

**ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA  
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**ESTUDIO DE SUPRESIÓN A *Phytophthora infestans*  
(Mont.) de Bary POR POBLACIONES MICROBIANAS  
AISLADAS DE SUELOS PAPEROS DE LA PROVINCIA DE  
CHIMBORAZO EN DOS DIFERENTES TIEMPOS DE  
MUESTREO**

**PREVIA A LA OBTENCIÓN DE GRADO ACADÉMICO O TÍTULO  
DE: INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

.....

**ELABORADO POR:**

**DIANA CAROLINA MOGROVEJO ARIAS**

**SANGOLQUI, NOVIEMBRE DE 2010**

# INDICE DE CONTENIDOS

CONTENIDO	PAGINA
<b>Capítulo 1. Introducción</b>	6
1.1 Formulación del problema	6
1.2 Justificación e importancia	8
1.3 Objetivos	10
1.3.1 Objetivo general	10
1.3.2 Objetivos específicos	10
1.4 Marco teórico	11
1.4.1 Características generales del oomiceto <i>Phytophthora infestans</i>	11
1.4.1.1 Taxonomía, origen, distribución, e importancia	11
1.4.1.2 Morfología y ciclo de vida	12
1.4.2 Características generales del tizón tardío	14
1.4.2.1 Mecanismos de control	15
1.4.3 Características generales de suelos supresores	17
1.4.3.1 Definición, características y tipos de supresividad	17
1.4.3.2 Factores abióticos involucrados en la supresividad a <i>Phytophthora infestans</i>	19
1.4.3.3 Factores bióticos involucrados en la supresividad a <i>Phytophthora infestans</i>	20
1.4.3.4 Microorganismos formadores de esporas	21
1.4.3.5 Caracterización de poblaciones microbianas de los suelos	23
1.5 Hipótesis	25
<b>Capítulos 2. Materiales y métodos</b>	26
2.1 Participantes	26
2.2 Zona de estudio	26
2.3 Periodo de investigación	26
2.4 Recolección de muestras de suelo	27
2.5 Estimación de la incidencia de infección de tubérculos de papa con <i>P. infestans</i> .	28
2.6 Preparación y mantenimiento del inóculo de <i>Phytophthora</i> <i>infestans</i> y <i>Rhizoctonia solani</i>	29
2.7 Ensayo 1: Efectos del suelo sobre la capacidad del patógeno para infectar tubérculos	30
2.8 Ensayo 2: Efecto del suelo sobre los esporangios	31
2.9 Ensayo 3: Prueba de patogenicidad	32

2.10 Aislamiento, selección y pruebas de antagonismos de colonias formadoras de esporas	33
2.11 Caracterización molecular de las colonias formadoras de esporas	34
2.12 Análisis de datos	35

<b>CONTENIDO</b>	<b>PAGINA</b>
<b>Capítulo 3. Resultados</b>	37
3.1 Análisis de suelo	37
3.2 Estimación de la incidencia de infección de tubérculos de papa con <i>P. infestans</i> .	37
3.3 Ensayo 1: Efectos del suelo sobre la capacidad del patógeno para infectar tubérculos	39
3.4 Ensayo 2: Efecto del suelo sobre los esporangios	41
3.5 Ensayo 3: Prueba de patogenicidad	45
3.6 Aislamiento, selección y pruebas de antagonismos de colonias formadoras de esporas	52
3.7 Caracterización molecular de las colonias formadoras de esporas	56
<b>Capítulo 4. Discusión</b>	58
4.1 Análisis de suelo	58
4.2 Estimación de la incidencia de infección de tubérculos de papa con <i>P. infestans</i> .	60
4.3 Ensayo 1: Efectos del suelo sobre la capacidad del patógeno para infectar tubérculos	60
4.4 Ensayo 2: Efecto del suelo sobre los esporangios	62
4.5 Ensayo 3: Prueba de patogenicidad	64
4.6 Aislamiento, selección y pruebas de antagonismos de colonias formadoras de esporas	65
4.7 Caracterización molecular de las colonias formadoras de esporas	66
<b>Capítulo 5. Conclusiones</b>	69
<b>Capítulo 6. Recomendaciones</b>	71
<b>Capítulo 7. Bibliografía</b>	72
<b>Capítulo 8. Anexos</b>	87
Anexo A. Interpretación de resultados de análisis de suelo	87
Anexo B. Protocolo de extracción de DNA de bacterias y hongos	88
Anexo C. Protocolo de reacción en cadena de la polimerasa para el gen 16S	89
Anexo D. Colonias aisladas del tiempo 1 y sus resultados de las pruebas de inhibición	90
Anexo E. Colonias aisladas del tiempo 2 y sus resultados de las pruebas de inhibición	92

## INDICE DE TABLAS

<b>TABLA</b>	<b>PAGINA</b>
Tabla 2.1 Escala de evaluación para las pruebas de antagonismo	34
Tabla 3.1 Análisis físico químico de suelos de la provincia de Chimborazo, campo Pisicaz (a) y Pusniag (b), de ambos tiempos de muestreo	38
Tabla 3.2 Características de las colonias del tiempo 1 con capacidad de supresión a <i>P. infestans</i> seleccionadas para el análisis ARDRA	44
Tabla 3.3 Características de las colonias del tiempo 2 con capacidad de supresión a <i>P. infestans</i> seleccionadas para el análisis ARDRA	55

## INDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA</b>	<b>PAGINA</b>
Fig. 1.1 Ciclo de vida de <i>Phytophthora infestans</i>	14
Fig. 3.1 Variación en el porcentaje de infección de rodajas de papa de acuerdo al día de evaluación para el campo Pisicaz	40
Fig. 3.2 Comparación del porcentaje de infección de rodajas de papa de acuerdo a la condición del suelo para el campo Pisicaz	41
Fig. 3.3 Variación en el porcentaje de infección de rodajas de papa de acuerdo al día de evaluación para el campo Pusniag	42
Fig. 3.4 Comparación del porcentaje de infección de rodajas de papa de acuerdo a la condición del suelo para el campo Pusniag	43
Fig. 3.5 Esporangio germinado, latente y lisado de <i>P. infestans</i> observados bajo luz UV	44
Fig. 3.6 Porcentaje de esporangios germinados, latentes, lisados, Ensayo 2, campo Pisicaz	45
Fig. 3.7 Porcentaje de esporangios germinados, latentes, lisados, Ensayo 2, campo Pusniag	46
Fig. 3.8 Variación en el porcentaje de infección de rodajas de papa de acuerdo al día de evaluación para el campo Pisicaz	48
Fig. 3.9 Comparación del porcentaje de infección de rodajas de papa de acuerdo a la condición del suelo para el campo Pisicaz	49
Fig. 3.10 Variación en el porcentaje de infección de rodajas de papa de acuerdo al día de evaluación para el campo Pusniag	51
Fig. 3.11 Comparación del porcentaje de infección de rodajas de papa de acuerdo a la condición del suelo para el campo Pusniag	42
Fig. 3.12 Agrupación de las colonias de microorganismos formadores de esporas aisladas de ambos campos y tiempos de muestreo	57

# CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Formulación del Problema

Los oomicetos, en particular el género *Phytophthora*, comprenden gran cantidad de patógenos eucariotas destructores de plantas y son por tanto los responsables de muchas de las enfermedades más devastadoras a nivel mundial (Erwin *et al.*, 1995). Estas enfermedades no son solo difíciles de manejar sino que también causan enormes pérdidas económicas a cultivos de suma importancia como la papa, el tomate o la soya. Estos patógenos tienen una destacada habilidad para manipular bioquímica, fisiológica y morfológicamente diversos procesos en sus plantas huésped (Gajendran *et al.*, 2006).

El tizón tardío o “lancha” es la más famosa, quizás la más estudiada y aún hoy la más destructiva e importante enfermedad de la papa (*Solanum tuberosum*) a nivel mundial (Erwin *et al.*, 1995). Es causada por el oomiceto *Phytophthora infestans* y es particularmente importante en cultivos con mucha humedad a moderadas temperaturas. La enfermedad es una amenaza constante para la producción de papa en los países en vías de desarrollo y es responsable de la gran cantidad de fungicidas y compuestos químicos que se aplican anualmente en los cultivos (Trout *et al.*, 1997). El tizón tardío ha sido reportado también en otros cultivos de Solanáceas (Jones, 1998; Bernal y Ochoa, 2003) como el tomate (*Solanum lycopersicum*) y la naranjilla (*Solanum quitoense*).

Todas las partes de la planta de papa son susceptibles (Erwin *et al.*, 1995). Una lesión individual en las hojas puede derivar en la destrucción masiva de toda la planta. La infección en los tubérculos es inicialmente superficial pero eventualmente se extiende algunos centímetros dentro del tubérculo. Las lesiones de las hojas y tubérculos son castañas rojizas, secas y granuladas. Estas lesiones favorecen el ingreso de otros microorganismos como hongos del género *Fusarium* (Jaramillo, 2003).

La producción de papa en el Ecuador se encuentra concentrada casi exclusivamente entre los 2800 y 3400 msnm, en las provincias del centro-norte del país, en donde predominan los suelos conocidos como Andisoles que son fértiles y adecuados para el cultivo debido a la gran cantidad de ceniza que contienen (Garzón, 1999). En Ecuador no se reportan pérdidas debidas a *P. infestans* en los tubérculos de papa. Este hecho permite presumir que as zonas productoras de papa en el Ecuador tienen suelos supresivos que no permiten que la parte subterránea de la planta se afecte. Garzón (1999) reportó que seis suelos andinos tenían propiedades supresivas sobre *P. infestans* y que esta supresión se debía tanto a factores biológicos como a factores físico-químicos de los suelos. Sin embargo, otros estudios indican que si bien los factores abióticos son importantes, participan también en la supresión los microorganismos que habitan los suelos (Castillo, 2004 y Lozoya-Saldaña *et al.*, 2006).

Los organismos fitopatógenos como *P. infestans*, generan grandes pérdidas económicas cuando atacan al follaje, tallos y/o raíces de una amplia variedad de cultivos (Andrison, 1995). Para prevenir y controlar las enfermedades, los agricultores aplican compuestos químicos que inhiben el crecimiento de dichos organismos, lo cual significa un costo permanente para

los productores así como también una elevada contaminación al ambiente. Por tal razón, es necesario el uso de estrategias alternativas para el manejo de las enfermedades, de manera que se vean reducidos tanto los costos de producción como los daños al medio ambiente (Martínez y Osorio, 2007).

En la actualidad, el control biológico de patógenos se conoce como una alternativa al manejo químico, el mismo que genera muchos problemas ambientales y, por lo tanto, ha disminuido su efectividad, aumentando la resistencia de los patógenos a este tipo de tratamiento (Venegas, 2006). Entre las estrategias alternativas se encuentra el uso de microorganismos antagonistas como agentes de control biológico. Es decir, se utilizan microorganismos que inhiben el crecimiento o minimizan los efectos de los patógenos cuando infectan a los cultivos. Los agentes de control biológico pueden a menudo aislarse desde suelos en donde la enfermedad es reducida o escasa, llamados suelos supresivos. La supresión y el antagonismo de algunos patógenos se ha estudiado ampliamente y se puede mencionar por ejemplo, el antagonismo a *P. infestans* por bacterias de los géneros *Burkholderia*, *Streptomyces* y *Pseudomonas* y hongos del género *Trichoderma* (Lozoya-Saldaña *et al.*, 2006), y el antagonismo de bacterias del género *Streptomyces* frente al hongo *Rizoctonia solani* (Castillo, 2004), entre otros.

## **1.2 Justificación e Importancia**

La papa tiene gran importancia como alimento a nivel mundial, de hecho, es el cuarto cultivo en importancia después del maíz, trigo y arroz (FAO, 2008). Sus tubérculos contienen abundantes nutrientes y pueden contribuir a mejorar la alimentación y reducir los índices de mortandad causados por mala nutrición en países subdesarrollados o en vías de

desarrollo. La papa es idónea para producirse donde la tierra es limitada y la mano de obra abundante, produce un alimento más nutritivo en menos tiempo, con menos tierra y en climas más difíciles que cualquier otro cultivo importante. Hasta un 85% de la planta de papa es comestible para las personas (FAO, 2008).

La región andina del Ecuador representa el área de diversidad genética de la papa, y en el centro de Ecuador, en particular, se encuentra una gran diversidad de papas silvestres también llamadas papas nativas (FAO, 2008). Actualmente, su producción está adquiriendo una vocación más comercial en respuesta a la demanda del sector urbano que representa más del 60% de la población. Casi toda la papa se produce y consume localmente, con un consumo *per cápita* de unos 25 kilogramos al año. Para el año 2007, el área total cosechada de papa en el Ecuador fue de 52000 Ha, evidenciando la importancia económica del cultivo (FAO, 2008).

El tizón tardío afecta negativamente a la producción de papa en América y en el mundo. El cultivo intensivo de papas tiende a incrementar la presión de las plagas y las enfermedades (FAO, 2008) lo que a menudo induce a la utilización intensiva de plaguicidas nocivos. Debido a esta enfermedad, en áreas de cultivo de secano (es decir que no tienen riego y en las que solo participa el agua lluvia) alrededor del mundo, es prácticamente imposible la producción de papa sin la aplicación de fungicidas (Kromann *et al.*, 2008).

En la actualidad, se hacen necesarias más investigaciones sobre la ecología y comportamiento de *P. infestans* debido al incremento en la

severidad de la infección, el incremento en la aplicación de químicos y la ocurrencia de oosporas sexuales que permanecen viables en el suelo por más de un año (Kromann *et al.*, 2008). Estudios como el presente sugieren que en el futuro pueden aplicarse nuevos sistemas de manejo del cultivo de papa como el uso de antagonistas/controladores biológicos (Faes *et al.*, 2005 y Ghorbani *et al.*, 2005) y aporta información sobre la interacción de los fitopatógenos con distintos géneros bacterianos como *Streptomyces* o *Bacillus* (Castillo, 2004 y Rodríguez, 2002). Nuevos sistemas de manejo y mejor información sobre la enfermedad incrementan la seguridad alimentaria de determinados grupos vulnerables de la población (mujeres y niños) y podrían reducir notablemente la contaminación del medio ambiente al disminuir la cantidad de pesticidas aplicados a los cultivos.

### **1.3 Objetivos**

#### **1.3.1 Objetivo general**

Estudiar la supresión a *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary por poblaciones microbianas aisladas de suelos paperos de la provincia de Chimborazo en dos diferentes tiempos de muestreo.

#### **1.3.2 Objetivos específicos**

- Estimar la incidencia de infección en tubérculos de papa con *P. infestans* en la provincia de Chimborazo, Ecuador.
- Determinar si los factores bióticos del suelo ejercen influencia sobre la capacidad del oomiceto para infectar tubérculos de papa.
- Aislar microorganismos formadores de esporas, resistentes al calor, posibles responsables de la supresividad a *P. infestans*.

- Determinar el perfil genético de las poblaciones microbianas aisladas a través de técnicas moleculares.
- Establecer el efecto del tiempo de muestreo en la supresión a *P. infestans* y en los perfiles genéticos de las poblaciones microbianas aisladas.

## **1.4 Marco teórico**

### **1.4.1 Características generales del oomiceto *Phytophthora infestans***

#### **1.4.1.1 Taxonomía, origen, distribución, importancia**

*Phytophthora infestans* es el nombre científico del agente causal del tizón tardío de la papa (*Solanum tuberosum*). Fue descrito por primera vez en 1842 en Europa. En ese entonces se denominó *Gangraena tuberosum solani*, adquiriendo otros nombres a medida que se avanzaba en su estudio. De hecho, es quizás la más conocida y estudiada de las especies de *Phytophthora* (Erwin y Ribeiro, 1996).

Etimológicamente, la palabra *Phytophthora* proviene de la unión de los vocablos griegos “phyto” = planta y “phthora” = destructor. *P. infestans* produjo una tremenda destrucción de los cultivos de papa en Irlanda hacia los años 1840s, con efectos inmediatos de pobreza y hambruna, que condujeron a profundos cambios sociales y económicos en ese país, a la reducción de la cuarta parte de su población por la muerte de un millón de personas y la migración de otro tanto, causando una amplia dispersión humana y gran impacto social (Erwin y Ribeiro, 1996).

El *Phylum* Oomycota, perteneciente al reino Cromista, comprende más de 700 especies, las cuales no tienen pigmentos fotosintéticos, poseen paredes formadas por celulosa o polímeros similares a celulosa y tienen hábitos acuáticos y terrestres aunque siempre necesitan la presencia del agua. Además poseen dos flagelos en las zoosporas y en los gametos masculinos. Por sus formas filamentosas parecidas a hifas, se agruparon originalmente como hongos. Sin embargo, los Oomycetes adquirieron la habilidad de infectar las plantas de manera independiente de los hongos verdaderos (Kamoun, 2002 citado por Jaramillo, 2003).

Diversos estudios confirman que la enfermedad se originó en el continente americano; Jaramillo (2003), asegura que se originó en México, mientras que otros autores (Abad y Abad, 1997; Forbes *et al.*, 1997 y Oyarzún *et al.*, 1998) consideran a *Phytophthora infestans* como un patógeno endémico de las zonas paperas de los Andes Suramericanos. Según Abad y Abad (1997), dicha enfermedad fue observada durante la dominación española en 1762-1767. Abad y Abad (1997) encontraron además una gran variabilidad del patógeno en la sierra del Perú y dado que la papa, el pepino, posiblemente el tomate y muchas solanáceas silvestres tuberíferas tienen su origen en el Perú, el autor sitúa el origen del patógeno en algún lugar de los Andes Peruanos.

#### **1.4.1.2 Morfología y ciclo de vida**

*Phytophthora infestans* posee características que son comunes a todas las especies del género *Phytophthora*: esporangios ovoides con forma de limón, zoosporas biflageladas dentro de los esporangios y oogonios globosos esféricos (Erwin y Ribeiro, 1996).

El ciclo de vida de *P. infestans* se puede apreciar en la figura 1.1. Cada esporangio tiene de seis a diez núcleos que se desprenden fácilmente de los esporangioforos cuando maduran, son arrastrados por las lluvias y los vientos. Se dispersan y germinan en los tejidos de las plantas huéspedes, mediante la germinación directa a través de un tubo germinativo o indirectamente al producir zoosporas (Smart, *et al.*, 2000 citado por Jaramillo, 2003). La esporulación es un proceso complejo que involucra factores como agua, nutrientes, esteroides, aireación, luz, temperatura, cationes, edad del cultivo, presencia de bacterias. Los esporangios se forman en un tiempo de 2-7 días en un amplio rango de temperaturas (8-22 °C) aunque el óptimo es de 18-22°C (Erwin y Ribeiro, 1996). Los esporangios germinan directamente formando uno o varios tubos de germinación que eventualmente crecen para formar un micelio, germinación directa, o indirectamente por diferenciación del citoplasma dentro del esporangio en discretas zoosporas que luego son liberadas a través de un poro de salida (Erwin y Ribeiro, 1996).

Se conocen dos tipos sexuales de *P. infestans*: A1 y A2. La interacción entre hifas de tipos opuestos compatibles resulta en la formación de oosporas (Drenth *et al.*, 1995). En la naturaleza, las oosporas son frecuentes en ubicaciones geográficas en las que están presentes ambos tipos (la zona Central de México, sobretodo). En otros lugares, solo son comunes los tipos A1. Cuando solo un tipo está presente, *P. infestans* se reproduce exclusivamente de forma asexual y se manifiesta como un micelio blanco observable en tejido foliar y en los tubérculo. El tipo de apareamiento A2 tiene gran tendencia a la autofertilización (96%), mientras que en A1 es escasa, siendo del 6% (Jaramillo, 2003).

