



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

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

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

**AUTOR: ALBÁN MÉNDEZ, ALEXANDRA PATRICIA**

**TEMA: IDENTIFICACIÓN, AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN  
Y EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE INFECCIÓN EN  
TUBÉRCULOS DE *Rhizoctonia solani* DE SUELOS PAPEROS DE LA  
PROVINCIA DE CARCHI.**

**DIRECTORA: M.Sc. KOCH KAISER, ALMA**

**CODIRECTOR: ING.-MAT. ROMERO SAKER, PEDRO**

**SANGOLQUÍ**

**2015**

**UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS – ESPE**  
**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA**  
**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**CERTIFICACIÓN**

Que la tesis titulada “IDENTIFICACIÓN, AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE INFECCIÓN EN TUBÉRCULOS DE *Rhizoctonia solani* DE SUELOS PAPEROS DE LA PROVINCIA DE CARCHI”, realizado por la señorita Alexandra Patricia Albán Méndez, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas establecidas por la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE, en el Reglamento de estudiantes.

Debido a que el mencionado trabajo es investigativo y que en el mismo se conjugan los conocimientos de quien lo realizó, recomendamos su publicación.

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 la señorita Alexandra Patricia Albán Méndez para que lo entregue a la Dra. María Augusta Chávez, en su calidad de Directora de la Carrera.



**M.Sc. Alma Koch K.**  
**DIRECTORA**



**Ing.-Mat. Pedro Romero S.**  
**CODIRECTOR**

**UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS – ESPE**  
**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA**  
**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD**

**Nombre del Autor:** ALEXANDRA PATRICIA ALBÁN MÉNDEZ

**DECLARO QUE:**

La tesis de grado titulada “IDENTIFICACIÓN, AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE INFECCIÓN EN TUBÉRCULOS DE *Rhizoctonia solani* DE SUELOS PAPEROS DE LA PROVINCIA DE CARCHI”, ha sido desarrollada con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan el pie de las páginas correspondiente, 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.



---

**Alexandra Patricia Albán Méndez**

**UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS – ESPE**  
**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA**  
**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**AUTORIZACIÓN**

Yo, Alexandra Patricia Albán Méndez

Autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo “IDENTIFICACIÓN, AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE INFECCIÓN EN TUBÉRCULOS DE *Rhizoctonia solani* DE SUELOS PAPEROS DE LA PROVINCIA DE CARCHI”, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, julio del 2015



**Alexandra Patricia Albán Méndez**

## **DEDICATORIA**

A mis queridos padres, quienes siempre han estado a mi lado brindándome su cariño y han sido mi soporte durante toda mi vida. Yo no sé qué hubiese sido de mí, si Dios no me hubiese mandado a este par de angelitos a mi lado.

A mis hermanos Andrés, Alejandro y a mi primo Santy, quienes siempre me han dado su apoyo incondicional, gracias por estar junto a mí todo este tiempo.

A mi sobrina Heather, quien con su alegría ha sido mi inspiración desde que llegó a mi vida.

Y a mi familia, quienes siempre han estado dispuestos a tenderme una mano cuando lo he necesitado.

**Alexandra Patricia Albán Méndez**

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, por haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor. Siempre ha estado a mí lado y ha sido él, quien con su infinita sabiduría ha sabido guiar mis pasos.

A mis padres, a quienes les debo todo en la vida, les agradezco, la paciencia, la comprensión y el apoyo incondicional que me han brindado para culminar mi carrera profesional y todo cuanto me he propuesto en la vida.

A mis hermanos, por siempre ayudarme en todo lo que he necesitado, gracias porque nunca me han negado su apoyo y ayuda incondicional.

A mi directora Almita Koch, le agradezco por compartir sus conocimientos y haberme ayudado en todo cuanto necesité para la realización de la tesis, pero sobre todo por sus enseñanzas, siempre se lo agradeceré porque las llevaré y aplicaré durante toda mi vida.

A mi codirector Pedrito Romero, gracias por saber dar esos consejos tan asertivos cuando más lo necesitaba y por siempre tener la predisposición para colaborarme en todo lo que he necesitado durante todo este tiempo.

A Jessy Maisincho quien supo colaborar con todo cuanto necesité en esta tesis.

A mis queridas Gaby y Liz quienes durante la tesis han sido un soporte tan importante en mi vida. Y aunque hemos tenido tantos aciertos y desaciertos, hoy sabemos que nos han servido para hacernos cada día más fuertes. Cómo no agradecerles si ustedes han sido parte una parte importante en este proceso de aprendizaje, en verdad mil gracias por todo el tiempo compartido, siempre ocuparán un lugar especial en mi corazón.

A mis losersitos: Magy, Vlado, Andy, Dianita, Gaby, Kary y Víctor, quienes durante todos estos años han sido mi apoyo incondicional en los momentos buenos y malos. Gracias por haber llegado a ser parte de mi vida. Los quiero un montón.

A Geovanny, gracias por ser esa mano amiga que colaboró en todo este proceso, siempre con tu buena predisposición me enseñaste que existen personas que están

dispuestos a ayudarte y escucharte cuando lo necesites. Pero sobre todo por brindarme tú amistad.

A Fer y a Leo gracias por compartir su conocimiento, me enseñaron que cada día es un nuevo aprendizaje, y que con paciencia y sin darse nunca por vencidos se puede llegar a alcanzar todo lo que te propongas en la vida.

A Carmita, Andrés one, Andrés two y Mayrita que en el transcurso de mi tesis siempre supieron darme su apoyo y con su experiencia supieron brindarme un millón de consejos que no solo me fueron útiles para esta etapa sino que me servirán para toda mi vida. Un millón de gracias.

A Henry, Vane, Dany, Carlitos, Alejo y Eve gracias por toda su colaboración pero sobre todo, por siempre estar dispuestos a escuchar cuando más lo necesitaba, ustedes siempre supieron ser ante todo amigos. Jamás los olvidaré.

Y a todas esas personas que de una u otra forma me ayudaron en esta etapa, un Dios les pague por todo este tiempo compartido.

**Alexandra Patricia Albán Méndez**

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN .....	II
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD .....	III
AUTORIZACIÓN.....	IV
DEDICATORIA .....	V
AGRADECIMIENTOS .....	VI
ÍNDICE DE CONTENIDOS .....	VIII
ÍNDICE DE TABLAS .....	XIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XV
ÍNDICE DE ANEXOS.....	XVII
RESUMEN.....	XIX
ABSTRACT .....	XX
<b>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1  Formulación del problema .....	1
1.2  Justificación del problema.....	2
1.3  Objetivos de la investigación .....	4
1.3.1  Objetivo general .....	4
1.3.2  Objetivos específicos.....	4
1.4  Marco teórico .....	5
1.4.1  Papa ( <i>Solanum tuberosum</i> ).....	5
1.4.1.1  Origen.....	5
Diversificación de la especie.....	6
Crecimiento del cultivo de papa en función de la temperatura .....	6
Importancia del cultivo de la papa en el mundo .....	6
Producción y consumo de papa en el Ecuador.....	7

	ix
Cultivo de papa en la provincia de Carchi .....	8
Variedades de papas que se siembran en la provincia del Carchi .....	9
1.4.1.2 Características de la especie <i>Solanum tuberosum</i> .....	10
Papa ( <i>Solanum tuberosum</i> L) .....	10
1.4.1.3 Reproducción vegetal.....	11
1.4.1.4 Desarrollo del cultivo de la papa.....	12
Etapa vegetativa .....	12
Tuberización.....	12
Desarrollo de tubérculos .....	12
Maduración .....	13
1.4.1.5 Duración del cultivo .....	13
1.4.2 Enfermedades que afectan los cultivos de la papa .....	14
1.4.3 <i>Rhizoctonia solani</i> .....	14
1.4.3.1 Síntomas producidos por <i>R. solani</i> .....	16
1.4.3.2 Clasificación de <i>Rhizoctonia solani</i> .....	17
1.4.3.3 Grupos de anastomosis (AG) .....	18
1.4.3.4 Grupos de anastomosis de <i>Rhizoctonia solani</i> .....	19
Grupos anastomósicos relacionados con la papa .....	22
1.4.4 Rizoctoniasis .....	22
1.4.5 Ciclo biológico de <i>Rhizoctonia solani</i> .....	24
1.4.6 Diseminación de <i>Rhizoctonia solani</i> .....	26
1.4.7 Manejo de <i>Rhizoctonia solani</i> .....	26
1.4.7.1 Control químico de <i>Rhizoctonia solani</i> .....	27
1.4.7.2 Control biológico de <i>Rhizoctonia solani</i> .....	28
1.4.8 Caracterización molecular de <i>Rhizoctonia solani</i> .....	28

1.4.8.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	x
1.4.8.2 Regiones ITS .....	28
1.5 Hipótesis.....	30
<b>CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
2.1 Participantes .....	32
2.2 Zona de estudio .....	32
2.2.1 Fase de campo .....	32
2.2.2 Fase en el laboratorio .....	33
2.3 Período de tiempo de investigación.....	33
2.4 Procedimiento.....	33
2.4.1 Encuestas para selección de campos .....	33
2.4.2 Muestreo de suelos .....	34
2.4.3 Aislamiento de <i>Rhizoctonia solani</i> a partir de muestras de suelo .....	35
2.4.3.1 Aislamiento con palillos.....	35
2.4.4 Caracterización macroscópica de <i>R. solani</i> .....	36
2.4.5 Caracterización microscópica de <i>R. solani</i> .....	37
2.4.5.1 Caracterización de hifas con azul de lactofenol.....	37
2.4.5.2 Caracterización de núcleos con safranina O .....	37
2.4.6 Caracterización molecular de <i>Rhizoctonia solani</i> .....	37
2.4.6.1 Purificación del micelio en medio líquido .....	37
2.4.6.2 Extracción de DNA .....	38
2.4.6.3 Amplificación de fragmentos de DNA con primers ITS .....	39
2.4.6.4 Amplificación de <i>Rhizoctonia solani</i> AG3 .....	40
2.4.6.5 Electroforesis del producto de PCR .....	41
2.4.7 Infección de tallos y tubérculos con <i>Rhizoctonia solani</i> .....	42

	xi
2.4.8	Análisis estadístico .....43
2.4.8.1	Análisis de los aislamientos obtenidos de <i>R. solani</i> .....43
2.4.8.2	Análisis de infección en tallos y tubérculos .....43
<b>CAPÍTULO 3: RESULTADOS .....44</b>	
3.1	Muestreo.....44
3.2	Aislamiento de <i>Rhizoctonia solani</i> a partir de muestras de suelo .....44
3.2.1	Aislamiento con palillos.....44
3.3	Caracterización macroscópica de <i>Rhizoctonia solani</i> .....47
3.4	Caracterización microscópica de <i>Rhizoctonia solani</i> .....47
3.4.1	Caracterización de hifas con azul de lactofenol .....47
3.4.2	Caracterización de núcleos con safranina O.....48
3.5	Caracterización molecular de <i>Rhizoctonia solani</i> .....48
3.5.1	Amplificación de fragmentos de DNA con primers ITS.....48
3.5.2	Amplificación de <i>Rhizoctonia solani</i> AG3 .....49
3.6	Infección con aislamientos obtenidos de <i>Rhizoctonia solani</i> .....50
3.6.1	Infección en tallo.....50
3.6.2	Infección en tubérculos .....53
<b>CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN .....57</b>	
4.1	Aislamiento de <i>Rhizoctonia solani</i> a partir de muestras de suelo .....57
4.2	Caracterización macroscópica y microscópica de <i>R. solani</i> .....58
4.3	Caracterización molecular de <i>Rhizoctonia solani</i> .....59
4.3.1	Amplificación de fragmentos de DNA con primers ITS.....59
4.3.2	Amplificación de <i>Rhizoctonia solani</i> AG3 .....59
4.4	Infección en tallos y tubérculos con aislamientos obtenidos de <i>R. solani</i> .....60
<b>CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES .....62</b>	

<b>CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES</b> .....	xii
<b>CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA</b> .....	64
<b>ANEXOS</b> .....	65
	78

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.1:</b>	Taxonomía de <i>Solanum tuberosum</i> (Pérez, 2012).....	10
<b>Tabla 1.2:</b>	Taxonomía de <i>Rhizoctonia solani</i> y de <i>Thanatephorus cucumeris</i> (Agrios, 1995).....	15
<b>Tabla 1.3:</b>	Clasificación de las reacciones de anastomosis (Macnish, Carling, & Braunard, 1993).....	19
<b>Tabla 1.4:</b>	Principales cultivos que ataca <i>Rhizoctonia solani</i> con sus grupos, subgrupos y estado teleomórfico asignado (González, Portal, & Rubio, 2006).....	20
<b>Tabla 1.5:</b>	Algunos grupos anastomósicos de <i>Rhizoctonia solani</i> y las enfermedades que causan en diferentes especies de plantas (Castiblanco, Díaz, & Guerrero, 2006). ....	20
<b>Tabla 1.6:</b>	Primers universales utilizados en la región ITS. ....	31
<b>Tabla 2.1:</b>	Campos muestreados en la provincia del Carchi.....	32
<b>Tabla 2.2:</b>	Primers utilizados en la amplificación de la región ITS (White, Bruns, Lee, & Taylor, 1990). ....	40
<b>Tabla 2.3:</b>	Ciclos de amplificación empleados para los primers: ITS1-ITS4 (Fernández, 2011).....	40
<b>Tabla 2.4:</b>	Primers utilizados en la amplificación de AG3 (Lees, Cullen, Sullivan, & Nicolson, 2002).....	41
<b>Tabla 2.5:</b>	Ciclos de amplificación empleados para los primers: Rs1F2 - Rs2R1 (Lees, Cullen, Sullivan, & Nicolson, 2002). ....	41
<b>Tabla N.1:</b>	Probabilidades de aislar <i>R. solani</i> en una etapa de cultivo de papa.....	92
<b>Tabla N.2:</b>	Probabilidad de presencia de <i>R. solani</i> en siembra, floración y cosecha. ....	92
<b>Tabla N.3:</b>	Probabilidad de ausencia de <i>R. solani</i> en siembra, floración y cosecha. ....	92
<b>Tabla N.4:</b>	Probabilidad de presencia y ausencia de <i>R. solani</i> .....	93
<b>Tabla O.1:</b>	Tabla de contingencia de la presencia/ausencia de <i>R. solani</i> en los aislamientos obtenidos en un ciclo de cultivo de papa.....	94

<b>Tabla R.1:</b>	Tabla de contingencia de la infección en tallos con los aislamientos obtenidos de <i>R. solani</i> en las diferentes etapas del cultivo de la papa. ...	98
<b>Tabla S.1:</b>	Probabilidades de infectar tallos con los aislamientos obtenidos de <i>R. solani</i> en las diferentes etapas de cultivo de papa. ....	98
<b>Tabla S.2:</b>	Probabilidad de infección en tallos con <i>R. solani</i> . ....	98
<b>Tabla S.3:</b>	Probabilidad de que no exista infección en tallos con <i>R. solani</i> . ....	99
<b>Tabla S.4:</b>	Probabilidad de que exista o no infección en tallos con <i>R. solani</i> . ....	99
<b>Tabla V.1:</b>	Tabla de contingencia de la infección en tubérculos con los aislamientos obtenidos de <i>R. solani</i> en una etapa de cultivo de papa. ..	102
<b>Tabla W.1:</b>	Probabilidades de infectar tubérculos con los aislamientos obtenidos de <i>R. solani</i> en las diferentes etapas de cultivo de papa. ....	102
<b>Tabla W.2:</b>	Probabilidad de infección en tubérculos con <i>R. solani</i> . ....	102
<b>Tabla W.3:</b>	Probabilidad de que no exista infección en tubérculos con <i>Rhizoctonia solani</i> . ....	103
<b>Tabla W.4:</b>	Probabilidad de que exista o no infección en tubérculos con <i>Rhizoctonia solani</i> . ....	103

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1:</b>	Principales variedades de papas demandadas en la provincia de Carchi (Flores, Naranjo, Galárraga, Sánchez, & Viteri, 2012). ....	9
<b>Figura 1.2:</b>	Morfología de una planta de papa ( <i>Solanum tuberosum</i> ) con sus respectivas partes (Farmex, 2013). ....	11
<b>Figura 1.6:</b>	Algunos síntomas producidos por <i>Rhizoctonia solani</i> en las plantas de papa a) Necrosis en tallos (Farmex, 2013), b) Pudrición en el cuello de la planta (Sánchez, 2011), c) Pobre crecimiento (Farmex, 2013), d) Coloraciones púrpura en los folíolos terminales (jóvenes), e) Tubérculos aéreos (Farmex, 2013), f) Presencia de costras pequeñas oscuras, esclerocios sobre tubérculos (De la Cruz, 2010). ....	24
<b>Figura 1.7:</b>	Ciclo biológico de <i>Rhizoctonia solani</i> (Agrios, 1997). ....	25
<b>Figura 1.8:</b>	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Creative Commons 3.0, 2012). ....	29
<b>Figura 1.9:</b>	Representación esquemática de las regiones estudiadas del DNA ribosomal con sus diferentes cebadores (Solé, 2002). ....	30
<b>Figura 2.1:</b>	Provincia del Carchi, Ecuador (InmoMundo, 2014). ....	34
<b>Figura 2.2:</b>	Etapas de cultivo de la papa: a) Siembra, b) Floración y c) Cosecha. ....	35
<b>Figura 2.3:</b>	Algunas etapas del aislamiento con palillos: a) Sumergimiento en agua de tarrinas con suelo, b) Colocación de palillos en el suelo humedecido y c) Siembra de palillos en cajas Petri con medio PDA modificado por Castro. ....	36
<b>Figura 3.1:</b>	Presencia/ausencia de <i>R. solani</i> en las etapas de siembra, floración y cosecha. ....	45
<b>Figura 3.2:</b>	Expresión de los aislamientos de <i>Rhizoctonia solani</i> en las diferentes etapas del cultivo de la papa. ....	46
<b>Figura 3.3:</b>	Expresión de <i>Rhizoctonia solani</i> en cultivos de papas de la provincia de Carchi en las tres diferentes etapas de cultivo. ....	46
<b>Figura 3.4:</b>	Micelio de <i>R. solani</i> : a) Micelio de <i>R. solani</i> a los tres días de crecimiento. b) Micelio de <i>R. solani</i> a los siete días. ....	47
<b>Figura 3.5:</b>	Imagen microscópica de las hifas de <i>R. solani</i> a 100 X. ....	48

	xvi
<b>Figura 3.6:</b> Núcleos de <i>R. solani</i> vistos a 100 X.....	48
<b>Figura 3.7:</b> Productos amplificados por PCR de aislamientos obtenidos a partir de muestras de suelos papeiros con los primers ITS1-ITS4. (+): carril del control positivo, (-): carril del control negativo y (MM): marcador de peso molecular.....	49
<b>Figura 3.8:</b> Amplificación de <i>R. solani</i> AG3, con los primers Rs1F2-Rs2R1. (+): carril del control positivo, (-): carril del control negativo y (MM): marcador de peso molecular.....	49
<b>Figura 3.9:</b> Tallos infectados con <i>R. solani</i> .....	50
<b>Figura 3.10:</b> Resultados de los tallos infectados/no infectados con los aislamientos obtenidos de <i>R. solani</i> en las diferentes etapas de siembra, floración y cosecha. ....	51
<b>Figura 3.11:</b> Expresión de infección de los aislamientos obtenidos de <i>Rhizoctonia solani</i> en tallos.....	52
<b>Figura 3.12:</b> Tallo infectados/no infectados con los aislamientos obtenidos de <i>R. solani</i> durante las etapas del cultivo de la papa.....	52
<b>Figura 3.13:</b> Tubérculo infectado con <i>Rhizoctonia solani</i> . ....	53
<b>Figura 3.14:</b> Resultados de los tubérculos infectados/no infectados con los aislamientos obtenidos de <i>R. solani</i> en las diferentes etapas de siembra, floración y cosecha. ....	54
<b>Figura 3.15:</b> Expresión de infección de los aislamientos obtenidos de <i>Rhizoctonia solani</i> en tubérculos.....	55
<b>Figura 3.16:</b> Tubérculos infectados/no infectados con los aislamientos obtenidos de <i>R. solani</i> durante las etapas de siembra, floración y cosecha. ....	55
<b>Figura O.1:</b> Prueba de chi cuadrado de independencia.....	94
<b>Figura R.1:</b> Prueba de chi cuadrado de independencia.....	97
<b>Figura V.1:</b> Prueba de chi cuadrado de independencia.....	101

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>ANEXO A:</b>	Encuesta realizada a los agricultores .....	78
<b>ANEXO B:</b>	Aislamiento de <i>Rhizoctonia solani</i> mediante diluciones.....	79
<b>ANEXO C:</b>	Aislamiento por medio de semillas .....	79
<b>ANEXO D:</b>	Medio PDA modificado por Castro.....	80
<b>ANEXO E:</b>	Medio etanol-nitrato de potasio.....	80
<b>ANEXO F:</b>	Solución de safranina O.....	80
<b>ANEXO G:</b>	Medio PDA.....	81
<b>ANEXO H:</b>	Medio líquido .....	81
<b>ANEXO I:</b>	Imagen de la cuantificación de DNA en el Nanodrop 8000.....	81
<b>ANEXO J:</b>	Muestras obtenidas en los seis campos de la provincia del Carchi durante una etapa de cultivo de la papa.....	82
<b>ANEXO K:</b>	Análisis estadístico .....	83
<b>ANEXO L:</b>	Intervalos de confianza con un NDC del 90%, de la presencia de <i>R. solani</i> durante una etapa de cultivo. ....	90
<b>ANEXO M:</b>	Aislamientos de <i>R. solani</i> obtenidos en la provincia del Carchi durante la etapa de siembra. ....	90
<b>ANEXO M.1:</b>	Aislamientos de <i>R. solani</i> obtenidos en la provincia del Carchi durante la etapa de floración.....	91
<b>ANEXO M.2:</b>	Aislamientos de <i>R. solani</i> obtenidos en la provincia del Carchi durante la etapa de cosecha. ....	91
<b>ANEXO N:</b>	Frecuencias absoluta y relativa de la presencia de <i>R. solani</i> en los suelos paperos de la provincia del Carchi durante la siembra, floración y cosecha.....	92
<b>ANEXO N.1:</b>	Probabilidades de aislar <i>R. solani</i> en los suelos paperos del Carchi durante las etapas de cultivo de siembra, floración y cosecha. ....	92
<b>ANEXO O:</b>	Prueba de hipótesis chi cuadrado de independencia para determinar si existe presencia significativa de <i>R. solani</i> en los aislamientos obtenidos en los suelos paperos de la provincia del Carchi durante la siembra, floración y cosecha. ....	93

