

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Evaluación *in vitro* de la actividad inhibitoria de endófitos
microbianos de papa (*Solanum tuberosum*) frente al fitopatógeno
*Rhizoctonia solani***

Natalia Camila López Mafla

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Quito, 4 de mayo de 2020

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA**

**Evaluación *in vitro* de la actividad inhibitoria de endófitos microbianos de
papa (*Solanum tuberosum*) frente al fitopatógeno *Rhizoctonia solani***

Natalia Camila López Mafla

Nombre del profesor, Título académico

Antonio León Reyes, PhD

Quito, 4 de mayo de 2020

DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Nombres y apellidos: Natalia Camila López Mafla

Código: 00131199

Cédula de identidad: 1004166870

Lugar y fecha: Quito, mayo de 2020

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

RESUMEN

Rhizoctonia solani es un fitopatógeno que afecta severamente al cultivo de papa, inhibiendo el crecimiento de nuevos brotes y causando pérdidas a nivel mundial. La búsqueda de nuevas alternativas para controlar este patógeno han llevado a realizar investigaciones con microorganismos endófitos que colonizan los tejidos de las plantas y aportan beneficios a los cultivos agrícolas. En este proyecto se probaron bacterias endófitas aisladas de tubérculos de tres variedades de papa (*Solanum phureja* variedades: Chaucha ratona, Yema de huevo y Chaucha amarilla tipo I) como inhibidoras del crecimiento de *Rhizoctonia solani in vitro*. Las bacterias endófitas utilizadas en esta investigación se obtuvieron a partir de una colección que contenía 104 endófitos que fueron previamente aislados de tubérculos de papas. Luego de la siembra de esta colección bacteriana, se observó que algunos cultivos presentaban más de una morfología y se procedió a re-aislarlas. Se obtuvo 27 endófitos adicionales, con lo que se tuvo un total de 138 aislados bacterianos que fueron usados en los posteriores ensayos de inhibición. Para estos ensayos se sembró en el centro de la caja Petri con medio PDA un pedazo de agar (0.7 cm de diámetro) de un cultivo de *Rhizoctonia solani* de 10 días, y en cada extremo (cuatro) se inoculó colonias de endófitos microbianos, cada ensayo se realizó por triplicado. Después de 7 días de inoculación se evaluó el potencial de inhibición de ciertas bacterias endófitas, y se encontró que 18 colonias tuvieron actividad para inhibir el crecimiento del hongo fitopatógeno. Posteriormente, se realizó una prueba estadística ANOVA y una prueba de Tukey con un nivel de significancia del 95%, y se determinó que 10 endófitos microbianos tienen un mayor potencial de antagonismo. Dentro de este grupo, las bacterias que más inhibieron fueron identificadas con los códigos A-79-4, D-79-19.2, A-82-5.2, C-82-15.2, D-82-17.1, D-82-16.2, B-25-40, C-25-24, C-25-55.3, B-25-53.2. A partir de este estudio se sugiere realizar bioensayos para evaluar la actividad de estas posibles cepas antagonistas en tubérculos de papas infectados con *Rhizoctonia solani*. Además, se recomienda identificar las cepas bacterianas con potencial de inhibición mediante pruebas a base de DNA. Para finalizar, este estudio abre nuevos caminos en la investigación para encontrar soluciones frente a la enfermedad causada por este importante fitopatógeno.

Palabras clave: *Rhizoctonia solani*, papa, endófitos microbianos, inhibición *in vitro*.

ABSTRACT

Rhizoctonia solani is a phytopathogen that severely affects potato crops. *Rhizoctonia solani* disrupt the potato's growth physiology which causes significant economic losses. The search for new alternatives to control this phytopathogen, have led to the investigation of endophytic microorganisms that colonize plant tissues and benefit the crops. In this project, we tested different endophytic bacteria, isolated from tubers of three potato varieties (*Solanum phureja* varieties: Chaucha ratona, Chaucha amarilla tipo I and Yema de huevo) as inhibitors of *in vitro* growth of *Rhizoctonia solani*. The endophytic bacteria used in this investigation was obtained in a previous project. The stored collection contained 104 endophytic bacteria, that were previously isolated from potato tubers. After sowing this collection, we observed that some crops had more than one morphology, so we re-isolated again. An additional 27 endophytes were obtained, giving a total of 138 bacterial isolates that were used in subsequent inhibition assays. For these tests, a piece of agar (0.7 cm diameter) from a 10-day-old *Rhizoctonia solani* culture was seeded in the center of the Petri dish with PDA medium, and microbial endophyte colonies were inoculated at four opposite sides, each test was performed in triplicate. After 7 days of inoculation, the inhibition potential of endophytic bacteria were evaluated, it was found that 18 colonies had capacity to inhibit the growth of the phytopathogenic fungus. Subsequently, a statistical ANOVA test and a Tukey test were performed with a significance level of 95% and it was determined that 10 microbial endophytes have a higher inhibition potential. Within this group, the bacteria with the highest inhibitory capacity were identified with the codes A-79-4, D-79-19.2, A-82-5.2, C-82-15.2, D-82-17.1, D-82-16.2, B-25-40, C-25-24, C-25-55.3, B-25-53.2. We suggest carrying out *in vivo* assays to evaluate the activity of these possible antagonistic strains in tubers of potatoes infected with *Rhizoctonia solani*. Furthermore, it is recommended to identify bacterial strains with inhibition potential by DNA-based tests. To conclude, this study opens new ways in research to find solutions to the disease caused by this important plant pathogen.

Key words: *Rhizoctonia solani*, potato, endophytic microorganisms, *in vitro* inhibition.

TABLA DE CONTENIDO

1.	Introducción	10
1.1	Origen de la papa	10
1.2	Importancia de los cultivos de papa.....	11
1.3	Enfermedad “Rhizoctoniasis”	11
1.4	Control de enfermedades	13
1.5	Objetivo general.....	14
1.6	Objetivo específico	14
2.	Métodos.....	15
2.1	Preparación del medio Tryptic Soy Agar (TSA)	15
2.2	Subcultivo de endófitos bacterianos aislados de tubérculos de papa en medio de cultivo Tryptic Soy Agar (TSA)	15
2.3	Purificación de endófitos bacterianos	15
2.4	Preparación del medio de cultivo Potato Dextrose Agar (PDA)	16
2.5	Ensayos <i>in vitro</i> de endófitos bacterianos contra <i>Rhizoctonia solani</i>	16
2.6	Evaluación de endófitos bacterianos con actividad inhibitoria contra el fitopatógeno <i>Rhizoctonia solani</i>	17
2.7	Análisis estadístico.....	17
3.	Resultados	18
3.1	Subcultivo y purificación de endófitos bacterianos	18
3.2	Evaluación de actividad inhibitoria de endófitos bacterianos frente al fitopatógeno <i>Rhizoctonia solani</i>	18
4.	Discusión.....	20