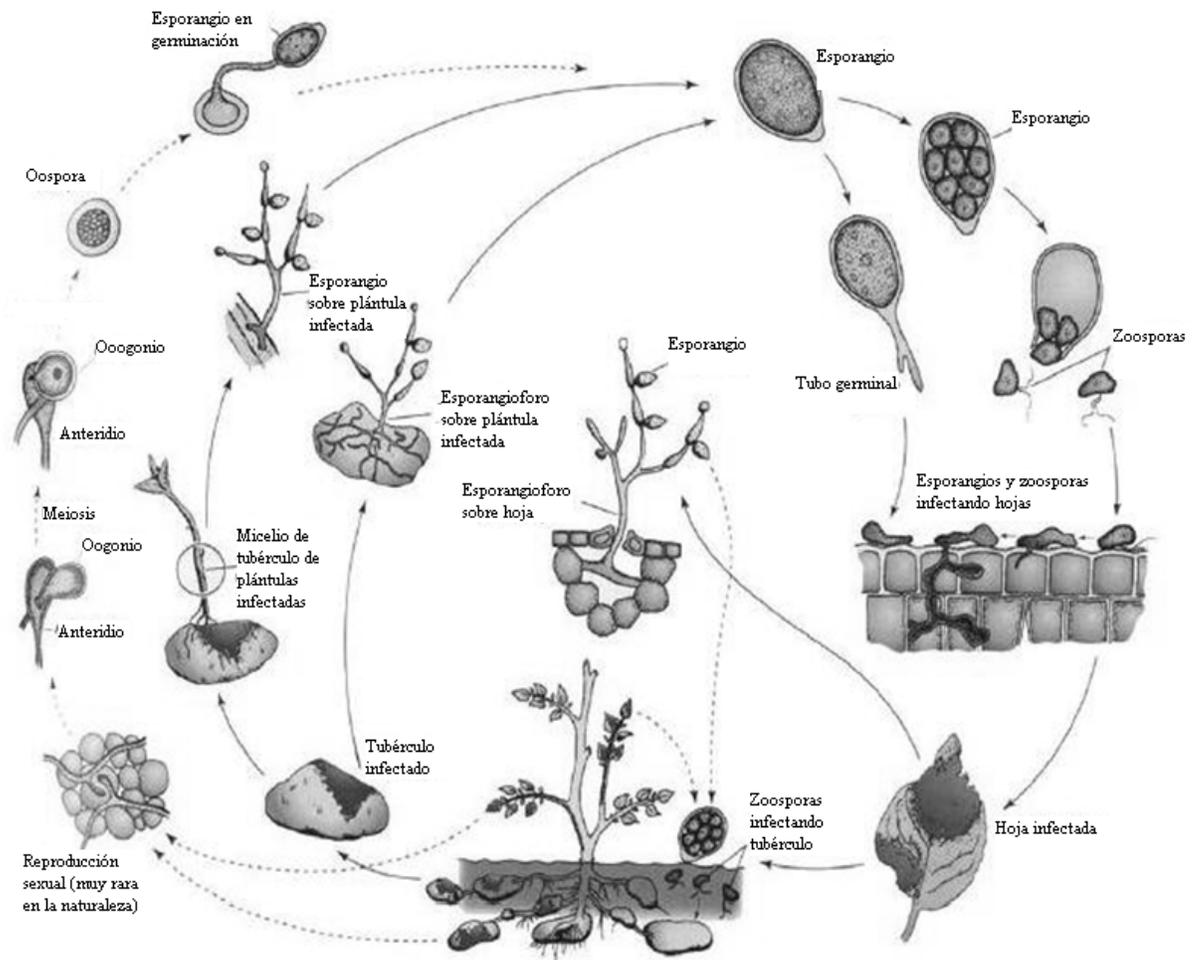


Figura 1.1. Ciclo de vida de *Phytophthora infestans*, agente causal del tizón tardío en papa y tomate (Figura tomada de Martínez y Osorio, 2007)

#### 1.4.2 Características generales del tizón tardío

El tizón tardío o “lancha” de la papa es probablemente la enfermedad de la papa más importante a nivel mundial. Es de particular agresividad en cultivos con mucha humedad a moderadas temperaturas. Infecta también a otras Solanáceas como la naranjilla o el tomate (Jones, 1998).

En lugares donde la diferencia de estaciones es marcada, la hibernación del patógeno se hace en su forma de micelio, ya sea en

tubérculos infectados almacenados o desechados que se apilan cerca de los campos de cultivo (Erwin y Ribeiro, 1996). Después que las plantas emergen, *P. infestans* invade algunos de los brotes en desarrollo y esporula produciendo el inóculo primario (figura 1.1). El inóculo primario puede estar compuesto de oosporas y esporangios. En la mayoría de los casos, el inóculo primario es de origen exclusivamente asexual. Tubérculos infectados usados como semilla o tubérculos infectados y abandonados funcionan como inóculo (Andrison, 1995). Una vez llevada a cabo la infección primaria, la diseminación de la enfermedad se realiza por medio de los esporangios que son transportados por el agua y el viento (Jaramillo, 2003).

La infección en los tubérculos es inicialmente superficial pero eventualmente se extiende algunos centímetros dentro del tubérculo. En ausencia de patógenos secundarios, las lesiones son castañas rojizas, secas y granulares. Bajo condiciones frías y secas, las lesiones en los tubérculos se desarrollan lentamente y pueden ser ligeramente hundidas (Jones, 1998).

#### **1.4.2.1 Mecanismos de control**

Las variedades resistentes de papa y el uso de buenas prácticas agrícolas pueden reducir o eliminar muchas de las enfermedades más frecuentes, como el tizón tardío. La producción constante de papa no sólo produce abundantes cosechas, sino condiciones muy favorables para los insectos y los hongos patógenos, cuya eliminación se pretende lograr a través de aplicaciones de enormes cantidades de insecticidas y plaguicidas con larga permanencia en los suelos (Rodríguez, 2002). El Manejo Integrado de Plagas (MIP) ha ayudado a los agricultores a reducir drásticamente la necesidad de utilizar sustancias químicas a la vez que se incrementa la producción. La capacitación en MIP permite a los productores reducir en un 75 por ciento los

costos de la aplicación de sustancias agroquímicas, como fertilizantes, plaguicidas y la mano de obra necesaria para aplicarlos, sin que disminuya la productividad (FAO, 2008).

Mecanismos de control estudiados para patógenos de suelo como *P. infestans* incluyen la aplicación de inóculos de microorganismos, extractos de compost, fungicidas y herbicidas elaborados en base a distintos químicos, entre otros (Mayton *et al.*, 2001, Ghorbani *et al.*, 2005, y Niem *et al.*, 2009), siendo los métodos químicos los que mejores resultados otorgan. Las respuestas y efectividad de los fungicidas preventivos difieren significativamente de los sistémicos (Sedegui *et al.*, 1999).

Es amplia la variedad de microorganismos utilizados como controladores biológicos. Yan *et al.* (2002) estudiaron el uso de rizobacterias, *Bacillus pumilus* y *Pseudomonas fluorescens* para activar un mecanismo de protección sistémica, que redujo la severidad del tizón tardío, en plantas de tomate. La transgénesis es una opción en el manejo integrado de plagas. Estudios en plantas transgénicas muestran que éstas pueden influir en la estructura de la microbiota del suelo, influenciando el desarrollo del tizón tardío (Zadorina *et al.*, 2009). Sin embargo, el efecto de la transgénesis no está aún bien definido.

La aplicación comercial de biocontroladores no es siempre consistente en distintas ubicaciones. La variabilidad puede deberse al genotipo de las plantas, factores ambientales, interacciones con otros microorganismos, prácticas agronómicas o mutaciones en los antagonistas. Ownley *et al.* (2003), señalan la importancia de la manipulación de las

propiedades del suelo para mejorar el control biológico ejercido por microorganismos antagonistas como *Pseudomonas fluorescens* y superar los problemas que afectan su aplicación comercial.

### **1.4.3 Características generales de suelos supresores**

#### **1.4.3.1 Definición, características y tipos de supresividad**

Un suelo supresor (también denominado supresivo) es aquel en el cual, la severidad o incidencia de una enfermedad permanece baja a pesar de la presencia del patógeno, de una planta susceptible y de condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad. (Baker y Cook, 1974; citado por Janvier *et al.*, 2006). Diferentes mecanismos pueden provocar la supresividad en un suelo: a) el patógeno no se establece o no persiste en el suelo b) el patógeno se establece pero causa poco o ningún daño o c) el patógeno se establece y causa la enfermedad por un tiempo, luego esta declina aún cuando el patógeno permanece en el suelo (Janvier *et al.*, 2006).

La naturaleza de la supresión no se ha comprendido aún en su totalidad. Muchos autores la atribuyen a factores físico-químicos como el tipo de suelo, su humedad, luz, capacidad de campo, contenido de aluminio, amonio, materia orgánica, entre otros. (van Bruggen y Semenov, 1999; Ownley *et al.*, 2003; Rimé *et al.*, 2003 y Porter *et al.*, 2005); mientras otros autores lo atribuyen a antagonismos microbianos especialmente de los géneros *Pseudomonas* (Haas y Défago, 2005), *Bacillus* (Berger *et al.*, 1996, Chattopadhyay *et al.*, 2004) *Streptomyces* (Castillo, 2004), *Mucor* (Erwin y Ribeiro, 1996), *Burkholderia*, *Trichoderma* (Lozoya-Saldaña *et al.*, 2006), entre otros. Por ejemplo, Erwin y Ribeiro (1996) mencionan que en suelos supresores, la presencia de níquel y cobalto incrementan la resistencia de las

papas a *P. infestans* y también mencionan que con altas concentraciones de fósforo, azufre, molibdeno, manganeso y cobre, la enfermedad disminuye.

Por otro lado, los fertilizantes de nitrógeno han mostrado un amplio rango de efectos en la severidad de las enfermedades del género *Phytophthora* así como en sus propágulos. Estudios *in vitro* reportan que fertilizantes con nitratos y radicales amonio, son altamente tóxicos para *P. infestans* (Duffy *et al.*, 1997).

Weller *et al.* (2002) y Borneman y Becker (2007) mencionan que se pueden distinguir dos tipos de supresividad: general y específica. Los suelos supresivos deben esta capacidad a una combinación entre ambos tipos de supresividad. La supresividad general está relacionada con la biomasa total de un suelo, la cual compite con el patógeno por los recursos o causa su inhibición a través de varias formas de antagonismo. Por lo general, ésta se beneficia por prácticas agronómicas diversas como la adición de materia orgánica. No hay una sola especie responsable y la supresividad no es transmisible entre suelos (Weller *et al.*, 2002). La supresividad específica, en cambio, es debida a los efectos de un grupo en particular o grupos selectos durante algún estadio del ciclo de vida del patógeno. Esta supresividad es transferible y de hecho ésta es su característica principal. En suelos con supresividad específica, otros miembros de la rizósfera, no necesariamente antagonistas, pueden modular el grado de supresión observada (Weller *et al.*, 2002).

#### 1.4.3.2 Factores abióticos involucrados en la supresividad a *Phytophthora infestans*

Suelos artificial o naturalmente contaminados con esporangios son infectivos para los tubérculos desde 15 hasta 77 días dependiendo del tipo de suelo, su contenido de humedad y pH. Como regla, los suelos arenosos pierden su capacidad de infección más rápido que los suelos arcillosos o limosos (Andrison, 1995). Los suelos húmedos (20-25% de capacidad de retención de agua) permanecen infectivos más tiempo que aquellos saturados de humedad o secos. La menor persistencia de la infectividad en suelos arenosos puede explicarse por la escasa presencia de esporangios y zoosporas que atraviesan la textura permeable del suelo o tal vez porque se secan más rápido. Los suelos muy ácidos (pH=3.8-4.2) inoculados con esporangios de *P. infestans* generalmente son supresivos a la infección de tizón. El bajo pH se ha asociado con la supresividad para otras enfermedades causadas por *Phytophthora* (Andrison, 1995). Además, es probable que la toxicidad del aluminio y la degradación microbiana del inóculo actúen simultáneamente o de forma complementaria en los suelos supresivos (Andrison, 1995). Porter *et al.*, (2005) reportaron que, bajo condiciones de invernadero, la infección de tubérculos con *P. infestans*, disminuye conforme aumenta la profundidad a la que el tubérculo está enterrado. También indican que la infección fue significativamente menor en suelos de tipo franco limoso que en suelos de tipo arenosos.

Halim *et al.* (2007) reportaron diversos compuestos químicos que inducen respuestas de defensa de las plantas ante los patógenos, en particular, al ácido salicílico como componente importante en la defensa basal de la planta de papa contra *P. infestans*.

### **1.4.3.3 Factores bióticos involucrados en la supresividad a *Phytophthora infestans***

Se han reportado como antagonistas de patógenos de plantas del género *Phytophthora*, a bacterias de los géneros *Streptomyces* (Bormann *et al.*, 1999), *Bacillus* (Berger *et al.*, 1996, Ghorbani *et al.*, 2005) y *Pseudomonas* (Ghorbani *et al.*, 2005, Haas y Défago, 2005). Aún a pesar de que estos géneros fueron aislados como antagonistas y de estar implicados en la supresión, se considera que lo más probable es que haya un consorcio que trabaja suprimiendo al patógeno (Park, 1963, Erwin y Ribeiro, 1996 y Bulluck y Ristaino, 2001).

Hipótesis tempranas sugerían que los antagonistas compiten con los patógenos, particularmente, produciendo antibióticos (Haas y Défago, 2005). Estos compuestos podrían interferir con el desarrollo del patógeno, por ejemplo, durante la germinación de esporas o en la colonización de las raíces. Antes de comprobar esta hipótesis fueron primero necesarios estudios que demostrasen que los antagonistas eran capaces de generar antibióticos no solo *in vitro* sino en el suelo, lo cual se confirmó para el hongo *Trichoderma viride* y el antibiótico gliotoxina (Haas y Défago, 2005). Los antagonistas ejercen diversos efectos sobre los patógenos: producen compuestos antibióticos (Faes *et al.*, 2005), compuestos biosurfactantes (de Souza *et al.*, 2003), inducen resistencia sistémica en la planta (Ghorbani *et al.*, 2005, Haas y Défago, 2005), interfieren en los factores de patogenicidad y actualmente existen bacterias endófitas que se utilizan para proteger gran cantidad de cultivos (Enebak *et al.*, 1997 y Wilhelm *et al.*, 1998).

Diferentes niveles de supresividad pueden ser inducidos a través de adición de abonos, fertilizantes o la rotación de cultivos. Los compuestos

químicos de gran persistencia, así como la materia orgánica útil para los saprófitos influyen en la capacidad supresora de los suelos (Rodríguez, 2002). Es posible además, manipular las condiciones de las comunidades microbianas con tratamientos biológicos y químicos como la aplicación de calor, agentes antimicrobianos, arreglos nutricionales, entre otros. Para favorecer el efecto supresivo del componente biótico, también pueden utilizarse suelos a los que se han adicionado fertilizantes de origen orgánico (Bulluck y Ristaino, 2001) o suelos artificialmente inoculados con el patógeno o con los antagonistas (Borneman Becker, 2007).

#### **1.4.3.4 Microorganismos formadores de esporas**

Las bacterias con capacidad de formar endosporas son quimioheterótrofas (utilizan un compuesto químico como fuente de carbono, y a su vez, este mismo compuesto es la fuente de energía), son aerobias o anaerobias facultativas y su hábitat típico es el suelo (Willey *et al.*, 2004). Algunas especies son patógenas y causan enfermedades debido a la producción de toxinas. La capacidad para originar las endosporas no constituye parte del crecimiento normal de las bacterias sino más bien es el resultado de un proceso de diferenciación que se inicia cuando la bacteria termina el periodo de crecimiento exponencial y se acerca a su fase estacionaria (Stanier *et al.*, 1996). Durante este proceso sintetiza, dentro de las células vegetativas, un tipo de célula totalmente diferente que luego es liberada. Las endosporas entran en un proceso de letargo hasta que las condiciones son favorables para su germinación. En muchos formadores de esporas, el fenómeno de esporulación genera también la síntesis de una clase distintiva de sustancias antibióticas, normalmente péptidos que pueden ser asignados a tres clases: edeínas, bacitracinas y el grupo gramicidina-polimixina-tirocidina (Stanier *et al.*, 1996 y Willey *et al.*, 2004).

Los géneros más conocidos de formadores de esporas son los géneros *Bacillus* (aerobios), *Thermoactinomyces* (también aerobios) y *Clostridium* (anaerobios). La mayor parte de los trabajos realizados sobre endosporas se han llevado a cabo, por razones experimentales en miembros del género *Bacillus* (Stanier *et al.*, 1996). En este género, la célula tiene la forma de bastón (bacilo), son aerobios o anaerobios facultativos, gram positivos, catalasa positivos, mesófilos, la temperatura promedio de crecimiento varía según la especie, pero se observa un máximo de crecimiento entre los 30-45°C y su porcentaje de G + C varía entre 50 y 61% (Willey *et al.*, 2004).

El género *Bacillus* es conocido como un buen productor de antibióticos con actividad antifúngica, especialmente extraídas de las endosporas. Además, estas bacterias presentan la ventaja de que las proteínas producidas, deben atravesar solo una membrana para ser vertidas al medio ambiente extracelular, lo que implica la capacidad de producir comercialmente una enorme cantidad de ellas (Van Welly, 2000 citado por Venegas, 2006).

Algunas especies, como *B. thurigiensis*, forman paralelamente a las endosporas un cristal de proteína adyacente que contiene los compuestos tóxicos responsables de sus capacidades supresoras. La producción de esporas en presencia de oxígeno es un rasgo que define el género, así como su morfología. Están ampliamente distribuidos en el ambiente natural en suelos de todo tipo. Las esporas son sumamente resistentes al calor, a las radiaciones ultravioleta e ionizantes y a muchos productos químicos tóxicos (Stanier *et al.*, 1996).

Los bacilos formadores de esporas, son comúnmente aislados de suelos a diferentes profundidades y altitudes y bajo diversas condiciones climáticas (Vilain *et al.*, 2006). Los miembros del grupo de *Bacillus cereus* (*B. cereus*, *B. anthracis* y *B. thuringiensis*) son los más comunes. Algunas cepas de *Bacillus* producen antibióticos capaces de suprimir enfermedades de la rizósfera de las plantas (Milner *et al.*, 1996) o producen proteínas con propiedades insecticidas como *Bacillus thuringiensis* (Chattopadhyay *et al.*, 2004) mientras que otras son ocasionales patógenos oportunistas de humanos. La resistencia al calor de las endosporas es la característica que se utiliza para su aislamiento y éstas se activan en el suelo cuando existe un exceso de materia orgánica disponible o cuando el contenido de humedad es alto (Stanier *et al.*, 1996). La diversidad de las especies presentes en el suelo es amplia: *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, entre otros (Berger *et al.*, 1996, Vilain *et al.*, 2006).

#### **1.4.3.5 Caracterización de poblaciones microbianas de los suelos**

Existen numerosos métodos que han sido desarrollados para caracterizar las poblaciones microbianas de los suelos, por ejemplo el aislamiento en placas de poblaciones antagonistas (Lozoya-Saldaña *et al.*, 2006 y Castillo 2004) así como métodos moleculares como Amplified rDNA Restriction Analysis (ARDRA), Terminal Restriction Length Polimorfism (T-RFLP) o hibridación, que proveen información sobre la abundancia relativa de dichas poblaciones así como su nivel taxonómico. Estos métodos se utilizan para monitorear las poblaciones que modulan o contribuyen a la supresión (Kitts, 2001, Blackwood *et al.*, 2003).

La técnica de ARDRA es un método genético que sirve para clasificar microorganismos a nivel de género o especie. Consiste en una amplificación a

través de PCR del rDNA 16S. Una vez amplificado el gen, se digiere el producto de la PCR con enzimas de restricción que otorgan patrones de corte distintos específicos y que sirven para agrupar a los individuos estudiados. Los nuevos fragmentos producto del análisis de restricción son resueltos en geles de electroforesis, generando un patrón de bandas de restricción de ácidos nucleicos característicos (Kitts, 2001). Además la información obtenida de la secuencia del DNA sobre una región o gen en particular ha permitido la amplificación de fragmentos específicos de DNA que sirven para diagnosticar géneros, especies o cepas (Heyndrickx *et al.*, 1996).