<b>ANEXO P:</b>	Infeción en tallos de papa con los 31 aislamientos obtenidos de <i>R. solani</i> en suelos paperos de la provincia del Carchi. ....	95
<b>ANEXO Q:</b>	Intervalos de confianza con un NDC del 90%, en la infección de tallos con <i>R. solani</i> . ....	96
<b>ANEXO R:</b>	Prueba de hipótesis chi cuadrado de independencia para determinar si existe infección significativa en tallos con los aislamientos de <i>Rhizoctonia solani</i> obtenidos a partir de muestras de suelos paperos de la provincia de Carchi, durante las etapas de siembra, floración y cosecha. ....	96
<b>ANEXO S:</b>	Probabilidades de infectar tallos con los aislamientos obtenidos de <i>Rhizoctonia. solani</i> en los suelos paperos del Carchi durante las etapas de cultivo de siembra, floración y cosecha. ....	98
<b>ANEXO T:</b>	Infeción en tubérculos de papa con los 31 aislamientos obtenidos de <i>R. solani</i> en suelos paperos de la provincia del Carchi. ....	99
<b>ANEXO U:</b>	Intervalos de confianza con un NDC del 90%, en la infección de tubérculos con <i>R. solani</i> . ....	100
<b>ANEXO V:</b>	Prueba de hipótesis chi cuadrado de independencia para determinar si existe infección significativa en tubérculos con los aislamientos de <i>Rhizoctonia solani</i> obtenidos a partir de muestras de suelos paperos de la provincia de Carchi, durante las etapas de siembra, floración y cosecha. ....	100
<b>ANEXO W:</b>	Probabilidades de infectar tubérculos con los aislamientos obtenidos de <i>Rhizoctonia solani</i> en los suelos paperos del Carchi durante las etapas de cultivo de siembra, floración y cosecha. ....	102

## RESUMEN

La papa es un rubro agrícola de importancia económica y social en el Ecuador. El cultivo se ha visto afectado con la rizoctoniasis o costra negra, causada por *Rhizoctonia solani* Kühn, que afecta las partes subterráneas de la planta, produciéndose canchales en brotes, tallos, estolones y raíces, lo que disminuye la emergencia de plantas e incrementa la presencia de tubérculos aéreos. La costra negra es la formación de esclerocios sobre la piel de los tubérculos, disminuyendo la calidad y el rendimiento del cultivo. El objetivo fue aislar a *R. solani* a partir de suelos paperos en la provincia del Carchi. De las 90 muestras analizadas, se logró obtener 31 aislamientos de *R. solani* durante las tres etapas del cultivo de la papa (siembra, floración y cosecha). Los resultados de los aislamientos fueron analizados mediante pruebas de hipótesis de chi cuadrado, que indicaron que existe presencia significativa ( $p=0.037$ ) de este patógeno en los suelos paperos de la provincia del Carchi. Se llevó a cabo la caracterización molecular con todos los aislamientos obtenidos de *R. solani*, mediante una PCR que amplificó la región ITS con los primers ITS1 e ITS4 obteniéndose una banda de 650 pb aproximadamente. Para el grupo AG se utilizaron los primers Rs1F2 y Rs2R1 específicos para AG-3, con los cuales se obtuvo una banda de 500 pb. Tanto en la identificación de las regiones ITS como del AG-3 se observó una frecuencia de las bandas del 100%. Además se realizaron pruebas de infección en plantas de papa con los 31 aislamientos, se evidenció síntomas necróticos de diferente intensidad en tallos y formación de esclerocios sobre los tubérculos. Se determinó que existe infección significativa en tallos ( $p=0.037$ ) y en tubérculos ( $p=0.053$ ).

### PALABRAS CLAVES:

- ***RHIZOCTONIA SOLANI KÜHN***
- **COSTRA NEGRA**
- **ESCLEROCIOS**
- **REGIÓN ITS**
- **AG-3**

## ABSTRACT

Potato is a entry agricultural of importance economic and social in Ecuador. The crop has been affected with the rizoctoniasis or black scab, caused by *Rhizoctonia solani* Kühn, which affects the underground parts of the plant, producing cankers in outbreaks, stems, stolons and roots, which decreases the emergence of plants and increases the presence of aerial tubers. The black scab is the formation of sclerotia over the skin of the tuber, has decreased the quality and performance the crop. The objective was to isolate *R. solani* from potato soils in the province of Carchi. Of the 90 samples analyzed, it was possible to obtain 31 isolates of *R. solani* during the three stages of the potato crop (planting, flowering and harvest). The results of the isolates were analyzed by hypothesis testing of Chi - square, which indicated that there is significant presence ( $p = 0.037$ ) of this pathogen in the potato soils in the province of Carchi. Also is did the molecular characterization with all isolates obtained of *R. solani*, using a PCR was amplified the ITS region with primers ITS1 and ITS4 was obtained a band of 650 bp approximately. For AG group were used the primers Rs2R1 and Rs1F2 , with which a band of 500 bp were obtained. Both in the identification of the ITS regions as the AG-3 was observed a frequency of the bands of the 100 %. Additionally, we performed tests of infection in potato plants with the 31 isolates, that showed necrotic symptoms of different intensity in stems and formation of sclerotia over the tubers. It was determined that there is significant infection in stems ( $p=0.037$  ) and tubers ( $p=0.053$  ).

## KEYWORDS:

- ***RHIZOCTONIA SOLANI* KÜHN**
- **BLACK SCAB**
- **SCLEROTIA**
- **ITS REGION**
- **AG-3**

IDENTIFICACIÓN, AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN  
DE LA CAPACIDAD DE INFECCIÓN EN TUBÉRCULOS DE *Rhizoctonia*  
*solani* DE SUELOS PAPEROS DE LA PROVINCIA DE CARCHI.

### 1.1 Formulación del problema

En el Ecuador, por muchos años el cultivo de la papa ha tenido alta prioridad, constituye una de las principales fuentes de ingresos. Hoy en día se conoce que los agricultores del país siembran anualmente cerca de 66.000 hectáreas. La provincia del Carchi ocupa el 25% de la superficie nacional que se dedica y es generadora de un 40% de la cosecha anual de todo el país (Pumisacho & Sherwood, 2002).

La falta de conocimiento por parte de los cultivadores al momento de la siembra de la papa han contribuido que la siembra enfrente muchos problemas que ponen en peligro su bienestar económico y la seguridad alimentaria del país (Pumisacho & Sherwood, 2002).

Los agricultores al seleccionar para semilla aquella papa que no pueden comercializar, o por basarse en criterios como la forma y tamaño del tubérculo, sin tener en cuenta su sanidad. Suelen seleccionar tubérculos que juegan un rol importante en la propagación de diversas enfermedades, que con el pasar del tiempo se irán acumulando en la planta (Herrera, Gómez, Corzo, & Cerón, 2001; Pumisacho & Sherwood, 2002).

La planta de papa es susceptible a por lo menos 75 agentes diferentes entre insectos plaga, microorganismos, fitopatógenos y nemátodos, que causan bajos rendimientos y pérdidas en la producción en las áreas del cultivo (Herrera, Gómez, Corzo, & Cerón, 2001).

Varias enfermedades de la papa, como la marchitez causada por el hongo *Verticillium sp.* no muestran síntomas visibles en el tubérculo. Otras enfermedades como la roña (*Spongospora subterranea*), la mortaja (*Rosellinia spp.*) y la rizoctoniasis (*Rhizoctonia solani*) es posible observar algunos signos de la enfermedad sobre los tubérculos. Sin embargo, sólo después de la siembra en la fase de crecimiento del cultivo

dichas afecciones se manifiestan, infestan el lote y afectan la producción (Zapata, 2000; Herrera, Gómez, Corzo, & Cerón, 2001).

En las zonas productoras de papa del mundo, una de las enfermedades más destructivas para los cultivos es producida por *Rhizoctonia solani*, un agente fitopatógeno que infecta el tubérculo. Debido a que se puede desarrollar en un rango de temperatura variado se disemina fácilmente sobre los tubérculos de papa mediante los esclerocios; causando la denominada costra negra o rizoctoniasis (Arauz , 1998; Agrios, 2004; Araujo, 2006).

Los daños que ocasionan son considerables, ataca a los brotes emergentes, causa la formación de esclerocios sobre la superficie del tubérculo, pudrición en yemas, brotes, raíces y tallos de plantas jóvenes o adultas, lesiones necróticas de color café oscuro que interfieren con el transporte de nutrientes, disminuyendo la emergencia y el rendimiento del cultivo (Giovannini, Andrade, Valenzuela, Castro, & Contreras, 2005).

Aunque el mayor daño es el incremento de papas pequeñas, deformes y agrietadas, aumentando el desecho, perdiendo capacidad comercializadora. Convirtiéndose en un problema significativo para los productores por las pérdidas económicas que ocasiona (Castro & Contreras, 2011).

La enfermedad que puede afectar tanto la calidad culinaria y sanitaria de los tubérculos ha sido investigada en diversos países a nivel mundial. A pesar de que ha sido la responsable de pérdidas para los agricultores, en el país ha sido estudiada a nivel de tubérculos con esclerocios, raíces y tallos infectados.

No se ha encontrado información de *Rhizoctonia solani* de estudios realizados a partir del análisis del suelo, mucho menos de la caracterización molecular de los grupos anastomóticos (AG) de este hongo.

## **1.2 Justificación del problema**

La mayoría de las enfermedades originadas en tubérculos es causada por fitopatógenos; pueden atacar las partes aéreas de la planta, destruyendo el follaje y causando manchas foliares y tizones, también a las raíces retardando el desarrollo del

cultivo, restándole vitalidad e incluso causándole la muerte y a los tubérculos ocasionando lesiones que pueden destruirlos o desmejorar su calidad (Ames, 1997).

Además de producir daño durante el desarrollo de las plantas en el campo, pueden afectar en la etapa de post cosecha, cuando el producto ha sido almacenado para su conservación y posterior consumo o comercialización (Ames, 1997).

Algunas provincias del Ecuador dedicadas al cultivo de la papa se han visto aquejadas por diferentes enfermedades causadas por hongos como: *Phytophthora infestans* (tizón tardío), *Streptomyces scabies* (sarna común), *Alternaria solani* (tizón temprano), *Rhizoctonia solani* (costra negra); responsables de causar rendimientos bajos, deterioro del producto cosechado y de su calidad sanitaria (Pumisacho & Sherwood, 2002).

Diferentes investigaciones han demostrado que los cultivos de papas sufren de rizoctoniasis; enfermedad ocasionada por *Rhizoctonia solani* que afecta tejidos, brotes y tallos de las plantas de la papa, la sintomatología más evidente es la presencia de esclerocios sobre la superficie del tubérculo (Vargas, 2006).

El estudio de la rizoctoniasis en los suelos paperos ecuatorianos ha cobrado importancia debido a que en los últimos años esta enfermedad ha aumentado su incidencia en casi todas las zonas productoras causando reducción en el número de plantas por hectárea, disminución en la cantidad de tubérculos e incluso la muerte de hasta el 70% de plántulas cultivadas. Varios productores de papas han asumido pérdidas en su economía por tal razón (Vargas, 2006; Castro & Contreras, 2011).

La identificación de hongos fitopatógenos es sustancial; pues contribuirá a minimizar diversas enfermedades especialmente en cultivos que tienen importancia a nivel mundial como la papa. Permitirá además tener una sanidad adecuada al momento de cultivar obteniéndose así un producto de alta calidad (Castro & Contreras, 2011).

Efectuar investigaciones sobre *R. solani*, proporcionará información adecuada para la utilización oportuna y controlada de fungicidas, químicos o mejor aún, de metodologías de control biológico efectivas, que dañen lo menos posible el medio ambiente (Rosaima, García, & Garnica, 2002).

Dado a que el Ecuador no se han realizado aislamientos a partir del suelo, ni se ha encontrado investigaciones sobre la caracterización molecular de *Rhizoctonia solani*, el objetivo del siguiente estudio es obtener más información sobre este hongo fitopatógeno mediante el uso de técnicas moleculares como la PCR, que permita comprobar la presencia o ausencia de *R. solani*, además del grupo anastomósico.

La información obtenida podrá ayudar al agricultor en el país, permitiéndole tener un manejo adecuado del suelo y a contrarrestar los daños producidos por este patógeno que aún no tiene un control efectivo (Frank, 1981; Agrios, 2004).

### **1.3 Objetivos de la investigación**

#### **1.3.1 Objetivo general**

Identificar, aislar, caracterizar y evaluar la capacidad de infección en tubérculos de *Rhizoctonia solani* de suelos paperos de la provincia del Carchi.

#### **1.3.2 Objetivos específicos**

- Tomar muestras de suelos paperos en seis campos de la provincia del Carchi en sus tres etapas de cultivo en siembra, floración y cosecha.
- Aislar *Rhizoctonia solani* a partir de muestras de suelos paperos de la provincia del Carchi y caracterizar morfológicamente los diferentes aislamientos del hongo.
- Purificar los aislamientos obtenidos de *Rhizoctonia solani*.
- Extraer el DNA de los micelios de *Rhizoctonia solani* y cuantificar.
- Realizar una PCR para verificar si los aislamientos obtenidos corresponden a *Rhizoctonia solani* y al grupo anastomósico AG3.
- Evaluar la capacidad de infección en tubérculos y tallos con los diferentes aislamientos obtenidos de *Rhizoctonia solani*.

## 1.4 Marco teórico

### 1.4.1 Papa (*Solanum tuberosum*)

#### 1.4.1.1 Origen

*Solanum tuberosum* fue domesticada en Sudamérica, específicamente en Bolivia, entre los lagos Titicaca y Poopó hace unos 10.000 años aproximadamente. Aunque existe controversia y opiniones divididas sobre el origen de la papa, sin duda se estima que el altiplano peruano - boliviano es el lugar donde inició la siembra de este importante cultivo (CONABIO, 2007).

La mayor diversidad genética de papa cultivada y silvestre se encuentra en las tierras altas de los Andes de América del Sur. Aparentemente la evolución de las especies de papa cultivada se originó a partir del nivel diploide (dos pares de cromosomas), la cual se encontraba distribuida desde el centro del Perú hasta Ecuador, Colombia y Venezuela (Pumisacho & Sherwood, 2002).

De aproximadamente 2.000 especies conocidas dentro del género *Solanum*, entre 160 y 180 forman tubérculos; pero sólo ocho son especies comestibles cultivadas. Existen cerca de 5.000 plantares de papa, pero hoy en día se cultivan en los Andes menos de 500 (Pumisacho & Sherwood, 2002).

Las papas nativas siguen siendo cultivadas en las zonas altas de Perú, Bolivia, Ecuador, Colombia, Venezuela, Argentina y hasta en Chile; son usadas principalmente para el autoconsumo de las familias productoras. Las papas nativas son cultivadas en campos muy pequeños, generalmente de menos de una hectárea en los que se hallan hasta 300 variedades (Rivero, 2005).

Sin embargo la biodiversidad de la papa está amenazada constantemente, algunas variedades antiguas ya no se pueden encontrar, principalmente debido a cambios climáticos y trastornos sociales. Desde los años 50; gracias al desarrollo comercial de las variedades modernas ha llevado a muchos agricultores a disminuir el cultivo de las papas nativas, ya han desaparecido de muchas comunidades. Con estas extinciones, no

sólo el patrimonio cultural de los Andes se reduce, sino también el material genético necesario para desarrollar nuevas variedades, resistentes a las plagas y al estrés climático (Rivero, 2005).

### **Diversificación de la especie**

El centro primario de diversificación corresponde a la zona andina que va desde Colombia atravesando Ecuador, Perú y Bolivia, hasta la parte norte de Chile y Argentina. Los centros secundarios de diversificación corresponden a Mesoamérica (Sur de México, Guatemala, El Salvador, partes occidentales de Honduras, Nicaragua y parte noroeste de Costa Rica), Venezuela y porción sur de Chile, específicamente en la Isla de Chiloé (CONABIO, 2007).

### **Crecimiento del cultivo de papa en función de la temperatura**

El cultivo de la papa varía su crecimiento en función de la temperatura de la siguiente manera (Fagro, 2008):

- La papa es un cultivo sensible a heladas, pero crece y se produce bien con temperaturas frescas.
- El crecimiento vegetativo es bueno a 20 °C – 25 °C. La producción de papas (tubérculos) tiene como óptimo temperaturas menores (18 °C – 20 °C).
- Las temperaturas altas (28 °C - 30 °C) impiden el crecimiento de los tubérculos al gastar la planta en respiración toda la producción de la fotosíntesis. En tales condiciones, la producción es de baja calidad por la formación de papa deformes. Las noches frescas favorecen la formación de los tubérculos.

### **Importancia del cultivo de la papa en el mundo**

El cultivo de la papa juega un rol importante en el sistema de alimentación global. Según estudios internacionales, contribuye a los requerimientos energéticos y de

nutrientes de más de dos mil millones de personas en los países en desarrollo (Espinal, *et al.*, 2006).

La papa como producto alimenticio presenta una fuerte expansión a nivel mundial, se sitúa como el cuarto producto básico, después del trigo, el arroz y el maíz. Los principales productores a nivel mundial son China, Rusia, Polonia, India y Estados Unidos los que concentran el 53% de las 311 millones de toneladas que se producen en el mundo (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2004).

Los principales exportadores son los Países Bajos, Francia, Alemania, Bélgica-Luxemburgo y Canadá, que concentran el 63% de las 7.8 millones de toneladas que se exportan. Además estos mismos países incluido Italia, España y los Estados Unidos, se constituyen como los mayores importadores de papa para consumo, concentrando el 62% de las importaciones. La papa a nivel mundial presenta un crecimiento moderado, el cual ha aumentado a una tasa anual del 1.6% (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2004; Chavarro, 2011).

### **Producción y consumo de papa en el Ecuador**

El cultivo de papa en el Ecuador es tradicional en la región interandina y constituye uno de los productos básicos en la dieta de los ecuatorianos. Dentro del Producto Interno Bruto (PIB) agrícola del Ecuador, representó el 8.72% del PIB total nacional durante los años 2000 - 2011 (Flores, Naranjo, Galárraga, Sánchez, & Viteri, 2012).

Según el III Censo Nacional Agropecuario, la actividad papera vincula a 88.130 productores representando un 10.5% de los productores agrícolas a nivel nacional. Además al menos 250.000 personas están involucradas directa o indirectamente con el cultivo (SICA - MAG, 2013).

La superficie cosechada de papa en el país durante el período 2000 - 2011 alcanzó un promedio de 49.038 hectáreas anuales, mientras que la producción promedio anual fue de 319.764 Tm anuales, significado un rendimiento promedio de 6.64 Tm/ha (Flores, Naranjo, Galárraga, Sánchez, & Viteri, 2012).

Las exportaciones de papa en promedio anual llegaron a \$1.53 millones entre los años 2000 y 2011, representando un 0.1% respecto a las exportaciones totales. Las importaciones alcanzan en promedio un total de \$ 5.6 millones por año; constituyendo el 0.04% del total de importaciones en este periodo. Se ha podido estimar que el consumo promedio per cápita 2000 - 2011 de papa en Ecuador ha sido de 22.29 kg/año (Flores, Naranjo, Galárraga, Sánchez, & Viteri, 2012).

El 90% de la papa a nivel nacional se consume; es la base de la alimentación de gran parte de la población ecuatoriana principalmente de los habitantes de las zonas altas (SICA - MAG, 2013).

En la Sierra ecuatoriana, la papa es el segundo cultivo más importante después del maíz, se produce en diez provincias de la Sierra, siendo las más representativas: Carchi, Pichincha, Tungurahua, Chimborazo y Cotopaxi que produjeron el 89% de la producción (Flores, Naranjo, Galárraga, Sánchez, & Viteri, 2012; SICA - MAG, 2013).

Se estima que durante el 2012 se produjeron 305.000 Tm con un rendimiento promedio nacional de 8 Tm/ha. Ecuador tuvo rendimientos bajos en comparación a otros países productores de papa (Suquilanda, 2013).

### **Cultivo de papa en la provincia de Carchi**

La zona norte del Ecuador tiene la mayor producción de papa por área al nivel nacional. Su rendimiento en promedio es de 21.7 t/ha. Aunque Carchi solo ocupa 15.000 ha de la superficie nacional dedicada al cultivo de papa, la provincia dispone de una diversidad de climas que permite cultivar desde papa en la parte alta, hasta frutales en la parte baja. El área papera de la provincia se distribuye a lo largo de las cordilleras oriental y occidental, entre los 2.800 hasta los 3.200 m.s.n.m. con clima frío de alta montaña.

La mayor superficie sembrada de papa se extiende sobre cuatro cantones: Tulcán, Montúfar, Espejo y Huaca, debido a que presentan temperaturas máximas, medias y mínimas bastante similares a lo largo del año (Pumisacho & Sherwood, 2002).

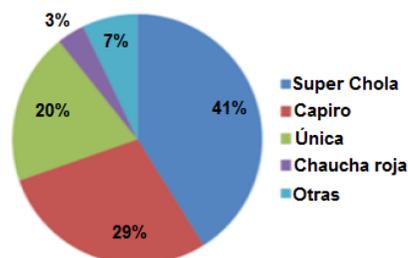
Históricamente, en el Ecuador, la provincia del Carchi es la que tienen el mayor número de hectáreas sembradas lo que representa un 20.37% de las hectáreas totales sembradas con papa, le sigue la provincia de Chimborazo con un 18.68% del total y no se puede descartar a la provincia de Cotopaxi con un 15.12% del total (SICA - MAG, 2013).