5. Conclusiones.....	24
6. Referencias.....	25
7. Tablas.....	32
8. Figuras.....	34

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Aislamiento de colonias con distintas morfologías en un subcultivo.....	32
Tabla 2: Distancia de inhibición entre endófitos bacterianos contra el patógeno <i>Rhizoctonia solani</i>	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Endófitos aislados de tres variedades de <i>Solanum phureja</i> : Chaucha ratona, Chaucha amarilla tipo I y Yema de huevo	34
Figura 2: Purificación de cultivo con más de una morfología.....	35
Figura 3: Cultivo de confrontación entre <i>Rhizoctonia solani</i> y endófitos microbianos aislados de tubérculos de <i>Solanum Phureja</i>	36
Figura 4: Evaluación <i>in vitro</i> de la distancia de inhibición entre los endófitos microbianos frente al fitopatógeno <i>Rhizoctonia solani</i>	37

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Origen de la papa

La papa (*Solanum tuberosum*) pertenece a la familia Solanaceae del género *Solanum*. La papa se originó en Sudamérica y su domesticación fue específicamente en Bolivia (Lagos Titicaca y Poopó), aproximadamente hace 10.000 a 7.000 años (Cortéz & Hurtado, 2002). El centro de diversificación primario fue la zona andina que corresponde a Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y la parte norte de Argentina y Chile. El centro de diversificación secundario fue Mesoamérica que forma parte El Salvador, Guatemala, el sur de México, Honduras, Nicaragua y el noreste de Costa Rica (Andrade & Sherwood, 2002).

Solanum tuberosum se encuentra dividida en dos subespecies, *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*, las cuales son cultivadas en Centro América y Sur América; y *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* que se cultiva en otras latitudes: Europa, África, América del Norte y Asia (FAO, 2009). La diferencia más notoria entre estas dos subespecies es que *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* requiere de fotoperiodos más cortos para formar el tubérculo (Hawkes, Brads, & Mackay, 1994). Es importante mencionar, que otra especie domesticada de gran relevancia por la formación del tubérculo es *Solanum phureja*, que es cultivada en América del Sur, y se distingue de otros cultivos de papas porque no tiene dormancia del tubérculo, es decir, la brotación del tubérculo ocurre inmediatamente después de la cosecha (Plasited, 1982).

A nivel mundial, existen miles de variedades de papas, las cuales se diferencian por el color de la pulpa y epidermis, diferentes ciclos de cultivo, necesidades de nutrientes, y resistencia a plagas (Motesdeoca, Andrade, Cuesta, & Carrera, 2007). Como se ha mencionado, existen unas diferencias claras entre los tipos de papas, no obstante, a estas se las clasifica en dos grandes variedades: nativas y mejoradas (Monteros, Cuesta, Jiménez, & López, 2005).

1.2 Importancia de los cultivos de papa

El cultivo de papa ocupa el tercer lugar de alimentos importantes a nivel mundial después del trigo y el arroz (FAOSTAT, 2019). La producción de papa es alrededor de 388 millones de toneladas a nivel mundial aproximadamente y la demanda aumenta cada día (FAOSTAT, 2019). La papa es considerada un alimento básico en la dieta de las personas por el gran aporte nutricional que brinda el tubérculo como: carbohidratos, vitaminas (C, B1, B3, B6), potasio, fósforo, magnesio. Además, posee antioxidantes que contribuyen a prevenir algunas enfermedades afines al envejecimiento (Prokop & Albert, 2008).

El cultivo de papa en Ecuador es uno de los más importantes debido a que aporta grandes beneficios económicos al país (INIAP, 2002). Además, es la fuente de ingresos de varias comunidades rurales e indígenas (INIAP, 2002). Se siembra alrededor de 33.000 hectáreas de papa anualmente en el Ecuador, dando un promedio de producción de 377.090 toneladas (INEC, 2019). En el Ecuador se han identificado tres zonas principales de producción: norte, centro y sur. La zona norte está conformada por Carchi e Imbabura y es la zona más productiva de papa siendo además la que más consume, pues en esta zona la papa es la fuente principal de alimento. La zona centro pertenece a Pichincha, Chimborazo, Tungurahua, Bolívar y Cotopaxi y por último, la zona sur la conforman las provincias de Azuay, Loja y Cañar (INIAP, 2002).

1.3 Enfermedad “Rhizoctoniasis”

En los cultivos de papas se presentan grandes problemas que limitan la producción, uno de ellos es la susceptibilidad a diferentes enfermedades durante el ciclo de vida, estas son causadas por bacterias, hongos, virus e insectos (Villarreal, 2013). Una de las enfermedades que afecta a los cultivos de papa a nivel mundial es “Rhizoctoniasis”, la cual es causada por el hongo *Rhizoctonia solani*, el cual es un basidiomiceto que no produce esporas y es identificado

únicamente por las características distintivas de la estructura micelial (Kanetis, Tsimouris, & Christoforou, 2016). Dentro de *Rhizoctonia solani* existen 13 grupos (AG), sin embargo, el organismo que afecta a la papa es AG3.

Los síntomas de la enfermedad se presentan en el tubérculo (costra negra) y en el tallo de la planta (cancro del tallo). El síntoma que se puede observar con facilidad es la costra negra, debido a que se forma una masa dura de color negro sobre el tubérculo, llamados esclerocios, donde estos cuerpos tienen formas irregulares, son de diferentes tamaños y pueden ser planos o presentarse como un bulto (Wharton & Wood, 2013). El hongo tiene la capacidad de adherirse a la superficie, pero no puede penetrar ni dañar el tubérculo, sin duda, cuando se usa como semilla la tasa de propagación de la enfermedad es mayor (Wharton & Wood, 2013).

Pese a que la costra negra es el síntoma más notable de *Rhizoctonia solani*, el cancro del tallo tiene un efecto negativo en la fisiología de la planta. Este síntoma surge al principio del crecimiento, el hongo ataca a los brotes germinantes y causa la muerte de la planta (Brink & Wustman, 2014). Al principio de la enfermedad los estolones, raíces y tallos lesionados poseen un color marrón, posteriormente el hongo forma chancros con forma de grietas o cráteres. El cancro del tallo afecta el tamaño, cantidad y forma de los tubérculos, también causa efectos negativos en relación con el crecimiento de la planta (Brink & Wustman, 2014).

La enfermedad inicia cuando el hongo *Rhizoctonia solani* se encuentra como esclerocios y micelios en los tubérculos o suelos infectados. Al sembrar semillas (tubérculos infectados) el hongo primero se expande en la superficie del tubérculo, posteriormente afecta al brote e infecta la raíz y el estolón primordial (Boogert & Luttikholt, 2004). El hongo en el suelo tiene el mismo efecto patogénico que por transmisión con semillas infectadas (Bains, Bennypaul, Lynch, Kawchik, & Schaupmeyer, 2002). La infección por *Rhizoctonia solani* tiene un mayor

impacto cuando las temperaturas en el ambiente son de 5°C hasta 25°C, puesto que, es la temperatura apropiada para el crecimiento de este fitopatógeno (Brink & Wustman, 2014). Por otro lado, la alta humedad del suelo, y un pH menores o igual a 7, son factores que favorecen la infección de *Rhizoctonia solani* en los cultivos de papa (Brink & Wustman, 2014).