Para el caso específico del género *Bacillus* se han llevado a cabo varias investigaciones (Heyndrickx, *et al.*, 1996; Wu, *et al.*, 2006; Sklarz, *et al.*, 2009) y el procedimiento se ha realizado amplificando el gen 16S y digiriendo el producto con diversas enzimas de restricción como *HaeIII*, *MspI*, *RsaI*, *HinfI*, *MnII*, *PvuII*, *AluI*, *TaqI*, *DpnII*, *Bfal* y *Tru9I*.

Si se determina que un microorganismo o un consorcio de microorganismos es el responsable de las características supresivas de un suelo, es de vital importancia su identificación y caracterización (Borneman y Becker, 2007). Para caracterizar las poblaciones microbianas, tanto con métodos tradicionales como los aislamientos en placa o con métodos moleculares como el ARDRA, es importante tomar en cuenta variables dinámicas como el tiempo, espacio, prácticas agronómicas y condiciones ambientales del suelo (Borneman y Becker, 2007 y Weller *et al.*, 2002) puesto que son variables que determinan la composición y diversidad de la microflora del suelo.

## 1.5 Hipótesis

Las poblaciones microbianas de los suelos de Chimborazo, aisladas en dos diferentes tiempos de muestreo, ejercen un efecto supresivo en el crecimiento de *Phytophthora infestans*

## **CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 Participantes**

En el presente proyecto participaron la Dra. Ma. Soledad Benítez, directora y MSc. Alma Koch, codirectora, de la Escuela Politécnica del Ejército. Colaboraron también Dr. Bert de Bievre, Dr. Jorge Andrade-Piedra, Marcelo Vinueza y Francisco Jarrín del Centro Internacional de la Papa.

### **2.2 Zona de estudio**

La recolección de las muestras de suelo se realizó en la provincia de Chimborazo, en las comunidades de Pisicaz y Pusniag. El procesamiento de las muestras, desarrollo de ensayos y análisis de datos se realizaron en el Área de Microbiología del Centro de Investigaciones Científicas de la Escuela Politécnica del Ejército en Sangolquí así como en las instalaciones del Centro Internacional de la Papa ubicado en la Estación “Santa Catalina” del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) en la Parroquia de Cutuglahua del Cantón Mejía, Provincia de Pichincha.

### **2.3 Periodo de investigación**

El estudio se inició en el mes de agosto del año 2009 y concluyó en el mes de septiembre del año 2010.

## 2.4 Recolección de muestras de suelo

El primer muestreo se realizó en el mes de noviembre del año 2009 y el segundo muestreo fue realizado en febrero del año 2010, en la comunidad de Pisicaz ( $3500 \pm 15$  msnm; coordenadas GPS 17MO747271, UTM 9820342), parroquia San Juan, cantón Riobamba y la comunidad de Pusniag ( $3556 \pm 15$  msnm; coordenadas GPS 17MO770286, UTM 9830026), parroquia Ilapo, cantón Guano, en la provincia de Chimborazo. El campo Pisicaz tenía un manejo orgánico, sin pesticidas y el cultivo de papa era el primer cultivo desde hace 20 años. El campo Pusniag tenía aplicación frecuente de pesticidas y el cultivo de papa era rotativo con cereales, especialmente avena.

En cada lugar de muestreo se seleccionó un campo y los dos campos seleccionados para el muestreo tenían un cultivo de papa de la misma edad (tres meses durante el primer muestreo y cosechadas durante el segundo muestreo). El campo Pisicaz tenía un sembrío de algunas variedades de papas nativas y el campo Pusniag tenía un sembrío de papas de variedad comercial súper chola.

Cada campo tuvo, al menos, 12 transectos sembrados con papa. Se tomaron las muestras de suelo de la sección central de cada uno de ocho transectos intermedios (dejando al menos dos transectos sin muestrear en cada extremo del campo). Fueron tomadas ocho muestras de suelo por campo, a 15-20 cm de profundidad, dos por cada transecto (que se combinaron y homogenizaron para obtener solo una por cada transecto) a una distancia de 12 m entre cada una.

Las muestras de suelo fueron sometidas a análisis para determinar sus propiedades físico-químicas en los laboratorios del Departamento de

Suelos del INIAP y de la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro AGROCALIDAD (Ver Resultados de Análisis de Suelo).

También se realizó la adquisición de tubérculos de distintas variedades de papa en el mercado Mayorista de la ciudad de Riobamba y mercados de las ciudades de Quito y Sangolquí para los distintos ensayos.

Las muestras de suelo se dividieron en tres porciones: Análisis de suelo, suelo tinalizado (T) y suelo no tinalizado (NT). La tinalización consiste en someter el suelo a calentamiento durante cierto periodo de tiempo, para reducir la cantidad y viabilidad de la población microbiana y sus formas vegetativas (Garzón 1999). La tinalización se realizó manteniendo el suelo durante 20 días a 65°C.

## **2.5 Estimación de la incidencia de infección de tubérculos de papa con *P. infestans***

Los tubérculos colectados en la provincia de Chimborazo y en mercados de las ciudades de Quito y Sangolquí, fueron lavados con agua potable y secados para después ser incubados a 16°C durante 21 días. Al finalizar el periodo de incubación, los tubérculos fueron cortados en la mitad y se evaluó la presencia de tizón en base a la descripción de las heridas en los tubérculos (Jones ,1998).

## **2.6 Preparación y mantenimiento del inóculo de *Phytophthora infestans* y *Rhizoctonia solani***

El inóculo de *P. infestans* que se utilizó en los ensayos fue obtenido de la colección del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), denominado cepa No. 95, fue multiplicado y mantenido en condiciones de laboratorio en el Centro Internacional de la Papa (CIP) utilizando agar centeno suplementado con 15 g/L de agar y 20 g/L de sucrosa. La multiplicación del inóculo se realizó tanto en hojas de variedad susceptible como en agar centeno.

El inóculo de *Rhizoctonia solani* fue aislado por el Departamento de Protección Vegetal del INIAP a partir de un esclerocio en un tubérculo contaminado. Se multiplicó y mantuvo en condiciones de laboratorio en el CIP utilizando agar tripticasa soya (TSA) 1/10 suplementado con 15 g/L de agar.

La solución de esporangios de *P. infestans* utilizada en los ensayos se obtuvo a través de un lavado de hojas de papa de variedad susceptible infectadas con tizón tardío utilizando agua destilada estéril. Soluciones con mayor concentración de esporangios se obtuvieron realizando un lavado/raspado con agua destilada estéril de cajas de agar centeno con la cepa No. 95 de *P. infestans*. Las soluciones se prepararon inmediatamente antes de cada ensayo.

## **2.7 Ensayo 1: Efectos del suelo sobre la capacidad del patógeno para infectar tubérculos**

Se empleó la metodología descrita por Garzón (1999). De cada una de las muestras se tomaron 600 mL de suelo tindalizado y no tindalizado, los que fueron inoculados con 10 mL de una solución fresca de esporangios de *P. infestans* calibrada a 25000 esporangios/mililitro y un volumen de agua variable para saturarlos de humedad (entre 50 y 100 mL de agua destilada estéril). Las muestras se dejaron incubar durante 1, 8 y 15 días a 16°C.

En cada uno de los días de evaluación, se prepararon cámaras húmedas con emparedados de suelo de la siguiente manera: Tubérculos de papa de las variedades resistentes uvilla y diamante eran sumergidos en alcohol por 10 s y, posteriormente, flameados para desinfectarlos. Los tubérculos se rebanaban en rodajas de menos de 5 mm de ancho. Entre dos rodajas de papa se colocaban 0,5 – 1 mL de suelo inoculado. Los emparedados de suelo eran colocados en cámaras húmedas (recipientes plásticos con tapa que contenían 50 mL de agua destilada en el fondo y una malla metálica suspendida a 2-3 cm sobre el agua para sostener los emparedados) e incubados durante siete días a 16°C. Concluida la incubación, se evaluaron los emparedados. Se registró el número de emparedados con infección de tizón tardío. Para cada muestra de suelo, se prepararon cinco emparedados con dos repeticiones, para un total de 10 emparedados por muestra y cada bandeja era una unidad experimental que contenía cinco emparedados. El ensayo 1 se llevó a cabo con muestras de ambos campos, del primer y segundo tiempo de muestreo.

## 2.8 Ensayo 2: Efecto del suelo sobre los esporangios

El efecto del suelo sobre los esporangios fue analizado empleando el protocolo modificado de Andrivon (1994) citado por Garzón (1999). Para cada muestra de suelo tanto tindalizado como no tindalizado, una membrana de nitrocelulosa (tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$ ) fue inoculada con un mL de una solución fresca de esporangios de *P. infestans* calibrada a 55000 esporangios/mL. La membrana se dividió por la mitad. Una de las mitades se conservó para el ensayo 3 mientras la otra mitad fue enterrada en una caja Petri (con el inóculo hacia abajo).

Los suelos fueron divididos en grupos según el tiempo que debían permanecer las membranas enterradas y luego fueron almacenados a 16°C. Al final de cada día de evaluación (1, 8 y 15 días) las membranas se sometieron a un proceso de tinción con el tinte fluorescente Uvitex siguiendo el protocolo de Mera (1996) citado por Garzón (1999): cada membrana fue sumergida en 6 mL de una solución Tris-HCl 0.1M pH=8 durante 10 min. Posteriormente se agregaban 6 $\mu\text{l}$  de una solución de Uvitex (0.1%) y se dejaron reposar durante una hora. Luego, cada membrana se sumergió en 6 mL de una solución de glicerol 25% por 10 min. Las membranas fueron colocadas en portaobjetos y en los cubreobjetos se colocaron dos gotas de una solución glicerol:lactofenol 9:1. Las placas se sellaron con esmalte transparente para evitar que la membrana o el cubreobjetos se deslicen.

Las placas fueron observadas en un microscopio con fuente de luz ultravioleta EC LUMAM-RPO. El ensayo 2 se llevó a cabo con muestras de ambos campos, del primer y segundo tiempo de muestreo. Para cada condición de suelo y cada día de evaluación se examinaron un mínimo de 50

esporangios por placa en los que se realizó la lectura de uno de estos tres estadios:

**Germinación:** Un esporangio fue considerado germinado cuando había desarrollado un tubo de germinación. Se evaluó solo la germinación directa.

**Latencia:** Un esporangio se consideró latente cuando su pared celular y su contenido estaban en buenas condiciones y no se evidenciaba deterioro o germinación directa.

**Lisis:** Un esporangio se consideró lisado cuando su estado fisiológico era malo (plasmólisis celular severa, contenido celular ausente o destruido) o su membrana celular estaba parcialmente destruida.

## **2.9 Ensayo 3: Prueba de patogenicidad**

Cada una de las membranas conservadas del ensayo 2, fue dividida en cinco porciones de aproximadamente el mismo tamaño. Cada porción se destinó a un emparedado como los realizados para el ensayo 1. Se incubaron los emparedados en cámaras húmedas durante siete días a 16°C. Concluida la incubación, se evaluaron los emparedados. Se registró el número de emparedados con infección de tizón tardío. Para cada muestra se prepararon cinco emparedados con dos repeticiones, para un total de 10 emparedados por muestra y cada bandeja era una unidad experimental que contenía cinco emparedados. El ensayo 3 se llevó a cabo con muestras de ambos campos, del primer y segundo tiempo de muestreo.

## 2.10 Aislamiento, selección y pruebas de antagonismo de colonias formadoras de esporas

Se utilizó una modificación del protocolo de Garbeva *et al.* (2003). Se pesaron cinco gramos de cada muestra de suelo y se colocaron en un tubo Falcon de 50 mL. Se añadieron 45 mL de agua destilada estéril (dilución 1/10). Se tomó 1 mL de la suspensión 1/10 y se colocó en un tubo Falcon de 15 mL que contenía 9 mL de agua destilada estéril (dilución 1/100). De esta dilución, se tomó 1 mL y se colocó en un tubo Falcon de 15 mL que contenía 9 mL de agua destilada estéril (dilución 1/1000). Las diluciones fueron incubadas en baño María a 80°C durante 10 min. Después, se colocaron 100 µL de cada dilución en cajas Petri con agar TSA 1/10 suplementado con 15 g/L de agar y se incubaron durante 48 horas a 27°C. El conteo de UFC se realizó por el método de recuento en placa. El aislamiento se realizó para los dos tiempos de muestreo y para ambos campos. Para todas las muestras, de cada dilución se aislaron al menos dos colonias tomando en cuenta dos aspectos: morfología y posibles efectos inhibitorios hacia otras colonias de la misma dilución.

Las colonias aisladas se sometieron a una prueba preliminar de antagonismo que consistió en una caja Petri de TSA 1/10 con un inóculo circular de *P. infestans* (1 cm de diámetro) y tres colonias diferentes alrededor, sembradas a 1 cm de distancia del inóculo de *P. infestans*. De esta primera prueba se seleccionaron las que mostraron un comportamiento supresivo. La segunda y tercera prueba consistieron en una caja Petri de TSA 1/10 con un inóculo rectangular de *P. infestans* (2 cm x 1 cm) y dos repeticiones de la colonia que se prueba (sembradas a través de estriado en un área de 1 cm x 1 cm y separadas 1,5 cm del inóculo de *P. infestans*). Las cajas Petri se incubaron a 20°C. Las pruebas de antagonismo para *R. solani* fueron realizadas de la misma manera.

Las evaluaciones sobre el crecimiento de la bacteria y *P. infestans/R. solani* se realizaron valiéndose de un control (el mismo inóculo de *P. infestans/R. solani* sin bacteria) y tomando como base cualitativa la tabla 2.1:

**Tabla 2.1.** Escala de evaluación para las pruebas de antagonismo

Escala	Interpretación
-	El patógeno crece antes que la bacteria. Impide evaluación
0	El patógeno crece alrededor y/o sobre la bacteria.
1	El patógeno alcanza o no topa a la bacteria pero si se detiene su crecimiento.
2	El patógeno muestra un halo de inhibición.
3	El patógeno está cubierto por la bacteria total o parcialmente pero aún presenta crecimiento.
4	El patógeno está cubierto por la bacteria totalmente y no crece.

### 2.11 Caracterización molecular de las colonias formadoras de esporas

Para obtener DNA genómico de las colonias aisladas se utilizó una modificación del protocolo descrito en Weising *et al.*, (1995) que se detalla en el Anexo B.

Las muestras de DNA se diluyeron en 50 µl de tampón RTE y se mantuvieron en congelación a – 20°C. La concentración y calidad de DNA de

las muestras se evaluó en geles de agarosa 1% teñidos con bromuro de etidio (1.6%) y observados con luz UV. La concentración de las muestras de DNA se determinó utilizando el marcador Low DNA Mass Ladder de Promega y cuando la concentración era superior a 20 ng/μl se diluyeron a 10 ng/μl.

El protocolo de PCR utilizado fue una modificación de Benítez y Gardener (2009) con un volumen de reacción de 25 μl y se detalla en el Anexo C. Se utilizaron los *primers* 8F (5´- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3´) y 1492R (5´- ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3´).

El producto de PCR se sometió a digestión, durante tres horas a 37 °C utilizando las siguientes enzimas de restricción: *EcoRI*, *HaeIII*, *HindI*, *MspI* y *RsaI*. Las recomendaciones del fabricante se siguieron para ensamblar las reacciones correspondientes a cada enzima y el volumen final de reacción para cada una fue de 10 μl. La digestión se evaluó en geles de agarosa 2% teñidos con bromuro de etidio (1.6%) observados bajo luz UV.

## 2.12 Análisis de datos

Los datos obtenidos en los ensayos 1, 2 y 3 fueron analizados con el *software* SPSS Statistics 17.0. Los tres ensayos tuvieron un diseño completamente al azar con toma repetida de muestras. Los resultados fueron evaluados en tres tiempos: 1, 8 y 15 días.

Cuando los datos no seguían la distribución normal, se aplicaron las transformaciones sugeridas para ajustarlos a esta distribución (Bland y Altman, 1996). Cuando no se consiguió la normalidad, se aplicó la prueba no

paramétrica de Kruskal Wallis. Diferencias significativas entre los tratamientos se consideraron cuando  $p < 0.05$ .

Las imágenes obtenidas de las digestiones enzimáticas fueron procesadas utilizando el software de análisis de bandas Cross Checker Version 2.91 (J. B. Buntjer, 1999) y las matrices binarias generadas fueron editadas a mano, cuando fue necesario. Las matrices se procesaron con el software NTYSYSpc Version 2.02j (Applied Biostatistics Inc., 1998) en donde se realizaron los análisis de similitud y agrupamiento utilizando el coeficiente de Dice y el algoritmo UPGMA, respectivamente. Los dendogramas y el coeficiente cofenético se obtuvieron con el mismo programa.

## **CAPÍTULO 3. RESULTADOS**

### **3.1. Análisis de suelo**

Los análisis de suelo realizados en los laboratorios del INIAP y de Agrocalidad mostraron que las características físico-químicas de los suelos varían según el campo y tiempo de muestreo (Tabla 3.1). Se observó una considerable disminución en parámetros como el fósforo, azufre y conductividad eléctrica entre el tiempo 1 y tiempo 2 del campo Pisicaz (80% para el fósforo, 35% para el azufre y 49% para la conductividad eléctrica). Los datos de pH, materia orgánica, nitrógeno total, fósforo, hierro y cobre del tiempo 1, son estadísticamente diferentes ( $p < 0,005$ ) entre los campos Pisicaz y Pusniag. Del tiempo 2, los datos de pH, materia orgánica, nitrógeno total, fósforo, calcio, magnesio, hierro, manganeso, cobre, zinc, azufre y conductividad eléctrica son estadísticamente diferentes ( $p < 0,005$ ) entre ambos campos.

### **3.2. Estimación de la incidencia de infección de tubérculos de papa con *P. infestans***

Con el fin de estimar la incidencia del tizón tardío en tubérculos de papa, se adquirieron tubérculos de varias variedades y de diferente susceptibilidad en mercados de las ciudades de Sangolquí, Quito y Riobamba. Se observó pudrición bacteriana así como polilla de la papa (*Tecia solanivora*) mas ninguno de los tubérculos recolectados presentó infección de tizón tardío.

**Tabla 3.1.** Análisis físico químico de suelos de la provincia de Chimborazo, campo Pisicaz (a) y Pusniag (b), de ambos tiempos de muestreo. \*

a)

<b>Pisicaz</b>				
<b>Tiempo</b>	1		2	
	Promedio n=3	Desv.st	Promedio n=3	Desv.st
<b>pH</b>	6,18	0,04	6,53	0,07
<b>M.O</b>	3,58	0,25	3,65	0,20
<b>N. total</b>	0,18	0,01	0,18	0,01
<b>P</b>	50,33	5,86	10,33	16,17
<b>K</b>	0,33	0,06	0,23	0,03
<b>Ca</b>	4,23	3,91	3,84	0,33
<b>Mg</b>	1,40	0,33	1,53	0,05
<b>Fe</b>	17,43	2,15	18,43	1,75
<b>Mn</b>	3,00	0,30	2,83	0,15
<b>Cu</b>	2,37	0,21	2,37	0,32
<b>Zn</b>	1,37	0,15	1,00	0,00
<b>Boro</b>	0,33	0,06	0,45	0,15
<b>Azufre</b>	25,33	9,45	16,67	6,11
<b>Cond.</b>				
<b>Ele</b>	1,74	0,21	0,90	0,09
<b>Al</b>	0,24	0,05	0,24	0,05
<b>Al+H</b>	0,27	0,06	0,27	0,06

b)

<b>Pusniag</b>				
<b>Tiempo</b>	1		2	
	Promedio n=3	Desv.st	Promedio n=3	Desv.st
<b>pH</b>	5,80	0,12	5,69	0,18
<b>M.O</b>	1,66	0,25	1,14	0,54
<b>N. total</b>	0,08	0,01	0,06	0,02
<b>P</b>	110,67	6,66	94,67	20,60
<b>K</b>	0,28	0,03	0,18	0,13
<b>Ca</b>	1,68	0,32	2,02	0,58
<b>Mg</b>	0,77	0,12	0,82	0,30
<b>Fe</b>	24,70	2,17	28,83	0,51
<b>Mn</b>	3,45	0,21	5,57	0,51
<b>Cu</b>	4,13	0,12	4,17	0,29
<b>Zn</b>	1,57	0,12	1,60	0,10
<b>Boro</b>	0,21	0,09	0,30	0,10
<b>Azufre</b>	24,67	5,03	28,00	3,46
<b>Cond.</b>				
<b>Ele</b>	2,11	0,11	1,90	0,28
<b>Al</b>	0,27	0,00	0,30	0,06
<b>Al+H</b>	0,30	0,00	0,33	0,06

\* Ver el Anexo A con la interpretación de resultados de suelos otorgada por los laboratorios del Departamento de Suelos del INIAP y Agrocalidad.

