cortas o largas y macroscópicas como textura polvorienta, olor a suelo húmedo, presencia de endo y exo pigmentación. Las características de las cepas se encuentran en el anexo C (Franco *et al*, 2009).

4.3. Pruebas de antagonismo in vitro para *P. infestans* y *R. solani*

Los actinomicetos representan una alta proporción de la biomasa microbiana del suelo, producen compuestos bioactivos y han mostrado un alto potencial como agentes de biocontrol por su prolífica producción de antibióticos naturales y metabolitos secundarios contra patógenos de plantas en el suelo como *P. infestans* (Tizón tardío) y *R. solani* (Rizoctoniasis-Damping off). Sobre todo el género *Streptomyces* es el grupo de actinomicetos que se encuentra con más abundancia en el suelo según Mutitu *et al.*, (2008) y Loqman *et al.*, (2009).

Las cepas de actinomicetos se enfrentaron mediante pruebas duales a *P. infestans* y *R. solani*. Mostraron diferentes porcentajes de inhibición. Se evaluaron 15 cepas en los ensayos de antagonismo con *P. infestans* de las cuales tres tuvieron un bajo porcentaje de inhibición 16.2% con respecto a las otras cepas, siete cepas presentaron porcentajes que variaron de 48.79% a 66.95%, y las cepas L9, L21, L37, L41 y L48 fueron más eficientes para el control del patógeno con promedio de inhibición de 73.96%, según la categorización de Kruskal Wallis (Resultados; tabla 3,1). Resultados similares

son presentados en estudios realizados por Fonseca *et al.* (2011), donde se evidenció inhibición del crecimiento del oomicete por parte de 8 cepas de actinomicetos aisladas de Purines de Chipaca con porcentajes de inhibición entre 33.3 – 77.8% y Loliam, (2012), que evaluó la actividad antagónica de *S. rubrolavendulae* S4 contra *P. infestans* mediante pruebas duales *in vitro*, obteniendo un porcentaje de inhibición del crecimiento del patógeno de 83.33%.

En las pruebas contra *R. solani*, de igual manera, se observaron diferentes porcentajes de inhibición (Resultados; tabla 3,2). De las 15 cepas analizadas, grupos de tres, nueve y tres cepas tuvieron promedios de inhibición que variaron entre 14.41-24.34%; 38.66-67.67% y 80.03-100%, respectivamente. Estos resultados coinciden con estudios donde el nivel de inhibición de los actinomicetos contra fitopatógenos varía acorde a la cepa de actinomiceto (Jung y Byung, 2002; Castillo, 2004 y Loqman *et al.*, 2009).

Los actinomicetos mostraron inhibición tanto al oomicete *P. infestans* como al hongo patógeno *R. solani*, corroborando datos de investigaciones realizados por Castillo, 2004; Lozoya *et al.*, 2006; Villamarín, 2011 y Dávila *et al.*, 2013, en los que se evaluó la capacidad antagónica de cepas de actinomicetos contra varios patógenos como *Fusarium sp.*, *Colletotrichum sp.*, *R. solani* y *P. infestans*. Las cepas presentaron diferentes niveles de inhibición, por ejemplo, la cepa de actinomiceto AAH53 tuvo porcentajes de inhibición de 53.08; 49.36 y 61.57% para *Rhizoctonia sp.*, *Fusarium sp.* y *Colletotrichum sp.*, respectivamente.

Investigaciones anteriores han demostrado que los antibióticos pueden estar implicados en los efectos antagonistas de actinomicetos contra hongos patógenos de plantas (Knauss, 1976; Turhan and Grossmann, 1986; Crawford et al., 1993; citados por Jung & Byung, 2002). Iznaga *et al.*, (2003), reportó cepas de actinomicetos aisladas de suelo, que producen componentes con actividad antifúngica inhibitoras del crecimiento diametral de patógenos. También se han reportado que actinomicetos endófitos producen metabolitos inhibitorios antifúngicos (Coombs *et al.*, 2004), enzimas degradantes de la pared celular como quitinasas (El-Tarabily, 2003) y glucanasas (Dávila *et al.*, 2013), así como sideróforos (Cao *et al.*, 2005) y la inducción de resistencia sistémica (Conn *et al.*, 2006) citados por (El-Tarabily *et al.*, 2008).