1.4 Control de enfermedades

Existen diversos controles para manejar este tipo de fitopatógenos de suelo como son: el uso de fungicidas y plaguicidas; rotación de cultivos; uso de semillas certificadas; y el empleo de diferentes desinfectantes pre-siembra (Bains, Bennypaul, Lynch, Kawchik, & Schaupmeyer, 2002). Actualmente se han encontrado nuevas alternativas para manejar *Rhizoctonia solani*, como el control biológico, siendo este un método amigable con el medio ambiente (Downing & Thomson, 2000).

Dentro de los controles biológicos los microorganismos endófitos juegan un papel importante para suprimir el crecimiento de fitopatógenos (Calleros, Olalde, & Carling, 2000). Las bacterias endófitas son microorganismos que forman parte de las plantas, por lo tanto, se encuentran en la superficie o en la parte interna de los tejidos. Estos microorganismos no causan ningún daño a la planta, por lo contrario, tienen efectos positivos en el crecimiento de las plantas hospedadoras; así también cumplen funciones antagonistas contra diferentes fitopatógenos (Downing & Thomson, 2000). Las plantas proveen nutrientes a los microorganismos y estos les benefician a las plantas, alrededor del 30% de carbono fijado por la fotosíntesis es invertido en ácidos orgánicos, azúcares y aminoácidos para nutrir a la comunidad bacteriana (Calleros, Olalde, & Carling, 2000). Una fuente de endófitos importantes para las plantas es la rizosfera, debido a que estos microorganismos tienen la capacidad de penetrar y colonizar los diferentes tejidos internos (Sorensen & Sessitsch, 2007).

Los mecanismos que realizan los endófitos al interactuar con las plantas son directos e indirectos (Glick, 2014). Los mecanismos directos, son los que promueven el crecimiento de la planta al producir fitohormonas, mientras que, los mecanismos indirectos se encuentran relacionados con la inhibición y control biológico de fitopatógenos, mediante la producción de metabolitos secundarios como: proteasas, sideróforos, compuestos volátiles (Glick, 2014). Las especies de endófitos microbianos que se encuentran con mayor frecuencia en las plantas son: alfa, beta y gama Proteobacteria; Actinobacteria; Firmicutes; Bacteroides; Planctomycetes y Verrucomicrobia, sin embargo, la cantidad de microorganismos depende de los distintos factores abióticos y bióticos (Perez, Rojas, & Fuentes, 2010).

En el presente proyecto se desea analizar si los endófitos aislados del tubérculo de papa tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de *Rhizoctonia solani* usando técnicas *in vitro*.

1.5 Objetivo general

Evaluar la actividad inhibitoria de los microorganismos endófitos obtenidos del tubérculo de la papa para inhibir el crecimiento del fitopatógeno *Rhizoctonia solani* mediante ensayos *in vitro*.

1.6 Objetivo específico

Subcultivar y purificar la colección de endófitos bacterianos previamente aislados de tubérculos de tres variedades de *Solanum phureja*.

Identificar bacterias endofíticas con actividad inhibitoria contra el fitopatógeno *Rhizoctonia solani* mediante ensayos de confrontación *in vitro*.

2. MÉTODOS

2.1 Preparación del medio Tryptic Soy Agar (TSA)

Para realizar la primera parte del proyecto se requirió preparar el medio de cultivo Tryptic Soy Agar (TSA). Para preparar el medio de cultivo se suspendió 40g de medio TSA DIFCO en un frasco Pyrex de 1000mL y se agregó 1L de agua destilada (Tankeshwar, 2019). Posteriormente, se calentó y se mantuvo en constante agitación hasta que el polvo se disolvió completamente, luego se autoclavó a 121°C durante 20min (Tankeshwar, 2019). Por último, se dispensó el medio autoclavado en cajas Petri dentro de la cabina de flujo laminar.

2.2 Subcultivo de endófitos bacterianos aislados de tubérculos de papa en medio de cultivo Tryptic Soy Agar (TSA)

En esta etapa se utilizó la colección de 104 endófitos microbianos aislados de tubérculos de papas a partir de un experimento realizado previamente en el Laboratorio de Agrobiotecnología en la Universidad San Francisco de Quito e INIAP (Spooren, 2020).

Frente a un mechero se tomó con un palillo estéril una pequeña cantidad del inóculo de los stocks almacenados a -80°C y se colocó en un extremo de la caja Petri con el medio TSA, después con un isopo estéril se realizó el primer estriado y para los demás estriados se utilizó el asa de siembra estéril (Minaxi & Saxena, 2010). Posteriormente, se incubó a temperatura ambiente durante 7 días.

2.3 Purificación de endófitos bacterianos

Después de 7 días de incubación se verificó la pureza de cada subcultivo. Si un subcultivo presentaba más de una morfología, se procedió a realizar el aislamiento de todas las morfologías encontradas (Minaxi & Saxena, 2010). Frente a un mechero se recogió con

diferentes palillos estériles cada una de las colonias con distinta morfología, y se colocó cada inóculo en diferentes cajas Petri con medio de cultivo TSA, posteriormente con un isopo se realizó el primer estriado, y para los demás estriados se utilizó un asa de siembra estéril (Minaxi & Saxena, 2010). Para finalizar se incubó los medios ya aislados durante 7 días a temperatura ambiente, cuando se comprobó que solo exista una morfología por cultivo (Minaxi & Saxena, 2010).

2.4 Preparación del medio de cultivo Potato Dextrose Agar (PDA)

El medio de cultivo PDA se usó para el cultivo de *Rhizoctonia solani* y los ensayos *in vitro*. En este caso se utilizó el medio de cultivo deshidratado Potato Dextrose Agar. Primero se colocó 49g del medio en un frasco Pyrex con 1000 mL de agua destilada, después con ayuda de un agitador magnético con calefacción se logró disolver el medio de cultivo PDA y se autoclavó a 121°C por 20 minutos (Rijal, 2015). Posteriormente, se retiró el medio de la autoclave, se dejó enfriar y en una cabina de flujo laminar se repartió el medio en cada una de las cajas Petri, por último, se almacenaron los medios a temperatura (Rijal, 2015).

2.5 Ensayos *in vitro* de endófitos bacterianos contra *Rhizoctonia solani*

Según Shehata, et. al. (2016), durante este proceso se requirió todos los endófitos microbianos puros subcultivados en el medio TSA e incubados durante 7 días. Además, se utilizó el hongo *Rhizoctonia solani* que fue subcultivado en un medio de cultivo PDA e incubado durante 10 días a temperatura ambiente en la oscuridad (Cui, Yang, Wei, Li, & Chen, 2020).

Para realizar los ensayos de inhibición *in vitro*, se utilizó cajas Petri con medios de cultivo PDA. Primero frente a un mechero se abrió la caja Petri con el hongo *Rhizoctonia solani* y con

un sacabocado estéril de 0.7 centímetros de diámetro se cortó un pedazo de agar con el hongo y se colocó en el centro de la nueva caja Petri con el medio PDA (Pérez, León, & Galindo, 2015). Posteriormente con palillos estériles se tomaron las colonias puras de los cultivos de endófitos microbianos y se inocularon a un centímetro del extremo de la caja Petri con el hongo (Pérez, León, & Galindo, 2015). Por último, se incubó por 7 días a temperatura ambiente en la oscuridad. Es importante mencionar que se utilizó como control positivo *Streptomyces lydicus*, el procedimiento de inoculación fue el mismo que con las bacterias endófitas (Perez, Rojas, & Fuentes, 2010). Estos experimentos se realizaron por triplicado para cada aislado.