### **3.3. Ensayo 1: Efectos del suelo sobre la capacidad del patógeno para infectar tubérculos**

Con el fin de evaluar el efecto del suelo sobre la capacidad de *P. infestans* para infectar tubérculos se realizaron pruebas no paramétricas de Kruskal Wallis para determinar si existen diferencias significativas entre los días de evaluación en cada tiempo de muestreo y en cada campo.

#### Campo Pisicaz

Para el campo Pisicaz, los días de evaluación presentaron diferencias significativas ( $p=0,000$ ) en ambos tiempos de muestreo. Los diagramas Box Plot (figuras 3.1 y 3.2) muestran las diferencias entre los días de evaluación. Sin embargo, se observó que, en ambos tiempos, durante el primer día de evaluación los porcentajes de infección se mantuvieron altos para ambas condiciones de suelo.

En el tiempo 1, el porcentaje de infección a los 8 días se redujo ampliamente para los suelos tinalizados. En el día 15 se registró un aumento en el porcentaje de infección para ambas condiciones; para finalizar después de los 15 días con un porcentaje de infección más bajo en los suelos tinalizados.

En el tiempo 2, el porcentaje de infección en el día 8, se mantuvo al 100% para los suelos no tinalizados mientras que se redujo para los tinalizados. En el día 15, disminuyó el porcentaje de infección para ambas condiciones de suelos. Después del día 15, el suelo tinalizado registra menores valores que los suelos no tinalizados.

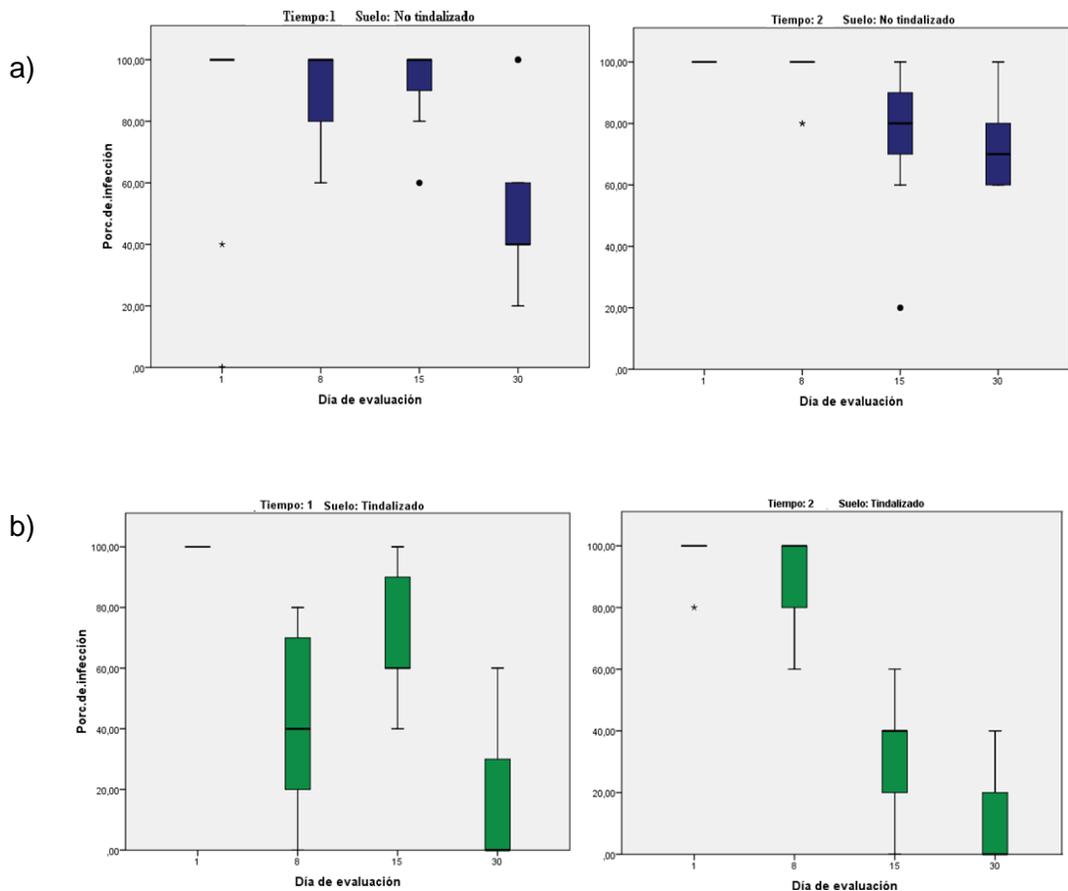


Figura 3.1. Variación en el porcentaje de infección de rodajas de papa de acuerdo al día de evaluación para el campo Pisicaz para los suelos no tinalizados (a) y tinalizados (b), n=16.

En el tiempo 1 y tiempo 2, para los porcentajes de infección se encontraron diferencias significativas ( $p=0,000$ ) entre las condiciones de suelo; los suelos no tinalizados tienen una mayor área bajo la curva que los tinalizados, por lo tanto mayor porcentaje de infección observado a lo largo de los diferentes tiempo de evaluación (figura 3.2).

No se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes de infección del tiempo 1 y el tiempo 2 para los suelos no tinalizados (área bajo la curva  $p=0,384$ ); sin embargo sí se encontraron diferencias significativas para los suelos tinalizados (área bajo la curva  $p=0,010$ ).

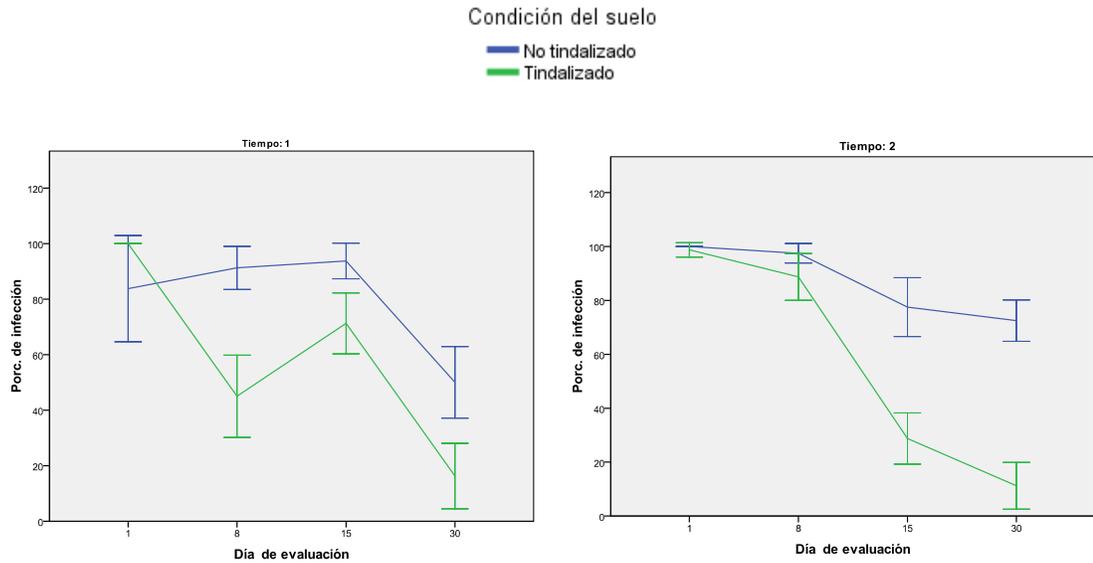


Figura 3.2. Comparación del porcentaje de infección de rodajas de papa de acuerdo a la condición del suelo para el campo Piscacaz en los días 1, 8, 15 y 30, al estar en contacto con suelo inoculado de ambos tiempos de muestreo, n=16, barras error: 95%.

### Campo Pusniag

Para el campo Pusniag, los días de evaluación presentaron diferencias significativas ( $p=0,000$ ) en ambos tiempos de muestreo. Los diagramas Box Plot (figura 3.3) muestran las diferencias entre los días de evaluación y entre los tiempos de muestreo para las dos condiciones de suelo.

En el tiempo 1, en el día 1, el suelo no tindalizado registró un menor porcentaje de infección, lo que se revierte durante el día 8 en donde se observó un menor porcentaje para los suelos tindalizados. En el día 15 del ensayo, ambas condiciones de suelo registraron un aumento en la infección, para finalizar con un menor porcentaje en los suelos tindalizados.

En el tiempo 2, ambas condiciones de suelo presentaron el máximo porcentaje de infección en el día 1. El porcentaje se redujo durante los siguientes días más en los suelos tinalizados que en los no tinalizados. Después de los 15 días, los suelos no tinalizados registraron un mayor porcentaje de infección.

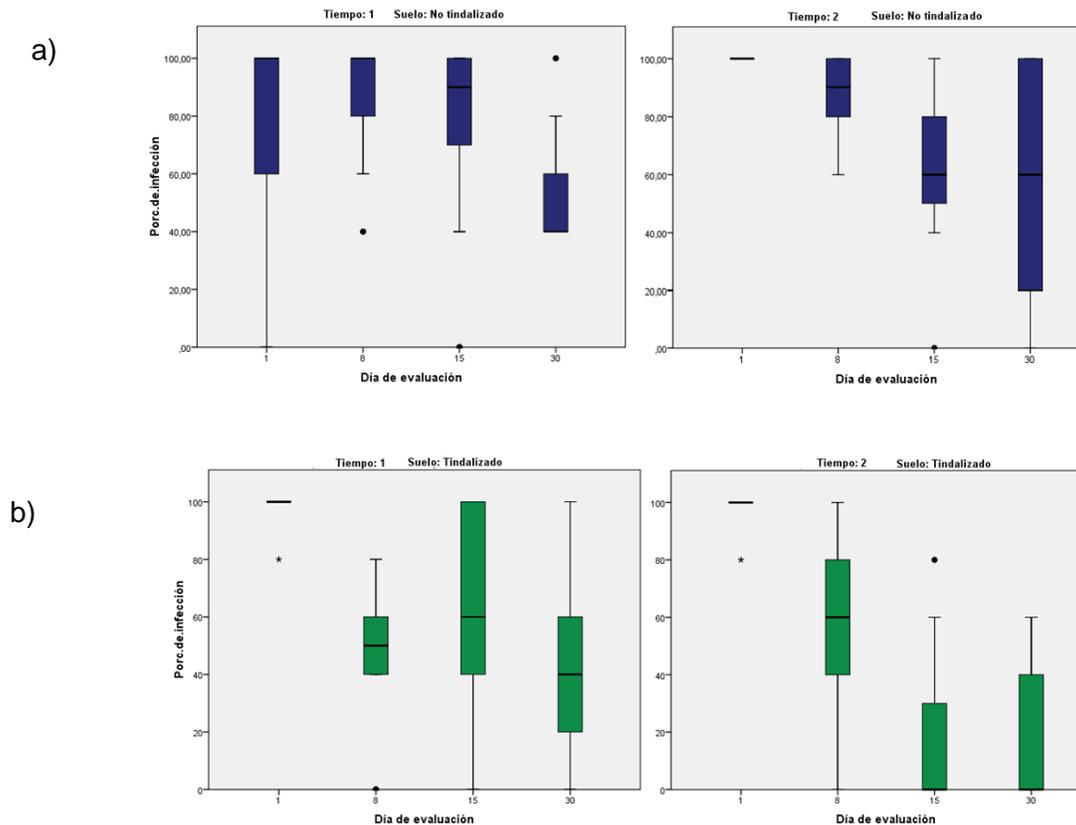


Figura 3.3. Variación en el porcentaje de infección de rodajas de papa de acuerdo al día de evaluación para el campo Pusniag para los suelos no tinalizados (a) y tinalizados (b), n=16

En el tiempo 1 y tiempo 2, se encontraron diferencias significativas ( $p = 0,000$ ) para los porcentajes de infección entre las condiciones de suelo; los suelos no tinalizados tienen una mayor área bajo la curva que los tinalizados (figura 3.4), por lo tanto un mayor porcentaje de infección observado a lo largo de los diferentes tiempos de evaluación. No se encontraron diferencias significativas de los porcentajes de infección entre el tiempo 1 y el tiempo 2

para los suelos no tindalizados (área bajo la curva  $p=0,610$ ); sin embargo sí se encontraron diferencias significativas para los suelos tindalizados (área bajo la curva  $p=0,000$ ).

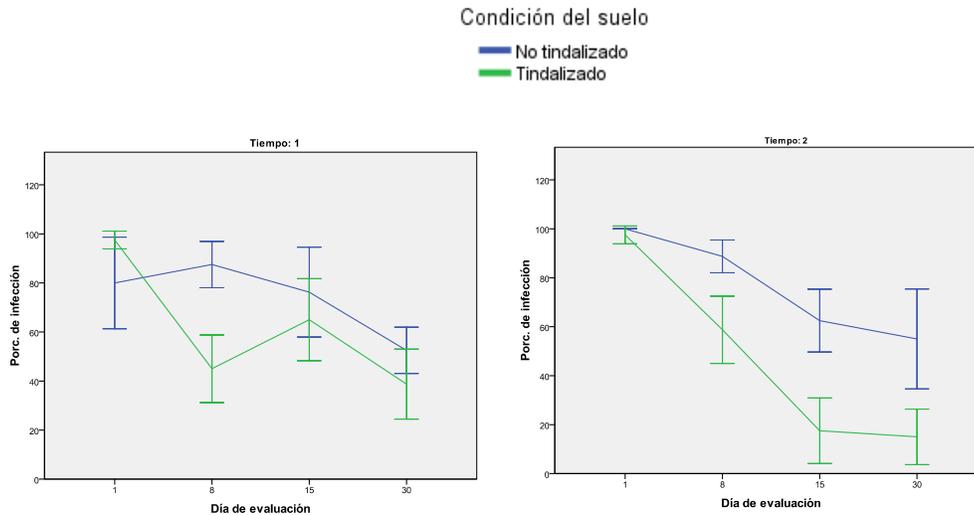


Figura 3.4. Comparación del porcentaje de infección de rodajas de papa de acuerdo a la condición del suelo para el campo Pusniag en los días 1, 8, 15 y 30, al estar en contacto con suelo inoculado de ambos tiempos de muestreo,  $n=16$ , barras error: 95%.

### 3.4. Ensayo 2: Efecto del suelo sobre los esporangios

Para determinar el efecto del suelo sobre los esporangios, estos fueron fijados y teñidos en una membrana de nitrocelulosa usando el tinte fluorescente Uvitex. En un microscopio de fluorescencia se examinaron las membranas y se registró el número de esporangios latentes, lisados y germinados presentes por muestra. La figura 3.5 muestra como se observa un esporangio germinado, latente y lisado utilizando un microscopio de fluorescencia. Se realizó una prueba estadística de Kruskal Wallis para determinar si existen diferencias significativas entre los días de evaluación para los esporangios en sus distintos estadíos.



Figura 3.5. Esporangio germinado, latente y lisado de *P. infestans* observados bajo luz UV en un microscopio de fluorescencia (20X). Los esporangios fueron teñidos con tinte fluorescente Uvitex sobre una membrana de nitrocelulosa.

Se determinó que en el tiempo 1, campo Pisciaz, existen diferencias significativas entre los días de evaluación para los esporangios germinados, latentes y lisados ( $p=0,000$ ). Para el campo Pusniag, se determinó que existen diferencias significativas entre los días de evaluación para los esporangios latentes ( $p=0,028$ ) y lisados ( $p=0,002$ ) mas no para los germinados ( $p=0,089$ ). Para el tiempo 2, en el campo Pisciaz, existen diferencias significativas entre los días de evaluación para los esporangios germinados ( $p=0,005$ ) y lisados ( $p=0,000$ ) pero no para los latentes ( $p=0,770$ ). En el campo Pusniag se encontraron diferencias significativas entre los días para los esporangios germinados ( $p=0,008$ ) pero no para los latentes ( $p=0,223$ ) y lisados ( $p=0,097$ ).

En el campo Pisciaz se observó un menor porcentaje de esporangios germinados durante el tiempo 1. El suelo no tindalizado mostró menor cantidad de esporangios germinados al final del ensayo en ambos tiempos de muestreo (figura 3.6 a). El porcentaje de esporangios latentes se mantuvo alto en ambos tiempos de muestreo y fue siempre mayor en los suelos no tindalizados (figura

3.6 b), al contrario del porcentaje de esporangios lisados que fue siempre mayor en los suelos tinalizados (figura 3.6 c).

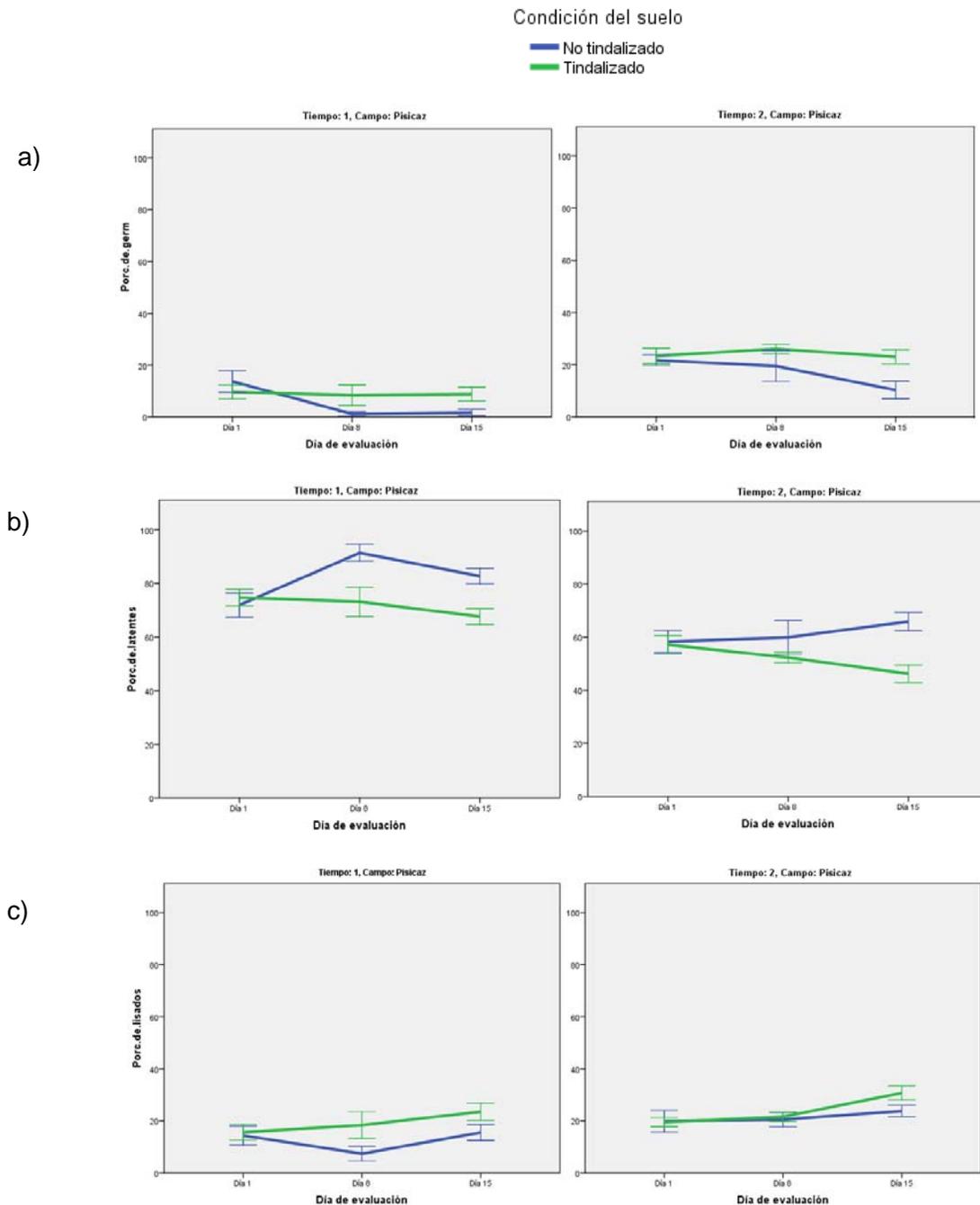


Figura 3.6 Porcentaje de esporangios germinados (a), latentes (b) y lisados (c) de muestras del campo Pisicaz, teñidos con tinte Uvitex sobre membranas de nitrocelulosa (n=16; barras de error corresponden al 95% de confianza). Se muestran los porcentajes registrados para ambas condiciones de suelo (tinalizado y no tinalizado), barras de error: 95%.