### **Variedades de papas que se siembran en la provincia del Carchi**

Cada zona del país produce distintas variedades de papa que pueden ser clasificadas en dos grupos nativos y mejorados. Los grupos nativos corresponden a cultivos locales que han sido sometidos a un proceso de selección a través de cientos de años por parte de los agricultores y de la misma naturaleza; en cambio, los grupos de variedades mejoradas son el resultado de la selección realizada por investigadores (Pumisacho & Sherwood, 2002).

Las características de la demanda por semilla de papa se definen cuando el productor toma la decisión de la variedad de papa a sembrar.

En el caso de Carchi, en la Sierra Norte, tres son las principales variedades de papa que se demandan: Super chola, Capiro y Única (figura 1.1); la primera y última utilizadas normalmente para su consumo en fresco, mientras que la segunda es demandada por la industria. Estas tres variedades juntas engloban el 90% de la demanda por variedad de papa en la provincia (Flores, Naranjo, Galárraga, Sánchez, & Viteri, 2012).



**Figura 1.1: Principales variedades de papas demandadas en la provincia de Carchi.**

**Fuente: (Flores, Naranjo, Galárraga, Sánchez, & Viteri, 2012).**

### 1.4.1.2 Características de la especie *Solanum tuberosum*

Pertenece a la familia de floríferas Solanaceae, al género *Solanum* (tabla 1.1) que es muy basto (alrededor de 1.400 especies) y ampliamente distribuido en el mundo. Sin embargo hay una fuerte concentración de especies en América del Sur y América Central, mil especies por lo menos (Pérez, 2012).

Es una planta herbácea anual, que presenta un sistema radicular fibroso y ramificado, con raíces superficiales concentradas en los primeros 60 cm del suelo. Desarrolla estolones (tallos laterales subterráneos), originados en los nudos más basales por debajo del nivel del suelo. Estos estolones o tallos modificados, se convierten en sus extremidades en tubérculos (Pumisacho & Sherwood, 2002).

**Tabla 1.1**

#### *Taxonomía de Solanum tuberosum*

<i>Solanum tuberosum</i>	
Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Orden:	Solanales
Familia:	Solanaceae
Género:	<i>Solanum</i>
Especie:	<i>Solanum tuberosum</i>

**Fuente: (Pérez, 2012).**

#### **Papa (*Solanum tuberosum* L)**

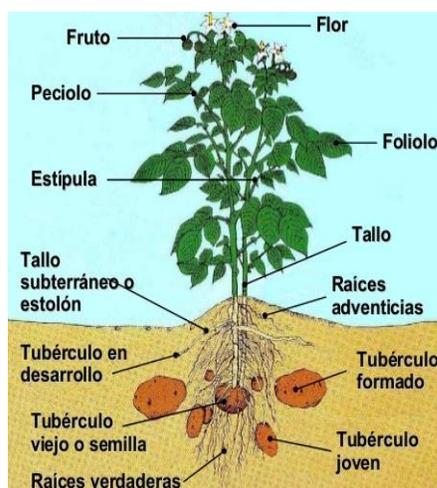
La papa pertenece a la familia Solanácea, género *Solanum* cuyo nombre científico es *Solanum tuberosum* L. Es una planta herbácea, dicotiledónea, provista de un sistema aéreo y otro subterráneo del cual se origina los tubérculos (Rouselle, Robert, & Cronier, 1999).

Alcanza una altura de un metro y produce tubérculos. Posee hábitos de crecimiento rastrero o erecto, generalmente de tallos gruesos y leñosos, con entrenudos cortos. Los

tallos son huecos o medulosos, excepto en los nudos que son sólidos, de forma angular y por lo general verdes o rojo púrpura (Pumisacho & Sherwood, 2002).

El follaje normalmente alcanza una altura entre 0.60 a 1.50 m. Las hojas primarias de plántulas pueden ser simples, pero una planta madura contiene hojas compuestas en par y alternadas, a lo largo del tallo, dando un aspecto frondoso al follaje (figura 1.2), especialmente en las variedades mejoradas (Pumisacho & Sherwood, 2002).

La papa en sí es la parte comestible es un tubérculo que la planta usa como reserva de almidón. Los frutos del cultivo de la papa son tóxicos (Rouselle , Robert, & Cronier, 1999).



**Figura 1.2: Morfología de una planta de papa (*Solanum tuberosum*) con sus respectivas partes.**

**Fuente: (Farmex, 2013).**

#### **1.4.1.3 Reproducción vegetal**

La reproducción de esta especie se realiza habitualmente de manera asexual por medio de tubérculos (estructuras de reserva formadas en el extremo de tallos subterráneos delgados) que producen brotes en las yemas u ojos. En menor grado también se realiza por medio de clonación (CONABIO, 2007).

#### **1.4.1.4 Desarrollo del cultivo de la papa**

El desarrollo de la planta de papa puede dividirse en cuatro principales etapas (figura 1.3)

##### **Etapas vegetativa**

Inicia con el rompimiento de la latencia de la semilla y termina cuando empieza la formación de tubérculos, lo que varía de 15 a 30 días, dependiendo de las condiciones climáticas donde se establezca el cultivo (Badillo, Castellanos, & Sánchez, 2001).

##### **Tuberización**

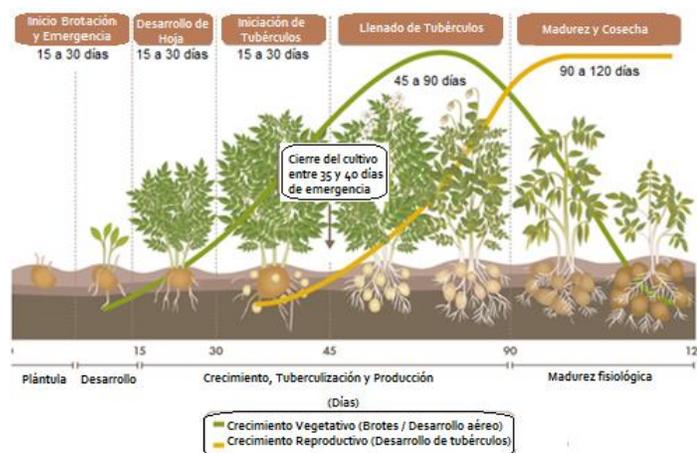
Comienza con la aparición de los estolones. La duración de esta etapa varía de 10 a 14 días. Un déficit de humedad en este periodo puede reducir el número de tubérculos producidos por cada planta (Cortez, Rodríguez, Martínez, & Macías, 2005).

##### **Desarrollo de tubérculos**

Se caracteriza especialmente por la acumulación de carbohidratos (en forma de almidón), con un incremento constante en el tamaño y peso de los tubérculos, bajo condiciones óptimas de humedad. Puede durar de 60 a 90 días, lo que depende del clima y sanidad del cultivo, ya que la humedad tiene una relación directa con el tamaño y calidad de los tubérculos, principalmente a mediados de la tuberización, que se presenta de tres a seis semanas después de su inicio, porque el crecimiento de los tubérculos puede retardarse bajo condiciones de estrés hídrico y no es común que continúe uniformemente después de aplicarse el riego (Sifuentes, Macías, Apodaca, & Mondaca, 2010).

## Maduración

Empieza con la caída del follaje, donde las hojas viejas se tornan amarillas hasta llegar, gradualmente, a un color café, al madurar. Tiene lugar un crecimiento mínimo de los tubérculos y los requerimientos hídricos van disminuyendo por la reducida evapotranspiración de las hojas en el proceso de secado (Sifuentes, Macías, Apodaca, & Mondaca, 2010).



**Figura 1.3: Etapas de crecimiento del cultivo de la papa.**

**Fuente: (SQM, 2014).**

### 1.4.1.5 Duración del cultivo

El cultivo de papa es anual y la temporada de siembra variará dependiendo de la región donde se cultive, en general abarca un período de desarrollo de tres a cinco meses (CONABIO, 2007).

Las papas silvestres se mantienen por largos periodos debido al continuo rebrote de los tubérculos. En contraste, las variedades cultivadas viven de cuatro a siete meses (Pumisacho & Sherwood, 2002).

### 1.4.2 Enfermedades que afectan los cultivos de la papa

El cultivo de la papa es susceptible a más de 300 plagas y enfermedades que son producidas por: virus, hongos, bacterias, nemátodos e insectos. Se estima que las pérdidas en rendimiento debido a enfermedades en la papa se acercan al 22% por año. Siendo la propagación de la papa por tubérculos uno de los principales factores que favorece altamente la transferencia de patógenos de una generación a la siguiente (Salazar, 1995; Estrada, 2000).

Algunas de las enfermedades que causan daño al cultivo de la papa son: la rancha o tizón tardío (*Phytophthora infestans*), la marchitez bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*), pierna negra (*Erwinia sp.*), el virus de enrollamiento de la hoja (PLVR), el nematodo del quiste (*Globodera rostochiensis* y *G. pallida*), pudrición bacteriana blanda (*E. carotovora*), gusanos blancos (*Premnotrypes* y *Rhigopsidium*), rizoctoniasis (*Rhizoctonia solani*), pulguillas (*Epitrix*), manchas foliares (*Alternaria solani*) (Salazar, 1995; Estrada, 2000).

Debido al gran número de patógenos causantes de diversas enfermedades, se requiere establecer prioridades para su control. Estas se catalogan según la incidencia, daño, posibilidad de protección química, transmisión a la próxima generación e importancia en el manejo económico y costo (Estrada, 2000).

### 1.4.3 *Rhizoctonia solani*

*Rhizoctonia solani* Kühn (anamorfo), conocido en su fase sexual como *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk (teleomorfo), es la especie más ampliamente reconocida de *Rhizoctonia*. Se caracteriza por estar distribuido en todo el mundo causando diversas enfermedades en una gran variedad de cultivos (Domsch, Gams, & Anderson, 1980; Ceresini, 1999).

Fue descrito en papa por Julius Kühn en 1858, pertenece a la clase Basidiomycete (tabla 1.2), no produce esporas asexuales “conidios” y únicamente en condiciones especiales produce esporas sexuales “basidiosporas” (Zarka, 1965; Domsch, Gams, & Anderson, 1980; Ceresini, 1999).

**Tabla 1.2*****Taxonomía de Rhizoctonia solani y de Thanatephorus cucumeris.***

<b>Taxonomía</b>	<b>Fase asexual (anamorfo)</b>	<b>Fase sexual (teleomorfo)</b>
Reino:	Mycetae	Mycetae
División:	Eumycota	Eumycota
Subdivisión:	Deuteromycotina	Basidiomycotina
Orden:	Agonomycetales	Tulasnellales
Género:	<i>Rhizoctonia</i>	<i>Thanatephorus</i>
Especie:	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Thanatephorus cucumeris</i>
Nombre científico:	<i>Rhizoctonia solani</i> Kühn	<i>Thanatephorus cucumeris</i> (Frank.) Donk.

**Fuente: (Agrios, 1995).**

En la naturaleza, este hongo se reproduce asexualmente y existe como micelio vegetativo y persiste en el terreno formando estructuras de resistencia o esclerocios, que son masas de hifas estrechamente entrelazadas con superficies duras y resistentes (Cotes, 2006).

Aunque por cortos lapsos puede estar también presente en las raíces de algunos hospedantes sin provocar efectos (Fernández, 1979).

*Rhizoctonia solani* se caracteriza por tener el micelio de color marrón oscuro y la formación de esclerocios a los 8 - 10 días de cultivo, no produce conidias, las células son multinucleadas, las hifas se ramifican cerca del septo de su origen y en ángulo recto. Además presenta una constricción en la base de la célula donde se origina una ramificación (Torres, 2002).

Se desarrolla a temperaturas muy diversas en zonas cálidas, templadas y frías, ocasionando daño considerable en los brotes emergentes del tubérculo cuando las condiciones no favorecen su rápida emergencia; por ejemplo, en suelos húmedos, ácidos y fríos (CIP, 2002).

Es un patógeno cuyo hábitat es el terreno y en donde según algunos autores, ciertas especies pueden vivir muchos años en estado saprofitario, otras en cambio necesitan el pasaje de la vida saprofitaria a la patogénica para poder sobrevivir. Debido a esas características es considerado como un patógeno versátil (Van Den Boogert, 1993; Cotes, 2006).

Puede atacar 250 especies de plantas (figura 1.4) y se presenta tanto en campo como en el sitio de almacenamiento de tubérculos que van a ser usados como material de propagación. Dentro de las especies que ataca, 52 corresponden a plantas arvenses asociadas al cultivo de papa (Jager & Velvis, 1988).



**Figura 1.3: Cultivos afectados por *Rhizoctonia solani*: a) Planta de arroz. Fuente: (Guillermo, 2014), b) Planta de maíz. Fuente: (Stoonn, 2013), c) Planta de trigo. Fuente: (González, 2010), d) Planta de papa. Fuente: (Tejera, 2012), e) Planta de tomate. Fuente: (Cádenas, 2012) , f) Planta de soya. Fuente: (Bazo, 2013), g) Planta de tulipán. Fuente: (Zetroc, 2007) , h) Lino. Fuente: (Muñoz, 2002), i) Orquídea. Fuente: (Dreamstime, 2000).**

#### 1.4.3.1 Síntomas producidos por *R. solani*

Los síntomas más comunes que causa el fitopatógeno en la mayoría de vegetales son el ahogamiento de las plántulas y la pudrición de la raíz, así como la pudrición y la

cancrosis del tallo de las plantas adultas y en proceso de crecimiento, así como tizones o manchas en el follaje cuando se encuentra cerca del suelo (Pérez, Castillo, & Cantú, 2001; Agrios, 2004).

#### **1.4.3.2 Clasificación de *Rhizoctonia solani***

Las hifas de *R. solani* tienen la particularidad de fusionarse, por lo que han sido clasificados en grupos de anastomosis (AG), cuyos miembros se diferencian morfológica y fisiológicamente en rango de hospederos, por requerimientos nutricionales, características bioquímicas, moleculares y secuencias de DNA (Parmeter, Sherwood, & Platt, 1969; Carling, Kuninaga, & Brainard, 2002).

Para caracterizar las poblaciones de *Rhizoctonia solani*, además del grupo anastomósico se han utilizado rasgos morfológicos, el número de núcleos, patología, sensibilidad a fungicidas, los cuales pueden mostrar variabilidad en los individuos y las poblaciones dentro de cada AG (González, 2002; Woodhall, Lees, Edwards, & Jenkinson, 2007).

En base a observaciones realizadas *in vitro* de la variación fenotípica y reacción de anastomosis de hifas se ha determinado que existen 14 grupos anastomósicos en *R. solani* (1 al 13-AG y el AG-BI); sin embargo, se han generado subgrupos para explicar las diferencias que existen en morfología, patología, y grado de anastomosis (Carling, 1996).

Debido a su versatilidad, ha sido objeto de múltiples estudios de tipo ecológico, patológico y de control biológico; sin embargo su taxonomía todavía es confusa y controversial, debido a que su morfología es muy sencilla y los rasgos fisiológicos y patológicos que se usan en su clasificación varían mucho, dificultando aún más la delimitación taxonómica del grupo (González, 2002).

Otro factor que contribuye a la confusión en su taxonomía, es que raramente produce estructuras sexuales, utilizadas tradicionalmente en la taxonomía de hongos. A pesar de la diversidad de formas que presenta *R. solani* se ha asignado a *Thanatephorus*

*cucumeris* (Frank) Donk como el estado teleomórfico común para la mayoría de los grupos anastomósicos (González, 2002).

### 1.4.3.3 Grupos de anastomosis (AG)

Un grupo de anastomosis (AG) está formado por aislamientos genéticamente relacionados. Según su capacidad de anastomosarse entre ellos, se puede observar una fusión perfecta en la cual hay unión de pared celular y membrana citoplasmática hasta ausencia total de reacción (Anderson, 1982; Carling, 1996).

Aunque los mecanismos y el significado biológico de la reacción de anastomosis no son completamente entendidos, representan la interacción somática entre individuos genéticamente diferentes o similares, lo cual en el caso de *Rhizoctonia* se observa a nivel microscópico e incluso macroscópico (Sneh, Burpee, & Ogoshi, 1991).

Entre aislamientos pertenecientes al mismo AG se produce fusión de las hifas, lo que sugiere la existencia de compatibilidad o incompatibilidad vegetativa (anastomosis). Los aislados de diferentes AG no se fusionan entre sí, lo que indica diferencias genéticas entre ellos. Esto ha llevado a varios autores a elaborar la hipótesis de que constituyen especies diferentes (Mordue, Currah, & Bridge, 1989; Boidin, 1998).

En base al grado de interacción entre las hifas, se describieron cuatro tipos de reacciones (C0, C1, C2 y C3), que explican la relación genética entre los aislamientos (tabla 1.3) (Macnish, Carling, & Braunard, 1993).

Si entre AG diferentes no existe interacción o existe muy poca reacción será C0 y C1 respectivamente, aunque se señala que C1 también puede observarse entre individuos de un mismo AG (Cubeta & Vilgalys, 1997).

Para aislamientos pertenecientes a igual AG se describen las reacciones C2 y C3. La primera se denomina reacción de muerte, en la que los aislados se fusionan y ocurre la lisis de las células anastomosadas, lo que indica incompatibilidad vegetativa entre individuos genéticamente diferentes (Carling, 1996).

La reacción C3, conocida como fusión perfecta, ocurre entre individuos genéticamente cercanos. Este caso que se produce cuando se enfrenta un aislado con él mismo (Carling, 1996).

La reacción C2 es importante para definir individuos genéticamente diferentes dentro de una población, mientras que C3 se espera que ocurra entre clones. A pesar de ello, el agrupamiento según la anastomosis no es completamente satisfactorio debido a que en ocasiones un aislado se anastomosa total o parcialmente con aislamientos de más de un grupo de anastomosis; algunos además pierden su capacidad de fusionarse (Anderson, 1982; Vilgalys & Cubeta, 1994; Carling, 1996).

**Tabla 1.3**

*Clasificación de las reacciones de anastomosis.*

<b>Reacción</b>	<b>Fenotipo</b>	<b>Relación genética entre los aislamientos</b>
C0: No hay interacción	No hay reconocimiento entre las hifas.	No existe relación genética entre los aislamientos. Pertenecen a diferentes AG.
C1: Ligero contacto hifal	No se evidencia contacto entre la pared o la membrana. Puede o no estar acompañada de muerte celular.	Aislamientos con relación genética muy distante. Pueden o no pertenecer al mismo AG.
C2: Reacción de muerte	Ocurre anastomosis entre las hifas, con muerte celular de las hifas anastomosadas y las adyacentes. Incompatibilidad somática evidente incluso a nivel macroscópico.	Aislamientos genéticamente idénticos o muy relacionados. Pertenecen al mismo AG y pueden ser clones.
C3: Fusión perfecta	Anastomosis evidente entre las paredes y membranas. No hay muerte celular	Aislamientos genéticamente idénticos o muy relacionados. Pertenecen al mismo AG y

**Fuente:** (Macnish, Carling, & Braunard, 1993).

#### 1.4.3.4 Grupos de anastomosis de *Rhizoctonia solani*

Hasta la fecha se han descrito 14 AG (tabla 1.4 y tabla 1.5) para *Rhizoctonia solani*, nominados del AG1 al AG13, cuyos miembros, de forma general se anastomosan solo con individuos del mismo grupo y el AG-BI, que incluye aislados capaces de fusionarse entre ellos y con otros grupos. Muchos AG han sido divididos en subgrupos que difieren en características bioquímicas, moleculares o patogénicas (Laroche, Jabaji, & Charest, 1992; Johnk & Jones, 1993; Liu, Domier, & Sinclair, 1993).

Esto sugiere que los AG y los subgrupos pudieran representar poblaciones de evolución independiente dentro del complejo *Rhizoctonia solani* (Vilgalys & Cubeta, 1994).

**Tabla 1.4**

***Principales cultivos que ataca Rhizoctonia solani con sus grupos, subgrupos y estado teleomórfico asignado.***

Grupo/subgrupo	Cultivos que ataca	Teleomorfo
AG1-IA	Arroz, maíz, sorgo, soya, frijol, césped	<i>Thanatephorus cucumeris</i> ¿ <i>Thanatephorus sasakii</i> ?
AG1-IB	Frijol, arroz, soya, leguminosas, lechuga, col, hortensia	<i>T. cucumeris</i> ¿ <i>T. microsclerotius</i> ?
AG1-IC	Zanahoria, soya, pino, lino	<i>T. cucumeris</i>
AG2-1	Crucíferas, fresa, tulipán	<i>T. cucumeris</i>
AG2-2IIIB	Arroz, jengibre, césped, maíz, remolacha	<i>T. cucumeris</i>
AG2-2IV	Remolacha, césped	<i>T. cucumeris</i>
AG3	Papa, tabaco, tomate, berenjena	<i>T. cucumeris</i>
AG4 (HGI, HGII y HGIII)	Tomate, papa, soya, cebolla, algodón, pino, guisantes	<i>T. cucumeris</i> ¿ <i>T. praticola</i> ?
AG5	Papa, césped, frijol, soya	<i>T. cucumeris</i>
AG6 (HG-I y GV)	No patogénico	<i>T. cucumeris</i>
AG7	Soya	<i>T. cucumeris</i>
AG8	Poaceae	<i>T. cucumeris</i>
AG9 (TP y TX)	Crucíferas, papa	<i>T. cucumeris</i>
AG10	No patogénica	<i>T. cucumeris</i>
AG11	Trigo	<i>T. cucumeris</i>
AG12	Coliflor, rábano	<i>T. cucumeris</i>
AG13	No patogénico	<i>T. cucumeris</i>
AGBI	No patogénico	<i>T. cucumeris</i>

**Fuente: (González, Portal, & Rubio, 2006).**

Tabla 1.5

*Algunos grupos anastomósicos de Rhizoctonia solani y las enfermedades que causan en diferentes especies de plantas.*

Grupo de anastomosis	Enfermedad	Hospedante
AG1-1	Marchités de la vaina, mancha de la vaina Esclerocios, tizón de la hoja Tizón de la hoja Tizón del sur Mancha marrón	Arroz Maíz Sorgo Soya Plántulas de alcanfor/ Césped
AG1-IB	Mustia Putrefacción Pudrición de pie	Frijol Calabaza Lechuga
AG1-IC	Ahogamiento y corona de la raíz	Soya Zanahoria
AG2-1	Ahogamiento Pudrición del cogollo Tizón de la hoja	Crucíferas Fresas Tulipanes
AG2-2 IIIB	Falso tizón de la vaina Tizón de la vaina Costra negra Parche marrón Pudrición Ahogamiento	Arroz Maíz Remolacha Pasto
AG2-2 IV	Pudrición de la raíz y tizón de la hoja Parche largo	Remolacha Pasto
AG 3	Costra negra y cancro del tallo/estolones “Target spot” Tizón de la hoja Mancha café	Papa Tabaco Tomate Berenjena
AG 4 (HGI, HGII y HGIII)	Pudrición del fruto Pudrición del tallo Ahogamiento y cancro del tallo Ahogamiento y pudrición de la raíz Pudrición de la vaina	Tomate Chícharo Papa Soya, cacahuete Habichuela, cebolla, algodón
AG5	Costra negra Parche marrón Pudrición de raíz	Papa Pasto Frijol, soya
AG8	Manchones desnudos Pudrición de raíz	Cereales Papa
AG9	Patógeno débil	Crucíferas

**Fuente:** (Castiblanco, Díaz, & Guerrero, 2006).

Hasta ahora, se han diferenciado dentro de *Rhizoctonia solani* 14 AG (AG-1 al 13 y AG-BI) que incluyen cepas patógenas y no patógenas, estos grupos son considerados como poblaciones genéticamente distintas a excepción de (AG-BI y AG-8) que tienen la habilidad de fusionarse con miembros de otros AG (Carling & Leiner, 1986; Bandy, Leach, & Tavantzis, 1988; González, 2002).