2.6 Evaluación de endófitos bacterianos con actividad inhibitoria contra el fitopatógeno *Rhizoctonia solani*.

Posterior a 7 días de cultivar los endófitos bacterianos con el hongo *Rhizoctonia solani*, se realizó la identificación de colonias que poseían actividad inhibitoria contra el fitopatógeno *Rhizoctonia solani* (Lahlali & Hijri, 2010). Para esto se observó el crecimiento de los endófitos microbianos en cada caja Petri que fue sembrado por triplicado, y se eligió las cepas bacterianas que presentaron una actividad de inhibición frente al fitopatógeno (Lahlali & Hijri, 2010). Posteriormente, para cada triplicado de endófitos microbianos con actividad de inhibición, se midió las distancias existentes entre las colonias y los micelios del hongo, usando el programa ImageJ 1.52a (Vinayarani & Prakash, 2018).

2.7 Análisis estadístico

Con los valores de distancia, obtenidos por triplicado de cada endófito microbiano con potencial de inhibición, se hizo un análisis de ANOVA de un solo factor, y las comparaciones de las medias se realizó con la prueba de Tukey ($p = 0,05$) mediante el Software Estadístico Minitab 18 (Andreote, y otros, 2009).

3. RESULTADOS

3.1 Subcultivo y purificación de endófitos bacterianos

Se cultivó los 104 aislados de la colección almacenada, en placas de medio TSA. Después de 7 días se observó cada una de las placas, para comprobar que solo exista una sola morfología por aislado. Sin embargo, en 27 cultivos se encontró colonias con distintas características morfológicas. Por lo tanto, se requirió separar las colonias que poseían morfología diferente en nuevas cajas Petri con medio TSA, para así obtener cultivos puros (Figura 2).

En la Tabla 1 se muestra los 27 cultivos que presentaron más de una morfología, en total se obtuvo 61 aislados. Los cultivos B-79-8, D-79-16, B-82-27, D-25-28, B-25-41, B-25-53 y C-25-55, presentaron tres morfologías diferentes, mientras que en los 20 cultivos restantes presentaron colonias con dos morfologías. Se obtuvo un total de 138 colonias sub-cultivadas en medio TSA. El procedimiento de separación es de gran importancia para las siguientes etapas del estudio, debido a que nos permitirá realizar un análisis exhaustivo de todos los aislados individuales encontrados en los tubérculos de papa.

3.2 Evaluación de actividad inhibitoria de endófitos bacterianos frente al fitopatógeno *Rhizoctonia solani*

Para evaluar la actividad inhibitoria de los endófitos bacterianos, se realizó ensayos de confrontación *in vitro* entre cada aislado y el fitopatógeno *Rhizoctonia solani*. Se realizó 38 ensayos, en los cuales por cada placa con PDA se sembró hasta cuatro colonias diferentes de endófitos microbianos, estos fueron ubicados a un centímetro de los extremos y en el centro se colocó un disco micelial de 0,7 centímetros de diámetro de *Rhizoctonia solani*, En estos ensayos de confrontación, 18 aislados (Tabla 2) presentaron un halo de inhibición entre las

colonias y el micelio del fitopatógeno (Figura 3). *Streptomyces lydicus* fue usado como control positivo.

Se midió la distancia que existía entre de cada una de las colonias y los micelios del hongo usando ImageJ 1.52a, de esta manera se obtuvo un promedio por cada triplicado (Tabla 2). La Tabla 2 se encuentra ordenada desde los endófitos que tuvieron una mayor distancia hasta los endófitos que tuvieron una menor distancia de inhibición. La cepa A-79-4 formó un mayor halo de inhibición frente al fitopatógeno, la distancia fue de 6,55 milímetros, mientras que la cepa que obtuvo una menor distancia de inhibición fue B-25.1, ya que, solo se observó un halo de inhibición de 1,823 milímetros entre el micelio del hongo y el endófito.

En la Figura 4 se muestran los 18 endófitos microbianos que tuvieron actividad inhibitoria frente al crecimiento del hongo *Rhizoctonia solani*, y el control positivo conformado por el microorganismo *Streptomyces lydicus*. En la Figura 4, cada barra representa la media de la distancia de inhibición. La letra en la parte superior de cada barra representa el grupo al cual conforma cada endófito microbiano (ANOVA Tukey 5%). Existen diferencias significativas entre algunos grupos de endófitos microbianos, por lo tanto, hay 5 grupos el cuál tienen un potencial de inhibición diferencial (Figura 4).

Se determinó que 10 endófitos (grupo a), tienen un mayor potencial de inhibición frente al crecimiento del fitopatógeno *Rhizoctonia solani*. Es importante destacar que los 10 endófitos con mayor actividad de inhibición deben ser estudiados meticulosamente, ya que, pueden ser potencialmente usados como posibles controladores biológicos.

4. DISCUSIÓN

Actualmente, el desarrollo de nuevas estrategias para manejar enfermedades causadas por hongos en los diferentes cultivos de plantas ha llevado a usar bacterias antagonistas de patógenos como una alternativa ante los controles convencionales (Perry, Moins, & Starr, 2009). Sin embargo, se ha visto que la eficacia de algunos microorganismos no es suficiente para controlar estos fitopatógenos, por lo tanto, una forma de mejorar estos controles biológicos es usando múltiples estrategias. Por esta razón, este estudio se basa en evaluar endófitos microbianos de tubérculos de papa, ya que se ha visto que estos tienen múltiples mecanismos de inhibición para controlar diferentes enfermedades causadas por hongos (Wagas, y otros, 2012). En este caso, se desea conocer la actividad antagonista de estos endófitos específicamente frente al crecimiento del hongo *Rhizoctonia solani*, ya que mediante esta información se pueden encontrar soluciones ante la enfermedad “cancro del tallo” y “costra negra” en cultivos de papa, causadas por este fitopatógeno (Larkin, 2005).

En el presente trabajo fue de gran importancia realizar el subcultivo de 104 endófitos microbianos, estos fueron previamente aislados de tubérculos de papa y almacenados a -80°C, la colección se obtuvo a partir de un estudio, realizado previamente por Spooren, (2020). Posteriormente, se encontró que 27 cultivos tenían colonias con más de una morfología, por lo que se aislaron según sus diferencias morfológicas. El procedimiento de separar los endófitos microbianos es transcendental, de modo que se debe realizar de manera meticulosa, para obtener cultivos con solo una morfología.