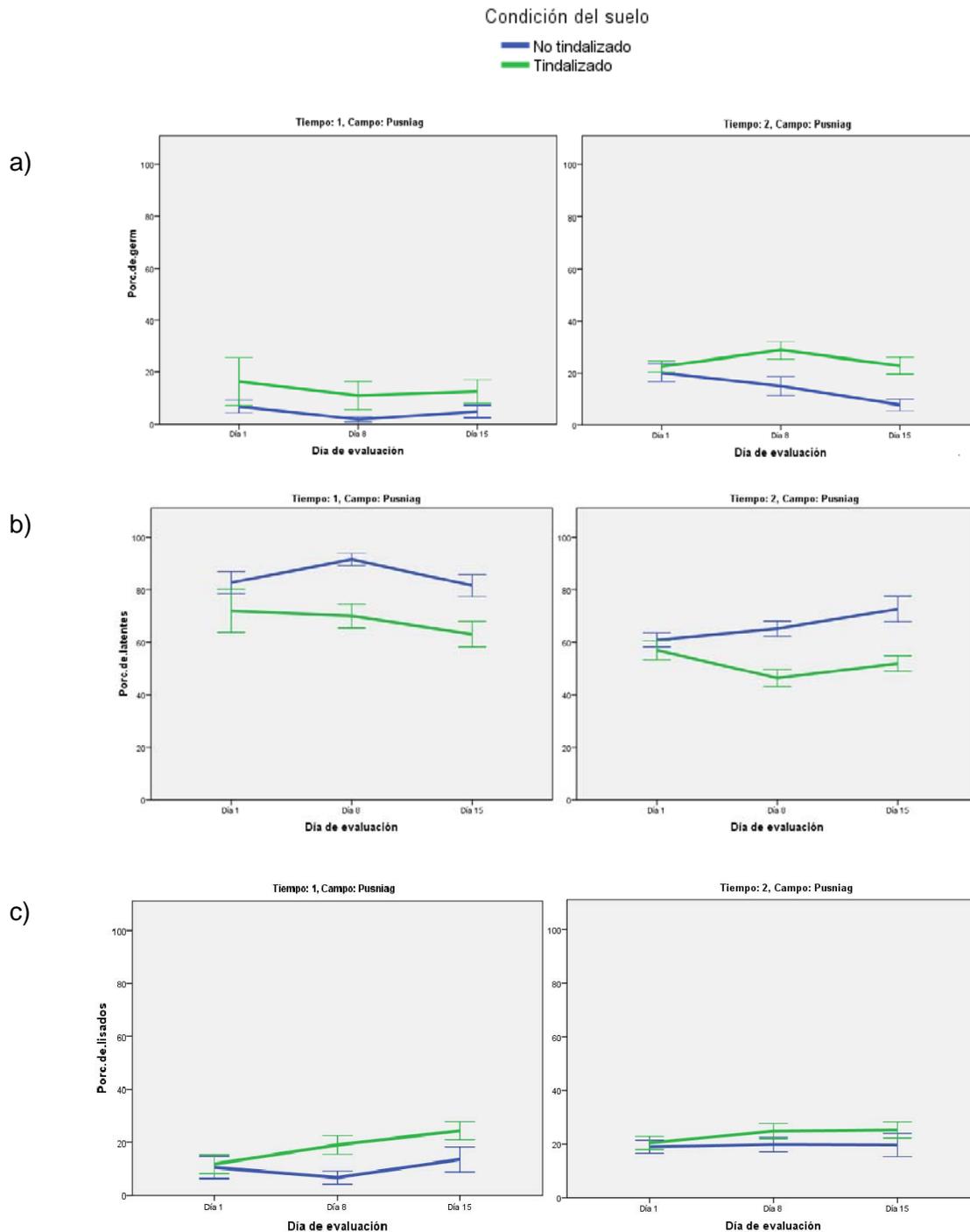


Figura 3.7 Porcentaje de esporangios germinados (a), latentes (b) y lisados (c) de muestras del campo Pusniag, teñidos con tinte Uvitex sobre membranas de nitrocelulosa (n=16; barras de error corresponden al 95% de confianza). Se muestran los porcentajes registrados para ambas condiciones de suelo (tindalizado y no tindalizado), barras de error: 95%.

En el campo Pusniag, se observó un porcentaje de esporangios germinados más bajo durante el tiempo 1 que en el tiempo 2. El suelo no tinalizado registró siempre un menor valor respecto al tinalizado (figura 3.7 a). El porcentaje de esporangios latentes mantuvo porcentajes considerables en ambos tiempos de muestreo siendo menor en el tiempo 2. Los suelos no tinalizados tuvieron mayores porcentajes de esporangios latentes que los tinalizados (figura 3.7 b). Por último, el porcentaje de esporangios lisados fue mayor durante todo el ensayo para los suelos tinalizados, en ambos tiempos de muestreo (figura 3.7 c).

### **3.5. Ensayo 3: Prueba de patogenicidad**

Para evaluar la patogenicidad de *P. infestans*, se utilizaron las membranas de nitrocelulosa del ensayo 2 para colocarlas entre dos rodajas de papa. Después del periodo de incubación se evaluó la presencia o ausencia de la infección. Se realizaron pruebas no paramétricas de Kruskal Wallis para determinar si existen diferencias significativas entre los días de evaluación en cada tiempo de muestreo y en cada campo.

#### Campo Pisicaz

Para el campo Pisicaz, los días de evaluación presentaron diferencias significativas ( $p=0,000$ ) en ambos tiempos de muestreo. Los diagramas Box Plot (figura 3.8) muestran las diferencias entre los días de evaluación y entre ambos tiempos de muestreo para las dos condiciones de suelo.

Se observó que, en el tiempo 1, el porcentaje de infección de los suelos tinalizados fue menor al de los suelos no tinalizados durante los días 8 y 15. En el día 1, el porcentaje de infección de los suelos no tinalizados es

variable y llegó incluso al 0%; aumentó durante el día 8 para volver a disminuir en el día 15. Al final del ensayo, los suelos tindalizados tuvieron un porcentaje de infección que llegó a 0%.

En el tiempo 2, los porcentajes de infección se mantienen altos durante los días 1 y 8 en ambas condiciones de suelo. A partir del día 15 se observa una drástica disminución para los suelos no tindalizados, mientras que continúa alta para los suelos tindalizados.

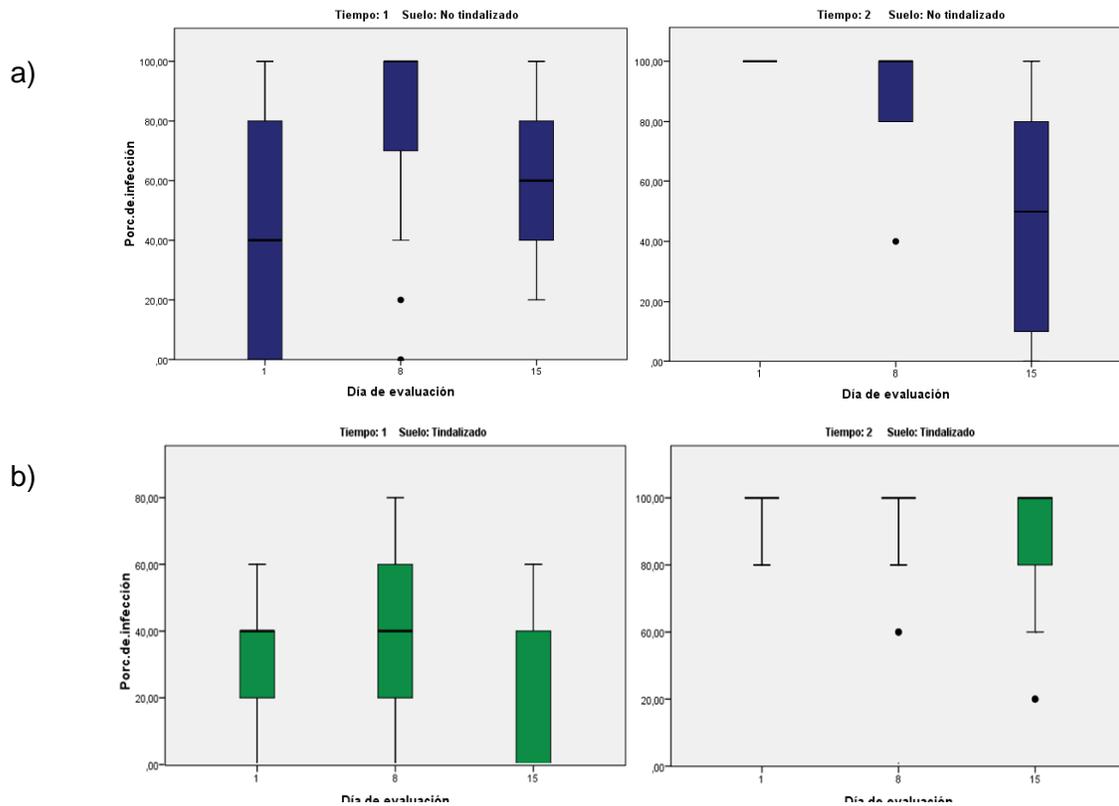


Figura 3.8 Variación en el porcentaje de infección de rodajas de papa de acuerdo al día de evaluación para el campo Pisicaz para los suelos no tindalizados (a) y tindalizados (b), n=16

En el tiempo 1, se encontraron diferencias significativas ( $p=0,000$ ) para los porcentajes de infección entre las condiciones de suelo; los suelos no tindalizados tienen una mayor área bajo la curva que los tindalizados (figura 3.9). Aunque en el tiempo 2 no se observaron diferencias significativas entre las condiciones del suelo ( $p=0,227$ ), el área bajo la curva de los suelos tindalizados es mayor que la de los suelos no tindalizados.

Se encontraron diferencias significativas para los porcentajes de infección entre el tiempo 1 y el tiempo 2 para los suelos no tindalizados (área bajo la curva  $p=0,033$ ) y tindalizados (área bajo la curva  $p=0,000$ ).

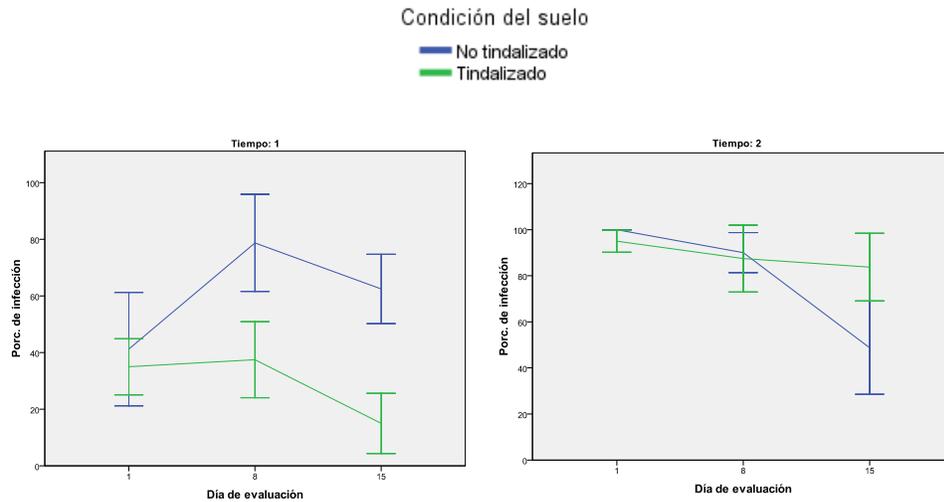


Figura 3.9. Comparación del porcentaje de infección de rodajas de papa de acuerdo a la condición del suelo para el campo Pisicaz en los días 1, 8, 15 y 30, al estar en contacto con suelo inoculado de ambos tiempos de muestreo,  $n=16$ , barras error: 95%.

### Campo Pusniag

Para el campo Pusniag, los días de evaluación presentan diferencias significativas ( $p=0,000$ ) en ambos tiempos de muestreo. Los diagramas Box Plot (figura 3.10) muestran las diferencias entre los días de evaluación y entre los tiempos de muestreo para las dos condiciones de suelo.

En el tiempo 1, el porcentaje de infección es mayor para los suelos no tinalizados durante todo el ensayo. El mayor porcentaje se registra en el día 8 (hasta de 100%), mientras que los menores porcentajes de infección para los suelos tinalizados se observan en los días 1 (50-70%) y 15 (40-80%).

En el tiempo 2, el porcentaje de infección se mantiene al máximo durante el día 1 para ambas condiciones de suelo. Durante el día 8, se observa una disminución en la infección de los suelos no tinalizados. Al final del ensayo, el porcentaje de infección es menor en los suelos no tinalizados, mientras que se mantiene alto para los suelos tinalizados.

En el tiempo 1, se encontraron diferencias significativas ( $p=0,000$ ) entre las condiciones de suelo para los porcentajes de infección; los suelos no tinalizados tienen una mayor área bajo la curva que los tinalizados (figura 3.11) y por lo tanto mayor porcentaje de infección observado a lo largo de los diferentes tiempos de muestreo. En el tiempo 2, aunque no se observaron diferencias significativas entre las condiciones del suelo ( $p=0,220$ ), el área bajo la curva para los suelos tinalizados es mayor.

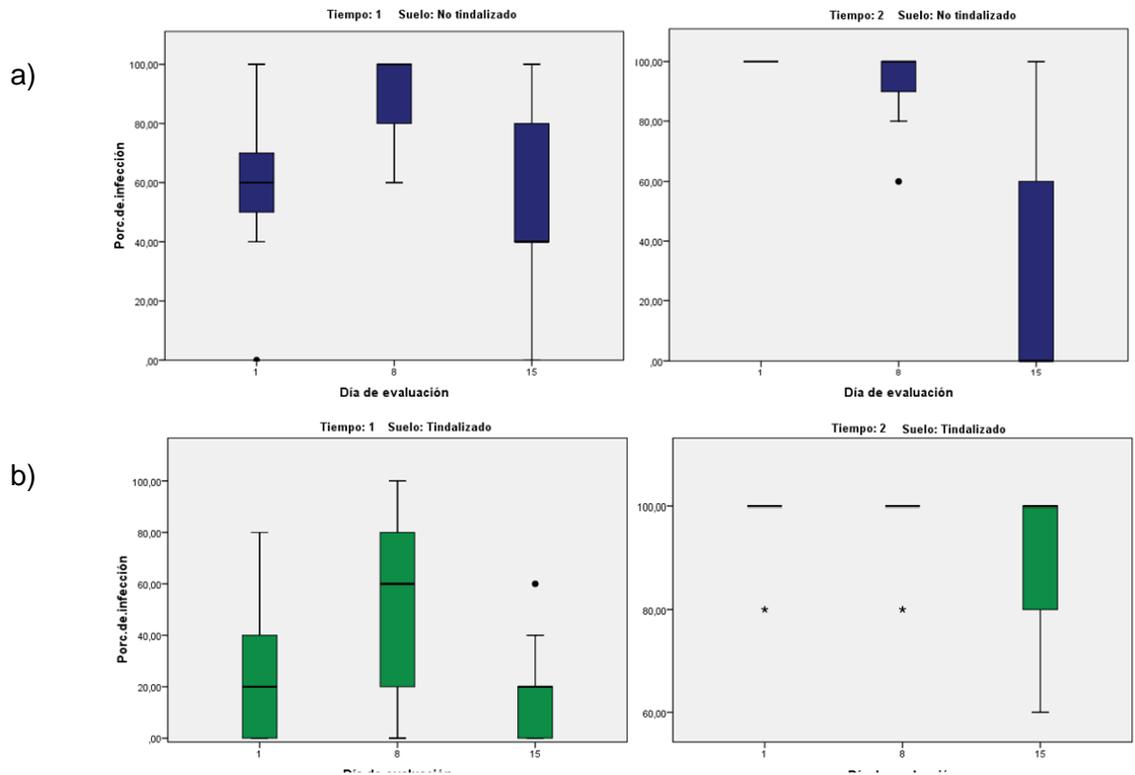


Figura 3.10 Variación en el porcentaje de infección de rodajas de papa de acuerdo al día de evaluación para el campo Pusniag para los suelos no tinalizados (a) y tinalizados (b),n=16

No se encontraron diferencias significativas de los porcentajes de infección entre el tiempo 1 y el tiempo 2 para los suelos no tinalizados (área bajo la curva  $p=0,366$ ); pero si se encontraron diferencias significativas para los suelos tinalizados (área bajo la curva  $p=0,000$ ).

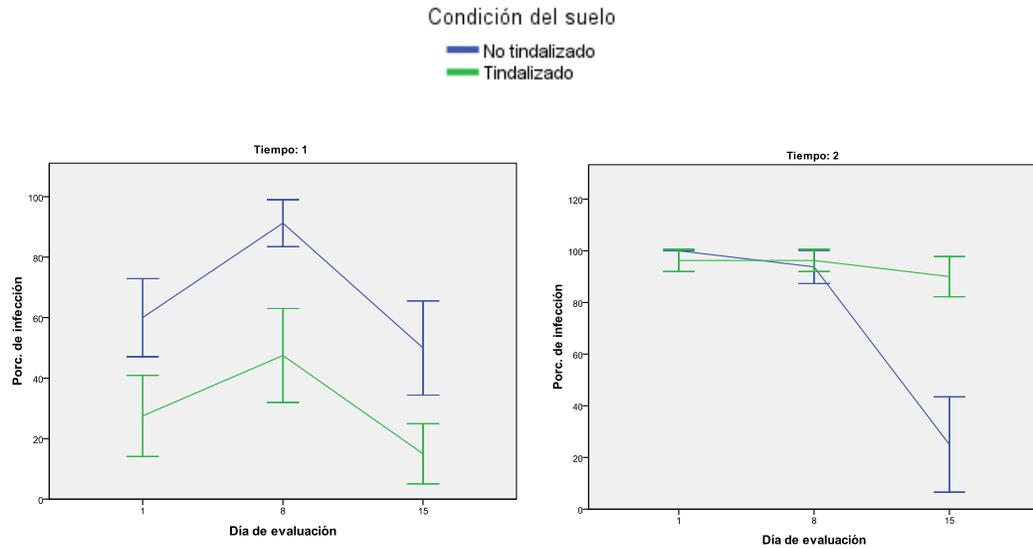


Figura 3.11 Comparación del porcentaje de infección de rodajas de papa de acuerdo a la condición del suelo para el campo Pisicaz en los días 1, 8, 15 y 30, al estar en contacto con suelo inoculado de ambos tiempos de muestreo, n=16, barras error: 95%.