### **Grupos anastomósicos relacionados con la papa**

*R. solani* AG-3 ha sido reportado como el grupo de anastomosis más importante que afecta el cultivo de la papa en diferentes localidades del mundo. Convirtiéndose en la principal causa de rizoctoniasis dentro de cuatro grupos de anastomosis diferentes; aunque los AG-2-1, AG-2-2, y AG-9, también han sido asociados con papa y suelos recién cultivados con papa (Woodhall, Lees, Edwards, & Jenkinson, 2007).

Los AG más frecuentes asociados con papa son AG-2 y AG-3 y menos frecuentes AG-4 y AG-5. Se han identificado AG-3 con una frecuencia del 94 al 97% y en segundo lugar el AG-2.1 en un 2.5 a 6% (Bandy, Leach, & Tavantziz, 1988; Cedeño, *et al.*, 2001; Escalona, Rodríguez, & Hernández, 2011).

#### **1.4.4 Rizoctoniasis**

Conocida con los nombres de “costra negra” por la presencia de esclerocios en la superficie de los tubérculos afectados y “cancro del tallo” por las lesiones necróticas en los tallos, es una de las enfermedades que afecta considerablemente la agricultura (Torres, 2002).

La rizoctoniasis es una afección persistente y común en todas las regiones donde se cultiva papa, encontrándose tanto superficialmente como en estratos profundos del suelo, muy adaptable, versátil y con capacidad de causar daños importantes al tejido vegetal colonizado, logrando ocasionar lesiones importantes en las raíces, el tallo y tubérculos de papa (Sneh, Burpee, & Ogoshi, 1998; CIP, 2002).

## Síntomas y signos de la enfermedad en el cultivo de papa

La enfermedad producida por *Rhizoctonia solani* puede llegar a afectar brotes, tubérculos, raíces, estolones y la parte basal del tallo de las plantas de papa. Sobre la superficie de los tubérculos maduros se presentan costras pequeñas oscuras (esclerocios del patógeno o estructura de resistencia y supervivencia) a manera de terrones de tierra que no se pueden remover fácilmente, ni siquiera con el lavado, sino con una leve presión con la uña, que al desprenderse no causa daño en la cáscara de la papa (Tsrer, Barak, & Sneb, 2001).

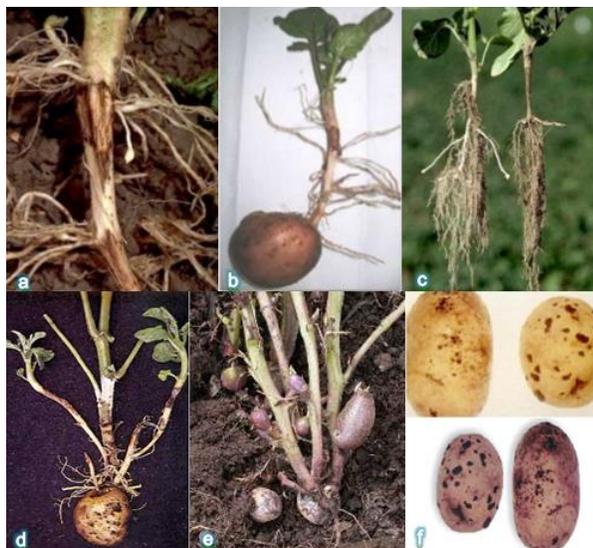
Un ataque severo con *R. solani* en papa, puede llegar a ocasionar la formación de tubérculos aéreos, lesiones y estrangulamiento de los tallos y reducción en la cantidad y en la calidad de la cosecha (Cotes, 2006).

También puede causar pérdida en el rendimiento, induciendo un porcentaje alto de tubérculos deformados y resquebrajados, tubérculos con esclerocios y exceso de tubérculos largos y pequeños. Además de su ataque puede aumentar la susceptibilidad a otras enfermedades (Tsrer, Barak, & Sneb, 2001).

Las plantas presentan pobre desarrollo, bajo vigor, entrenudos abultados, enanismo, floración prematura y ramas abiertas antes de su madurez fisiológica (FEDEPAPA, 2012).

En la parte aérea, se observan signos como coloraciones púrpura en los folíolos terminales (jóvenes) por acumulación de azúcares en las hojas y enrollamiento de folíolos hacia el haz, mostrando el envés. Adicionalmente, en la base de la planta, adheridos a los tallos, se presentan tubérculos aéreos, que generalmente se tornan oscuros por su exposición a la luz (FEDEPAPA, 2012).

Estos síntomas y signos (figura 1.6) se pueden presentar de manera generalizada en los terrenos cuando parte de la semilla no fue bien seleccionada y presenta inóculo del patógeno o la totalidad de la semilla está infectada. También se puede presentar por secciones del campo e incluso en plantas individuales debido a que partes del lote pueden estar infectadas (FEDEPAPA, 2012).



**Figura 1.4:** Algunos síntomas producidos por *Rhizoctonia solani* en las plantas de papa a) Necrosis en tallos. Fuente: (Farmex, 2013), b) Pudrición en el cuello de la planta. Fuente: (Sánchez, 2011), c) Pobre crecimiento. Fuente: (Farmex, 2013), d) Coloraciones púrpura en los folíolos terminales (jóvenes). Fuente: (Farmex, 2013), e) Tubérculos aéreos. Fuente: (Farmex, 2013), f) Presencia de costras pequeñas oscuras, esclerocios sobre tubérculos. Fuente: (De la Cruz, 2010).

#### 1.4.5 Ciclo biológico de *Rhizoctonia solani*

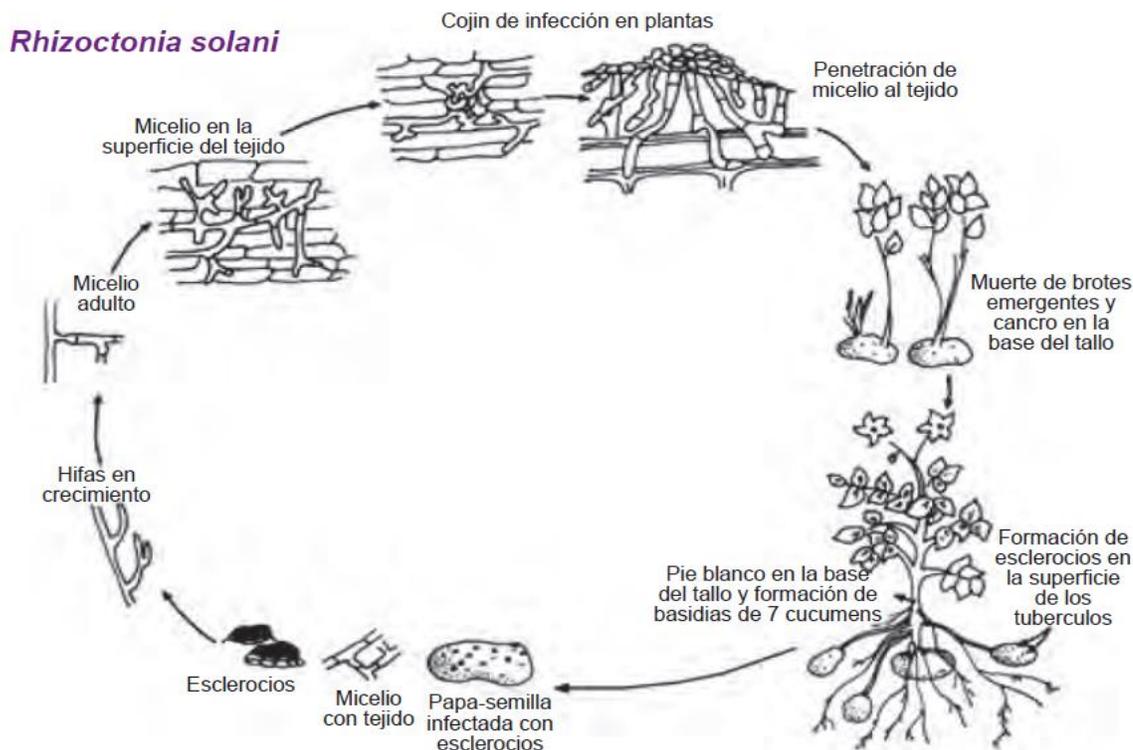
El patógeno se mantiene de una temporada a otra en forma de micelio en restos vegetales, como esclerocio en el suelo o sobre la superficie de los tubérculos inicia su propagación cuando las condiciones ambientales son las favorables (Cotes, 2006).

Inicialmente *R. solani* presente en el suelo es estimulada por exudados producidos por la actividad de crecimiento celular de las plantas y por la descomposición de residuos orgánicos. A partir de los esclerocios se forma el micelio, que al entrar en contacto con la planta ataca la superficie externa (Ceresini, 1999).

El proceso de infección es promovido por la producción de diferentes enzimas extracelulares que degradan varios componentes de la pared celular de las plantas, como la celulosa, la cutina y la pectina. Después de este primer ataque, el hongo continúa su

desarrollo en la superficie externa de la planta, causando enfermedad. Su crecimiento puede continuar gracias a la toma de nutrientes de las células vegetales (Ceresini, 1999).

Durante la etapa de crecimiento, plantas, raíces y estolones son invadidos por el hongo, la formación de esclerocios en los tubérculos nuevos se produce en cualquier momento, dependiendo de las condiciones ambientales. Sin embargo, el mayor desarrollo se produce una vez que la planta está muerta y las papas han quedado bajo el suelo por un tiempo prolongado (figura 1.5). Suelos contaminados, tubérculos con esclerocios, plantación tardía y superficial, harán que el hongo se desarrolle y afecte el brote impidiendo su emergencia (Cotes, 2006).



**Figura 1.5: Ciclo biológico de *Rhizoctonia solani* .**

**Fuente: (Agrios, 1997).**

#### 1.4.6 Diseminación de *Rhizoctonia solani*

*R. solani* se desarrolla bien en suelos húmedos, ácidos y con temperaturas bajas. Un gramo de suelo puede contener como inóculo patogénico desde dos propágulos de *R. solani* hasta  $2.27 \times 10^5$  (Adams, 1990; Prado, Correa, Aricapa, & Escobar, 2001).

La lluvia, el riego y las operaciones efectuadas durante la plantación aumentan la distribución del patógeno en el terreno, aunque el fitopatógeno puede sobrevivir por largos periodos de tiempo en condiciones desfavorables gracias a los esclerocios, que son la principal fuente de inóculo para el inicio de la enfermedad (Prado, Correa, Aricapa, & Escobar, 2001).

La forma más común de propagar el hongo es la siembra de tubérculos con esclerocios que en condiciones de buena humedad y temperatura óptima de 18 °C empieza su infección sobre la superficie de los nuevos tubérculos (Garcés de Granada, Orozco, & Arbeláez, 2003).

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 (CIP, 1996).

Se sugiere que la virulencia de la cepa, la susceptibilidad del hospedero y las condiciones ambientales son los factores que más favorecen el desarrollo y crecimiento del patógeno en campo abierto, el cual repercute negativamente en la producción y rendimiento de la cosecha (CORPOICA, 2011).

#### 1.4.7 Manejo de *Rhizoctonia solani*

Dado a que *R. solani* puede sobrevivir en restos vegetales o como esclerocios largos periodos de tiempo en el suelo, principalmente en los primeros 15 - 20 cm (Sneh, Burpee, & Ogoshi, 1998).

Las principales maneras de evitar la presencia *R. solani* son (Montesdeoca, *et al.*, 2013):

- Realizar rotación de cultivos.

- Eliminar los restos del cultivo anterior y malezas.
- Usar semilla de buena calidad ya sea producida en la finca (mediante selección positiva o selección negativa) o comprada fuera (semilla certificada o de productores reconocidos).
- Tratar la semilla con fungicidas.
- Evitar que el agua se empoce.
- Limpiar y lavar las herramientas y desinfectarlas con cloro.
- Cuando *R. solani* esté presente es necesario, eliminar las plantas infectadas.
- Seleccionar los tubérculos antes de almacenarlos.
- Almacenar los tubérculos en sitios secos, ventilados y con luz difusa.

#### 1.4.7.1 Control químico de *Rhizoctonia solani*

El control químico es considerado por los agricultores como el arma más efectiva y rápida contra los principales problemas fitosanitarios, aunque en la rizoctoniasis dicho control ha demostrado baja eficacia (Garcés de Granada, Orozco, & Zapata, 1999).

Para el control de *R. solani* en el cultivo de papa se utilizan moléculas químicas como Benomyl y Carbendazim, que son fungicidas sistémicos de amplio espectro que se utilizan para el control de enfermedades en semilla. Dichos fungicidas actúan inhibiendo la síntesis de la tubulina en la mitosis; actúan rápidamente, puesto que son absorbidos por la planta a través del tallo, las hojas y las raíces (CORPOICA, 2011).

Las moléculas químicas mencionadas son comúnmente aplicadas al tubérculo semilla previo a la plantación, siendo recomendables cuando se utiliza semilla infectada con *R. solani* (Núñez, 2002).

El tratamiento con fungicidas es efectivo en los tubérculos semilla, sirven para reducir el inóculo de *R. solani* presente en ellas o cuando los suelos no están demasiado infestados, pero este beneficio puede ser menor en el campo cuando el suelo está infestado por *R. solani* AG3 persistente en los cultivos de papa (CORPOICA, 2011).

### 1.4.7.2 Control biológico de *Rhizoctonia solani*

El control biológico ha sido usado como una alternativa muy prometedora para el control de *R. solani* y se define como la disminución del inóculo o de la actividad de una enfermedad causada por un patógeno como consecuencia de la interacción de uno o más organismos, incluyendo la planta hospedera pero excluyendo al hombre (Baker, 1987).

Diversos géneros de hongos han sido identificados como potenciales agentes de control biológico contra varios fitopatógenos del suelo; sin embargo son *Trichoderma spp.* y *Gliocladium spp.* los que han ofrecido mejores resultados. Ambos hongos ejercen su acción mediante varios mecanismos, entre los que juega un rol importante el parasitismo (Cotes, Cárdenas, & Pinzón, 2001).

Especies del género *Trichoderma* han sido muy estudiadas como antagonistas de patógenos del suelo, como *R. solani* (Harman, *et al.*, 2004). Pero actualmente otros modelos de biocontrol están empleando especies de *Rhizoctonia* no patogénica consideradas como hipovirulentas (binucleadas) como agentes de control biológico para reducir la severidad de la rizoctoniasis (CIP, 1996; Carling, Kuninaga, & Brainard, 2002).

### 1.4.8 Caracterización molecular de *Rhizoctonia solani*

#### 1.4.8.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR (Polymerase Chain Reaction) es una herramienta molecular que consiste en amplificar in vitro fragmentos específicos de DNA, con la finalidad de detectar una secuencia o gen de interés en el genoma de un organismo. Hasta el día de hoy se ha empleado con éxito en diferentes campos del conocimiento como en la medicina, biología, agronomía, áreas forense y taxonomía (Dale & Schantz, 2007).

La PCR (figura 1.6), consiste en tres pasos esenciales:

- **Desnaturalización del DNA:** sirve para separar por temperatura (95°C) el DNA de doble cadena a moléculas de cadena sencilla, que servirán de molde para la síntesis de los fragmentos (Dale & Schantz, 2007).
- **Alineamiento:** la temperatura se reduce para permitir el reconocimiento de los oligonucleótidos a las cadenas moldes, la temperatura óptima de alineamiento puede variar desde los 40 a 65 °C, y dependerá de las características de los oligonucleótidos (Dale & Schantz, 2007).
- **Extensión:** el DNA polimerasa producirá la cadena de DNA complementaria a partir de los oligonucleótidos unidos a las cadenas moldes, la temperatura de extensión óptima es aproximadamente a 72 °C (Dale & Schantz, 2007).

La enzima DNA Taq polimerasa agrega aproximadamente 1000 bases por minuto. Estos pasos (ciclos) se repiten las veces que sea necesario, para obtener de manera exponencial el fragmento de interés, en 30 a 40 ciclos se acumula alrededor de 106 a 108 moléculas a partir de la muestra de DNA (Dale & Schantz, 2007).

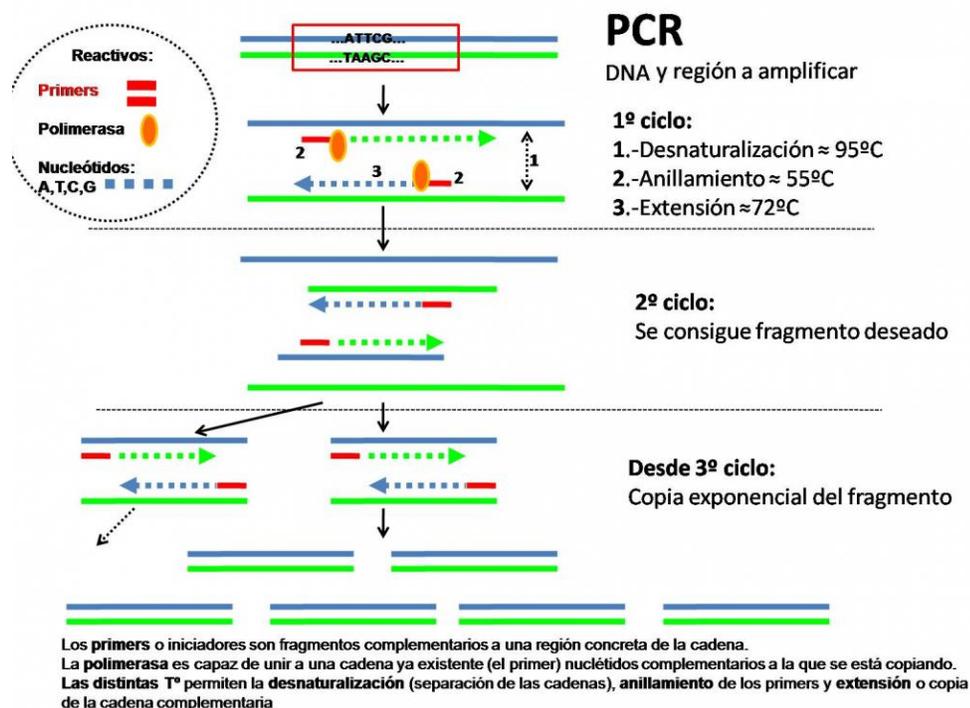


Figura 1.6: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Fuente: (Creative Commons 3.0, 2012).

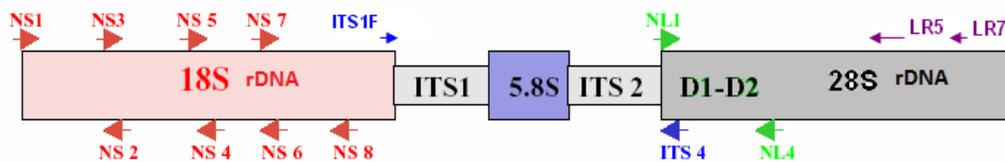
### 1.4.8.2 Regiones ITS

Las regiones Espaciadores de Transcripción Interna (ITS) son secuencias de DNA altamente específicas, que se encuentran entre los genes que codifican para el RNA ribosomal (rRNA); son utilizadas en el estudio de poblaciones puesto que muestran diferencias evolutivas y permiten obtener una buena información filogenética y taxonómica de los individuos (Liu, Sinclair, & Chen, 1992).

Son de evolución rápida las regiones ITS, por consiguiente su variabilidad permite la realización de análisis filogénicos, evolutivos y biogeográficos entre órdenes, géneros y especies relacionados, siendo de gran utilidad en casos en que los caracteres morfológicos no son suficientes para la solución de problemas evolutivos y taxonómicos (Bandy, Leach, & Tavantzis, 1988).

Actualmente se cuenta con gran cantidad de secuencias de DNA ribosomal (rDNA) que han sido alineadas y comparadas en numerosos organismos, permitiendo recolectar información acerca de sus relaciones filogenéticas. Han sido ampliamente utilizados en el estudio de la relación filogenética entre taxones muy cercanos y en la identificación específica de organismos, especialmente patógenos (Insua, López, Freire, & Méndez, 2003).

Los genes 18S, 5.8S, y 28S (figura 1.7) para el RNA ribosomal nuclear en hongos son organizados normalmente en tándem con repeticiones idénticas de 60 - 200 copias por genoma (Insua, López, Freire, & Méndez, 2003).



**Figura 1.7: Representación esquemática de las ITS del DNA ribosomal.**

**Fuente:** (Solé, 2002).

La región ITS completa de 600 a 800 pb puede amplificarse fácilmente con iniciadores universales (tabla 1.6); la naturaleza multicopia de las repeticiones del rDNA

hace de esta región una secuencia fácil de amplificar (Villalobos, Escobal, & Santerre, 2005; Suvi, 2005).