Tener cultivos puros es necesario, ya que así se logrará identificar exitosamente las cepas que tienen actividad inhibitoria frente al fitopatógeno *Rhizoctonia solani* (Cui, Yang, Wei, Li, & Chen, 2020). Además, que contribuirá a estudios posteriores para facilitar la identificación molecular de los microorganismos que son de interés (Dale, Beeton, Harbison, Jones, & Pontes, 2006). En la Figura 2 se puede observar la separación exitosa de un cultivo

que tenía dos colonias, estas fueron identificadas porque al visualizar los cultivos existían colonias con distintas características como: color, tamaño, forma, textura. Por lo tanto, se realizó el mismo procedimiento para los 27 cultivos. Así se logró aislar el resto de los cultivos, y en total se subcultivó 138 endófitos microbianos.

Para analizar la actividad de inhibición, todos los microorganismos aislados, fueron examinados mediante ensayos *in vitro* de confrontación contra *Rhizoctonia solani*. En estos ensayos se utilizó un control positivo, de este modo se pudo determinar con mayor seguridad cuáles son los microorganismos que tienen la capacidad de inhibir (Ge, y otros, 2008). El microorganismo utilizado como control positivo fue *Streptomyces lydicus*, puesto que ha sido estudiado ampliamente por su capacidad de controlar e inhibir el crecimiento de diferentes hongos fitopatógenos (Ge, y otros, 2008). *Streptomyces lydicus* produce distintos metabolitos secundarios, como enzimas líticas, las cuales logran descomponer la pared celular de *Rhizoctonia solani* (George, 2019). Otro mecanismo de inhibición es la producción de compuestos sideróforos, los cuales causan una privación de nutrientes y el hongo muere (George, 2019).

La actividad de inhibición de endófitos bacterianos frente a *Rhizoctonia solani* se da por distintos mecanismos. Según la literatura, los endófitos que colonizan los tejidos de la planta pueden producir una variedad de metabolitos secundarios antimicóticos como: enzimas líticas β - (1-3) glucanasas, quitinasas, y compuestos volátiles para contrarrestar el efecto nocivo que causa *Rhizoctonia solani* en los cultivos de papa (Shanmugam, Gupta, & Dohroo, 2013). El efecto de inhibición de los endófitos microbianos se manifestó, al observar en los cultivos una distancia entre el micelio del hongo y la cepa (Figura 3). Este resultado puede interpretarse en el contexto de los mecanismos que poseen los endófitos para controlar a *Rhizoctonia solani*, como el antagonismo directo (Lugtenberg & Kamilova, 2009). Sin embargo, otro mecanismo

es por competencia, en el cual los endófitos combaten con el fitopatógeno por los nutrientes presentes en el agar (Rosenblueth & Martínez, 2017).

Para conocer cuales endófitos poseen un mayor potencial antagonista se midió el halo de inhibición de los 18 endófitos en cada uno de los triplicados. En este caso, se encontró que el endófito A-79-4 tiene una mayor distancia de inhibición, mientras que el endófito B-25-41 es el que menor distancia tiene frente al crecimiento del micelio del hongo. A pesar de no conocer a que especie corresponden estos endófitos, se ha determinado en algunos estudios que las cepas que tienen actividad antifúngica frente a *Rhizoctonia solani* son: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, algunos actinomicetos como *Streptomyces mutabilis* y *Streptomyces cyneofuscatus* (Selim, Gomaa, & Essa, 2016). Por lo tanto, los endófitos estudiados en este proyecto probablemente pueden estar relacionados con estas cepas.

Luego de tener el promedio de la distancia de inhibición de los 18 endófitos, se realizó una prueba estadística ANOVA de un solo factor, y se determinó que hay una diferencia estadísticamente significativa en la distancia de inhibición entre los distintos microorganismos. Complementariamente, se realizó una prueba de Tukey y se confirmó cuáles son los endófitos que difieren entre sí. En la Figura 4, se analiza que los 10 endófitos que conforman el (grupo a), tienen una mayor actividad antifúngica frente al fitopatógeno. A pesar de existir diferencias en las distancias de inhibición, estos microorganismos tienen el mismo potencial. Es importante mencionar que el control positivo (*Streptomyces lydicus*) se encuentra dentro de este grupo, por lo tanto, esto nos asegura que los endófitos (grupo a), pueden ser microorganismos potenciales para controlar el crecimiento del fitopatógeno.

Aunque, se determinó cuáles endófitos tienen un efecto de inhibición, es necesario realizar otro tipo de pruebas para poder evaluar y determinar con seguridad el antagonismo contra *Rhizoctonia solani*. Por consiguiente, se debe efectuar otra evaluación *in vitro*, como la confrontación en ensayos de cultivo dual, esta técnica nos permitirá tener resultados veraces y

con menos errores, puesto que se tiene mayor control en distintos factores (Sriraj, Sundravadana, & Alice, 2014). Además, se debe utilizar un control negativo en el cual solo crecerá el patógeno (Vinayarani & Prakash, 2018). Para tener resultados específicos se debe calcular el porcentaje de inhibición frente al crecimiento del micelio (Sriraj, Sundravadana, & Alice, 2014). Por lo tanto, el error estándar se reducirá y los resultados nos indicaran información veraz sobre la actividad de inhibición (Vinayarani & Prakash, 2018).

Debido a que *Rhizoctonia solani* es uno de los fitopatógenos que ha causado mayores efectos negativos en los cultivos de papas, ha sido de gran interés para los investigadores desarrollar técnicas para controlar la enfermedad (Lahlali & Hijri, 2010). Por lo tanto, al tratar de desarrollar controles biológicos, en varios estudios indican que los ensayos *in vivo* son indispensables para analizar la actividad antagonista de los microorganismos (Barnard & Gurevich, 2005). En este estudio no se logró realizar bioensayos *in vivo* con los 10 endófitos prometedores, sin embargo, es de gran importancia, puesto que nos permitirá evaluar los efectos que tienen los endófitos en tubérculos y plantas infectadas con *Rhizoctonia solani*.

Para el uso de controles biológicos, además de los ensayos de inhibición, es necesario realizar otro tipo de análisis como la identificación a base de ADN (Shehata, Lyons, Jordan, & Raizada, 2016). Mediante este análisis se caracterizará y se identificará a que cepas pertenecen los distintos microorganismos con actividad de inhibición frente a *Rhizoctonia solani* (Shehata, Lyons, Jordan, & Raizada, 2016). La identificación molecular se realiza a través de la secuenciación del gen 16S rRNA, siendo una técnica específica para bacterias (Patel, Shah, Joshi, Ramar, & Natarajan, 2019). Este análisis confiere varias ventajas para el uso de controles biológicos, ya que, permite conocer específicamente las especies de microorganismos endófitos con actividad antagonista (Shehata, Lyons, Jordan, & Raizada, 2016). Por lo tanto, se pueden crear controles biológicos para minimizar los efectos nocivos de *Rhizoctonia solani* en cultivos de papa (Shehata, Lyons, Jordan, & Raizada, 2016).