### 3.6. Aislamiento, selección y pruebas de antagonismo de colonias formadoras de esporas

Se realizó un conteo de las colonias que sobrevivieron el tratamiento térmico, en agar TSA, incubadas durante 48 h por el método de recuento en placa. En las muestras del tiempo 1, a día cero, el promedio de UFC/g suelo en el campo Pisicaz es  $1,99 \times 10^4$  mientras que para el campo Pusniag es  $9,65 \times 10^3$ . En el tiempo 2, a día cero, el promedio de UFC/g suelo para el campo Pisicaz es de  $1,02 \times 10^4$ , mientras que para el campo Pusniag es de  $1,140 \times 10^4$ .

Del tiempo 1, se aislaron un total de 62 colonias bacterianas (28 del campo Pisicaz y 34 del campo Pusniag) y del tiempo 2 se obtuvieron 111

colonias (47 de Pisicaz, 64 de Pusniag). Las colonias fueron aisladas y conservadas en agar TSA 1/10. Todas fueron aisladas de muestras de día 0.

Para seleccionar las poblaciones microbianas con las que se realizaron las pruebas de antagonismo contra *P. infestans*, se consideraron dos criterios: características morfológicas y comportamiento inhibitorio hacia otras colonias de la misma dilución. Del tiempo 1 se seleccionaron 37 bacterias (24 de Pisicaz, 13 de Pusniag). Se obtuvieron mayor cantidad de colonias del campo Pisicaz; sin embargo, más colonias escala 3 proceden de muestras del campo Pusniag (ver detalle en Anexos D y E). Del tiempo 2 se seleccionaron 46 bacterias para las pruebas de antagonismo (10 de Pisicaz, 36 de Pusniag).

De los resultados de las pruebas de antagonismo se puede observar que a ninguna colonia que presente escala alta de supresión a *P. infestans* (escala 3) se le asignó una escala de supresión a *R. solani* diferente de (-), 0 ó 1.

Algunas colonias no pudieron ser evaluadas en la prueba de antagonismo a *R. solani* debido a que el patógeno creció antes que la colonia bacteriana y la cubrió impidiendo su evaluación, lo cual se consideró como una escala (-), inferior a 0 (Ver Metodología).

**Tabla 3.2.** Características de las colonias del tiempo 1 con capacidad de supresión a *P. infestans* seleccionadas para el análisis ARDRA

Campo	Nombre asignado	Morfología*				Prom. escala <i>P. infestans</i> **	Prom. escala <i>R. solani</i> **
		Color	Borde	Forma	Otros		
Pisicaz	T1 PIS 2.2	B	R	I	P	3	-
Pisicaz	T1 PIS 7	B	R	C	B, P	1	1
Pisicaz	T1 PIS 8	B	R	C	B, P	1	1
Pisicaz	T1 PIS 16	B	R	C	B, P	1	0
Pisicaz	T1 PIS 17	P	O	C	S	1	-
Pisicaz	T1 PIS 21.1	B	R	C	B,P	1	1
Pisicaz	T1 PIS 21.2	B	R	C	B,P	1	-
Pisicaz	T1 PIS 33	O	R	C		2	-
Pusniag	T1 PUS 3	B	R	C	P	3	-
Pusniag	T1 PUS 11	B	I	C	P	3	-
Pusniag	T1 PUS 14	B	R	C	B, P	1	0
Pusniag	T1 PUS 33	B	R	C	P	3	-

\* Color: B (blanca), P(parda),O(otro) Borde: R(regular), O(ondulado), I(irregular)

\* Forma: I(irregular), C(circular) Otros: P(pequeña), B(brillante), S(seca)

\*\* Medio TSA 1/10, tres repeticiones para cada muestra

Para los posteriores procesos de extracción de DNA y caracterización molecular se seleccionaron las bacterias con mejor comportamiento supresivo, para *P. infestans*, otorgando un total de 12 colonias del primer tiempo (Tabla 3.2) de muestreo y 20 del segundo tiempo (Tabla 3.3).

**Tabla3.3.** Características de las colonias del tiempo 2 con capacidad de supresión a *P. infestans* seleccionadas para el análisis ARDRA

Campo	Nombre asignado	Morfología				Prom. escala <i>P. infestans</i>	Prom. escala <i>R. solani</i>
		Color	Borde	Forma	Otros		
Pisicaz	T2 PIS 7	B	O	C		2	1
Pisicaz	T2 PIS 8	B	O	C	B	1	2
Pisicaz	T2 PIS 23	B	R	C	G, S	1	2
Pisicaz	T2 PIS 46	B	O	C		1	0
Pusniag	T2 PUS 1	P	O	C	S	2	2
Pusniag	T2 PUS 2	B	R	C		2	2
Pusniag	T2 PUS 3	B	R	C		2	0
Pusniag	T2 PUS 4	B	R	C		2	1
Pusniag	T2 PUS 13	B	R	C		2	-
Pusniag	T2 PUS 19	P	I	C	S	2	0
Pusniag	T2 PUS 21	B	R	C	G, S	2	-
Pusniag	T2 PUS 27	B	R	C		2	0
Pusniag	T2 PUS 28	B	R	C		3	0
Pusniag	T2 PUS 33	R	R	C	P	3	-
Pusniag	T2 PUS 34	B	R	C		3	-
Pusniag	T2 PUS 37	P	R	C	S	2	2
Pusniag	T2 PUS 42	B	I	R	G	2	2
Pusniag	T2 PUS 50	B	R	C	G	1	-
Pusniag	T2 PUS 51	B	O	C	G	2	1
Pusniag	T2 PUS 55	B-P	R	C	S	2	1

\* Color: B (blanca), P(parda), R(roja) Borde: R(regular), O(ondulado), I (irregular)

\* Forma: C(circular), R(rizoide) Otros: P(pequeña), G (grande), B(brillante), S(seca)

\*\* Medio TSA 1/10, tres repeticiones para cada muestra

### 3.7. Caracterización molecular de las colonias formadoras de esporas

El protocolo de amplificación del gen 16S fue optimizado para los primers 8F y 1492R, agregando BSA en concentración final de 1mg/mL. Treinta ciclos fueron suficientes para obtener un producto de PCR robusto y específico.

Para el análisis ARDRA se consideraron tres de las cinco enzimas: *HaeIII*, *MspI* y *RsaI*, descartando las enzimas *EcoRI* y *HindIII*. La enzima *EcoRI* presentó los mismos sitios de corte en todas las muestras, mientras que la enzima *HindIII* no tuvo sitio de corte en ninguna de las muestras amplificadas.

El dendograma obtenido, que considera las colonias de ambos tiempos y los resultados de la digestión de las enzimas *HaeIII*, *MspI* y *RsaI* (Figura 3.12), muestra que todas las colonias aisladas tienen un índice de similaridad mayor a 0,24. Se aprecia que los *clusters* obtenidos, en la mayoría de los casos, agrupan por separado a las colonias del tiempo 1 (recuadros azules) de las del tiempo 2 (recuadros rojos). Solo existen dos *clusters* que agrupan a colonias del tiempo 1 con colonias del tiempo 2 y se muestran en un recuadro verde.

El coeficiente de correlación cofenética muestra una muy buena relación entre los datos de similaridad y los *clusters* obtenidos en el dendograma ( $r=0,87903$ ), es decir que los *clusters* mostrados reflejan bien la similaridad existente entre las colonias.

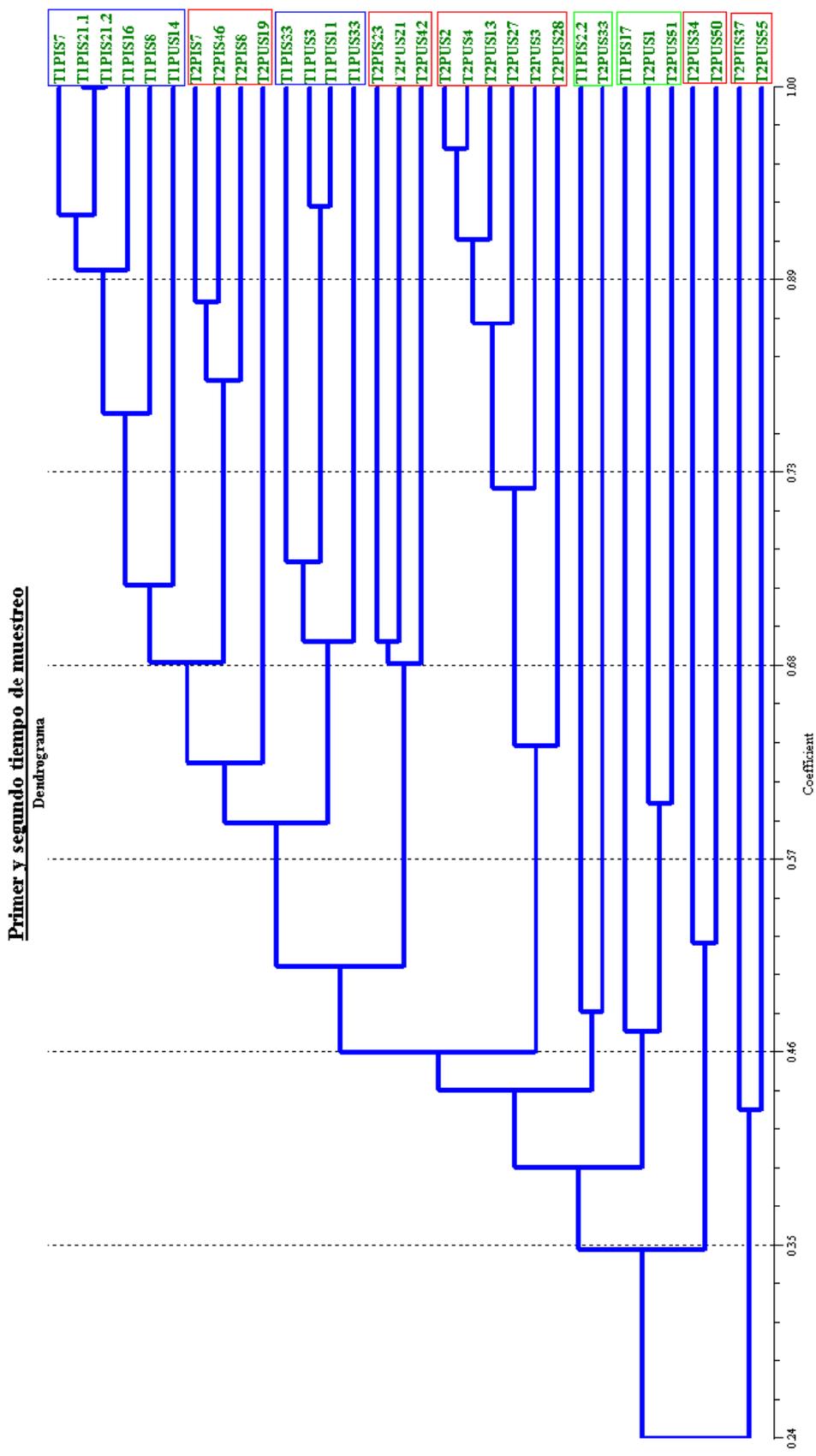


Figura 3.12. Dendrograma del análisis ARDRA de colonias aisladas de ambos tiempos de muestreo cuyo producto de PCR del gen 16S fue digerido con las enzimas *HaeIII*, *MspI* y *RsaI* El dendrograma fue obtenido con el software NTYSYSpc Versión 2.02j (Applied Biostatistics Inc., 1998) utilizando el coeficiente de similitud Dice y el algoritmo de agrupamiento UPGMA.

## **CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN**

En este trabajo se pretende estimar la incidencia de la infección de tizón tardío en tubérculos de papa, así como determinar si los factores bióticos del suelo ejercen influencia en la capacidad del patógeno de infectar los tubérculos. Adicionalmente, se aislaron microorganismos formadores de esporas, resistentes al calor, a partir de muestras de suelo y se determinó el perfil genético de las poblaciones aisladas a través de la técnica molecular denominada ARDRA. Por último, se pretende establecer el efecto del tiempo del muestreo en la capacidad supresora de los suelos a *P. infestans* y en los perfiles genéticos de las poblaciones aisladas. Los resultados de estos ensayos y análisis se discuten a continuación.

### **4.1 Análisis de suelos**

Los análisis de suelo realizados mostraron que las características físico-químicas de los suelos varían según el campo y tiempo de muestreo. En algunos parámetros, como el fósforo, azufre y conductividad eléctrica se observaron variaciones drásticas entre tiempo 1 y tiempo 2. Estas diferencias pueden deberse a que durante el tiempo 2, los campos muestreados se encontraban en periodo de cosecha (Pusniag) y post-cosecha (Pisicaz). La disminución puede explicarse por el hecho de que una vez que se hubieron cosechado los tubérculos, no se continuó con la aplicación de compuestos químicos (pesticidas, fungicidas, fertilizantes) y por lo tanto su concentración disminuyó en el tiempo 2. La reducción de la concentración del fósforo es la más notable y tal como mencionan Tomljenovic y Schrader (2001), los

compuestos fosforados son menos persistentes en el medio que los compuestos clorados y por lo general son hidrolizados y/u oxidados. Son necesarios análisis físico-químicos de los suelos sometidos a tinalización, de manera que puedan observarse los efectos del proceso térmico sobre las características de los suelos así como en la diversidad microbiana.

El tipo de suelo de los campos muestreados es arenoso, el cual pierde su capacidad de infección más rápido que los suelos arcillosos o limosos, según lo reportado por Andrivon (1995). El manejo de los suelos influyó también en los resultados de análisis. El campo Pusniag, se mantiene en constante proceso productivo (en alternancia de cultivo con cereales) por lo que se fumiga y abona con frecuencia, mientras que el campo Pisicaz mantiene un permanente monocultivo de papas nativas, iniciado por primera vez durante el primer tiempo de muestreo de este proyecto. Es importante el efecto que tienen las plantas cultivadas en la rizósfera. Como lo menciona García (2009) la planta libera diversos tipos de sustancias al ambiente rizosférico como proteínas, aminoácidos, azúcares, metabolitos secundarios e incluso gases. A estas sustancias se les atribuyen funciones diversas como el enriquecimiento del suelo, la simbiosis o la acción antimicrobiana que afecta a la comunidad bacteriana. En el campo Pisicaz, no se aplicaban pesticidas ni abonos pero si fertilizantes. García y Dorrnsoro (2010) mencionan que los fertilizantes aportan a la concentración de diversos elementos en el suelo. Es quizás por esta razón que la concentración de N total, Ca y Mg en el campo Pisicaz es mayor que en el campo Pusniag. Rimé *et al.* (2003) encontraron que diferencias aparentemente pequeñas en la composición del suelo entre campos localizados en la misma área climática y manejados de manera similar, pueden traducirse en diferencias en su comportamiento supresivo.

## **4.2 Estimación de la incidencia de infección de tubérculos de papa con *P. infestans*.**

La nula incidencia de infección en tubérculos de papa con *P. infestans*, confirma lo reportado por Garzón (1999) donde se menciona que la reducción de la infección permite presumir algún factor en los suelos que suprime al patógeno e impide el desarrollo de la enfermedad en los tubérculos de papa. Andrivon (1995) refiere que puede presumirse un mecanismo dual de fungistasis y destrucción del inóculo en los suelos supresivos por factores tan variados como la acción tóxica de elementos como el aluminio, el cobre (Stephan *et al.*, 2005), acción antagonista ejercida por la microbiota propia del suelo (Park, 1963, Erwin y Ribeiro, 1996, Stephan *et al.*, 2005), prácticas agronómicas que se llevan a cabo en el suelo (Borneman y Becker, 2007) e incluso la profundidad a la que se encuentra el tubérculo (Porter *et al.*, 2005).

Es importante mencionar que no se han observado cambios en la incidencia de la infección en más de diez años (Garzón, 1999), incluso cuando podría esperarse que el patógeno interactuara de manera diferente infectando severamente los tubérculos. Aún así, y considerando que las muestras de tubérculos para este ensayo se consiguieron en una de las provincias con mayor producción de papa (Chimborazo) se tiene un claro panorama sobre lo que puede estar ocurriendo en las demás provincias de producción papera en el país.

## **4.3 Ensayo 1: Efectos del suelo sobre la capacidad del patógeno para infectar tubérculos**

Durante el ensayo 1, efectos del suelo sobre la capacidad del patógeno para infectar tubérculos, el comportamiento de la infección fue similar en el

campo Pisicaz y el campo Pusniag, probablemente debido a la similitud hallada entre las colonias bacterianas aisladas de ambos campos.

En el mismo ensayo, aún se mantuvo un porcentaje de infección considerable a los 15 días. Por lo tanto, se puede inferir que el patógeno continúa viable por algún tiempo después de los 15 días de exposición al suelo. Garzón (1999) reportó que puede alcanzar incluso los 30 días o más. Andrivon (1995) menciona que suelos artificial o naturalmente contaminados con esporangios son infectivos para los tubérculos incluso hasta 77 días, dependiendo del tipo de suelo, contenido de humedad y pH. Por esta razón, son necesarios nuevos estudios que evalúen el comportamiento del patógeno en periodos de tiempo menos distantes entre sí.

Aunque los resultados de los análisis de suelo muestren diferencias entre los campos muestreados, el comportamiento es similar. En ambos campos, durante el tiempo 1 y el tiempo 2, se observó un menor porcentaje de infección al final del ensayo para los suelos tindalizados. Es probable que al proceso de tindalización hubieran sobrevivido esporas de microorganismos con capacidad supresora, explicando la reducción en el porcentaje de infección. Por otro lado, es importante también el efecto de diversos factores del suelo. Rimé *et al.*, (2003) sugieren que las características físico-químicas de los suelos determinan el comportamiento supresivo de los mismos. Tal como menciona Andrivon (1995), este hecho demuestra la influencia de las características del suelo sobre la capacidad del patógeno de infectar con éxito.

El ensayo 1 mostró también que la condición y tipo de suelo es un factor que determina el comportamiento de la infección. Los suelos arenosos, como los de los campos muestreados, pierden su capacidad de infección con

mayor facilidad que otros tipos de suelos como los arcillosos o limosos (Andrison, 1995). La menor persistencia de la enfermedad en los suelos arenosos muestreados puede explicarse por la escasez de esporangios que se origina cuando estos atraviesan la textura permeable del suelo durante el periodo de incubación tras la inoculación o debido a que el suelo pierde humedad con mayor rapidez afectando la viabilidad de los esporangios e induciendo en estos latencia o lisis.

#### **4.4 Ensayo 2: Efecto del suelo sobre los esporangios**

El ensayo 2 mostró que para la supresión de la enfermedad, actúan contra el patógeno los factores bióticos y abióticos presentes en el suelo. Los suelos no tindalizados tenían una menor cantidad de esporangios germinados al final del ensayo y mayor cantidad de esporangios latentes, confirmando lo concluido por Garzón (1999).

El ensayo 2, efecto del suelo sobre los esporangios, demostró que la condición del suelo influye en el estadio de los esporangios mas no influye el tiempo de muestreo o el campo. Es así que, en ambos tiempos de muestreo y en los dos campos muestreados, el porcentaje de esporangios germinados y lisados fue mayor para los suelos tindalizados, mientras que el porcentaje de esporangios latentes fue mayor para los suelos no tindalizados. La mayor proporción de esporangios latentes puede deberse a la pérdida de humedad del suelo arenoso (Andrison, 1995) o a la competencia entre los esporangios del patógeno y la microflora por los recursos presentes en el suelo o por el espacio. Como lo mencionan Gamboa *et al.* (2004), un tipo de control biológico es el resultante de la competencia por recursos se observa cuando dos microorganismos que comparten un nicho rivalizan por los mismos

sustratos. Es también un método de control biológico, la competencia por el espacio. La efectividad del antagonista depende también de su habilidad para reproducirse y alcanzar un nivel que evite que el patógeno se establezca o multiplique (Bautista, 2006).