Las enzimas líticas quitinasas y glucanasas disuelven o dañan polímeros estructurales, como quitina y β -1-3-glucanos de la pared celular en la mayoría de los hongos fitopatógenos, produciendo un efecto desfavorable sobre su desarrollo y diferenciación (Goldman *et al.*, 1994; citado por Michel *et al.*, 2005). La presencia de estas enzimas están relacionadas directamente con la resistencia a *P. infestans* (Salas y Zamora, 2009), debido a que la pared celular del oomicete está compuesta por celulosa y β -glucano a diferencia de los hongos (Erwin y Ribeiro, 1996). Por lo tanto, se puede presumir que las glucanasas secretadas por los actinomicetos degradan la pared celular produciendo la lisis del patógeno, mientras que las quitinasas degradan la quitina de la pared celular de *R. solani* provocando que no se desarrolle.

4.4. Pruebas de antagonismo in vitro en folíolos de papa de la variedad “uvilla” contra *P. infestans*

Las cepas de actinomicetos L21 y L48 seleccionadas en las pruebas duales por mostrar inhibición a las cepas de *P. infestans* ESPE1 y CIP84, y el actinomiceto L18 por inhibir en menor porcentaje a los patógenos se utilizaron para realizar el ensayo antagónico con folíolos de papa, donde se pudo visualizar que las cepas siguieron el patrón de las pruebas duales en medio YGA a nivel de laboratorio.

La variedad de papa “uvilla” es nativa de la Sierra ecuatoriana, los productores la cultivan por sus propiedades organolépticas, agrícolas y por ser parte de la identidad cultural. Es una variedad con potencial en el mercado por su sabor, valor nutritivo y calidad culinaria. En el estudio se utilizó folíolos de esta variedad porque es susceptible a *P. infestans* (Torres *et al.*, 2011).

La cepa de *P. infestans* CIP84 utilizada para el ensayo de antagonismo fue aislada de folíolos infectados por el patógeno en los campos del Centro Internacional de la Papa. Los actinomicetos se han evaluado con diferentes cepas del oomicete, por ejemplo Villamarín (2011) utilizó la cepa INIAP 95 y obtuvo resultados similares a los de este estudio.

Como se observa en las figuras 3.10 y 3.11 los actinomicetos L21 y L48 inhibieron la infección de *P. infestans* en los folíolos de papa. Se puede

atribuir el antagonismo a los actinomicetos porque los controles positivos (folíolo+*P. infestans*) mostraron infección por el patógeno; la solución salina utilizada para el inóculo de los actinomicetos no influyó sobre *P. infestans* porque los folíolos inoculados con solución salina y *P. infestans* se infectaron normalmente y el control negativo de los actinomicetos L18 (figura. 3.12) no inhibió la infección de *P. infestans* al folíolo.

Franceschi (2005) señala que los microorganismos del suelo, en este caso, los actinomicetos, ayudan a incrementar los mecanismos de defensa propios de las plantas, aumentando la secreción de sustancias que limitan el crecimiento de hongos fitopatógenos (Vassilev *et al.*, 2006; Jain y Jain, 2007) o estimulando las defensas naturales de la planta (Prévost *et al.*, 2006; Lehr *et al.*, 2008). En otros estudios se han reportado que los efectos protectores de las plantas pueden ser incrementados por sustancias secretadas por los actinomicetos como quitinasas y glucanasas (Taechowisan *et al.*, 2004), Ácido Indol Acético (Martinez-Noel *et al.*, 2001), sideróforos (Matthijs *et al.*, 2007; Hamdali *et al.*, 2008; Cao *et al.*, 2005) o de otras sustancias anti fúngicas (Xiao *et al.*, 2002; Errakhi *et al.*, 2007). Por lo tanto, se podría decir que las respuestas naturales de defensa de los folíolos contra el patógeno se aumentaron por la secreción de glucanasas por parte de los actinomicetos, inhibiendo el crecimiento de *P. infestans*. Al observar al microscopio los folíolos inoculados con actinomicetos y *P. infestans* no se encontraron esporangios visibles, micelio o alguna otra estructura del oomicete.