5. CONCLUSIONES

El presente estudio demostró mediante ensayos *in vitro* que 10 microorganismos endófitos aislados de tubérculos de papas tienen un potencial de inhibición contra el fitopatógeno *Rhizoctonia solani*, debido a que tuvieron la capacidad de formar una zona de inhibición significativa, al suprimir el crecimiento del hongo. No obstante, para realizar estos ensayos fue de gran relevancia trabajar con cultivos que contengan un solo aislado de endófitos microbianos. Por lo tanto, este estudio reveló la importancia del aislamiento de colonias en cultivos que tenían más de dos morfologías, ya que, así se logró realizar los ensayos con todos los endófitos microbianos. Puesto que, con mayor validez se puede determinar que las 10 bacterias endófitas pueden ser microorganismos potenciales para inhibir el crecimiento del hongo *Rhizoctonia solani*.

A pesar de los resultados obtenidos en este proyecto, la investigación detallada sobre ensayos *in vitro* no es suficiente para confirmar que los 10 endófitos con potencial de inhibición son capaces de contrarrestar los efectos negativos causados por *Rhizoctonia solani* en plantas y tubérculos de papas. Por ello, se recomienda realizar bioensayos *in vivo* con estos 10 posibles endófitos, para confirmar la actividad antifúngica e identificar los efectos que producen en plantas y tubérculos cuando están infectados con este fitopatógeno.

Por otro lado, después de realizar los estudios de inhibición y determinar cuáles son los endófitos antagonistas del fitopatógeno, es necesario identificarlos usando técnicas a base de ADN, debido a que, con esta información se puede realizar estudios exhaustivos, para conocer los mecanismos de inhibición y evaluar los efectos para minimizar la enfermedad producida por *Rhizoctonia solani* en cultivos de papa.

6. REFERENCIAS

- Andrade, M., & Sherwood, S. (2002). *La Papa en el Ecuador*. Quito: INIAP.
- Andreote, F., Araújo, W. d., Azevedo, J., Elsas, J., Rocha, U., & Overbeek, L. (2009). Endophytic Colonization of Potato (*Solanum tuberosum L.*) by a Novel Competent Bacterial Endophyte, *Pseudomonas putida* Strain P9, and Its Effect on Associated Bacterial Communities. *Plant Microbiology*, 75(11), 3396-3406. doi:10.1128/AEM.00491-09
- Bains, P., Bennypaul, H., Lynch, D., Kawchik, L., & Schaupmeyer, C. (2002). Rhizoctonia disease of potatoes (*Rhizoctonia solani*): Fungicidal efficacy and cultivar susceptibility. *American Journal of Potato Research*, 79, 99-106.
- Barnard, R., & Gurevich, K. (2005, Febrero 7). In vitro bioassay as a predictor of in vivo response. *Theoretical Biology and Medical Modelling*, 2(3). doi:10.1186/1742-4682-2-3
- Boogert, P. V., & Luttikholt, A. (2004). Compatible biological and chemical control systems for *Rhizoctonia solani* in potato. *Eur. J. Plant Pathol*, 110, 111-118.
- Brink, L. v., & Wustman, R. (2014). *Rhizoctonia solani* in potatoes and its control. *Praktijkonderzoek Plan & omgeving*, 1-27.
- Calleros, V., Olalde, V., & Carling, D. (2000). Anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* on potato in Central Mexico and potential for biological and chemical control. *Am J Potato Re*, 77, 219–224.
- Cortéz, R., & Hurtado, G. (2002). *Guía técnica Cultivo de la Papa*. San Salvador: Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal CENTA.
- Cui, L., Yang, C., Wei, L., Li, T., & Chen, X. (2020, Febrero). Isolation and identification of an endophytic bacteria *Bacillus velezensis* 8-4 exhibiting biocontrol activity against

potato scab. *Biological Control*, 141.

doi:<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104156>

Dale, C., Beeton, M., Harbison, C., Jones, T., & Pontes, M. (2006, Abril). Isolation, Pure Culture, and Characterization of “Candidatus *Arsenophonus arthropodicus*,” an Intracellular Secondary Endosymbiont from the Hippoboscid Louse Fly *Pseudolynchia canariensis*. *Applied and Environment Microbiology*, 4(72), 2997-3004. doi:10.1128/AEM.72.4.2997-3004.2006

Downing, K., & Thomson, J. (2000). Introduction of the *Serratia marcescens* chiA gene into an endophytic *Pseudomonas fluorescens* for the biocontrol of phytopathogenic fungi. *Can. J. Microbiol*, 46, 363–369.

FAO. (2009, Marzo 04). *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*. Retrieved from La papa: <http://www.fao.org/potato-2008/es/lapapa/tuberculo.html>

FAOSTAT. (2019, Enero 5). *Los 25 principales países productores de papa*. Retrieved Febrero 26, 2020, from FAOSTAT: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>

Ge, C., Cheng, W., Yan, J., Min, H., Liu, T., & De, W. (2008, Diciembre 1). Identification of an antifungal metabolite produced by a potential biocontrol Actinomyces strain A01. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(4), 701-707. doi:10.1590/S1517-838220080004000020

George, H. (2019, Agosto 12). *How to use Streptomyces lydicus to control fungal plant diseases*. Retrieved Abril 19, 2020, from Gardener’s Path: <https://gardenerspath.com/how-to/organic/streptomyces-lydicus-use/>

Glick, B. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiol. Res*, 169, 30-39.

- Hawkes, J., Brads, J., & Mackay, G. (1994). Origins of cultivated potatoes and species relationships. *Potato genetics*, 3-42.
- INEC. (2019, Julio 17). *2018: Seis cultivos con mayor producción en Ecuador*. Retrieved Febrero 27, 2020, from Instituto Nacional de Estadística y Censos: <https://www.ecuadorencifras.gob.ec/2018-seis-cultivos-con-mayor-produccion-en-ecuador/>
- INIAP. (2002). *El Cultivo de la Papa en Ecuador*. (M. Pumisacho, & S. Sherwood, Editors) Retrieved Febrero 27, 2020, from El Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias: <https://cipotato.org/wp-content/uploads/Documentacion%20PDF/Pumisacho%20y%20Sherwood%20Cultivo%20de%20Papa%20en%20Ecuador.pdf>
- Kanetis, L., Tsimouris, D., & Christoforou, M. (2016, Mayo 5). Characterization of *Rhizoctonia solani* Associated with Black Scurf in Cyprus. *Plant Diseases*, 100(8). doi:<https://doi.org/10.1094/PDIS-10-15-1238-RE>
- Lahlali, R., & Hijri, M. (2010, Octubre 1). Screening, identification and evaluation of potential biocontrol fungal endophytes against *Rhizoctonia solani* AG3 on potato plants. *FEMS Microbiology Letters*, 311(2), 152-159. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02084.x>
- Larkin, M. B. (2005, Enero 21). Efficacy of several potencial biocontrol organisms against *Rhizoctonia solani* on potato. *Crop Protection*, 24(11), 939-950. doi:[doi:10.1016/j.cropro.2005.01.012](https://doi.org/10.1016/j.cropro.2005.01.012)
- Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009, Octubre 13). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63, 541-556. doi:<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918>