La lisis de los esporangios en los suelos tinalizados se debe a factores físico-químicos del suelo. El efecto que tienen los valores de pH y el contenido de aluminio en los esporangios ha sido mencionado ya por Andrivon (1995) donde el patógeno fue inhibido a concentraciones de entre 2.5-100mg/L de cloruro o sulfato de aluminio. Mientras mayor es el contenido de aluminio de un suelo, mejor es su efecto fungistático y fungitóxico. Por lo tanto, los valores de aluminio bajos de los suelos muestreados explican que el porcentaje de esporangios lisados sea pequeño en los dos campos y en ambos tiempos de muestreo, en comparación al alto porcentaje de esporangios latentes.

La relación existente entre el contenido de materia orgánica alto de los suelos y el bajo porcentaje de esporangios germinados concuerda con lo mencionado por Garzón (1999) y Erwin *et al.* (1995). Un alto contenido de materia orgánica (>2%) puede causar que en los suelos exista mayor diversidad de poblaciones microbianas debido a que la materia orgánica retiene nutrientes y mantiene la humedad (Willey *et al.*, 2004). Son estas comunidades microbianas abundantes la que pueden afectar el estadio de los esporangios. Si existe una mayor diversidad de poblaciones microbianas, mayor es el efecto antagonista que tienen estas sobre los esporangios y por lo tanto menor es la germinación y lisis de los mismos y mayor el estado de latencia.

Un bajo contenido de nitrógeno (0,0 – 0,15%) propicia un mayor porcentaje de esporangios latentes. De esta forma, se confirma lo demostrado en estudios llevados a cabo con antagonistas de patógenos de suelo (Erwin y Ribeiro, 1996) como *Trichoderma koningii*, en donde se menciona que mientras menor es el contenido de nitrógeno, menor es la actividad de biocontrol ejercida por el antagonista (Duffy *et al.*, 1997). Valores altos de azufre y fósforo tienen un efecto negativo en la germinación de esporangios, propiciando su latencia, lo que concuerda con lo descrito por Erwin *et al.*, (1995). Niveles medios (campo Pisicaz) o altos de cobre (campo Pusniag), disminuyen la posibilidad de latencia de los esporangios (Stephan *et al.*, 2005). Ghorbani *et al.* (2005) mencionan que esta es la razón por la cual los fungicidas contra *P. infestans* en base al cobre son tan efectivos.

#### **4.5 Ensayo 3: Prueba de patogenicidad**

El ensayo 3, prueba de patogenicidad, también demostró que la condición y los factores químicos del suelo, son importantes para el desarrollo de la infección. Los datos sobre el estadio de los esporangios del ensayo 2, explican el comportamiento de los ensayos 1 y 3. Por ejemplo, cuando la infección en los suelos tinalizados es más baja que en los no tinalizados, se observó una menor latencia y mayor lisis en las placas correspondientes a los suelos tinalizados. De igual forma, cuando la infección es mayor en los suelos tinalizados, las placas correspondientes mostraron mayor cantidad de esporangios germinados.

En el tiempo 1, se observó que el porcentaje de infección es mayor para los suelos no tinalizados. Esto puede deberse a que la comunidad microbiana no fue totalmente capaz de ejercer su efecto de supresión debido a

la alta concentración de fósforo que afecta a la comunidad antagonista de los suelos (Erwin *et al.*, 1995).

En el tiempo 2, se dio lo contrario del tiempo 1. Al finalizar el ensayo se observó un mayor porcentaje de infección en los suelos tinalizados, probablemente porque la comunidad microbiana ejerció de mejor manera su efecto supresivo al disminuir la concentración de fósforo (de manera más notable en el campo Pisicaz) respecto al tiempo 1.

#### **4.6 Aislamiento, selección y pruebas de antagonismos de colonias formadoras de esporas**

En lo que respecta al aislamiento de poblaciones bacterianas formadoras de esporas, se aislaron más colonias del tiempo 2 (111 colonias) que del tiempo 1 (62 colonias); Un total de 13 colonias tuvieron al mismo tiempo capacidad de inhibición para *P. infestans* y *R. solani*. Se aislaron más colonias con alta capacidad de supresión a *P. infestans* en el campo Pusniag, tiempo 2. Garbeva *et al.* (2003) explican que el número de esporas cultivables varía según el manejo del suelo. Probablemente se aislaron más colonias del tiempo 2 debido a que las condiciones de cosecha y post-cosecha (menor cantidad de materia orgánica disponible, baja o nula aplicación de abonos y fertilizantes) de los campos, propician en las bacterias comportamientos más competitivos favoreciendo la formación de endosporas y la síntesis de compuestos antibióticos, volviéndolas más elegibles que las del tiempo 1 durante el proceso de selección.

Una alta capacidad inhibidora a *P. infestans* no significó, en todos los casos, también una alta inhibición a *R. solani*. De hecho, ninguna de las colonias asignadas con escala 3 de inhibición a *P. infestans* tuvo una escala de inhibición alta para *R. solani*. Castillo (2004) explica que las bacterias ejercen su efecto antagonista de manera diferente dependiendo del patógeno con el que se ensayan. Rodríguez (2002) explica que, dependiendo del patógeno, los controladores biológicos producen compuestos antibióticos, compiten por los nutrientes o parasitan al patógeno. Esto permite presumir que aunque las colonias aisladas muestran buena supresión a *P. infestans* (oomicete cuya pared celular está formada por celulosa) no necesariamente se comportan de igual manera con *R. solani* (hongo cuya pared celular está formada por quitina). Si bien algunas especies del género *Bacillus*, son agentes muy adecuados para el control biológico de diversos organismos patógenos de los géneros *Pythium* y *Phytophthora*, gracias debido a la producción de bacteriocinas, antibióticos, el potencial antifúngico de algunas enzimas extracelulares (hidrolasas) es aún desconocido a pesar de su potencia (Mojica *et al.*, 2009).

#### **4.7 Caracterización molecular de las colonias formadoras de esporas**

En diversos estudios de similaridad en procariotas, se han utilizado amplicones del gen 16S puesto que contienen regiones altamente conservadas (debidas a cruciales limitaciones funcionales y estructurales) pero al mismo tiempo, poseen regiones de gran variabilidad que sirven para distinguir una especie de otra (Porwal *et al.*, 2009). Un método útil y sencillo para determinar relaciones filogenéticas comprende justamente la comparación de patrones de secuencias 16S obtenidos a través de digestiones enzimáticas (Heyndrickx *et al.*, 1996) o análisis ARDRA.

Para llevar a cabo un análisis ARDRA o cualquier otro análisis de similitud que involucre digestión enzimática, es necesario que las enzimas de restricción utilizadas otorguen patrones claramente distinguibles, de ser posible únicos, entre muestras diferentes (Wu, *et al.*, 2006 y Porwal *et al.*, 2009). Para el análisis ARDRA de este proyecto, se utilizaron las enzimas *HaeIII*, *MspI* y *RsaI*, que fueron las mejores para discriminar las colonias aisladas, confirmando los resultados de Heyndrickx, *et al.*, 1996, Blanc *et al.*, 1997, Wu, *et al.*, 2006 y Porwal *et al.*, 2009.

En lo que respecta al análisis ARDRA, evaluando el dendograma obtenido se observó que las colonias se agrupan principalmente tomando en cuenta el tiempo de muestreo. Se demuestra que si bien, la similaridad entre las colonias es alta, existen diferencias entre las colonias aisladas del tiempo 1 con las aisladas del tiempo 2, probablemente debido a las diferencias en la disponibilidad de nutrientes por el manejo de los suelos en los campos muestreados.

Por otra parte, en algunos de los clusters, las colonias se agrupan en función de sus características morfológicas y su escala de inhibición a *P. infestans*. Este resultado sugiere que las características morfológicas de las colonias microbianas podrían ser asociadas a comportamientos más o menos supresivos frente a *P. infestans* además de aportar más información a la insuficiente caracterización morfológica (Blanc *et al.*, 1997). Aunque los muestreos fueron realizados en los mismos campos y dentro de la misma provincia, el tiempo es un factor importante en la agrupación de las colonias (coeficiente =0,24) en el dendograma.

El trabajo realizado es relevante puesto que en el Ecuador, no se reportan pérdidas debidas al tizón tardío en los tubérculos de papa, situación que se presenta con frecuencia en otros países (Carrasco *et al.*, 1997, Ortíz *et al.*, 1998, Garzón, 1999). Por otro lado, se aporta información acerca del comportamiento de la infección de tizón tardío en suelos de Chimborazo, la provincia con mayor área cultivada y una de las de mayor producción de papa en el país (Andrade, J. com. pers.) donde la mayor parte de productores son minoristas que sobreviven en condiciones de pobreza extrema y donde se hace necesaria la ejecución de mejores prácticas agronómicas y de manejo de suelos. Adicionalmente, se ha generado un banco de 173 colonias bacterianas formadoras de esporas, de las cuales 32 inhiben el crecimiento de *P. infestans* y 13 colonias que mostraron al mismo tiempo efectos supresivos ante *P. infestans* y *R. solani*.

## CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

- La incidencia del tizón tardío en los tubérculos de papa de varios mercados del país es nula. La ausencia de la infección permite presumir que los suelos de las provincias de producción papera en el Ecuador son supresivos a *Phytophthora infestans*.
- Los ensayos realizados con suelos tindalizados y no tindalizados mostraron que en la supresión de la enfermedad intervienen tanto factores bióticos como abióticos de los suelos.
- En el ensayo de efectos del suelo sobre la capacidad del patógeno para infectar tubérculos, los suelos tindalizados mostraron un menor porcentaje de infección, en ambos campos muestreados y en los dos tiempos de muestreo.
- En el ensayo de efecto del suelo sobre los esporangios, el porcentaje de esporangios germinados y lisados fue mayor para los suelos tindalizados, mientras que el porcentaje de esporangios latentes fue mayor para los suelos no tindalizados.

- En el ensayo de prueba de patogenicidad, se obtuvieron resultados diferentes para cada tiempo de muestreo. La mayor infección en los suelos no tinalizados del tiempo 1 puede deberse a la acción del fósforo sobre las comunidades bacterianas antagonistas.
- De los ensayos 1 y 3, se puede inferir que el patógeno es capaz de mantenerse viable después de los 15 días y aún por más tiempo.
- Un total de 32 colonias bacterianas formadoras de esporas mostraron actividad supresora contra *Phytophthora infestans*. La mayor parte de estas colonias proviene del segundo tiempo de muestreo, campo Pusniag.
- Las enzimas HaeIII, MspI y RsaI fueron las más adecuadas para diferenciar especies formadoras de esporas. El dendograma obtenido agrupa a las colonias bacterianas principalmente en función del tiempo de muestreo y en menor proporción en función de sus características morfológicas.
- Se acepta la hipótesis propuesta que establece que las poblaciones microbianas de los suelos de Chimborazo, aisladas en dos diferentes tiempos de muestreo, ejercen un efecto supresivo en el crecimiento de *Phytophthora infestans*.

## CAPÍTULO 6. RECOMENDACIONES

- Recolectar las muestras de suelo en zonas de fácil acceso para que, en caso de ser necesario, las muestras puedan recolectarse nuevamente sin mayor problema.
- Realizar un análisis físico-químico de los suelos tinalizados para observar de que manera afecta este proceso térmico a las características del suelo.
- Mantener un control de suelo no inoculado para los distintos ensayos así como realizar las evaluaciones más frecuentemente para observar de con mejor detalle la evolución de la infección en el tiempo.
- Realizar ensayos de sensibilidad de *P. infestans* en cajas Petri utilizando compuestos fosforados, compuestos de aluminio y cobre para observar de forma directa el efecto de los mismos sobre el patógeno.
- Continuar con el estudio e incluir en el análisis ARDRA colonias bacterianas aisladas en los días de evaluación de los ensayos de supresión, así como de los suelos tinalizados, de manera que se puedan observar las diferencias en la comunidad bacteriana no solo entre tiempos de muestreo o campos sino también entre días de evaluación y entre las condiciones de suelo.

## CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA

Abad, G. y Abad, J. (1997). Another Look at the Origin of Late Blight of Potatoes, Tomatoes, and Pear Melon in the Andes of South America. *Plant Disease* Vol. 81 No. 6

Andrивon, D. (1994). Dynamics of the survival and infectivity to potato tubers of sporangia of *Phytophthora infestans* in three different soils. *Soil Biol. Biochem.* 26 (8): p. 945-952

Andrивon, D. (1995). Biology, Ecology and Epidemiology of the Potato Late Blight Pathogen *Phytophthora infestans* in soil. *The American Phytopathology Society* Vol. 85, No. 10.

Bautista, S. (2006). El control biológico en la reducción de enfermedades postcosecha en productos hortofrutícolas: Uso de microorganismos antagonicos. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha* Vol. 8, No. 1, p. 1-6

Benítez, M. S. y McSpadden-Gardener B. (2009). Linking sequence to function in soil: Sequence-directed isolation of novel bacteria contributing to soil-borne plant disease suppression. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: p. 915-924

Berger, F., Li, H., Write, D., Frazer, R. y Leifert, C. (1996). Effect of pathogen inoculums, antagonist density, and plant species on biological control of *Phytophthora* and *Phytium* damping-off by *Bacillus subtilis* Cot1 in high-humidity fogging glasshouses. *Phytopathology* 86: p. 428-433

Bernal, G. y Ochoa, J. (2003). Desarrollo de mejores estrategias de manejo para las enfermedades causadas por *Phytophthora infestans* en cultivo de solanaceas usando marcadores moleculares. Informe Tecnico Anual – INIAP, Año 2003, p. 54-60.

Blackwood, C., Marsh, T., Sang-Hoon, K., y Eldor, P. (2003). Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Data Analysis for Quantitative Comparison of Microbial Communities. *Applied And Environmental Microbiology*, Feb. 2003, Vol. 69, No. 2, p. 926–932

Blanc, M., Marilley, L., Beffa, T. y Aragno, M. (1997). Rapid Identification of Heterotrophic, Thermophilic, Spore-Forming Bacteria Isolated from Hot Composts. *Internationaj Journal of Systematic Bacteriology*, Vol. 47, No. 4. p. 1246-1248

Bland, J. y Altman, G. (1996). Statistics notes: Transformin data. *BMJ* Vol. 312: p. 770

Bormann, C., Baier, D., Horr, I., Raps, C., Berger, J., Jung, G. Y Schwarz, H. (1999). Characterization of a Novel, Antifungal, Chitin-Binding Protein from *Streptomyces tendae* Tu"901 That Interferes with Growth Polarity. *Journal Of Bacteriology*, Vol. 181, No. 24. p. 7421–7429

Borneman, J. y Becker, O. (2007). Identifying Microorganisms Involved in Specific Pathogen Suppression in Soil. *Annu. Rev. Phytopathol.*45:p. 153-172.

Bulluck, L. y Ristaino, J. (2001). Effect of Synthetic and Organic Soil Fertility Amendments on Southern Blight, Soil Microbial Communities, and Yield of Processing Tomatoes. *Phytopathology* 92:p. 181- 189.

Carrasco, E. Estrada, N. Gabriel, J., Alfaro, G. Larondelle, Y., García, W. y Quiroga, O. (1997). Seis Cultivares Potenciales de Papa con Resistencia al Tizón Tardío (*Phytophthora infestans*) en Bolivia. *Revista Latinoamericana de la Papa* Vol 9, p. 106-122

Castillo, C. (2004). Efectividad de actinomicetos aislados de la rizósfera de papa sobre *Rhizoctonia solani* Kühn in vitro. *Revista Mexicana de Fitopatología*, julio-diciembre, Vol. 22, No. 002. p. 203-207

Chattopadhyay, A., Bhatnagar, N. y Bhatnagar, R. (2004). Bacterial Insecticidal Toxins. *Critical Reviews in Microbiology*, 30(1): p.33–54.

de Souza, J., de Boer, M., de Waard, P., van Beek, T. y Raaijmakers, J. (2003). Biochemical, Genetic, and Zoosporicidal Properties of Cyclic Lipopeptide Surfactants Produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Applied And Environmental Microbiology*, p. 7161–7172

Drenth, A., Janssen, E. y Govers, F. (1995). Formation and survival of oospores of *Phytophthora infestans* under natural conditions. *Plant Pathology* Vol. 44, p. 86-94

Duffy, B., Ownley, B., y Weller, D. (1997). Soil chemical and physical properties associated with suppression of take-all of wheat by *Trichoderma koningii*. *Phytopathology* 87: p.1118-1124.

Enebak, S.A., Wei, G. y Kloepper, J. (1997). Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on loblolly and slash pine seedlings. *Forest Sci.* 44: p. 139-144.

Erwin, D. Bartnicki, S. y Tsao, P. (1995). *Phytophthora: Its biology, ecology and pathology*. Editado por Dept. of Plant Pathology, University of California. Estados Unidos.

Erwin, D. y Ribeiro, O. (1996). *Phytophthora Diseases Worldwide*. American Phytopathology Society Press. Estados Unidos.

Faes, V.; Vaccari, M. y Beccaria, A. (2005). Aislamiento y caracterización de bacterias filamentosas con actividad antimicrobiana. *FABICIB* 9, p. 131-139.

Forbes, G. Escobar, X. Ayala C., Revelo J., Ordoñez, M. Fry, B., Doucett K. y Fry, W. (1997). Population Genetic Structure of *Phytophthora infestans* in Ecuador. *Phytopathology* Vol. 87, No. 4 p. 375-380.

García, I. y Dorronsoro, C. (2010). Contaminación del suelo. Departamento de Edafología y Química Agrícola de la Universidad de Granada. España. Link: <http://edafologia.ugr.es/index.htm>. Consulta realizada el 04 de noviembre de 2010. Última actualización: 29 de octubre de 2010.

Gajendran, K., Gonzales, D., Farmer, A., Archuleta, E., Win, J., Waugh, M. y Kamoun, S. (2006). *Phytophthora* functional genomics database (PFGD): functional genomics of *Phytophthora*–plant interactions. *Nucleic Acids Research*, Vol. 34, p. 465–470

Gamboa, F; Herazo, B y Martínez, M (2004): Control microbiológico sobre *Streptococcus mutans* y su acción cariogénica. *Universitas Scientiarum*, 19. (4), pp. 5 -55

Garbeva, P., van Veen, J. y van Elsas, L. (2003). Predominant *Bacillus* spp. In agricultural soil under different management regimes detected via PCR-DGGE. *Microbial Ecology* Vol. 45, No. 3, p. 302-316

García, J. (2009). ¿Cómo impactan la biodiversidad y los exudados radiculares a la productividad agrícola? *InnovakNews*. Vol.14. Link: [http://www.innovakglobal.com/periodicos\\_pdf/periodico\\_innovak\\_junio09.pdf](http://www.innovakglobal.com/periodicos_pdf/periodico_innovak_junio09.pdf)

Garzón, C. (1999). Supresión de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary en suelos de seis localidades de la sierra ecuatoriana. Universidad Católica del Ecuador. Tesis de Licenciatura.

Ghorbani, R., Wilcockson, S. y Leifert, C. (2005). Alternative treatments for late blight control in organic potato: Antagonistic micro-organisms and compost extracts for activity against *Phytophthora infestans*. *Potato Research* 48: p. 181-189

Haas, D. y Défago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent *Pseudomonas*. *Nature Reviews Microbiology*.