4.5. Pruebas de antagonismo en invernadero para *R. solani*

Se realizaron ensayos preliminares sobre la infección de *R. solani* para observar el comportamiento del hongo bajo condiciones de invernadero. Se evaluaron diferentes concentraciones del inóculo del patógeno y como resultados se obtuvieron infección en el cuello de los tallos de las plantas y pudrición de brotes por *R. solani* con el inóculo de 20 g de semilla de avena colonizada por el hongo que fue utilizado en los ensayos de antagonismo.

Las cepas de actinomicetos antagónicas seleccionadas en las pruebas duales *in vitro* contra *R. solani* fueron evaluadas en ensayos en invernadero para observar su comportamiento frente a plantas infectadas con el hongo. No ha sido establecida una escala de susceptibilidad de plantas de papa a *R. solani*. En el ensayo se utilizó la variedad “superchola” porque existen registros de cultivos infectados por *R. solani* y representa más de la mitad del área sembrada (Andrade *et al.*, 2002).

La actividad antagónica de los actinomicetos se da por el mecanismo de antibiosis, las bacterias secretan antibióticos y enzimas líticas que afectan a los patógenos (Taechowisan *et al.*, 2004). Existen estudios donde los actinomicetos antagonistas que mostraron actividad antifúngica *in vitro* fueron inactivos *in vivo*. En la mayoría de los casos donde los actinomicetos no inhibieron *in vitro* tampoco lo hicieron *in vivo* (Broadbent *et al.* 1971; citado por Jung y Byung, 2002). En este estudio se obtuvieron resultados similares porque los actinomicetos que inhibieron al hongo a nivel de laboratorio no lo

hicieron en los ensayos de invernadero, las plantas mostraron infección por *R. solani*.

En las plantas infectadas, tanto controles positivos (plantas+*R. solani*) como los tratamientos de antagonismo (planta+*R. solani*+cepa de actinomiceto), no se observó tejido necrótico. Sin embargo, la colonización del hongo en el tejido del tallo de la planta es un síntoma de infección porque la infección del hongo comienza cuando las hifas crecen hacia el hospedero como resultado de la atracción por exudados químicos (aminoácidos, azúcares, ácidos orgánicos y fenoles) de las plantas. Después del primer contacto, las hifas crecen sobre el tejido de las plantas y en unas horas se aplanan e inician el crecimiento direccional sobre las células epidérmicas del hospedero provocando lesiones necróticas (Keijer, 1996).

Otros síntomas que se observaron en este trabajo de *R. solani* fueron pudrición de brotes subterráneos, retardando o anulando la emergencia, lo que causó falta de uniformidad en el cultivo, plantas débiles y pequeñas (anexo D) y coincide con lo reportado por Lehtonen (2009).

Se utilizó sustrato estéril en el experimento para evitar que *R. solani* se encuentre en el sustrato, además se realizó una prueba de aislamiento del hongo y no se obtuvo crecimiento (anexo D) por lo que, la infección de las plantas se atribuye al inóculo inicial de *R. solani*. Se realizaron ensayos de recuperación de los microorganismos del sustrato a la mitad y final del ensayo, como se observa en la figuras 3.17, se aisló actinomicetos en medio

YGA y la figura 3.18 indica el aislamiento de *R. solani* en medio PDA mediante la técnica de palillos, por lo tanto los microorganismos se establecieron y estuvieron viables durante el experimento.