- Minaxi, J., & Saxena, J. (2010). Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* RM-3 as a potential biocontrol agent. *Mycopathologia*, *170*, 181-193. doi:10.1007/s11046-010-9307-4
- Monteros, C., & Reinoso, I. (2010). Biodiversidad y oportunidades de mercado para las papas nativas ecuatorianas. *INIAP*, 11.
- Monteros, C., Cuesta, X., Jiménez, J., & López, G. (2005). Las papas nativas en el Ecuador. *INIAP-CIP*, 26.
- Motesdeoca, F., Andrade, H., Cuesta, X., & Carrera, E. (2007). Información Técnica de la Variedad de Papa. *INIAP- Suprema*, 1-10.
- Patel, P. P., Shah, R., Joshi, B., Ramar, K., & Natarajan, A. (2019, Febrero 15). Molecular identification and biocontrol activity of sugarcane rhizosphere bacteria against red rot pathogen *Colletotrichum falcatum*. *Biotechnol Reports*, *21*. doi:10.1016/j.btre.2019.e00317
- Perez, A., Rojas, J., & Fuentes, J. (2010). Diversidad de bacterias endófitas asociadas a raíces del pasto colosuana (*Bothriochloa pertusa*) en tres localidades del departamento de Sucre, Colombia. *Acta Biol. Colombia*, *15*, 219-228.
- Pérez, F., León, J., & Galindo, N. (2015). Actinomicetos aislados del compost y su actividad antagonista a fitopatógenos de la papa (*Solanum tuberosum* spp. *andigena* Hawkes). *Revista mexicana de fitopatología*, *33*(2), 116-139. Retrieved Mayo 1, 2020, from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092015000200116&lng=es&nrm=iso
- Perry, R., Moins, M., & Starr, J. (2009). *Biological control using microbial pathogens, endophytes and antagonists*. Wallingford: CABI. Retrieved Abril 19, 2020
- Plasited, R. (1982). *Hybridization of Crop Plants*. Nueva York: Editorial Committee.

- Prokop, S., & Albert, J. (2008, Marzo 23). *Las papas, la nutrición y la alimentación*. Retrieved Febrero 26, 2020, from FAO: <http://www.fao.org/potato-2008/es/lapapa/IYP-6es.pdf>
- Rijal, N. (2015, Junio 1). *Potato Dextrose Agar (PDA): principle, composition and colony characteristics*. Retrieved Mayo 1, 2020, from Culture Media Used In Microbiology: <https://microbeonline.com/potato-dextrose-agar-pda-principle-composition-colony-characteristics/>
- Rosenblueth, M., & Martínez, E. (2017, Febrero 14). Bacterial Endophytes and Their Interactions with Hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(8). doi:<https://doi.org/10.1094/MPMI-19-0827>
- Selim, H., Gomaa, N., & Essa, A. (2016, Noviembre 7). Application of endophytic bacteria for the biocontrol of *Rhizoctonia solani* (Cantharellales:Ceratobasidiaceae) damping-off disease in cotton seedlings. *Biocontrol Science and Technology*, 14(25), 1-33. doi:[10.1080/09583157.2016.1258452](https://doi.org/10.1080/09583157.2016.1258452)
- Shanmugam, V., Gupta, S., & Dohroo, N. (2013, Enero). election of a compatible biocontrol strain mixture based on co-cultivation to control rhizome rot of ginger. *Crop Protection*, 43, 119-127. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.08.012>
- Shehata, H., Lyons, E., Jordan, K., & Raizada, M. (2016, Enero 16). Relevance of in vitro agar based screens to characterize the anti-fungal activities of bacterial endophyte communities. *BMC Microbiology*, 16(8). doi:<https://doi.org/10.1186/s12866-016-0623-9>
- Sorensen, J., & Sessitsch, A. (2007). Plant-associated bacteria—lifestyle and molecular interactions. *En Modern Soil Microbiology*, 211-236.
- Spooren, J. (2020). *Mining the Microbiome: Unearthing Bacterial Communities that Reside in Tubers of Native (Andean) Potato Varieties*. Utrecht University, Politécnico . Quito: Universidad San Francisco de Quito. Retrieved Abril 20, 2020

- Sriraj, P., Sundravadana, S., & Alice, D. (2014, Septiembre 03). Efficacy of fungicides, botanicals and bioagents against *Rhizoctonia solani* inciting leaf blight on turmeric (*Curcuma longa* L.). *Academic Journal of Microbiology Research*, 8(36), 3284-3294. doi:<https://doi.org/10.5897/AJMR2013.6315>
- Tankeshwar, A. (2019, Febrero 9). *Tryptic Soy Agar (TSA): Composition, Preparation and Uses*. Retrieved Mayo 1, 2020, from Bacteriology: <https://microbeonline.com/tryptic-soy-agar-tsa-composition-preparation-uses/>
- Villarreal, A. (2013, Diciembre 11). “*Evaluación de fungicidas alternativos (Fludioxonil y Azoxystrobin), para el control de costra negra (Rhizoctonia solani Kuhn) y roña (Spongospora subterránea) de suelo en el cultivo de papa (Solanum tuberosum L.), Carchi - Ecuador.*”. Retrieved Marzo 03, 2020, from Universidad Politécnica Estatal del Carchi: <http://repositorio.upec.edu.ec/bitstream/123456789/36/1/172%20EVALUACION%20DE%20FUNGICIDAS%20ALTERNATIVOS%20%28FLUDIOXONIL%20Y%20AZOXYSTROBIN%29%2C%20PARA%20EL%20CONTROL%20DE%20COSTRA%20NEGRA%20%28RHIZOCTONIA%20SOLANI%20KUHN%29%20Y%20RO%20-%20>
- Vinayarani, G., & Prakash, H. (2018, Junio 1). Growth Promoting Rhizospheric and Endophytic Bacteria from *Curcuma longa* L. as Biocontrol Agents against Rhizome Rot and Leaf Blight Diseases. *The Plant Pathology Journal*, 3(34), 218-235. doi:10.5423/PPJ.OA.11.2017.0225
- Wagas, M., Khan, A., Kamran, M., Hamayun, M., Kang, S., Kim, Y., & Lee, I. (2012, Septiembre 7). Endophytic fungi produce gibberellins and indoleacetic acid and promotes host-plant growth during stress. *Molecules*, 17(9), 10754-10773. doi:<https://doi.org/10.3390/molecules170910754>

Wharton, P., & Wood, E. (2013). Rhizoctonia stem canker and blank scurf of potato. *University of Idaho Extension* , 1-5.