**Tabla 1.6**

*Primers universales utilizados en la región ITS.*

Primer	Secuencia	Fuente
ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	(Binder & Hibbett, 2003).
ITS1F	5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3'	(Suvi, 2005).
LR5	5'-TCCTGAGGGAAACTTCG-3'	(Suvi, 2005).
ITS4	5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	(White, Bruns, Lee, & Taylor, 1990).
ITS5	5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'	(White, Bruns, Lee, & Taylor, 1990).

A pesar de la conservación de los genes del RNA de los hongos, existe la variación suficiente en las secuencias para permitir su uso como sitios diana para la amplificación diferencial. Considerablemente, la variación de secuencia más grande es encontrada en los espacios internos transcritos (ITS), regiones entre los genes rRNA dentro de una unidad repetitiva de rRNA. Entonces, algún organismo o incluso cepas diferentes aisladas de un mismo organismo que tengan repeticiones del rDNA, pueden ser detectados específicamente por la selección de iniciadores basados en los espaciadores de las regiones variables (Henson y French, 1993).

## 1.5 Hipótesis

Existe presencia significativa estadística de *Rhizoctonia solani* en aislamientos obtenidos a partir de muestras de suelos paperos de la provincia de Carchi, durante las etapas de siembra, floración y cosecha.

## CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Participantes

Este trabajo de investigación fue realizado por la señorita Alexandra Patricia Albán Méndez en el Laboratorio de Microbiología ubicado en el bloque G de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología, Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE.

En el presente estudio participaron como directora la M.Sc. Alma Koch Kaiser, y como codirector el Ing.-Mat. Pedro Romero Saker, docentes de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología.

### 2.2 Zona de estudio

#### 2.2.1 Fase de campo

Se seleccionaron seis campos a diferentes altitudes en la provincia del Carchi, cantón Montúfar, parroquia Piartal (tabla 2.1) para la toma de muestras de suelos paperos durante las etapas de siembra floración y cosecha.

**Tabla 2.1**

*Campos muestreados en la provincia del Carchi.*

<b>Campo</b>	<b>Parroquia</b>	<b>Variedad de papa sembrada</b>	<b>Altura (m.s.n.m)</b>
1		Única	2858
2		Super chola	2856
3	Piartal	Super chola	2810
4		Super chola	2813
5		Super chola	2806
6		Super chola	2801

### **2.2.2 Fase en el laboratorio**

Una vez cumplido el muestreo del suelo en la provincia del Carchi, el trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología del bloque G de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE, que se encuentra ubicado en Sangolquí, Av. El Progreso, s/n, Cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha.

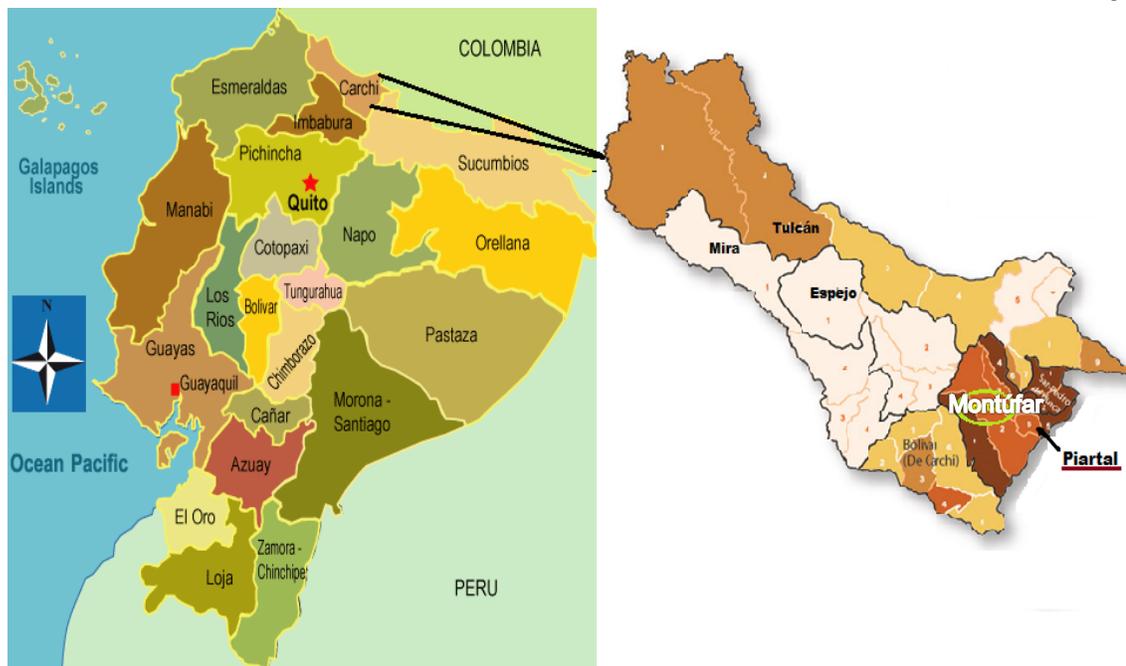
### **2.3 Período de tiempo de investigación**

La presente investigación se inició en abril del 2013 y finalizó en abril del 2014, con un periodo de duración de 12 meses.

### **2.4 Procedimiento**

#### **2.4.1 Encuestas para selección de campos**

Se realizó una encuesta (anexo A) a los agricultores de la provincia del Carchi (figura 2.1), para conocer si sus cultivos presentaban las características propias de la costra negra (rizoconiasis). Una vez analizados los resultados, se procedió a seleccionar los campos adecuados para el muestreo de suelos.



**Figura 2.1: Provincia del Carchi, Ecuador.**

**Fuente: (InmoMundo, 2014).**

#### 2.4.2 Muestreo de suelos

El muestreo se realizó en suelos paperos con altitudes menores de los 3000 m.s.n.m. de la provincia del Carchi en la parroquia de Piartal, cantón Montúfar, durante un ciclo de cultivo, en las etapas de: siembra, floración y cosecha (figura 2.2).

En todos los campos se realizó un muestreo estratificado al azar y se tomó muestras a profundidades de 15 a 20 cm en cinco transectos del campo. Se cogieron dos submuestras en cada uno, se combinaron y homogenizaron para obtener una muestra de suelo de 2 Kg por cada transecto. Se obtuvieron un total de cinco muestras por campo y 30 muestras en la provincia del Carchi en cada una de las fases del cultivo.

Al final del muestreo se contó un total de 90 muestras, para las etapas de siembra, floración y cosecha.



**Figura 2.2:** Etapas de cultivo de la papa: a) Siembra, b) Floración y c) Cosecha.

### 2.4.3 Aislamiento de *Rhizoctonia solani* a partir de muestras de suelo

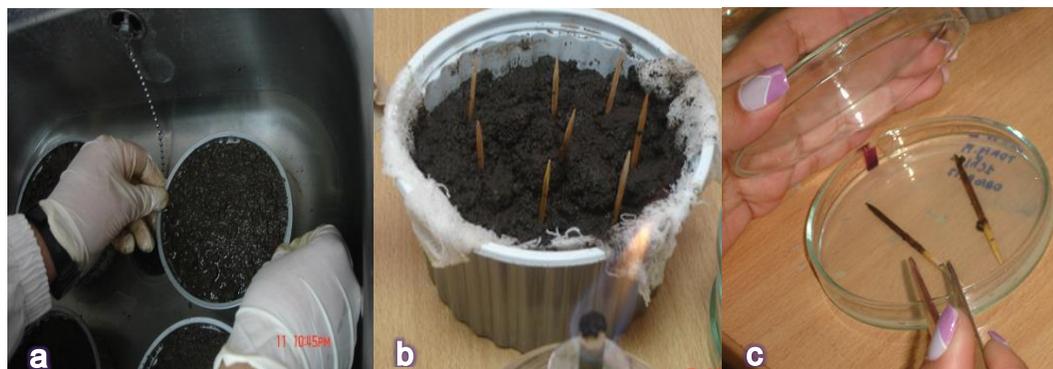
Para el aislamiento de *R. solani*, se realizó diferentes metodologías, descritas en los anexos B y C. El método que fue efectivo en la investigación se llevó a cabo con palillos de dientes esterilizados, como se explica a continuación.

#### 2.4.3.1 Aislamiento con palillos

Para esta metodología, se utilizó tarrinas de 6 cm de largo y 9.5 cm de ancho, perforadas en la parte inferior. Luego se cubrieron con pedazos de gasas previamente autoclavados; sobre las que se colocó las muestras de suelo.

Inmediatamente las tarrinas llenas de suelo fueron sumergidas en agua hasta quedar totalmente empapadas (figura 2.3). Se dejaron en reposo por una noche. Se procedió a

colocar 10 palillos, previamente autoclavados. Separados a 2 cm uno de otro y a una profundidad de 5 cm en el suelo humedecido.



**Figura 2.3: Algunas etapas del aislamiento con palillos: a) Sumergimiento en agua de tarrinas con suelo, b) Colocación de palillos en el suelo humedecido y c) Siembra de palillos en cajas Petri con medio PDA modificado por Castro.**

Por último se cubrieron las tarrinas con papel aluminio para evitar contaminación y se esperó 48 h para poder realizar las siembras de los palillos infectados en cajas Petri con medio PDA modificado por Castro, (anexo D) (Paulitz; Schroeder; 2005 modificado por Koch, Albán & Fuentes, 2013).

Una vez que se realizó la siembra de dos palillos en cada una de las cajas Petri, se incubaron a temperatura ambiente y en cámara húmeda durante tres días, tiempo en el que se observó el crecimiento del *Rhizoctonia solani*. Se repitió cinco veces el proceso para cada muestra (Trujillo, Cavin, & Aragaki, 1987).

#### **2.4.4 Caracterización macroscópica de *R. solani***

El análisis macroscópico de los aislamientos se realizó en cajas Petri con medio de cultivo PDA modificado por Castro, donde se observó la coloración, forma y tamaño del micelio durante los primeros días de crecimiento. Además de si existía formación o no de esclerocios (Perdomo, Hernández, González, Pineda, & Alezones, 2007).

## **2.4.5 Caracterización microscópica de *R. solani***

### **2.4.5.1 Caracterización de hifas con azul de lactofenol**

Para este proceso se utilizó cultivos de cajas Petri con medio PDA modificado por Castro de cuatro días e incubados a 25 °C.

El montaje se hizo sobre un portaobjeto, sobre el cual se colocó una gota de azul de lactofenol. Se cortó un pedazo de cinta adhesiva transparente de aproximadamente 2 cm y con el lado adhesivo de la cinta se tocó el borde del micelio y se lo pegó sobre la gota del portaobjeto. Las placas se visualizaron en el microscopio (Olympus) con los lentes de 10 X, 40 X y 100 X. (Castiblanco, Díaz, & Guerrero, 2006).

### **2.4.5.2 Caracterización de núcleos con safranina O**

Para la tinción de núcleos, se extrajeron discos delgados de agar - micelio (8 mm de diámetro) de cultivos de cuatro días sembrados en medio PDA modificado por Castro.

Se hizo el montaje del disco de agar con crecimiento en portaobjetos, sobre el que se depositó una gota de safranina O (anexo F), solución que facilitó la visualización de los núcleos en el microscopio (Olympus) con los lentes de 10 X, 40 X y 100 X (Perdomo, Hernández, González, Pineda, & Alezones, 2007).

Tanto la tinción con azul de lactofenol como con safranina O permitieron la observación de las características morfológicas microscópicas descritas para *Rhizoctonia solani* (Castiblanco, Díaz, & Guerrero, 2006).

## **2.4.6 Caracterización molecular de *Rhizoctonia solani***

### **2.4.6.1 Purificación del micelio en medio líquido**

Para la purificación del micelio se trabajó con los aislamientos obtenidos, de los cuales se procedió a seleccionar secciones de las hifas jóvenes de los cultivos en el

estéreo microscopio (Olympus). Las hifas jóvenes seleccionadas se sembraron en medio PDA (anexo G).

Una vez que el micelio del hongo creció, se tomó una sección preferentemente de los extremos del cultivo y se sembró en cajas Petri con medio PDA, incubadas a 25 °C.

Este proceso fue repetido hasta obtener cultivos puros. Además, para confirmar su purificación, se analizó las características de *R. solani* tanto a nivel macroscópico como microscópico.

De los cultivos puros se tomó un pedazo de micelio libre de agar y se sembraron en matraces de 100 mL que contenían medio líquido (anexo H).

Los matraces con el medio líquido fueron colocados en un agitador orbital (Wisd) a 90 r.p.m durante cuatro días (Castellanos, Jara, & Mosquera).

#### **2.4.6.2 Extracción de DNA**

Los micelios que se ocuparon para la extracción fueron los obtenidos en el medio líquido. Con ayuda de una bomba al vacío (Welch) se filtraron todos los micelios y se colocaron en tubos eppendorf de 2 mL para ser guardados en el refrigerador a 4 °C.

El micelio refrigerado fue molido con nitrógeno líquido en un mortero con una pequeña cantidad de arena de cuarzo y colectado en un tubo de plástico de 2 mL. Se añadió a la muestra macerada 650 µL de buffer de extracción (50 mM Tris HCl pH 8,0; 1M NaCl, 20mM EDTA pH 8.0, 1% CTAB, 1% PVP) y 12 µL de mercaptoetanol; se incubó a 65 °C durante una hora con agitación lenta. Culminado este período, se adicionó 100 µL de proteinasa K y nuevamente se incubó durante 15 min a 95 °C.

Posteriormente se centrifugó la muestra a 13000 r.p.m. por 10 min. Se sacó el sobrenadante a un tubo nuevo dos veces continuas, se aforó la muestra con el buffer de extracción a 750 µL y se añadió 750 µL de CIA (Cloroformo Alcohol Isoamílico, 24:1). Se agitó fuertemente y se dio un vórtex a la muestra hasta que las dos fases sean homogéneas, antes de centrifugar a 13000 r.p.m. durante cinco min.

El sobrenadante resultante se transfirió a un tubo de plástico limpio y se añadió 750  $\mu\text{L}$  de etanol 100%, se mezcló suavemente y se llevó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 30 min. Transcurrida la refrigeración, se centrifugó la muestra a 13000 r.p.m. durante 1 min; se eliminó el etanol y se añadió 300  $\mu\text{L}$  de etanol acetato de sodio por 5 min.

Descartando el sobrenadante, se añadió 200  $\mu\text{L}$  de etanol acetato de amonio y se eliminó rápidamente. Los tubos se secaron boca abajo hasta que el olor a etanol se eliminó completamente; a continuación se resuspendió el pellet en TE 0.5 X. Se conservaron las muestras a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Modificado Colombo, Second, & Charrier, 2000).

El DNA que se extrajo fue purificado con el kit PowerClean® DNA Clean – Up kit.

Para medir la concentración del DNA se recurrió al Nanodrop ND 8000 (Thermo Scientific), para ello se utilizó 1  $\mu\text{L}$  de DNA; en este equipo se pudo observar si las muestras obtenidas estaban contaminadas con proteínas, alcoholes, fenoles además nos proporcionó la concentración del DNA en  $\text{ng}/\mu\text{L}$  (anexo I).

#### **2.4.6.3 Amplificación de fragmentos de DNA con primers ITS**

Para la amplificación de fragmentos de DNA se emplearon los primers ITS1 e ITS4 (tabla 2.2). Se realizó la preparación de la master mix para un volumen final de 25  $\mu\text{L}$  en la cámara de flujo laminar (ESCO).

Se trabajaron los ensayos de PCR con dupletas del control negativo que contenían todos los reactivos de PCR excepto el DNA, con el fin de comprobar la ausencia de contaminación en los reactivos y del control positivo que se obtuvo a partir de aislamientos realizados en tubérculos infectados con esclerocios.

Para la preparación de las reacciones se colocó 1.5  $\mu\text{L}$  de DNA, 2.5  $\mu\text{L}$  de buffer (10 X), 18.2  $\mu\text{L}$  de agua destilada, 0.5  $\mu\text{L}$  de dNTPS (10 mM), 1.5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (25 mM), 0.25  $\mu\text{L}$  de cada uno de los primers ITS y 0.3  $\mu\text{L}$  de Taq DNA polimerasa (Modificado White, Bruns, Lee, & Taylor, 1990; Modificado Bertini, *et al.*, 1999)

La amplificación se realizó por 35 ciclos (tabla 2.3) en un termociclador (Labnet), la visualización del producto de la PCR se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa (Orozco, Osorio, Botero, Rivera, & López, 2011).

**Tabla 2.2**

*Primers utilizados en la amplificación de la región ITS.*

Primers	Secuencia	Tamaño (pb)
ITS 1	(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')	700
ITS 4	(5'-TCCTCCGCTATTGATATGC-3')	

**Fuente: (White, Bruns, Lee, & Taylor, 1990).**

**Tabla 2.3**

*Ciclos de amplificación empleados para los primers: ITS1-ITS4.*

Etapas	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95 °C	180 seg
Desnaturalización	95 °C	30 seg
Hibridación del primer	55 °C	60 seg
Extensión del primer	72 °C	120 seg
Extensión final	72 °C	600 seg

**Fuente:(White, Bruns, Lee, & Taylor, 1990).**

#### **2.4.6.4 Amplificación de *Rhizoctonia solani* AG3**

Para la identificación de *R. solani* AG-3 se utilizaron los primers Rs1F2-Rs2R1 (tabla 2.4). Se preparó para la master mix una mezcla de PCR con un volumen final de 25 µL, que contenía 2.5 µL de buffer 1 X de PCR, 2 µL de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de dNTP's,

0.3 mM de cada uno de los primers, 1 Unidad de Taq DNA polimerasa y 2  $\mu$ L de DNA templete. El termociclador (Labnet), se programó para 35 ciclos como lo indica la tabla 2.5 (Fernández, 2011).

**Tabla 2.4**

*Primers utilizados en la amplificación de AG3.*

Primers	Secuencia	Pares de bases (pb)
Rs1F2	(5'-TTGGTTGTAGCTGGTCTATTT-3')	
Rs2R1	(5'-TATCACGCTGAGTGGAACCA-3')	500

**Fuente: (Lees, Cullen, Sullivan, & Nicolson, 2002).**

**Tabla 2.5**

*Ciclos de amplificación empleados para los primers: Rs1F2 - Rs2R1.*

Propósito	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95 °C	120 seg
Desnaturación	95 °C	45 seg
Hibridación del primer	63 °C	60 seg
Extensión del primer	72 °C	90 seg
Extensión final	72 °C	300 seg

**Fuente: (Fernández, 2011).**

#### **2.4.6.5 Electroforesis del producto de PCR**

Para observar la presencia de bandas del tamaño deseado tanto para la región ITS como para el grupo anastomósico AG-3, se realizó una corrida electroforética en un gel

de agarosa al 2 %, con Syber safe 0.04  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , en cada posillo se agrgó: 8.4  $\mu\text{L}$  de producto de PCR y 1.6  $\mu\text{L}$  de Blue Juice. A la par, en el mismo gel, se corrieron 10  $\mu\text{L}$  del marcador molecular 100 bp Labnet (Modificado Orozco, Osorio, Botero, Rivera, & López, 2011).

El gel se corrió a 120 V y 300 mA durante 45 min, en una cámara de electroforesis con el buffer TBE 1 X. Finalmente el DNA se visualizó en el fotodocumentador de imágenes (Thermo Scientific) acoplado a un transiluminador con luz UV (UVP); en donde se comparó el tamaño de las bandas obtenidas con el tamaño de las bandas dadas por el marcador molecular.

#### **2.4.7 Infección de tallos y tubérculos con *Rhizoctonia solani***

Para la evaluación de la capacidad de infección en tubérculos y tallos de los aislamientos, se siguió la metodología de Bains y Bisht (1995). Se utilizó tubérculos de la variedad de papa Super chola que fueron desinfectados con formaldehído al 2% y guardados por cuatro semanas a temperatura ambiente para su germinación. Y los aislados de *Rhizoctonia solani* que fueron previamente identificados.

Después de iniciada la germinación, los tubérculos se colocaron a una profundidad de 5 cm en tarrinas de plástico de 15 cm de altura. Estos recipientes fueron llenados con una mezcla de suelo y cáscara de arroz autoclavados con vapor de agua por tres horas en una proporción de 2:1.

Se tomó discos del micelio de 6 mm de diámetro aproximadamente de los aislados de 5 días de edad, crecidos en PDA y se colocó en el hoyo donde se sembró previamente la papa a continuación se cubrió con una capa de 2 cm del suelo.

Para el desarrollo de las plantas, las tarrinas fueron colocadas en estanterías donde la temperatura oscilaba entre 18 y 25 °C. Transcurrido 40 días después de la siembra y de la inoculación, se procedió a examinar las lesiones en la base de los tallos de las plantas obtenidas y en los tubérculos (Bains & Bisht, 1995).

## **2.4.8 Análisis estadístico**

Los datos obtenidos durante la investigación fueron analizados mediante herramientas estadísticas (anexo K).

### **2.4.8.1 Análisis de los aislamientos obtenidos de *R. solani***

El análisis de los aislamientos se realizó en base a los datos obtenidos mediante observaciones realizadas en el microscopio, se determinó si existió presencia o ausencia de *R. solani* en una muestra de suelo. Para ello se designó valores de “1” para las muestras donde estuvo presente *R. solani* y de “0” para las muestras donde no lo estuvo.

Los resultados obtenidos se analizaron con la ayuda del programa estadístico INFOSTAT1, que permitió realizar pruebas de hipótesis chi - cuadrado de independencia, intervalos de confianza y probabilidades que permitieron determinar si las variables empleadas influyeron en la presencia o en la ausencia de *R. solani*, en los aislamientos provenientes de muestras del suelo.

### **2.4.8.2 Análisis de infección en tallos y tubérculos**

Para la parte de infección en tubérculos y tallos la variable de respuesta que se analizó fue si los tubérculos y los tallos estuvieron infectados. Mediante observación se determinó si existió o no infección, se dio valores de “1” para los tubérculos y tallos infectados y de “0” para tubérculos y tallos no infectados. Estos resultados se analizaron con la ayuda del programa estadístico INFOSTAT (Di Rienzo, *et al.*, 2011); dónde se realizó pruebas de hipótesis de chi - cuadrado de independencia, para conocer si la infección producida por *R. solani* es significativa en las partes infectadas o no.