Distintos factores ambientales pueden afectar el desarrollo de los microorganismos. El ensayo de antagonismo se realizó en un invernadero donde las condiciones de temperatura y humedad no pudieron ser controladas. Las temperaturas altas registradas tuvieron un rango de 25-33°C y las bajas entre 5 y 10°C, los actinomicetos son organismos mesófilos que viven en temperaturas de 20 a 35°C (Mariano, 2009), además la incidencia de la enfermedad causada por *R. solani* en los tallos y estolones de las plantas se da a temperaturas bajas (18°C), por lo tanto las variaciones de temperatura pudieron afectar el progreso de la infección y a los microorganismos antagonistas (Lehtonen, 2009). La humedad es otro componente que afectó al proceso de infección porque *R. solani* necesita de humedad relativa alta (Lehtonen, 2009) para infectar a las plantas. Durante los 12 días en que las plantas estuvieron cubiertas con una funda de plástico se pudo tener humedad alta pero al retirarla porque las plantas empezaron a emerger y necesitaban más oxígeno, la humedad fue menor. Los antagonistas también se ven afectados por la humedad, según Jung & Byung (2002), los bajos rangos de humedad 2 a 13 % favorecen el crecimiento y distribución de actinomicetos en el suelo. Probablemente los actinomicetos no inhibieron a *R. solani* por las altas humedad y temperatura que se mantuvieron en el experimento. Algunos autores recomiendan utilizar los metabolitos de

actinomicetos para que no se disminuya o anule su efecto de biocontrol contra hongos fitopatógenos en ensayos *in vivo* (Trejo *et al.*, 1998; Whipps, 2001).

CAPÍTULO 5:

CONCLUSIONES

- Las cepas de actinomicetos aislados de la provincia de Loja tuvieron diferencias significativas ($p < 0.0001$) en la capacidad de inhibir el crecimiento de *P. infestans* en pruebas antagónicas en caja Petri. Las cepas de actinomicetos con mayor porcentaje de inhibición a *P. infestans* seleccionadas fueron L21 y L48 (77.65 y 75.33%), respectivamente, y la cepa L18 con menor porcentaje de inhibición (16.2%), según la categorización de Kruskal Wallis.
- Los actinomicetos aislados de suelos paperos de la provincia de Loja inhiben a *R. solani* mostrando diferencias significativas ($p < 0.0001$) de la capacidad de inhibición. La cepa de actinomiceto L37 tuvo mayor porcentaje de inhibición (100%) a *R. solani*, seguida de la cepa L41 con 83.83% y la cepa L18 tuvo menor porcentaje de inhibición 14.41%, según la categorización de Kruskal Wallis.
- La capacidad antagónica de los actinomicetos seleccionados en pruebas duales *in vitro* contra *P. infestans* en folíolos de papa variedad “uvilla”, arrojó porcentajes de inhibición al oomicete de 100% para las cepas L21 y L48 y 0% para el actinomiceto L18.
- Las cepas de actinomicetos L37, L41 y L18 antagónicas a *R. solani in vitro* no presentaron inhibición al patógeno en los ensayos de invernadero.

CAPÍTULO 6:

RECOMENDACIONES

- Se recomienda caracterizar molecularmente las cepas de actinomicetos que presentaron capacidad antagónica a los patógenos *in vitro* en estudio para conocer su especie y analizar los metabolitos secundarios que producen.
- Para las pruebas de antagonismo en invernadero, se recomienda optimizar la obtención del inóculo de actinomicetos, probar diferentes concentraciones del inóculo sobre varias cepas del patógeno *R. solani* aisladas de distintas zonas del país y utilizar invernaderos con condiciones controladas.
- Se recomienda seguir con estudios de antagonismo en invernadero enfrentando las cepas de actinomicetos con distintas cepas de *P. infestans* para en un futuro poder hacer un bioproducto que controle al patógeno.

CAPÍTULO 7:

BIBLIOGRAFÍA

- Allauca, S. (2004). Evaluación de 50 accesiones de *Solanum phureja* con resistencia a *Phytophthora infestans* y *Rhizoctonia solani*. 108.
- Alonso, F. (2002). *El cultivo de la patata*. España: Mundi-Prensa.
- Alonso, F. (2008). *El cultivo de la patata*. España: Mundi-Prensa.
- Andrade, H., Bastidas, O., & Sherwood, S. (2002). La papa en el Ecuador. *El cultivo de papa en Ecuador*, 21-28.
- Andrade-Piedra, J., Hijmans, R., & Juárez, H. (2005). Simulation of Potato Late Blight in the Andes. II: Validation of the LATEBLIGHT Model. *Phytopathology*, 1200-1208.
- Bains, P., & Bisht, V. (1995). Anastomosis Group Identity and Virulence of *Rhizoctonia solani* Isolates Collected from Potato Plants in Alberta, Canada. *Plant Dis*, 241-242.
- Basaúl, J. (2005). Determinación de la virulencia de aislamientos de *Rhizoctonia solani* Kühn obtenidos de micelio sobre plantas y de esclerocios de tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.), y su relación con la liberación de ácido en medio líquido. Valdivia, Chile.
- Brown, A. (2001). *Benson's Microbiological Applications*. Auburn: Mc Graw Hill.
- Burton, W. (1966). *The Potato*. Wageningen : Veenman y Zonen .
- Cao, L., Qiu, Z., You, J., Tan, H., & Zhou, S. (2005). Isolation and characterization of endophytic streptomycete antagonists of Fusarium wilt pathogen from surface-sterilized banana roots. *FEMS Microbiol Lett*, 147–152.
- Castillo, C. (2004). Efectividad de Actinomicetos aislados de la rizósfera de papa sobre *Rhizoctonia solani* Kühn in vitro. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 203-207.
- Castro, I., & Contreras, A. (2011). *Manejo de plagas y enfermedades en el cultivo de la papa*. Austral.
- Centro Internacional de la Papa, C. (1999). *Manual de las enfermedades más importantes de la papa en el Perú*. Lima.

- CIP, C. I. (2001). *cipotato*. Obtenido de Tizon Tardío: <http://cipotato.org/csd/materials/HTorres/HTorresTT.pdf>
- Contreras, A. (1999). Antecedentes sobre el origen de la papa. *Revista de la Papa*, 2-3.
- Cuesta, X., Andrade, H., Bastidas, O., Quevedo, R., & Sherwood, S. (2002). Botánica y Mejoramiento Genético. *El cultivo de papa en el Ecuador*, 33-42.
- Dávila, M., Gallegos, G., Hernández, F., Ochoa, Y., & Flores, A. (2013). Actinomicetos antagónicos contra hongos fitopatógenos de importancia agrícola. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 1187-1196.
- De Araújo, J., Da Silva, A., & Azevedo, J. (2000). Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.). *Brazilian Archives of Biology and Technology*.
- Degtyareva, E., Vinogradovab, K., Aleksandrovab, A., Filonenkoc, V., & Kozhevina, A. (2009). Soil Actinomycetes as Potential Biofungicides. *Vestnik Moskovskogo Universiteta*, 22-26.
- El-Tarabily, K., Nassar, A., Hardy, G., & Sivasithamparam, K. (2008). Plant growth promotion and biological control of *Pythium aphanidermatum*, a pathogen of cucumber, by endophytic actinomycetes. *Journal of Applied Microbiology*, 13-26.
- Errakhi, R., Bouteau, F., Lebrihi, A., & Barakate, M. (2007). Evidences of biological control capacities of *Streptomyces* spp. against *Sclerotium rolfsii* responsible for damping-off disease in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *World J Microbiol Biotechnol*, 1503–1509.
- Erwin, D., & Ribeiro, O. (1996). *Phytophthora Diseases Worldwide*. California: APS Press.
- Ezziyyani, M., Sid Ahmed, A., Perez, C., Requena, M., & Candela, M. (27 de 10 de 2005). *Control biológico por microorganismos antagonistas: Horticom News*. Recuperado el 15 de Julio de 2013, de Horticom News: <http://horticom.com/pd/article.php?sid=62425>
- Farah, N., Chaudhary, A. R., Abbasi, N. A., Irfan-UI, -H., & Iftikhar, A. (2008). Influence of inoculum levels of *Rhizoctonia solani* and susceptibility on new potato germplasm. *Pak. J. Bot.*, 2199-2209.
- Ferrera, R., & Alarcón, A. (1995). *Microbiología Agrícola: Hongos, bacterias micro y macrofauna, control biológico y planta-microorganismo*. México: Limusa.