Halim, V., Eschen-Lippold, L., Altmann, S., Birschwilks, M., Scheel, D. y Rosahl, S. (2007). Salicylic Acid Is Important for Basal Defense of *Solanum tuberosum* Against *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* Vol. 20, No. 11, p. 1346–1352

Heyndrickx, M., Vauterin, L., Vandamme, P., Kersters, K., Deyos, P. (1996) Applicability of combined amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) patterns in bacterial phylogeny and taxonomy. *J. Microbiol. Methods* 26 p. 247-259.

Janvier, C., Villeneuve, F., Alabouvette, C., Edel-Hermann, V., Mateille, T. y Steinberg, C. (2006). Soil health through soil disease suppression: Which strategy from descriptors to indicators? *Soil Biology and Biochemistry* Vol. 39, No. 1 p. 1-23.

Jaramillo, S. (2003). Monografía sobre *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Universidad Nacional de Colombia.

Jones, G. (Editor). (1998). The epidemiology of plant diseases. Kluwer Publishers. Gran Bretaña.

Kitts, C. (2001). Terminal restriction fragment patterns: A tool for comparing microbial communities and assessing community dynamics. *Current Issues in Intestinal Microbiology* 2001, 2 (1): p. 17-25

Kromann, P., Taipe, A., Andrade-Piedra, J. L., Munk, L., and Forbes, G. A. (2008). Preemergence infection of potato sprouts by *Phytophthora infestans* in the highland tropics of Ecuador. *Plant Dis.* 92: p. 569-574.

Lozoya-Saldaña, H.; Coyote, M.; Cerrato, R. y Lara, E. (2006). Antagonismo microbiano contra *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. *Agrociencia* 40, No. 4, p. 491-499

Martínez, P. y Osorio, J. (2007). Estudios preliminares para la producción de un biosurfactante bacteriano activo contra *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary. *Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 8, p. 5-16.

Mayton, H., Forbes, G., Mizubuti, E., y Fry, W. (2001). The roles of three fungicides in the epidemiology of potato late blight. *Plant Dis.* 85: p. 1006-1012.

Milner, J., Silo-Suh, L., Lee, J., He, H. Clardy, J. y Handelsman, J. (1996). Production of Kanosamine by *Bacillus cereus* UW85. *Applied And Environmental Microbiology*, Vol. 62, No. 8 p. 3061–3065

Mojica-Marin, V., Luna-Olvera, H., Sandoval-Coronado, C., Pereyra-Alfárez, B., Morales-Ramos, L., González-Aguilar, N., Hernández-Luna, C. y Alvarado-Gomez, O. (2009). Control biológico de la marchitez del chile (*Capsicum annum L.*) por *Bacillus thuringiensis*. *Phyton* (B. Aires) [online]. Vol 78, No.2, pp. 105-110.

Niem, R., Heiskanen, I., Ahtiainen, J., Rahkonen, A. y otros. (2009). Microbial toxicity and impacts on soil enzyme activities of pesticides used in potato cultivation. *Applied Soil Ecology* 41: p. 293–304

Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación FAO (2008). Año Internacional de la Papa, Sitio Web Oficial. Link: <http://www.potato2008.org/es/elaip/index.html>

Ortíz, O., Winters, P. y Fano, H. (1998) La percepción de los agricultores sobre el problema del tizón tardío o rancha (*Phytophthora infestans*) y su manejo: Estudio de casos en Cajamarca, Perú. *Revista Latinoamericana de la Papa* Vol 11.

Ownley, B.; Duffy, B. y Weller, D. (2003). Identification and manipulation of soil properties to improve the biological control performance of phenazine-producing *Pseudomonas fluorescens*. *Applied and Environmental Microbiology* 69, p. 3333-3343

Oyarzún, P., Pozo, A., Ordoñez; M.E., Doucett, K. y Forbes, G. (1998). Host Specificity of *Phytophthora infestans* on Tomato and Potato in Ecuador. *Phytopathology*. 88(3): p. 265-271.

Park, D. (1963). The ecology of soil-borne fungal disease. *Annu. Rev. Phytopathol* 1: p. 241-258

Porter, L., Dasgupta, N. y Johnson D. (2005). Effects of tuber depth and soil moisture on infection of potato tubers in soil by *Phytophthora infestans*. *Plant Disease* Vol. 89 No. 2

Porwal S, Lal S, Cheema S, y Kalia VC (2009) Phylogeny in Aid of the Present and Novel Microbial Lineages: Diversity in *Bacillus*. *PLoS ONE* 4(2): e4438.

Rimé, D.; Nazaret, S. Gourbiere, F.; Cadet P. y Moenne-Loccoz, Y. (2003). Comparision of sandy soil suppressive or conducive to ectoparasitic nematode damage on sugarcane. *Phytopathology* 93, p. 1437-1444.

Rodríguez, V. (2002). Efecto antagónico y biocontrolador de algunos microorganismos saprofitos contra *Rhizoctonia solani*, un fitopatógeno causante del (damping off) en plantas de tomate. Universidad Mayor de San Marcos. Perú. Tesis de Maestría.

Sedegui, M., Carroll, R., Morehart, A., Hamlen, R., y Power, R. (1999). Comparison of assays for measuring sensitivity of *Phytophthora infestans* isolates to fungicides. *Plant Dis.* 83: p. 1167-1169.

Sklarz, M., Angel, R., Gillor, O., y Soares, M. (2009). Evaluating amplified rDNA restriction analysis assay for identification of bacterial communities. *Antonie van Leeuwenhoek* 96:p. 659–664

Stanier, R., Ingraham, J., Wheelis, M. y Painter, P. (1996). Microbiología. Segunda Edición, Editorial Reverté, España.

Stephan, D., Schmitt, A., Martins Carvalho, S., Seddon, B. y Koch, E. (2005). Evaluation of biocontrol preparations and plant extracts for the control of *Phytophthora infestans* on potato leaves. *European Journal of Plant Pathology* 112: p. 235–246

Tomljenovic, M. y Schrader, R. (2001). Los plaguicidas. Memorias del Curso de entrenamiento. Santiago, Chile.

Trout, C. L., Ristaino, J. B., Madritch, M., y Wangsomboondee, T. (1997). Rapid detection of *Phytophthora infestans* in late blight-infected potato and tomato using PCR. *Plant Dis.* 81: p. 1042- 1048.

van Bruggen, A. y Semenov, A. (1999). A new approach to the search for indicators of root disease suppression. *Australian Plant Pathology* 28, p. 4-10.

Venegas, V. (2006) Selección y evaluación de aislamientos de bacterias del género Bacillus Cohn, antagonistas de Fusarium solani (Mart.) Sacc. y Fusarium oxysporum Schlecht, presentes en calas de colores. Universidad Austral de Chile. Tesis de Licenciatura

Vilain, S., Luo, Y., Hildreth, M. y Brozel, V. (2006). Analysis of the Life Cycle of the Soil Saprophyte *Bacillus cereus* in Liquid Soil Extract and in Soil. *Applied And Environmental Microbiology*, Vol. 72, No. 7, p. 4970–4977

Weising, K., Nybom, H., Wolff, K. y Meyer, W. (1995). DNA Fingerprinting in Plants and Fungi. CRC Press. Estados Unidos

Weller, D., Raaijmakers, J., McSpadden-Gardener, B., y Thomashow, L. (2002). Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*40: p. 309-348

Wilhelm, E., Arthofer, W., Schafleitner, R. y Krebs, B. (1998). *Bacillus subtilis* an endophyte of chestnut (*Castanea sativa*) as antagonist against chestnut blight (*Cryphonectria parasitica*). *Plant Cell Tissue Org. Culture* 52: p. 105-108.

Willey J., Sherwood, L., y Woolverton, C. (2004). Microbiología. Mc Graw Hill, séptima edición. España.

Wu, X., Walker, M., Hornitzky, M y Chin, J. (2006) Development of a group-specific PCR combined with ARDRA for the identification of *Bacillus* species of environmental significance. *J. Microbiol. Methods*, Vol. 64, No.1, p. 107-119

Yan, Z., Reddy, M., Ryu, C., McInroy, J., Wilson, M., y Kloepper, J. (2002). Induced systemic protection against tomato late blight elicited by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology* 92: p. 1329-1333.

Zadorina, E., Boulygina, E., Kolganova, T., Kuznetsov, B. y Skryabin, K. (2009). Evaluation of the Effect of Late Blight-Resistant Potato Plants on the Structure of Bacterial Associations in Soil. *Applied Biochemistry and Microbiology*, Vol. 45, No. 2, p. 194–198

## CAPÍTULO 8. ANEXOS

### Anexo A.

Interpretación de resultados de suelos otorgada por los laboratorios del Departamento de Suelos del INIAP y Agrocalidad en Anexos

Aluminio / Aluminio + H (meq/100ml)		pH		Conduc. Eléctrica (dS/m)	
Bajo	< 0,37	Acido	5,5	< 2,0	No salino
Medio	0,37	Lig. ácido	5,6-6,4	2,0 -3,0	Lig. Salino
		Prácticamente neutro	6,5-7,5	3,0 - 4,0	Salino
		Lig. alcalino	7,6-8	4,0-8,0	Muy salino
		Alcalino	8,1		

M.O (%)	N (%)	P (ppm)	K (cmol/kg)	Ca (cmol/kg)	Mg (cmol/kg)	
< 1,0	0-0,15	0-10	< 0,2	< 1	< 0,33	Bajo
1,0-2,0	0,16-0,3	11,0 - 20,0	0,2-0,38	1,0-3,0	0,34-0,66	Medio
> 2,0	>0,31	> 21	> 0,4	> 3,0	> 0,66	Alto
Fe (ppm)	Mn (ppm)	Cu (ppm)	Zn (ppm)	B (ppm)	S (ppm)	
0- 20,0	0-5,0	0- 1,0	0-3,0	< 1,0	< 12,0	Bajo
21-40	6,0-15,0	1,1 - 4	3,1-6,0	1,0-2,0	12,0 - 24,0	Medio
> 41	> 15,0	> 4,1	> 6,1	> 2,0	> 24	Alto

## Anexo B.

### Protocolo de extracción de DNA de bacterias y hongos.

1. Realizar un cultivo líquido selectivo para bacteria u hongo, de 2ml y sembrar el contenido bacteriano (raspado) en el medio líquido.
2. Incubar por un período de 24 a 72 horas. (dependiendo de la bacteria).
3. Centrifugar por 8min a 14.000 rpm y descartar el sobrenadante, luego colocar en el eppendorff una pequeña cantidad de arena, y con ayuda de un homogenizador, pulverizar al pellet, por un período de 45s.
4. Añadir 0.5ml de tampón de extracción sobre el macerado, y luego añadir 300ul de cloroformo y/o cloroformo:isoamilalcohol 24:1. Nuevamente macerar ligeramente para mezclar el tampón y el solvente.

Tampón de extracción

Reactivo	Conc. final	En 500 ml
Sorbitol	140 mM	12.15 g
Tris HCl ph=8	220mM	13.32 g
EDTA	22mM	3.214 g
NaCl	800mM	23.376 g
CTAB	0.8%	4 g
Sarkosyl	1%	5 g
b-mercaptoetanol	0.2%	Opcional. Añadir justo antes del uso

5. Invertir los tubos varias veces y luego incube las muestras a 55°C de 20 a 30 minutos. Invertir los tubos manualmente unas cinco veces cada 10 minutos.
6. Dejar que los tubos tomen la temperatura ambiente por unos cinco minutos y centrifugar a 14000rpm en una microcentrifuga por 10 minutos.
7. Transferir el sobrenadante sin topar la interfase a un tubo nuevo, limpio y estéril.
8. Añadir de 1 a 1.5vol de isopropanol, y dejarlos durante 5 minutos en hielo o en un congelador para que precipiten los ácidos nucleicos.
9. Centrifugar los tubos por 3 minutos a 14000rpm en una microcentrifuga. Si el pellet de DNA no esta firme centrifugar por tres minutos mas.
10. Descartar el sobrenadante, y lavar el pellet de DNA con ethanol al 70% por una o dos veces.
11. Secar el pellet de DNA por 20 a 25 minutos, y posteriormente disolverlo en 100ul tampón RTE con 1ul de RNAsa (10mg/ml). Dejar que la RNAsa actúe por 30minutos.
12. Medir la concentración de DNA y ajustar la misma entre 5 a 20 ng/ul para una reacción PCR

## **Anexo C.**

### **Protocolo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el gen 16S**

Este protocolo está estandarizado con los primers 8F y 1492 R.

1. Preparar la máster mix que contenga lo siguiente:
  - a. Agua destilada
  - b. Buffer 5X (concentración final 1X)
  - c. BSA (concentración final 1mg/ml)
  - d.  $MgCl_2$  25mM (concentración final de 2mM)
  - e. dNTPs 2mM (concentración final de 0,2mM)
  - f. Primer Forward 100uM (concentración final de 1 uM)
  - g. Primer Reverse 100uM (concentración final de 1 uM)
  - h. Taq Polimerasa 5U/ul (concentración final de 1,5U/25ul de reacción)
  
2. Correr en el termociclador un programa de PCR que contenga los siguientes pasos:
  - a. 95<sup>0</sup>C, 5 minutos
  - b. 94<sup>0</sup>C, 1 minuto
  - c. 54<sup>0</sup>C, 45 segundos
  - d. 70<sup>0</sup>C, 1 minuto
  - e. Repetir desde el paso b. 29 (veinte y nueve) veces
  - f. 70<sup>0</sup>C, 8 minutos
  - g. 4<sup>0</sup>C, “for ever”
  - h. Fin

## **Anexo D.**

## Colonias aisladas del tiempo 1 y sus resultados de pruebas de inhibición

Campo	Nombre asignado	Morfología*				Escala <i>P.</i> <i>infestans</i>	Escala <i>R.</i> <i>solani</i>
		Color	Borde	Forma	Otros		
Pisicaz	T1 PIS 1	B	R	C	P	0	-
Pisicaz	T1 PIS 2	B	R	I	G	0	-
Pisicaz	T1 PIS 2.1	B	R	I	P	0	-
Pisicaz	T1 PIS 2.2	B	R	I	P	3	-
Pisicaz	T1 PIS 3	B	R	I	P	0	-
Pisicaz	T1 PIS 5	B	R	I	G	1	-
Pisicaz	T1 PIS 7	B	R	C	B,P	1	1
Pisicaz	T1 PIS 8	B	R	C	B,P	1	1
Pisicaz	T1 PIS 13	B	R	C	P	0	-
Pisicaz	T1 PIS 16	B	R	C	B,P	1	0
Pisicaz	T1 PIS 17	P	O	C	S	1	-
Pisicaz	T1 PIS 19	B	R	C	P	1	-
Pisicaz	T1 PIS 20	B	R	C	P	0	-
Pisicaz	T1 PIS 21.1	B	R	C	B,P	1	1
Pisicaz	T1 PIS 21.2	B	R	C	B,P	1	-
Pisicaz	T1 PIS 21.3	B	R	C	B,P	0	-
Pisicaz	T1 PIS 22	B	R	I	P	0	-
Pisicaz	T1 PIS 24	B	R	R		1	-
Pisicaz	T1 PIS 25	B	R	R		1	-
Pisicaz	T1 PIS 26	B	R	I		1	-
Pisicaz	T1 PIS 27	B	R	C	G	1	-
Pisicaz	T1 PIS 28	B	R	I		3	-
Pisicaz	T1 PIS 31	O	R	C		3	-
Pisicaz	T1 PIS 33	O	R	C		2	-

Pusniag	1 PUS 1	B	R	I	P	1	-
Pusniag	T1 PUS 2	B	R	C	P	3	-
Pusniag	T1 PUS 3	B	R	C	P	3	-
Pusniag	T1 PUS 4	P	R	C	P	1	-
Pusniag	T1 PUS 7	B	R	C	G	0	-
Pusniag	T1 PUS 9	P	R	C		3	-
Pusniag	T1 PUS 10	B	R	C		0	-
Pusniag	T1 PUS 11	B	I	C	P	3	-
Pusniag	T1 PUS 12	B	R	C	P	2	-
Pusniag	T1 PUS 13	B	R	C	B	3	-
Pusniag	T1 PUS 14	B	R	C	B,P	1	0
Pusniag	T1 PUS 33	B	R	C	P	3	-
Pusniag	T1 PUS 34	B	R	C		0	-

- \* Color: B (blanca), P(parda), O(otro)
- \* Borde: R(regular), O(ondulado), I (irregular)
- \* Forma: I(irregular), C(circular), R(rizoide)
- \* Otros: P(pequeña), B(brillante), S(seca)

## Anexo E.

Campo	Nombre asignado	Morfología*				Escala <i>P. infestans</i>	Escala <i>R. solani</i>
		Color	Borde	Forma	Otros		
Pisicaz	T2 PIS 7	B	O	C		2	1
Pisicaz	T2 PIS 8	B	O	C	B	1	2
Pisicaz	T2 PIS 17	B	R	C		0	-
Pisicaz	T2 PIS 18	B	R	C	G	0	-
Pisicaz	T2 PIS 23	B	R	C	GS,	1	2
Pisicaz	T2 PIS 33	B	R	F		1	-
Pisicaz	T2 PIS 34	B	R	I	G,S	1	-
Pisicaz	T2 PIS 40	B	R	I	S	1	-
Pisicaz	T2 PIS 45	B	R	I		0	-
Pisicaz	T2 PIS 46	B	O	C		1	0
Pusniag	T2 PUS 1	P	O	C	S	2	2
Pusniag	T2 PUS 2	B	R	C		2	2
Pusniag	T2 PUS 3	B	R	C		2	0
Pusniag	T2 PUS 4	B	R	C		2	1
Pusniag	T2 PUS 5	B	R	P	G	0	-
Pusniag	T2 PUS 13	B	R	C		2	-
Pusniag	T2 PUS 14	P	R	C	S	0	-
Pusniag	T2 PUS 19	P	I	C	S	2	0

Pusniag	T2 PUS 20	B	R	C		0	0
Pusniag	T2 PUS 21	B	R	C	G,S	2	-
Pusniag	T2 PUS 22	B	R	I		0	-
Pusniag	T2 PUS 24	B	R	I		1	-
Pusniag	T2 PUS 25	B	R	R		1	-
Pusniag	T2 PUS 26	P	RI	C	G	1	-
Pusniag	T2 PUS 27	B	R	C		2	0
Pusniag	T2 PUS 28	B	R	C		3	0
Pusniag	T2 PUS 29	P	R	C		0	-
Pusniag	T2 PUS 30	B	R	C	G	0	-
Pusniag	T2 PUS 31	B	R	C	S	2	-
Pusniag	T2 PUS 33	R	R	C	P	3	-
Pusniag	T2 PUS 34	B	R	C		3	-
Pusniag	T2 PUS 37	P	R	C	S	2	2
Pusniag	T2 PUS 39	O	O	C		1	-
Pusniag	T2 PUS 42	B	I	R	G	2	2
Pusniag	T2 PUS 49	P	R	C	G,S	1	-
Pusniag	T2 PUS 50	B	R	C	G	1	-
Pusniag	T2 PUS 51	B	O	C	G	2	1
Pusniag	T2 PUS 53	O	R	C		0	-
Pusniag	T2 PUS 55	B-P	R	C	S	2	1
Pusniag	T2 PUS 58	B	R	C		1	-
Pusniag	T2 PUS 59	B	R	C		1	-
Pusniag	T2 PUS 61	B	R	RI		1	-

Pusniag	T2 PUS 62	B	R	I	G	0	-
Pusniag	T2 PUS 63	B-P	R	C	S	0	-
Pusniag	T2 PUS 64	P	R	C	S	2	1

**Colonias aisladas del tiempo 2 y sus resultados de las pruebas de inhibición**

- \* Color: B (blanca), P(parda), R(roja),O(otro)
- \* Borde: R(regular), O(ondulado), I (irregular)
- \* Forma: P(puntiforme), I(irregular), C(circular), R(rizoide)
- \* Otros: G (grande), P(pequeña), B(brillante), S(seca)