## CAPÍTULO 3: RESULTADOS

### 3.1 Muestreo

Del muestreo realizado a los seis campos de suelos paperos de la provincia del Carchi, parroquia Piartal, cantón Montúfar en el 2013, se obtuvieron las siguientes muestras: 30 en la siembra el 30 de abril, 30 en la floración el 9 de julio y 30 en la cosecha el 15 de octubre. Dando un total de 90 muestras (anexo J) durante una etapa de cultivo de la papa.

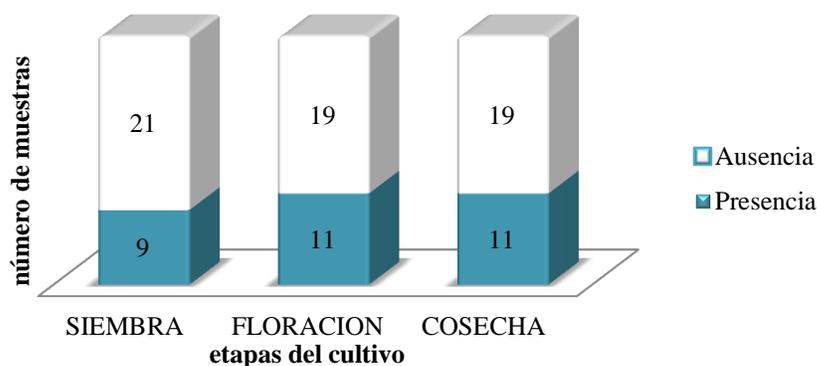
### 3.2 Aislamiento de *Rhizoctonia solani* a partir de muestras de suelo

#### 3.2.1 Aislamiento con palillos

Después de realizar el proceso de aislamiento de las 90 muestras de suelos paperos procedentes de la provincia del Carchi, durante las etapas de siembra, floración y cosecha, se obtuvieron 31 aislamientos de *Rhizoctonia solani*, con un intervalo de confianza del 90% entre 26% al 43% (anexo L).

#### **Aislamiento obtenidos de *Rhizoctonia solani* en siembra, floración y cosecha**

En siembra se obtuvieron 9 aislamientos (anexo L.1), en floración se obtuvieron 11 aislamientos (anexo L.2) y en cosecha se obtuvieron 11 aislamientos (anexo L.3) de *R. solani* (figura 3.1) de la muestras tomadas en los suelos paperos de la provincia del Carchi.



**Figura 3.1: Presencia/ausencia de *R. solani* en las etapas de siembra, floración y cosecha.**

La probabilidad de que *R. solani* pueda ser aislado de los suelos paperos de la provincia del Carchi es del 33.33% (anexo M y M.1) tanto para la siembra, la floración y la cosecha (tabla 3.1).

### **Análisis inferencial**

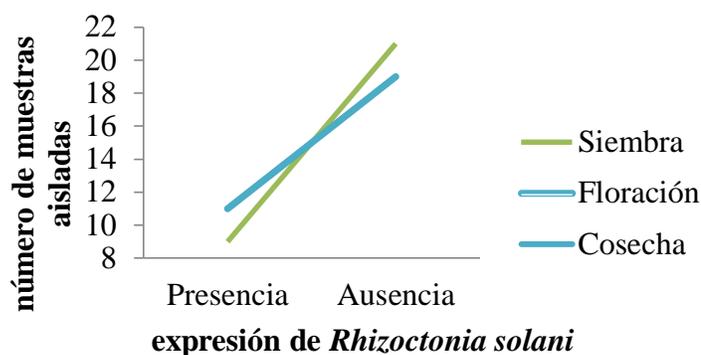
Para el análisis de los resultados del aislamiento, se realizó una prueba de hipótesis chi cuadrado de independencia (anexo N), que determinó que existe presencia significativa ( $p=0.037$ ) de *Rhizoctonia solani* en los suelos paperos de la provincia del Carchi en los aislamientos obtenidos durante las diferentes etapas del cultivo de la papa (siembra, floración y cosecha).

Además se determinó que existe influencia significativa ( $p=0.032$ ) de la siembra, floración y cosecha en la presencia o ausencia de *R. solani* es decir, el aislamiento es dependiente del estado del cultivo (tabla O.1).

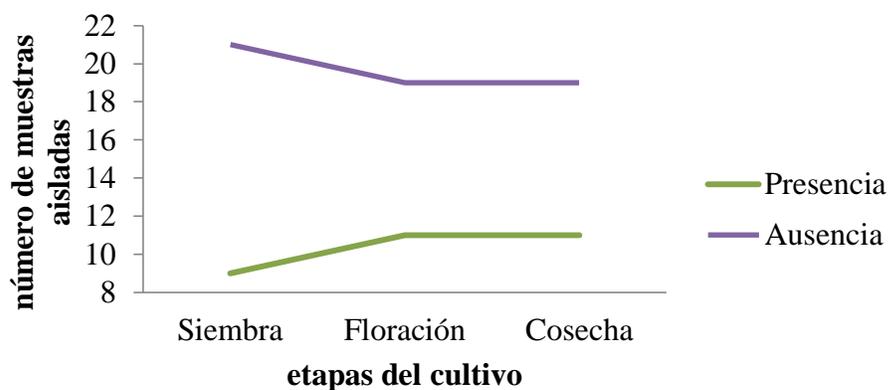
### **Análisis de la expresión de *Rhizoctonia solani* en los aislamientos obtenidos en los suelos paperos de la provincia del Carchi**

Al analizar la expresión de *Rhizoctonia solani*, se evidenció que existe una mayor probabilidad de presencia en los aislamientos realizados durante la floración y cosecha,

mientras que la mayor probabilidad de ausencia se da en la siembra como se observa en las figuras 3.2 y 3.3.



**Figura 3.2:** Expresión de los aislamientos de *Rhizoctonia solani* en las diferentes etapas del cultivo de la papa.



**Figura 3.3:** Expresión de *Rhizoctonia solani* en cultivos de papas de la provincia de Carchi en las tres diferentes etapas de cultivo.

### Análisis inferencial

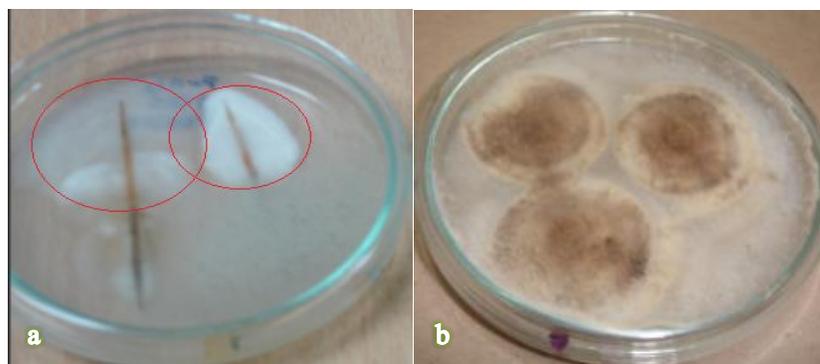
Se determinó que existe mayor probabilidad estadística de presencia de *R. solani* en las etapas de floración y cosecha con un valor de 12.22%, y que existe una mayor

probabilidad de ausencia en la etapa de siembra con un valor de 23.33% (tabla M.1.2 y M.1.3).

Además se comprobó que hay un de probabilidad del 34.44% de que exista presencia de *R. solani* y un 65.56 % de probabilidad de que exista ausencia en los aislamientos obtenidos de los suelos paperos de la provincia del Carchi (tabla M.1.4).

### 3.3 Caracterización macroscópica de *Rhizoctonia solani*

En los aislamientos obtenidos de *R. solani* al inicio del crecimiento, el micelio tuvo una coloración blanca amarillenta que conforme transcurre el tiempo se torna marrón – café. Además presentó crecimiento rastrero y sobre el micelio se observó la presencia de esclerocios (figura 3.4).

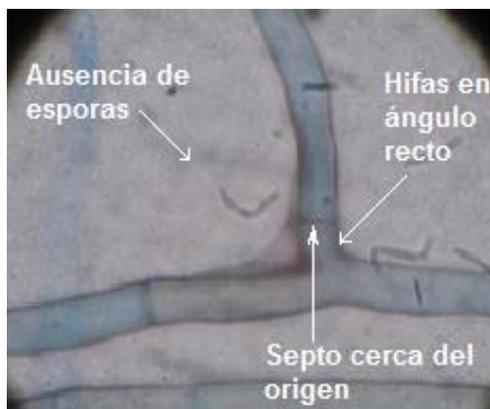


**Figura 3.4: Micelio de *R. solani*: a) Micelio de *R. solani* a los tres días de crecimiento. b) Micelio de *R. solani* a los siete días.**

### 3.4 Caracterización microscópica de *Rhizoctonia solani*

#### 3.4.1 Caracterización de hifas con azul de lactofenol

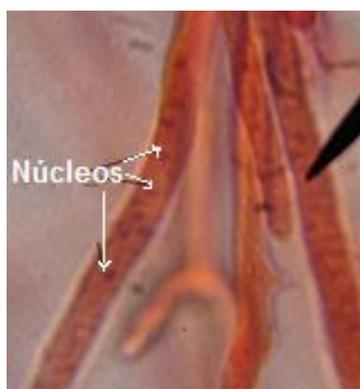
Al efectuar el análisis de los cultivos obtenidos mediante la tinción con azul de lactofenol, se observó que las hifas forman un ángulo de 90°, con un septo cerca de la ramificación principal y ausencia de esporas (figura 3.5).



**Figura 3.5:** Imagen microscópica de las hifas de *R. solani* a 100 X.

### 3.4.2 Caracterización de núcleos con safranina O

Las placas que se efectuaron permitieron observar los núcleos en las hifas de *R. solani*. Se presentaron varios núcleos por célula al ser teñidos con safranina O.

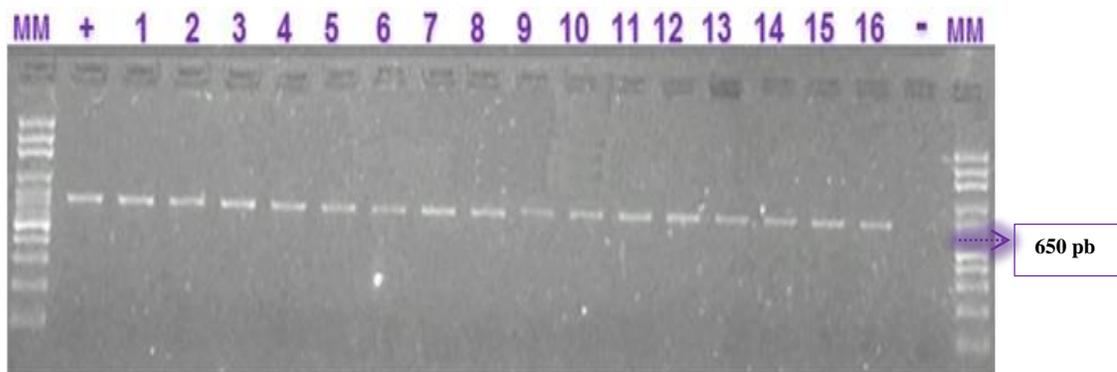


**Figura 3.6:** Núcleos de *R. solani* vistos a 100 X.

## 3.5 Caracterización molecular de *Rhizoctonia solani*

### 3.5.1 Amplificación de fragmentos de DNA con primers ITS

La amplificación por PCR de las regiones ITS de DNA extraído de los aislamientos de *R. solani* dio una banda de aproximadamente 650 pb para todos los aislados encontrados (figura 3.7).



**Figura 3.7:** Productos amplificados por PCR de aislamientos de *R. solani* obtenidos a partir de muestras de suelos paperos con los primers ITS1 - ITS4. (+): carril del control positivo, (-): carril del control negativo y (MM): marcador de peso molecular.

### 3.5.2 Amplificación de *Rhizoctonia solani* AG3

La amplificación para AG 3 realizada con los productos obtenidos de las regiones ITS, mostró una banda de aproximadamente 500 pb. De los 31 aislamientos encontrados todos fueron positivos, es decir hubo una amplificación del 100% (figura 3.8).



**Figura 3.8:** Amplificación de *R. solani* AG3, con los primers Rs1F2 - Rs2R1. (+): carril del control positivo, (-): carril del control negativo y (MM): marcador de peso molecular.

### 3.6 Infección con aislamientos obtenidos de *Rhizoctonia solani*

#### 3.6.1 Infección en tallo

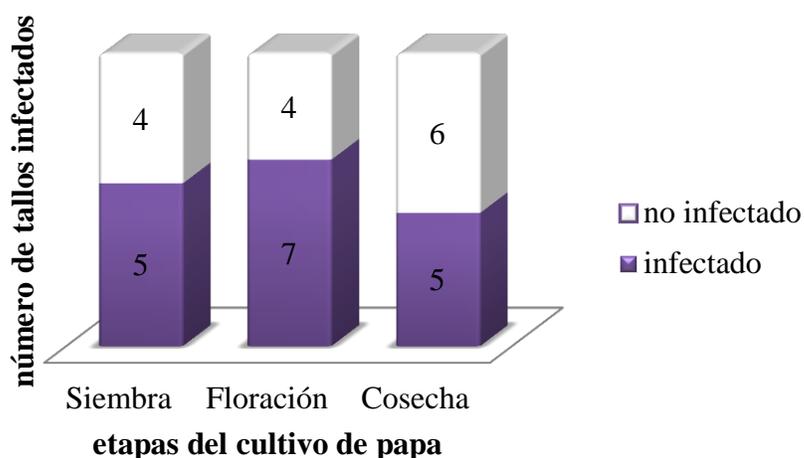
De los 31 aislamientos obtenidos de *Rhizoctonia solani*, 18 de ellos (anexo O) causaron daño en el tallo con un intervalo de confianza del 90%, entre 43% al 73% (anexo P).

Las manifestaciones de infección en el tallo fueron manchas de color café en su base, y partes necrosadas (figura 3.8).



**Figura 3.9: Tallos infectados con *R. solani*.**

La infección en tallos realizada con los 31 aislamientos obtenidos en las diferentes etapas del cultivo de papa, determinó que existió un mayor número de tallos infectados con los aislamientos obtenidos en la etapa de floración, mientras que existió un mayor número de tallos no infectados con *R. solani* con los aislamientos obtenidos en la etapa de cosecha (figura 3.10 y 3.11).



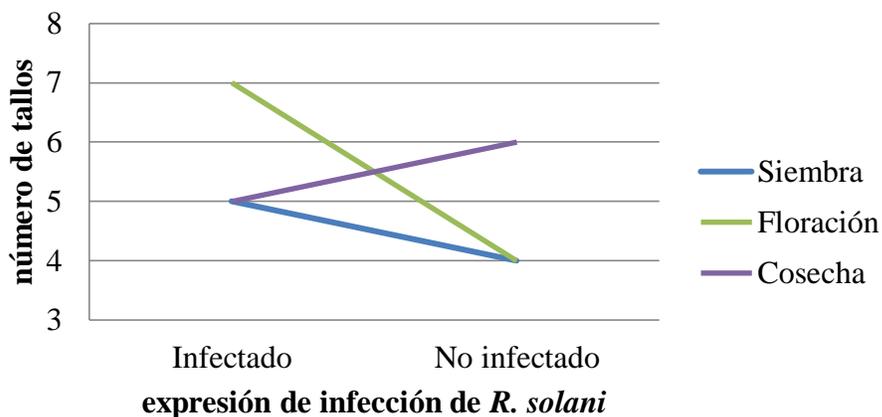
**Figura 3.10: Resultados de los tallos infectados/no infectados con los aislamientos obtenidos de *R. solani* en las diferentes etapas de siembra, floración y cosecha.**

### **Análisis inferencial**

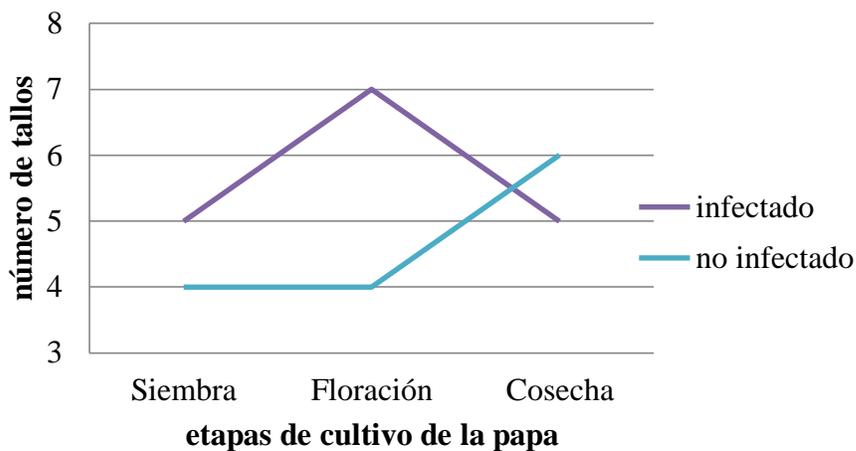
Para el análisis de los resultados de la capacidad de infección en tallos de *R. solani*, se realizó una prueba de hipótesis chi - cuadrado de independencia y se determinó que si existe infección significativa de *R. solani* en tallos con los aislamientos obtenidos durante una etapa de cultivo de papa ( $p=0.0371$ ) anexo Q.

### **Análisis de la expresión de infección en tallos de *Rhizoctonia solani* en las etapas de cultivo.**

Se analizó la expresión de infección de *Rhizoctonia solani* en tallos (figura 3.11 y 3.12), se observó que existe mayor probabilidad de infección con los aislamientos obtenidos en la etapa de floración, mientras que existe igual probabilidad de no infección con los aislamientos de siembra y floración.



**Figura 3.11:** Expresión de infección de los aislamientos obtenidos de *Rhizoctonia solani* en tallos.



**Figura 3.12:** Tallo infectados/no infectados con los aislamientos obtenidos de *R. solani* durante las etapas del cultivo de la papa.

## Análisis inferencial

Se determinó que existe mayor probabilidad estadística de presencia de infección con *R. solani* en la etapa de floración 22.58% y se evidencia una mayor probabilidad de ausencia de infección en la etapa de cosecha con un valor de 19.35% (tabla R.2 y R.3).

Además se comprobó que hay una probabilidad del 54.84% de que exista infección en tallos y de un 45.16 % de probabilidad de que no exista infección con los aislamientos obtenidos de *R. solani* de los suelos paperos de la provincia del Carchi (tabla R.4).

### 3.6.2 Infección en tubérculos

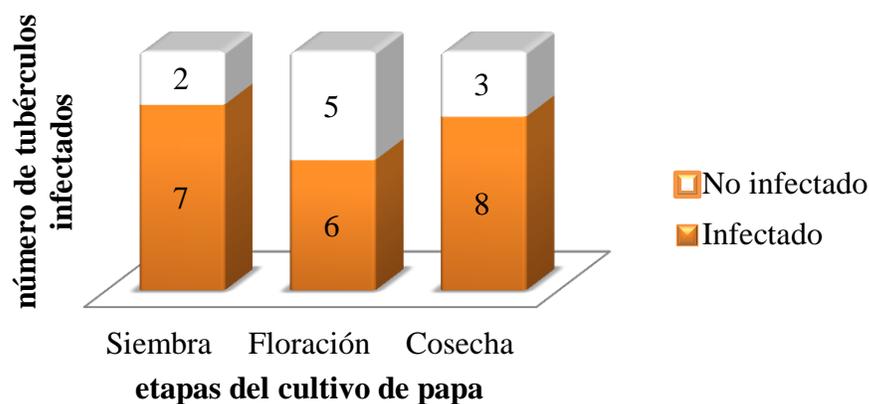
De los 31 aislamientos obtenidos de *Rhizoctonia solani*, 21 produjeron daños en los tubérculos con un intervalo de confianza del 90%, entre 53% al 82% (anexos S y T).

La mayoría de los tubérculos infectados presentaron formación de esclerocios en la superficie de los tubérculos (figura 3.13).



**Figura 3.13:** Tubérculo infectado con *Rhizoctonia solani*.

La infección en tubérculos realizada con los 31 aislamientos obtenidos en las diferentes etapas del cultivo de papa, determinó que existió un mayor número de tubérculos infectados con los aislamientos obtenidos en la etapa de cosecha, mientras que existió un mayor número de tubérculos no infectados con *R. solani* con los aislamientos obtenidos en la etapa de floración (figura 3.14).



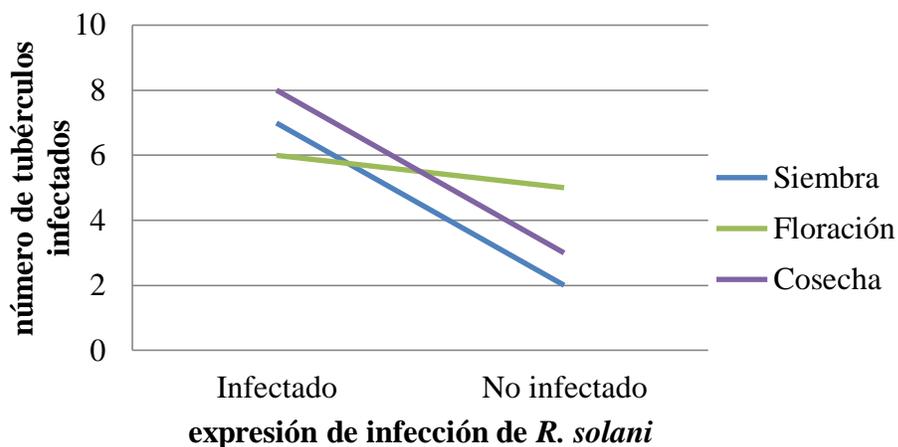
**Figura 3.14: Resultados de los tubérculos infectados/no infectados con los aislamientos obtenidos de *R. solani* en las diferentes etapas de siembra, floración y cosecha.**

### **Análisis inferencial**

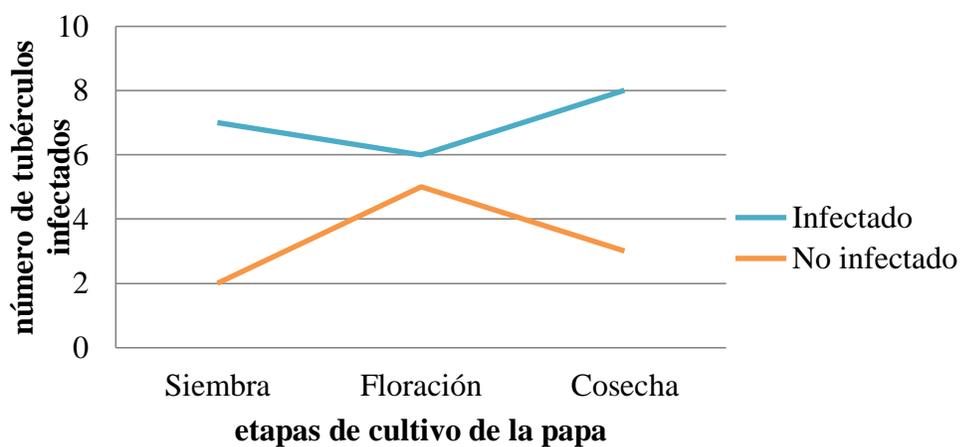
Para el análisis de los resultados de la capacidad de infección en tubérculos de *R. solani*, se realizó una prueba de hipótesis chi - cuadrado de independencia y se determinó que si existe infección significativa de *R. solani* en tubérculos con los aislamientos obtenidos durante una etapa de cultivo de papa ( $p=0.053$ ) como se evidencia en el anexo U.