- Fonseca, Y., Catellano, D., & Leon, T. (2011). Efecto antagónico in vitro de actinomicetos aislados de purines de Chipaca (*Bideens pilosa* L.) frente a *P. infestans* Mont de Bary. *Facultad Nacional de Agronomía*, 6111-6119.
- Forbes, B., Sahm, D., & Weissfeld, A. (2009). *Bailey & Scott: diagnóstico microbiológico*. Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Franco, M. (2008). Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas Rizobacterias con hongos formadores de micorrizas. *Departamento de Fisiología Vegetal*, 261.
- Franco, M., Gómez, D., Castro, N., & Rendón, M. (2009). Polihidroxialcanoatos en actinomicetos nativos de suelos colombianos. *Rev. Perú.biol*, 115-118.
- Goodfellow, M. (1983). Ecology of Actinomycetes. *Rev. Microbial*, 189-216.
- Gutiérrez, S. (2008). *Identificación de bacterias*. Obtenido de Universidad Central de Venezuela: http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/08_Tema_12_identificaci%C3%B3n.pdf
- Hamdali, H., Bouizgarne, B., Hafidi, M., Lebrihi, A., Virolle, M., & Ouhdouch, Y. (2008). Screening for rock phosphate solubilizing actinomycetes from Moroccan phosphate mines. *Appl Soil Ecol*, 12–19.
- Herrera, M., Carpio, H., & Chávez, G. (1999). Estudio sobre el Subsector de la Papa en el Ecuador. 140.
- Iznaga, Y., Lemus, M., González, L., Garmendia, L., Nadal, L., & Vallin, C. (2003). Antifungal activity of actinomycetes from Cuban solis. *Phytotherapy Res*, 494-496.
- Jacas, J., & Caballero, P. (2005). *El control biológico de plagas y enfermedades*. Catellón de la Plana : Publicaciones de la Universidad Jaume.
- Jafari, N., Kasra, R., Reza, M., Hossein, A., & Gharavi, S. (2012). Degradation of a textile reactive azo dye by a combined biological-photocatalytic process: *Candida tropicalis* Jks2-Tio2/Uv. *Journal of Environmental Health Sciences & Engineering*, 9 (33), 1-7.
- Jain, P., & Jain, P. (2007). Isolation, characterization and antifungal activity of *Streptomyces sampsonii* GS 1322. *Indian J Exp Biol*, 203-206.
- Jayasinghe, D., & Parkinson, D. (2008). Actinomycetes as antagonists of litter decomposer fungi. *Applied soil ecology*, 109-118.

- Jiang, H., Tay, J., & Tay, S. (2004). Changes in structure, activity and metabolism of aerobic granules as a microbial response to high phenol loading. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 602-608.
- Jung, L., & Byung, H. (2002). Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Canadian Journal of Microbiology*, 407-417.
- Kamilaki, A. (2000). The removal of reactive dyes from textile effluents: A bioreactor approach employing whole bacterial cells. (Tesis de Doctorado). Londres: Universidad de Leeds.
- Kamoun, S. (2003). Molecular Genetics of Pathogenic Oomycetes, Eukaryotic Cells. *Minireviews*, 191-199.
- Keijer, J. (1996). *The initial steps of the infection process in Rhizoctonia solani*. In. *Rhizoctonia species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control*. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Larrea, O. (2001). Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario . *Manejo integrado de plagas* , 96-100.
- Lehr, N., Schrey, S., Hampp, R., & Tarkka, M. (2008). Root inoculation with a forest soil streptomycete leads to locally and systemically increased resistance against phytopathogens in Norway spruce. *New Phytol*.
- Lehtonen, M. (12 de May de 2009). *Rhizoctonia solani* As A Potato Pathogen Variation Of Isolates In Finland And Host Response. Yliopistopaino, Helsinki, Finland.
- Loliam, B., Morinaga, T., & Chaiyanan, S. (2012). Biocontrol of *Phytophthora infestans*, Fungal Pathogen of Seedling Damping Off Disease in Economic Plant Nursery. *Psyche*, 20-26.
- Loqman, S., Ait Barka, E., Clément, C., & Ouhdouch, Y. (2009). Antagonistic actinomycetes from Moroccan soil to control the grapevine gray mold. *World J Microbiol Biotechnol*, 81-91.
- Lozoya, H., Coyote, M., Ferrera, R., & Lara, E. (2006). Antagonismo microbiano contra *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary. *Agrociencia*, 31-43.
- Maila, G. (2010). Validacion del Simulador de Epidemias "LateBlight2004" con clones precoces y resistentes de papa (*Solanum tuberosum*). Cutuglagua-Pichincha . Quito, Pichincha, Ecuador: Universidad Central del Ecuador.
- Mancero, L. (2007). *Estudio de la Cadena de la Papa en Ecuador*. Obtenido de <ftp://ftp.fao.org/es/esa/lisfame/CadenaPapaEcuFinalEspa%F1ol.pdf>

- Mariano, A. (2009). Herramientas para el mejoramiento genético de *S. violaceusniger* YCED-9 enfocadas a la producción de metabolitos secundarios. México: Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada.
- Martinez-Noel, G., Madrid, E., Bottini, R., & Lamattina, L. (2001). Indole acetic acid attenuates disease severity in potato-*Phytophthora infestans* interaction and inhibits the pathogen growth in vitro. *Plant Physiol Biochem*, 815–823.
- Matthijs, S., Tehrani, K., Laus, G., Jackson, R., Cooper, R., & Cornelis, P. (2007). Thioquinolobactin, a *Pseudomonas* siderophore with antifungal and anti-*Pythium* activity. *Environ Microbiol*, 425-434.
- Michel, A., Otero, M., Rebolledo, O., Lezama, R., & Ochoa, M. (2005). Producción y efecto antagónico de quitinasas y glucanasas por *Trichoderma* spp, en la inhibición de *Fusarium subglutinans* y *Fusarium oxysporum* in vitro. *Revista Chapingo*, 273-278.
- Mogrovejo, C. (2010). Estudio de supresión a *P. infestans* por poblaciones microbianas aisladas de suelos paperos de la provincia de Chimborazo en dos diferentes tiempos de muestreo. Sangolqui, Pichincha, Ecuador: Escuela Politécnica del Ejército .
- Mutitu, E. W., Muiru, W. M., & Mukunya, D. M. (2008). Evaluation of Antibiotic Metabolites from Actinomycetes Isolates for the Control of Late Blight of Tomatoes under Greenhouse Conditions . *Asian Journal of Plant Sciences* , 284-290.
- Neumann, C., & Lundstedt, J. (2012). Antecedentes generales del Tizón Tardío (*Phytophthora infestans*) en el cultivo de papa. Chile: ASP .
- Orquera, G. (2010). “Análisis de comunidades bacterianas relacionadas con la supresividad a *P. infestans* en suelos paperos de las provincias de Carchi y Loja. Sangolqui, Pichincha, Ecuador: Escuela Politécnica del Ejército.
- Oyarzún, P. (2004). Control biológico de patógenos del suelo en diversos cultivos agrícolas. *I seminario Internacional y II Nacional del control biológico de plagas y enfermedades de los cultivos*.
- Oyarzún, P., Gallegos, P., Asaquibay, C., Forbes, G., Ochoa, J., Paucar, B., y otros. (2002). Manejo integrado de plagas y Enfermedades. *El cultivo de papa en el Ecuador*, 85-93.
- Paulitz, T., & Schroeder, K. (2005). A new method for the quantification of *Rhizoctonia solani* and *R. oryzae* from soil. *Plant Disease*, 767-772.