### **Análisis de la expresión de infección en tubérculos de *Rhizoctonia solani* en las etapas de cultivo.**

Se analizó la expresión de infección de *Rhizoctonia solani* en tubérculos (figura 3.15 y 3.16), se observó que existe mayor probabilidad de infección con los aislamientos obtenidos en la etapa de cosecha, mientras que existe mayor probabilidad de no existir infección con los aislamientos de floración.



**Figura 3.15:** Expresión de infección de los aislamientos obtenidos de *Rhizoctonia solani* en tubérculos.



**Figura 3.16:** Tubérculos infectados/no infectados con los aislamientos obtenidos de *R. solani* durante las etapas de siembra, floración y cosecha.

### Análisis inferencial

Se determinó que existe mayor probabilidad estadística de presencia de infección en tubérculos con *R. solani* en la etapa de cosecha 25.81%, y que existe una mayor probabilidad de ausencia de infección en la etapa de floración con un valor de 16.13% (tabla V.2 y V.3).

Además se comprobó que hay una probabilidad del 67.74% de que exista infección en tubérculos y de un 32.36 % de probabilidad de que no exista infección con los aislamientos obtenidos de *R. solani* de los suelos paperos de la provincia del Carchi (tabla V.4).

## CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

### 4.1 Aislamiento de *Rhizoctonia solani* a partir de muestras de suelo

Al existir en la mayoría de suelos donde se cultiva papa una baja actividad microbiana, se acumula la materia orgánica a través de los años; los suelos de la provincia del Carchi es uno de estos casos (Pumisacho & Sherwood, 2002).

Los suelos por presentar altos contenidos de materia orgánica son sensibles al ataque de fitopatógenos como *Rhizoctonia solani*, el cual presenta cierto tipos de especies que pueden vivir alimentándose de ella. El hongo tiende a producir esclerocios que germinan con facilidad y le permiten permanecer viable por muchos años en el suelo (Fernández , 1979; Pumisacho & Sherwood, 2002).

Además *R. solani* tiene la capacidad de localizar diversos sustratos, característica de los parásitos facultativos que poseen vida saprofita, deben ser consideraras, ya que generalmente la emisión de estructuras infectivas del hongo (esclerocios y micelio vegetal) se da en las capas superficiales hacia el centro del surco (Pumisacho & Sherwood, 2002).

A pesar de que *Rhizoctonia solani* es un habitante natural del suelo, muchas veces la principal fuente de inóculo proviene de tubérculos infectados con la enfermedad, y esta se ve favorecida sobre todo cuando se presentan temperaturas húmedas y bajas en el suelo (Bayer, 2006).

Con el uso de medios de cultivo selectivos se logra el aislamiento y reproducción de *R. solani*. Su importancia radica en la composición, el medio al estar combinado con antibactericidas y antifungicidas reduce posibles interferencias de poblaciones de microorganismos no deseadas (Fernández, *et al.*, 2006).

El medio de cultivo PDA modificado por Castro que contenía concentraciones de 63 mg de metalaxyl y 50 mg de procloraz permite el crecimiento de *R. solani* e inhibe el crecimiento de bacterias y de algunas especies de hongos (Vargas, 2006).

En base al análisis estadístico realizado en la investigación se corroboró que en las muestras tomadas de los suelos paperos de la provincia del Carchi existe presencia

significativa ( $p=0.037$ ) de *Rhizoctonia solani*. Y que la presencia/ausencia del fitopatógeno depende de la etapa del cultivo siembra, floración y cosecha.

La probabilidad de presencia de *R. solani* en los aislamientos obtenidos en la provincia del Carchi es del 34%.

De las 90 muestras tomadas los resultados que se obtuvieron en el primer muestreo fueron 9 aislamientos, en el segundo 11 aislamientos y en el tercer muestreo 11 aislamientos de *R. solani*, demostrándose que el mayor número de aislamientos se observó en las etapas de floración y cosecha y el menor en siembra, sin embargo no se evidenció una diferencia estadística alta significativa entre etapas, esto se debe a que el fitopatógeno afecta la planta desde sus primeros estadios de desarrollo (Rodríguez, 2001).

#### **4.2 Caracterización macroscópica y microscópica de *R. solani***

Las características morfológicas y fenotípicas en todos los aislamientos obtenidos de suelos paperos de la provincia del Carchi corresponden a *R. solani*. Las hifas presentaron la clásica ramificación en ángulo recto, núcleos, ausencia de esporas, el micelio fue incoloro en estado juvenil y amarillo a café claro - marrón en estado maduro que tuvo crecimiento rastroso y esclerocios. Las características observadas coinciden con las señaladas para esta especie en estudios previos (Ogoshi, 1987 y Sneh *et al.*, 1991).

La caracterización de color, forma y tamaño del micelio y esclerocios concuerda con la descrita por Perdomo, *et al.*, (2007). Al evaluar el comportamiento de los 31 aislados de *R. solani* (intervalo de confianza del 90% entre 26% - 43%), todos produjeron esclerocios de forma rápida.

En los aislamientos obtenidos se encontraron diferencias morfológicas, en la coloración del micelio y de producción de esclerocios coincide con lo reportado por Giovannini, *et al.*, (2005), que menciona que es posible encontrar individuos morfológicamente distintos con claras diferencias morfológicas dentro de una población de *R. solani* localizada en un área determinada.

### **4.3 Caracterización molecular de *Rhizoctonia solani***

#### **4.3.1 Amplificación de fragmentos de DNA con primers ITS**

El análisis utilizando ITS es el que mejores resultados ha demostrado, corresponde con mayor fidelidad con los valores de anastomosis y la variabilidad detectada por este método ha sido la mayor. Es decir, el polimorfismo detectado en el rDNA - ITS permite una caracterización más precisa de los aislamientos de *Rhizoctonia solani* (Ogoshi, 1987).

Para la realización de la identificación molecular de los aislamientos obtenidos, el método se basa primeramente en la identidad de secuencias de rDNA de las regiones ITS que incluye la región codificante 5.8S del rRNA y las regiones intergénicas ITS 1 e ITS 4, que tienen una alta variación genética, han sido constantemente utilizadas en estudios filogenéticos y como soporte genético de la clasificación de *R. solani* en grupos anastomóticos y subgrupos (Woodhall, Lees, Edwards, & Jenkinson, 2007; Lehtonen, Ahvenniemi, Wilson, German, & Valkonen, 2008).

Gracias a la variabilidad presente en las regiones ITS de rDNA es posible identificar los distintos grupos anastomóticos.

#### **4.3.2 Amplificación de *Rhizoctonia solani* AG3**

Los resultados obtenidos coinciden con los reportados por (Anguiz & Martin, 1989), al confirmar la presencia de los AG 3 de *R. solani* en el cultivo de papa. En el presente estudio predominó la presencia del AG 3 en un 100%, estos valores confirman que la mayoría de los aislamientos de *R. solani* que afectan el cultivo de la papa pertenecen al AG 3, reportado por Carling & Leiner, (1986); Bandy, Leach, & Tavantzis, (1988) y Carling & Leiner, (1990).

En los aislamientos obtenidos de suelos paperos de la provincia del Carchi la presencia de los AG 3 en general fue consistente, esto se afirma con lo dicho por Chávez, *et al.*, (2011), los cuales dicen que en las localidades con suelos fríos con

altitudes entre 1500 y 3600 m.s.n.m, exceso de humedad y con lluvias severas se observa que hay gran cantidad de ataques con *R. solani* (AG 3).

En una zona del Perú productora de papa se obtuvieron aislamientos de AG 3 de localidades altas y frías y en las localidades más bajas y cálidas al AG 4 (Anguiz & Martin, 1989).

Según investigaciones efectuadas en México y Venezuela se determinó que de los 14 grupos anastomósicos dos tienen importancia para la papa, son el AG 3 y AG 4. Donde la frecuencia de ataque del AG 3 oscila entre el 70% y 90%, mientras que del grupo AG 4 oscila entre el 4% y 30% (Rosales, 2003).

Aunque en este trabajo sólo se identificó el grupo anastomósico (AG 3), en muchos estudios se han reportado otros grupos anastomósicos presentes en el cultivo de papa, como los grupo AG 5 y AG 2-2, identificados con diferentes frecuencias en campos paperos de Nueva Zelanda, Paquistán, Gran Bretaña y Turquía, entre otros (Woodhall, Lees, Edwards, & Jenkinson, 2007).

#### **4.4 Infección en tallos y tubérculos con aislamientos obtenidos de *R. solani***

En el análisis realizado en tallos como en tubérculos infectados se confirmó lo expuesto por Bayer (2006), según su estudio los síntomas que ocasiona la rizoctoniasis son: lesiones en los tallos de color rojizo a café que se convierten en costras y en los tubérculos la presencia de coscras sobre la superficie.

*R. solani* tiene la capacidad de causar daños importantes al tejido vegetal produciendo lesiones significativas en las raíces, el tallo y tubérculos. Wharton, *et al.*, (2004) creen que la mayoría de las infecciones ocurren durante las primeras etapas del desarrollo de la planta, ya que la resistencia a la infección de estolones y tallo se incrementa después de la emergencia del brote, limitando así la expansión de la infección.

Chávez, *et al.*, (2011) encontraron que *R. solani* posee una amplia variabilidad genética especialmente en el cultivo de papa, que se distingue por los diferentes tipos de

lesiones que pueden provocar en tallos y tubérculos y por la pronta respuesta de los esclerocios.

Durante la observación del proceso de infección no se observó infección en algunos tallos y tubérculos, podría deberse a la gran diversidad genética y versatilidad que presenta el fitopatógeno causante de rizoctoniasis. Carling & Leiner, (1990), observaron que en aislamientos del grupo AG – 3 hay cepas altamente patogénicas como no patogénicas. En la *R. solani* AG – 3 se encuentra una especie no patógena que es capaz de ejercer un control biológico sobre *R. solani* en el cultivo de papa (Shen & Ogoshi, 1998).

De acuerdo al análisis estadístico realizado con pruebas de chi - cuadrado de independencia se determinó que existe infección significativa en tallos ( $p=0.037$ ) y en tubérculos ( $p=0.053$ ) durante las etapas de siembra, floración y cosecha.

De los 31 aislamientos obtenidos de *R. solani*, se observó que 18 causaron infección en tallos (intervalo de confianza del 90% entre 43% - 76%) y 21 afectaron a tubérculos (intervalo de confianza del 90% entre 53% - 82%).

Se determinó que hay una mayor probabilidad de infección de los tallos con los aislamientos de *Rhizoctonia solani* obtenidos durante la floración, mientras que existe una mayor probabilidad de no infectarse con los aislamientos conseguidos en cosecha.

En cambio en los tubérculos se observó que existe mayor probabilidad de infección con los aislamientos obtenidos en cosecha y que hay mayor probabilidad de que no se dé la infección con los aislamientos de la floración.

En tallos se comprobó que hay un 54% de probabilidad de infección, mientras que en tubérculos existe un 67% de que ocurra la infección con los aislamientos obtenidos de *R. solani* de los suelos paperos de la provincia del Carchi durante la siembra, floración y cosecha.

## CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

- Los suelos paperos de la provincia de Carchi presentaron presencia significativa ( $p=0.037$ ) de *Rhizoctonia solani* en las tres etapas del cultivo de papa.
- Los aislamientos de *R. solani* se obtuvieron de muestras de suelo, durante la siembra, floración y cosecha; en campos con altitudes menores a los 3000 m.s.n.m.
- Los aislamientos realizados con palillos de dientes esterilizados permitieron el aislamiento de *R. solani*.
- La adición de antibióticos y fungicidas en medios de cultivo PDA modificado por Castro, redujo el crecimiento de otras especies de hongos y bacterias.
- La presencia o ausencia de *R. solani* depende de las etapas del cultivo siembra, floración y cosecha.
- La probabilidad de presencia de *R. solani* en los aislamientos obtenidos en la provincia del Carchi es del 34%.
- El mayor número de aislamientos del fitopatógeno se observó en las etapas de floración y cosecha y el menor en siembra.
- La presencia de *R. solani* y del AG-3 fue confirmada a través de una PCR, que analizó la región ITS del rDNA.
- La regiones ITS del rDNA permite una identificación satisfactoria de *R. solani* y los grupos anastomóticos AG.
- En sitios fríos con altitudes entre 1500 y 3600 m.s.n.m y con alta humedad el grupo anastomótico AG 3 de *R. solani* es el responsable de los ataques a los cultivos de papa.
- Se comprobó que en áreas frías localizadas a altitudes superiores a los 1500 m.s.n.m existe prevalencia del 100% del grupo AG 3.
- En las pruebas de infección realizadas con los 31 aislamientos obtenidos se determinó que existe infección significativa de *R. solani* en tallos ( $p=0.037$ ) y en tubérculos ( $p=0.053$ ) durante las etapas de siembra, floración y cosecha.

- Existe mayor probabilidad de infección de los tallos con los aislamientos de *Rhizoctonia solani* obtenidos durante la floración, mientras que existe una mayor probabilidad de infección de tubérculos con los aislamientos conseguidos en cosecha.
- En tallos se comprobó que hay un 54% de probabilidad de infección, mientras que en tubérculos existe un 67% de que ocurra la infección con los aislamientos obtenidos de *R. solani* de los suelos papeiros de la provincia del Carchi durante las diferentes etapas del cultivo de la papa.

## CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

- Secuenciar las muestras del DNA de *R. solani* obtenidas de los aislamientos realizados en los suelos paperos de la provincia del Carchi.
- Realizar alineamientos en bases de datos como el blast, con las secuencias conseguidas de *R. solani*.
- Elaborar árboles filogenéticos en base a los múltiples alineamientos.
- Aislar *R. solani* de suelos paperos de otras provincias productoras de papa en el Ecuador.

**CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA**

- Adams, G: Butler, E. (1979). Serological relationships among anastomos groups of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, 69, 629-633.
- Adams, P. (1990). The potencial of plant diseases. *Phytopathol*, 69-79.
- Agrios, G. (1995). Fitopatología. Trad por Manuel Gúzman (Segunda ed.). México: Limusa.
- Agrios, G. (1997). *Plant Pathology* (4° ed.). San Diego: Academic Press.
- Agrios, G. (2004). *Fitopatología* (2° ed.). México: Limusa.
- Allauca Saguno, S. M. (2004). Evaluación de 50 accesiones de *Solanum phureja* con resistencia a *Phytophthora infestans* y *Rhizoctonia solani* . Quito.
- Ames de Icochea, T. (1997). Enfermedades Fungosas y Bacterianas de Raíces y Tubérculos Andinos. Lima.
- Anderson, N. (1982). The Genetics and Pathology of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathol*, 329.347.
- Anguis, R., & Martin, C. (1990). Caracterizacion y Patogenicidad de *Rhizoctonia solani* Kühn, que afecta a la papa en tres zonas ecologicas del Perú. *Fitopatologia*(25), 16-22.
- Anguis, R., & Martin, C. (1989). Anastomosis group identity and virulence of *Rhizoctonia solani* isolates collected from potatoes in Perú. *Plant Disease*, 199-201.
- Araujo, R. (2006). Efecto *in vitro* de diferentes concentraciones de metribuzina y fenoxaprop p etil sobre el crecimiento de *Rhizoctonia solani*. Trujillo, México.
- Arauz , L. (1998). Fitopatología: Un enfoque agroecológico. Costa Rica.
- Ariza, N. (2003). Caracterización molecular y análisis de la variabilidad genética de aislamientos de *Rhizoctonia solani* Kühn, en cultivos de papa Cundinamarca y Nariño.
- Badillo, T., Castellanos, J., & Sánchez, G. (2001). Niveles de referencia de nitrógeno en tejido vegetal de papa variedad Alpha. *Agroicencias*, 615-623.
- Baigorri, G. (1989). Seed treatment for control of *Rhizoctonia solani* on soybean. *IV Conferencia Mundial de Investigación en soja*, (págs. 98-99).

- Bains, P., & Bisht, V. (1995). Anastomosis group identify and virulence of *Rhizoctonia solani* isolates collected from plants in Alberta, Canadá. *Plant Disease*, 79, 241-242.
- Baker, K. (1987). Evolving concepts of biological control of plants pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 67-85.
- Bandy, B., Leach, S., & Tavantziz, S. (1988). Anastomosis group 3 is the mayor cause of *Rhizoctonia solani* disease of potato in Maine. *Plant Disease*, 596-598.
- Basaúl, J. (2005). Determinacion de la virulencia de aislamientos de *Rhizoctonia solani* Kühn obtenido de micelio sobre plantas y de escrocios de tubérculo y papa (*Solanum Tuberosum L.*), y su relacion con la liberacion de ácido en medio líquido. *Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Escuela de Agronomia.*
- Bayer. (2006). Plagas en la papa: costra negra. *Bayer CropScience México.*
- Bazo, R. (27 de Octubre de 2013). *Cualo Percepción*. Obtenido de <http://cualopercepcion.com/i-4-35282>  
La\_semilla\_bendita\_...\_convertida\_en\_maldita\_por\_algunos\_\_humanos\_.html
- Bennett, Briggs, W., & M, T. (2011). Razonamiento estadístico. Mexico: Pearson Educacion.
- Bertini, L., Amicucci, A., Agostini, D., Polidori, E., Potenza, L., Guidi, C., & Stocchi, V. (1999). A new pair of primers designed for amplification of the ITS region in Tuber species. *FEMS Microbiology Letters*, 239-245.
- Binder, M., & Hibbett, D. (2003). Oligonucleotides. *AFTOL project.*
- Boidin, J. (1998). Taxonomie moleculaire des *Aphyllophorales*. *Mycotaxon*, 445-491.
- Borba, N. (2008). La papa un alimento basico. Posibles Impactos frente a la introduccion de papa transgénica. *RAP-AL.*
- Cádenas, M. (Mayo de 2012). *Consejos para cultivar tomates cherry*. Obtenido de <http://www.okdecoracion.com/3905/consejos-para-cultivar-tomates-cherry/>
- Carling, D. (1996). Grouping in *Rhizoctonia solani* by hyphal anastomosis reaction. En B. Sneh, H. Jabaji, S. Neate, & G. Dijist, *Rhizoctonia species Taxonomy Molecular Biology Ecology Pathology and disease control* (págs. 37-47). Netherlands.

- Carling, D., & Leiner, R. (1986). Isolation and characterization of *Rhizoctonia solani* and binucleate *R. solani* like fungi from aerial systems and subterranean organs of potato plants. *Phytopathol*, 725-729.
- Carling, D., & Leiner, R. (1990). Virulence of isolates of *Rhizoctonia solani* AG-3 collected from potato plants and soil. *Plant Disease*(74), 901-903.
- Carling, D., Kuninaga, S., & Brainard, K. (2002). Hyphal anastomosis reactions, rDNA-Internal Transcribed Spacer Sequences, and virulence levels among subsets of *Rhizoctonia solani* Anastomosis Group-2 (AG-2) and AG-BI. *Phytopathology*, 43-50.
- Carrero, C., García, P. L., Rojas, A., & Pino, H. (2011). Detección de *Rhizoctonia solani* en tejidos de papa mediante anticuerpos policlonales. *Interciencia*, 59-64.
- Carter, D., Archer K, B. D., & Shaw, D. S. (1991). ADN polymorphism in *Phyptora infestans* the UK experience. 272.
- Castellanos, G., Jara, C., & Mosquera, G. (2009). Guía práctica 9: Micelio de hongos. Producción de micelio en medio líquido para extracción de ADN. 9-15.
- Castellanos, G., Jara, C., & Mosquera, G. (s.f.). Enfermedad: Pudrición radical por *Rhizoctonia solani*. *CIAT*, 7-16.
- Castiblanco, N., Díaz, J., & Guerrero, O. (2003). Caracterización molecular y análisis polimorfo de aislamientos de *Rhizoctonia solani* Kühn, provenientes de cultivos de papa en Cundinamarca y Nariño. *CIA*.
- Castro, I., & Contreras, A. (2011). Manejo de plagas y enfermedades en el cultivo de la papa. *Fondo para la Innovacion Agraria (FIA)*, 72.
- Cedeño, L., Carrero, C., Quintero, K., Araujo, Y., Pino, H., & García, R. (2001). Identificación y virulencia de grupos de anastomosis de *Rhizoctonia solani* Kühn asociados con papa en Mérida, Venezuela. *Interciencia*, 296-300.
- Ceresini, P. (1999). *Rhizoctonia solani*. *Pathogen profile*, 728.
- Ceresini, P., Shew, H., Vigalys, R., & Cubeta, M. (2002). Genetic diversity of *Rhizoctonia solani* AG-3 from potato and tobacco in North Carolina. *Mycologia*(94), 437.
- Chavarro, E. (2011). Variabilidad genética y detección molecular de poblaciones del hongo *Rhizoctonia solani* en regiones colombianas productoras de papa. *Universidad de Colombia. Facultad de Agronomía*.