- Paz y Miño, M. (1998). El significado de hospederos alternativos de *Phytophthora infestans* y su consecuencia en relación al manejo del tizón tardío en papa. Quito.
- Prévost, K., Couture, G., Shipley, B., Brzezinski, R., & Beaulieu, C. (2006). Effect of chitosan and a biocontrol streptomycete on field and potato tuber bacterial communities. *Biocontrol*, 533–546.
- Rubio, V., & Fereres, C. (2005). Recuperado el 17 de Junio de 2013, de Control biológico de plagas y enfermedades de los cultivos: <http://digital.csic.es/bitstream/10261/13780/1/46.%20Rubio%20and%20Fereres,%202005.pdf>
- Salas, C., & Zamora, H. (2009). β (1,3) Glucanase From Intercellular Space Of Tomato Leaves (*Lycopersicon esculentum* ceraciforme) After Infección With *Phytophthora infestans*. *Revista Colombiana de Química*.
- Sánchez, H., Sánchez, F., & Catellanos, M. (2005). *Ecología*. Zapopan : Umbral .
- Sanz, A. (2005). Aislamiento y Caracterización de Genes de la Ruta Biosintética de un Antifúngico Oxopentaeno producido por *Streptomyces* sp. Centro Nacional de Biotecnología (CSIC). 178.
- Saravanan, P., Pakshirajan, K., & Saha, P. (2008). Kinetics of phenol and m-cresol biodegradation by an indigenous mixed microbial culture isolated from a sewage treatment plant. *Journal of Environmental Sciences*, 20, 1508-1513.
- Schumann, G., & D'Arcy, C. (2000). Late blight of potato and tomato. *The Plant Health Instructor*.
- Sneh, B., Burpee, L., & Ogoshi, A. (1991). A identification of *Rhizoctonia* species. *American Phytopatological Society*, 133.
- Srividya, S., Adarshana, T., Deepika, V. B., Kajingailu, G., & Nilanjan, D. (2012). *Streptomyces* sp. 9p as effective biocontrol against chilli soilborne fungal phytopathogens. *European Journal of Experimental Biology*, 163-173.
- Taechowisan, T., Peberdy, J., & Lumyong, S. (2004). PCR cloning and heterologous expression of chitinase gene of endophytic *Streptomyces*. *J Gen Appl Microbiol*, 177–182.
- Tigrero, J. (2004). Control biológico de patógenos del suelo en diversos cultivos agrícolas. *I seminario Internacional y II Nacional del control biológico de plagas y enfermedades de los cultivos*. Quito.

- Torres, L., Cuesta, X., Monteros, C., & Rivadeneira, J. (Diciembre de 2011). *Inventario de tecnologías: Variedades de papa*. Recuperado el 27 de Diciembre de 2013, de <http://cipotato.org/region-quito/informacion/inventario-de-tecnologias/variedades#introduccion>
- Trejo, S., Rivas, I., & Crawford, D. (1998). In vitro and in vivo antagonism of *Streptomyces violaceusniger* YCED9 against fungal pathogens of turfgrass. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 865-872.
- Van De Peer, Y., & De Wachter, R. (1997). Evolutionary relationships among crown taxa taken into account site-to-site rate variation in 18S rRNA. *J. Mol. Evol.*, 619-630.
- Vargas, F. (2006). Caracterización del Antagonismo a *Rhizoctonia solani* Kuhn en suelos papeiros del Ecuador. Quito, Pichincha, Ecuador.
- Vassilev, N., Vassileva, M., & Nikolaeva, I. (2006). Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. *Appl Microbiol Biotechnol*, 137-144.
- Venner, R., & Martin, M. (2009). Aislamiento y selección de Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en cultivos de Uchuva (*Physalis peruviana* L.) con capacidad antagónica frente a *Fusarium* sp. Bogotá, Colombia: Pontificia Universidad Javeriana.
- Villamarín, D. (2011). Capacidad de infección de *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary en suelos papeiros, procedentes de las provincias de Carchi, Pichincha, Chimborazo y Loja y su inhibición por actinomicetos nativos. Sangolquí, Pichincha, Ecuador.
- Wang, H., Zheng, X., Su, J., Tian, Y., Xiong, X., & Zheng, T. (2009). Biological decolorization of the reactive dyes Reactive Black 5 by a novel isolated bacterial strain *Enterobacter* sp. EC3. *Journal of Hazardous Materials*, 171, 654-659.
- Whipps, J. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 487-511.
- Willey, J., Sherwood, L., & Woolverton, C. (2008). *Prescott, Harley, and Klein's Microbiology*. New York: McGraw-Hill.
- Woloshuk, C., Meulenhoff, J., Sela-Buurlage, M., Van den Elzen, P., & Cornelissen, B. (1991). Pathogen-Induced Proteins with Inhibitory Activity toward *Phytophthora infestans*. *The Plant Cell*, 619-628.
- Xiao, K., Kinkel, L., & Samac, D. (2002). Biological control of *Phytophthora* root rots on alfalfa and soybean with *Streptomyces*. *Biol Control*, 285-295.