- Chávez, J., Hernández, F., Morales, G., & Rodríguez, R. (2011). Susceptibilidad al Pencycuron, de Grupos de Anastomosis de *Rhizoctonia solani* Kühn en ocho Regiones Paperas de México. *Revista Agraria*, 20-25.
- CIP. (1996). *Principales enfermedades, nematodos e insectos de la papa*. Lima.
- CIP. (2002). *Perspectiva del desarrollo de la papa*. Quito.
- Colombo, C., Second, G., & Charrier, A. (2000). Diversity within American cassava germ plasm based on RAPD merketts. *Genetics and Molecular Biology*, 189-199.
- Conabio. (2003). *Sistema de información de organismos vivos modificados*. 15-18.
- CONABIO. (2007). *Sistema de información de Organismos Vivos Modificados. CONABIO*, 5-15.
- CORPOICA. (2011). *Trichoderma koningiopsis Th003, alternativa biológica para el control de Rhizoctonia solani en el cultivo de papa*. Bogotá.
- Cortez, M., Rodríguez, C., Martínez, J., & Macías, C. (2005). ecnología de producción y manejo de la mosca blanca de la hoja plateada en el cultivo de la soya en el norte de Sinalo. *INIFAP-CIRNO*, 52.
- Cotes. (2011). *Biología y manejo de Rhizoctonia solani. Laboratorio de control Biologico. Centro de Biotecnología y Bioindustria (CBB), CORPOICA. AA.*
- Cotes, A. M. (2006). *Biología y manejo de R. solani. CORPOICA*, 1-7.
- Cotes, A., Cárdenas, A., & Pinzón, H. (2001). Effect of seed priming in the presence of *Trichoderma koningiion* seed and seedling disease induced in tomato by *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* sp. Lycopersici. *IOBC Bulletin*, 259-263.
- Creative Commons 3.0. (2012). *NeuroWipia*. Obtenido de <http://neurowikia.es/content/diagn%C3%B3stico-anatomopatol%C3%B3gico-y-t%C3%A9cnicas-de-biolog%C3%AD-molecular-en-tumores-primarios-del-sn>
- Cubeta, M., & Vilgalys, R. (1997). Population Biology of the *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, 480-484.
- Dale, W., & Schantz, M. (2007). From genes to genomes concepts and aplicaciones of DNA technology. 32-36.
- De la Cruz, E. (2010). *Manual de micología agrícola*. Chapingo, México.

- Di Rienzo, J., Casanoves, F., Balzarini, M., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. (2011). *Infostat version 2011. Grupo Infostat. FCA*. Obtenido de [www.infostat.com.ar](http://www.infostat.com.ar)
- Díaz, A. (2009). *Diseño estadístico de experimentos*. Antioquia: Universidad de Antioquia.
- Domsch, K., Gams, W., & Anderson, T. (1980). *Compendium of soil fungi* (Vol. 1). New York: Academic Press.
- Dreamstime. (2000). *dreamstime*. Obtenido de <http://es.dreamstime.com/foto-de-archivo-libre-de-regal%C3%ADas-jard%C3%ADn-bot%C3%A1nico-plantas-de-la-orqu%C3%ADea-image23941005>
- Echeverría. (2006). Caracterización biológica y molecular de aislamientos del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin. *Instituto de Costa Rica. Escuela de Biología. Centro de Investigación en Biotecnología (CIB). Centro de Investigaciones en café (CICAFE)*.
- Escalona, Y., Rodríguez, D., & Hernández, A. (2011). Estudio de *Rhizoctonia solani* Kühn aislado de papa (*Solanum tuberosum* L.) en Mérida, Trujillo, Táchira y Lara. Caracterización cultural. *Bioagro*, 23(3), 161-168.
- Escalona, Y., Rodríguez, D., & Hernández, A. (2012). Estudio de *Rhizoctonia solani* Kühn aislado de papa (*Solanum tuberosum*) en los estados Táchira, Mérida, Trujillo y Lara. Virulencia y caracterización molecular. *Bioagro*, 13-22.
- Espinal, C., & et al. (2006). La cadena de la papa en Colombia. Colombia.
- Estrada, N. (2000). *La biodiversidad en el mejoramiento genético de la papa*. La Paz: Centro de Información para el Desarrollo- CID.
- Fagro. (2008). Manejo del cultivo de la papa. *Horticultura*, 20-24.
- Farmex. (2013). Propuesta Farmex para el cultivo de papa. *Farmex*, 3-36.
- FEDEPAPA. (2012). Plagas y enfermedades de la papa. *Revista Papa*.
- Fernández, L., Rojas, N., Roldán, T., Ramírez, M., Zegarra, H., & Uribe, R. (2006). *Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados*. México: INE.
- Fernández, M. (1979). *Volumen VI: Hongos y Micoplasmas*. Buenos Aires: Colección Científica del Inta.

- Fernández. (2011). Identificación molecular de grupos anastomóticos de *Rhizoctonia solani* asociados a la costra negra y cancro del tallo en el cultivo de papa en Sinaloa. *Instituto Politecnico Nacional*.
- Flores, R., Naranjo, H., Galarraga, J., & Maria Paz Sanchez, S. V. (2012). Estudio de la demanda de semilla de papa de calidad en Ecuador. *OFIAGRO. Centro Internacional de la papa Quito*, 246.
- Frank, J. A. (1981). *Rhizoctonia* Canker (Black scurf). *Compendium of Potato Diseases*, 52.54.
- Garcés de Granada, E., Orozco, M., & Arbeláez, G. (2003). Utilización de microorganismos del suelo para el control de enfermedades de plantas. 1-26.
- Garcés de Granada, E., Orozco, M., & Zapata, A. (1999). Fitopatología en flores. *Acta Biológica Colombia*, 5-27.
- García, R., García, A., & Garnica, C. (2002). Distribución, incidencias y alternativas de control de *Rhizoctonia solani* en el cultivo de papa en el estado Mérida, Venezuela. *Latinoamericana de la papa*, 24-40.
- Giovannini, Andrade, N., Valenzuela, E., Castro, I., & Contreras, A. (2005). Caracterización morfológica y patogénica de *Rhizoctonia solani* Kühn a partir de tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) provenientes de diferentes predios de la x región de Chile. *Idesia*, 13-18.
- González. (2008). Aspectos de sistematica y biología del complejo *Rhizoctonia*. *Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal*, 12(3).
- González, D. (2002). Estado actual de la taxonomía de *Rhizoctonia solani* Kühn. *Revista mexicana de Fitopatología*, 20, 200-205.
- González, F. (16 de Febrero de 2010). *Iglesiendo: El trigo y la cizaña*. Obtenido de <http://iglesiando.com/2010/02/16/el-trigo-y-la-cizana/>
- González, V., Portal, M., & Rubio, V. (2006). Review. Biology and systematics of the form Genus *Rhizoctonia*. *Spanish Journal*, 55-70.
- Guillermo. (5 de Mayo de 2014). *Micrrespuestas*. Obtenido de <http://microrespuestas.com/cual-es-la-planta-del-arroz>
- Handerson, D. (2010). *Rhizoctonia solani*. Problemas en transplantes y plantas.
- Harman, G., Howell, C., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 43-56.

- Hawkes, J. (s.f.). Biosystematics of the potato. The potato crop. *The scientific basic for improvement*, 15-69.
- Henson, J., & French, R. (1993). The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Phytopathol*, 31, 81-109.
- Herrera, F., Gómez, L., Corzo, E., & Cerón, M. (2001). Producción y almacenamiento artesanal de semilla de papa. *Corpoica Regional Uno*, 1-10.
- Hofman, T., & Jongebloed, P. (1998). Infection process of *Rhizoctonia solani* on *Solanum tuberosum* and effects of granular nematicidas. *Neth. J. Pl. Path*, 94, 243-252.
- InmoMundo. (19 de Mayo de 2014). *Mapa de carreteras de Carchi*. Obtenido de <http://www.zonu.com/America-del-Sur/Ecuador/Carchi/Carreteras.html>
- Insua, A., López, M., Freire, R., & Méndez, J. (2003). *Sequence analysis in the ribosomal DNA internal transcribed spacer region in some scallop species*. Espña: Genome.
- Jager, G., & Velvis, H. (1988). Inactivation of sclerotia of *Rhizoctonia solani* on potato tubers by *Verticilium biguttatum*, a soil-borne mycoparasite. *PL Path*, 94(5), 225.
- Johnk, J., & Jones, R. (1993). Differentiation of Population of AG-2-2 of *Rhizoctonia solani* by Analysis of Fatty Acids. *Phytopathology*, 278-283.
- Laroche, J., Jabaji, P., & Charest, P. (1992). Differentiation of Two Anastomosis Groups of *Rhizoctonia solani* by Isozyme Analysis. *Phytopathology*, 1387-1393.
- Lees, A., Cullen, D., Sullivan, W., & Nicolson, M. (2002). Development of conventional and quantitative real-time PCR assays for the detection and identification of *Rhizoctonia solani* AG-3 in potato and soil. *Plant Pathology*, 293-302.
- Lehtonen, M., Ahvenniemi, P., Wilson, M., German, K., & Valkonen, J. (2008). Biological diversity of *Rhizoctonia solani* (AG-3) in a northern potato-cultivation environment in Finland. *Plant Pathology*, 141-151.
- Liu, Z., & Sinclair, J. (1993). Differentiation of Intraspecific Groups Within Anastomosis Group I of *Rhizoctonia solani* Using Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer and Isozyme Analysis. *Plant pathol*, 376-382.
- Liu, Z., Sinclair, J., & Chen, W. (1992). Genetic diversity of *Rhizoctonia solani* anastomosis group 2. *Phytopatology*, 778-787.
- López, A. (5 de Mayo de 2013). *UPtoDown*. Obtenido de <http://infostat.uptodown.com/>

- Macnish, G., Carling, D., & Braunard, K. (1993). Characterization of *Rhizoctonia solani* AG-8 from Bare Patches by Pectic Isozyme (Zymogram) and Anastomosis Techniques. *Phytopathology*, 922-927.
- Manuel, Pumisacho; Sherwood, Stephen. (2002). *El cultivo de la papa en el Ecuador* (INIAP, CIP ed.). Abya Yala.
- Martin, c; Torres, H. (September de 1987). Control of *Rhizoctonia* and another soil-borne diseases of TPS. *Fungal Diseases of the potato. Report of Planning Conference of fungal diseases of the potato.*
- Martínez, S., & Soto, C. (1993). Extracción de ADN hongos. *Revista Colombiana de Química*, 79-82.
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. (2004). Acuerdo de competitividad de la cadena agroalimentaria de la papa. Boyacá, Colombia.
- Molina, J., & Rodrigo, M. (2010). Estadística descriptiva en Psicología.
- Monteros, C. D. (2011). Estudio de mercado para caracterizar y cuantificar la demanda de papas nativas en diferentes segmentos de mercado de Quito. *Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Programa Nacional de Raíces y tuberculos.*
- Montesdeoca, F., Panchi, N., Navarrete, I., Pallo, E., Yumisaca, F., Taipe, A., & Espinoza, S. (2013). *Guía fotográfica de las principales plagas del cultivo de papa en Ecuador. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Centro Internacional de la Papa (CIP), Consorcio de Productores de Papa (CONPAPA).* Quito: McKnight Foundation.
- Mordue, J., Currah, R., & Bridge, P. (1989). An Integrated Approach to *Rhizoctonia* Taxonomy: Cultural, Biochemical and Numerical Techniques. *Micological Research*, 78-90.
- Moreira, F., & Huisling, J. (2012). *Manual de Biología de Suelos Tropicales. Muestreo y caracterización de la biodiversidad bajo suelo.* Mexico D.F: Bignell .
- Mosquera, A., Bayman, P., & Otero, T. (2010). *Ceratobasidium* como hongo micorrizico de orquideas en Colombia. *Open Journal System. Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Ciencias Biologicas.*
- MP. (2000). En T. A. Society, *Plagas y Enfermedades del Tomate* (págs. 20-22). Madrid: Mundi Prensa.

- MSc. Pavone, D. (Marzo de 2012). Biocontrol de *Rhizoctonia solani* Kühn por *Trichoderma* spp. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias. Postgrado en Biología Celular.
- Muñoz, A. (2002). *Cepvi.com. Psicología, Medicina, Salud y Terapias alternativas*. Obtenido de <http://www.cepvi.com/medicina/plantas/lino.shtml#.U5yFC3afvgs>
- Nanodrop 8000 Spectrophotometer. (2008). *V2.0 User's Manual*.
- Nolberto, V., & Ponce, M. (2001). Estadística Inferencial Aplicada. Lima.
- Ñústez, C. (2002). Efecto de diferentes niveles de inóculo de *Rhizoctonia solani* en semilla y dos sistemas de manejo, sobre el rendimiento y sanidad del tubérculo cosechado. *CORPOICA*.
- Ochoa, D. (2008). Caracterización Molecular de 60 hongos que forman parte del cepario micológico del C.B.C.M DE LA Universidad Particular de Loja. *Universidad Técnica Particular de Loja. Escuela de Bioquímica y Farmacia*.
- Ogoshi, A. (1987). Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. *Phytopathol*, 125-143.
- Ogoshi, A. (1995). Pathogenicity and host specificity in *Rhizoctonia solani*. *Kohomoto*, 2.
- Orozco, C., Osorio, C., Botero, M., Rivera, F., & López, G. (2011). Evaluación microbiológica y molecular de *Moniliophthora perniciosa*.
- Parmeter, J., Sherwood, R., & Platt, W. (1969). Anastomosis groups among isolates of *Thanatephorus cucumeris*. *Phytopathology*, 1270-1278.
- Paulitz; Schroeder; 2005 modificado por Koch, Albán & Fuentes, 2013. A New Method for the quantification of *Rhizoctonia solani* and *R. oryzae* from soil. *The American Phytopathological*, 767-771.
- Perdomo, R., Hernández, A., González, A., Pineda, J., & Alezones, J. (2007). Caracterización y evaluación de virulencia en aislados de *Rhizoctonia solani* Kühn causante de la mancha bandeada del Maíz. *Interciencia*, 48-55.
- Pérez, L. (2012). *Paquete tecnológico para la producción de papa (Solanum tuberosum L) bajo sistema de riego en el valle de Perote, Veracruz*. Veracruz.
- Pérez, L., Castillo, J., & Cantu, F. (2001). Efectividad biológica de TCMTB para el control de la costa negra *Rhizoctonia solani* Kühn de la papa *Solanum tuberosum L*. en la Region de Leon, Guanajuato, Mexico. 16-21.

- Pfenning. (1997). Soil and rhizosphere microfungi from Brazilian tropical forest ecosystems. *biodiversity of tropical microfungi*, 341-365.
- Prado, G., Correa, F., Aricapa, M., & Escobar, F. (2001). Caracterización preliminar de la resistencia de germoplasma de arroz al añublo de la vaina (*Rhizoctonia solani*). *Foro Arroceros Latinoamericano*, 8-11.
- Proyecto "Environmental Radionuclides as Indicators of Land Degradation in Latin American, Caribbean and Antarctic Ecosystems". (2009).
- Pumisacho, M., & Sherwood, S. (2002). *El cultivo de la papa en el Ecuador*. Quito: INIAP - CIP.
- Quilmes, U. N. (14 de Enero de 2014). Obtenido de Introducción a la Biología Celular y Molecular : [ibcmunq.files.wordpress.com/2010/03/tp5.pdf](http://ibcmunq.files.wordpress.com/2010/03/tp5.pdf)
- Reinoso. (2011). *El cultivo de la papa y su participación en la economía ecuatoriana*. EESC, PRNT-Papa.
- Rivero, V. (2005). Herramientas agrícolas del Perú antiguo. *Calendario agrícola del Inca*.
- Robles, J., Koreen, L., Park, S., & Perlin, D. (2004). Multilocus sequence typing is a reliable alternative method to DNA fingerprinting among strains of *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 2480-2488.
- Rodríguez, B. (2001). Generalidades del Cultivo de papa en Colombia. *Federación de productores de papa*.
- Romero, M., Ramírez, A. P., & Ubaque, H. F. (2003). Producción Ecológica Certificada de Hortalizas de Clima Frio. Bogotá.
- Rosaima, G., García, A., & Garnica, C. (2002). Distribución, Incidencia y Alternativas de Control de *Rhizoctonia solani* en el Cultivo de Papa en el Estado Mérida, Venezuela. *Revista Latinoamericana de la Papa*, 24-40.
- Rosales, M. (2003). *Evaluación de preparados granulados en el control de Rhizoctonia solani en el cultivo de la papa (Solanum tuberosum L.) variedad atlántica en la ladera Xecoil Santa Apolonia, Chimaltenango*. Guatemala.
- Rouselle, P., Robert, Y., & Cronier, J. (1999). *La patata: producción y mejora, plagas y enfermedades*. México: Mundi-Prensa México.
- Salazar, L. (1995). *Los virus de la papa y su control*. Lima: Centro Internacional de la papa.

- Sánchez, V. (2011). *Diccionario de especialidades agroquímicas* (5° ed.). Perú.
- Shen, B., & Ogoshi, A. (1998). Identificación de *Rhizoctonia* Species. *APS press*, 135.
- SICA - MAG, O. (2013). El cultivo de la papa en el Ecuador y planes de mejora. Quito, Pichincha, Ecuador.
- Sifuentes, E., Macías, J., Apodaca, M., & Mondaca, E. (2010). Predicción de la fenología de papa. Principios y aplicaciones prácticas. *Sinaloa*, 4-10.
- Sneh, B., Burpee, L., & Ogoshi, A. (1991). Identification of *Rhizoctonia* spp. *The American Phytopathological*, 133.
- Sneh, B., Burpee, L., & Ogoshi, A. (1998). *Identification of Rhizoctonia Species*. Minnesota: APS Press.
- Solé, M. (2002). Caracterización morfológica y molecular de hongos queratinofílicos: el orden Onygenales.
- Spiegel, M., & Stephens, L. (2001). *Estadística*. México: McGraw-Hill.
- SQM. (Miércoles de Mayo de 2014). *SQM*. Obtenido de <http://www.sqm.com/es-es/productos/nutricionvegetaldeespecialidad/cultivos/papa.aspx#tabs-6>
- Stoorn. (3 de Febrero de 2013). *Ciencia al día*. Obtenido de <http://cienciaaldia.com/2013/02/las-plantas-pueden-ser-altruistas/>
- Suquilanda, M. (2013). La producción orgánica de la papa.
- Suvi, T. (2005). Ectomycorrhizal fungal diversity of birch in Tagamoisa wooded meadow and the adjacent forest.
- Tejera, H. (Junio de 2012). *Cámara Nacional de la Alimentación*. Obtenido de [http://www.muval.com.uy/1\\_museo\\_papas.htm](http://www.muval.com.uy/1_museo_papas.htm)
- Todd, C. (september de 2009). *Rhizoctonia* disease on potatoes: The effect of anastomosis groups, fungicides and zonc on disease.
- Torres, H. (2002). Manual de enfermedades más importante del Perú. Perú.
- Torres, H. (2005.). Principales Enfermedades Fungosas de la papa relacionadas con la producción de Tubérculos Semilla. *Manual de Capacitación*, 8-9.
- Tovar, J. (2008). Evaluación de la capacidad antagonista "In vitro" de aislamientos de *Trichoderma* spp frente al hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani*. *Pontificia*

*Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Carrera de Microbiología Agrícola.*

- Trujillo, E., Cavin, C., & Aragaki, M. (1987). Ethanol - Potassium Nitrate Medium for Enumerating *Rhizoctonia solani* - like fungi from soil. *Plant Disease* , 1098-1100.
- Tsor, L; Barak, R; Sneb, B. (2001). Biological control of Black scurf on potato under organic management. *Crop Protection*, 20, 145-150.
- Valadez, E., & Kahl, G. (2000). Huellas de ADN en genomas de plantas (Teoría y protocolos de laboratorio). 141.
- Van Den Boogert, P. (1993). *The ecology of Verticillium biguttatum its significance for the population dynamics of Rhizoctonia solani in potato*. Wageningen.
- Vargas, F. (2006). Caracterización del antagonismo a *Rhizoctonia solani* Kühn en suelos papeiros del Ecuador. *Universidad Central del Ecuador. Facultad de Ciencias Agrícolas*. .
- Vilgalys, R., & Cubeta, M. (1994). Molecular Systematics and Population Biology of *Rhizoctonia*. *Annual Review of Phytopathology*, 135-155.
- Villalobos, A., Escobal, M., & Santerre, A. (2005). Extracción de DNA y amplificación de secuencias de ITS en psilocybe (agaricales, fungi). *Avances en la Investigación Científica en el CUCBA.*, 548-553.
- Walpole, E., Raymond, H., Myers, S., & Keying, Y. (2007). Probabilidad y estadística para Ingeniería y Ciencias. Mexico: Pearson Education.
- Wharton, P., Kirk, W., Berry, D., & Snapp, S. (2004). Potato Disease. *Phytopathology*. Obtenido de [www.potatodiseases.com](http://www.potatodiseases.com)
- White, T., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. In *PCR Protocols : A guide to Methods and Applications*. San Diego: Academic Press.
- Whitley, E., & Ball, J. (2002). Statics review 2 : Samples and populations. *Critical Care*, 6, 8.
- Woodhall, J., Lees, A., Edwards, S., & Jenkinson, P. (2007). Characterization of *Rhizoctonia solani* from potato in Great Britain. *Plant Pathology*, 286-295.
- Yildiz, A., & Timur, M. (2002). Anastomosis group determination of *Rhizoctonia solani* Kühn (Teleomorfh: *Thanatephorus cucumers*) isolates from tomatoes grown in

Aydin, Turkey and their disease reaction on various tomato cultivars. *Phytopathology*(150), 526-528.

Zapata, J. (2000). Manejo integrado de las enfermedades de la papa. Manejo integrado del cultivo de la papa. Manual Técnico. *Corpoica - Regional Uno*, 130-141.

Zarka, A. (1965). Studies on *Rhizoctonia solani* Kühn, the cause of the black scurf disease of potato. 78.

Zetroc. (29 de Junio de 2007). *Jardineria.pro*. Obtenido de <http://www.jardineria.pro/varios/fichas/tulipan/#.U5yDoXafvgs>