7. TABLAS

Tabla 1: Aislamiento de colonias con distintas morfologías en un subcultivo

Muestra de colección (Chaucha ratona)	Muestras separadas	Muestra de colección (Yema de huevo)	Muestras separadas	Muestra de colección (Chaucha amarilla tipo 1)	Muestras separadas
A-79-1	A-79-1.1	A-82-3	A-82-3.1	C-25-11	C-25-11.1
	A-79-1.2		A-82-3.2		C-25-11.2
B-79-1.2	B-79-1.2.1	A-82-5	A-82-5.1	C-25-21.1	C-25-21.1.1
	B-79-1.2.2		A-82-5.2		C-25-21.1.2
A-79-6	A-79-6.1	C-82-13	C-82-13.1	D-25-28	D-25-28.1
	A-79-6.2		C-82-13.2		D-25-28.2
B-79-8	B-79-8.1	C-82-14	C-82-14.1	B-25-41	D-25-28.3
	B-79-8.2		C-82-14.2		B-25-41.1
	B-79-8.3	C-82-15	C-82-15.1		B-25-41.2
C-79-11	C-79-11.1	D-82-16	C-82-15.2	D-25-46	B-25-41.3
	C-79-11.2		D-82-16.1		D-25-46.1
C-79-13	C-79-13.1	D-82-17	D-82-16.2	B-25-53	D-25-46.2
	C-79-13.2		D-82-17.1		B-25-53.1.1
D-79-16	D-79-16.1	D-82-18	D-82-17.2	C-25-55	B-25-53.1.2
	D-79-16.2		D-82-18.1		B-25-53.2
	D-79-16.3	D-82-18.2	C-25-55.1		
D-79-17	D-79-17.1	B-82-27	B-82-27.1		C-25-55.2
	D-79-17.2		B-82-27.2		C-25-55.3
D-79-19	D-79-19.1		B-82-27.3		
	D-79-19.2				
B-79-52	B-79-52.1				
	B-79-52.2				
C-79-54	C-79-54.1				
	C-79-54.2				

La tabla muestra los 27 subcultivos que presentaron colonias con diferente morfología y en cuantos cultivos se separó dependiendo de las distintas morfologías encontradas. La tabla está dividida por cultivos de endófitos microbianos pertenecientes a diferentes variedades de *Solanum phureja*: Chaucha ratona, Yema de huevo, Chaucha amarilla tipo 1.

Tabla 2: Distancia de inhibición entre endófitos bacterianos contra el patógeno *Rhizoctonia solani*

Variedad de <i>Solanum phureja</i>	Endófito microbiano	Distancia de inhibición (milímetros \pm Desviación estándar)
Chaucha ratona	A-79-4	6.55 \pm 1.77
Chaucha ratona	D-79-19.2	6.421 \pm 0.87
n.c	<i>S. lydicus</i> (*)	6.226 \pm 0.80
Yema de huevo	A-82-5.2	5.762 \pm 0.97
Yema de huevo	C-82-15.2	5.225 \pm 0.79
Yema de huevo	D-82-17.1	5.129 \pm 1.42
Yema de huevo	D-82-16.2	5.08 \pm 1.05
Chaucha amarilla tipo I	B-25-40	4.494 \pm 1.03
Chaucha amarilla tipo I	C-25-24	4.41 \pm 0.53
Chaucha amarilla tipo I	C-25-55.3	4.05 \pm 1.20
Chaucha amarilla tipo I	B-25-53.2	3.306 \pm 0.93
Yema de huevo	C-82-22	3.23 \pm 1.94
Chaucha amarilla tipo I	C-25-55.2	3.227 \pm 0.99
Yema de huevo	C-82-21	2.75 \pm 0.80
Chaucha amarilla tipo I	A-79-3.1	2.74 \pm 0.87
Yema de huevo	A-82-7	2.401 \pm 0.89
Chaucha amarilla tipo I	C-25-21	2.178 \pm 1.01
Yema de huevo	D-82-37	2.031 \pm 0.38
Chaucha amarilla tipo I	B-25-1	1.823 \pm 0.66

La tabla indica la media y la desviación estándar de la distancia de inhibición formada entre los 18 endófitos microbianos y el crecimiento del micelio del hongo *Rhizoctonia solani*. (*) *Streptomyces lydicus* corresponde al control positivo del experimento. La distancia fue medida en el programa ImageJ 1.52a.

8. FIGURAS

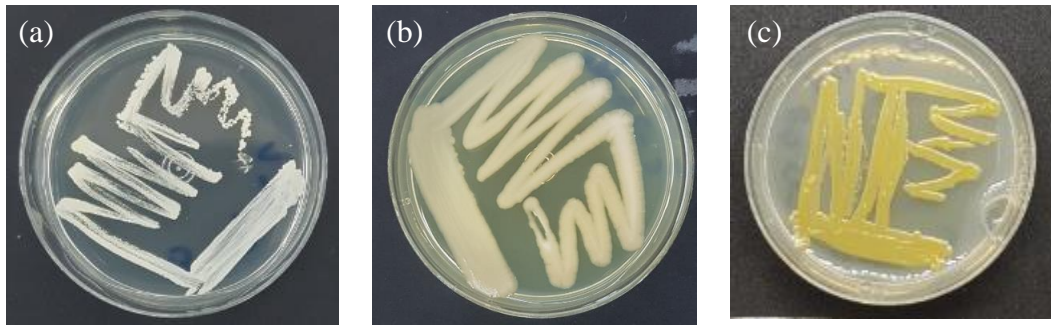


Figura 1: Endófitos aislados de tres variedades de *Solanum phureja*: Chaucha ratona, Chaucha amarilla tipo I y Yema de huevo

En la figura se presenta algunas bacterias endofíticas que conforman la colección de microorganismos que fueron aislados previamente en un estudio realizado en el Laboratorio de Agrobiotecnología en la Universidad San Francisco de Quito. (a) B-79-8.1 fue aislado del tubérculo de papa de la variedad Chaucha ratona, (b) C-25-45 fue aislado del tubérculo de papa de la variedad Chaucha amarillo tipo I, (c) C-82-13 fue aislado de tubérculo de papa de la variedad Yema de huevo. Estos microorganismos fueron usados durante el actual estudio para evaluar la actividad de inhibición frente al fitopatógeno *Rhizoctonia solani*.

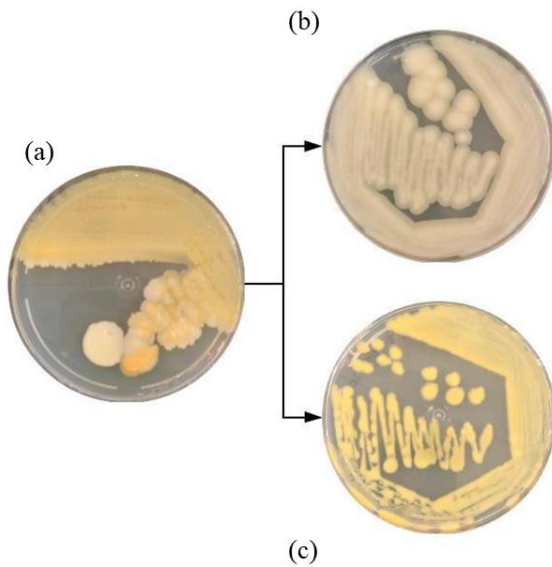


Figura 2: Purificación de cultivo con más de una morfología

En la figura se presenta el correcto re-aislamiento de un cultivo en el cual existe dos colonias con diferentes características morfológicas. (a) D-25-46, cultivo con dos colonias de endófitos microbianos. (b) D-25-46-1, cultivo de endófitos re-aislados, colonias de color amarillo crema. (c) D-25-46-2, cultivo de endófitos re-aislados, colonias de color amarillo intenso.

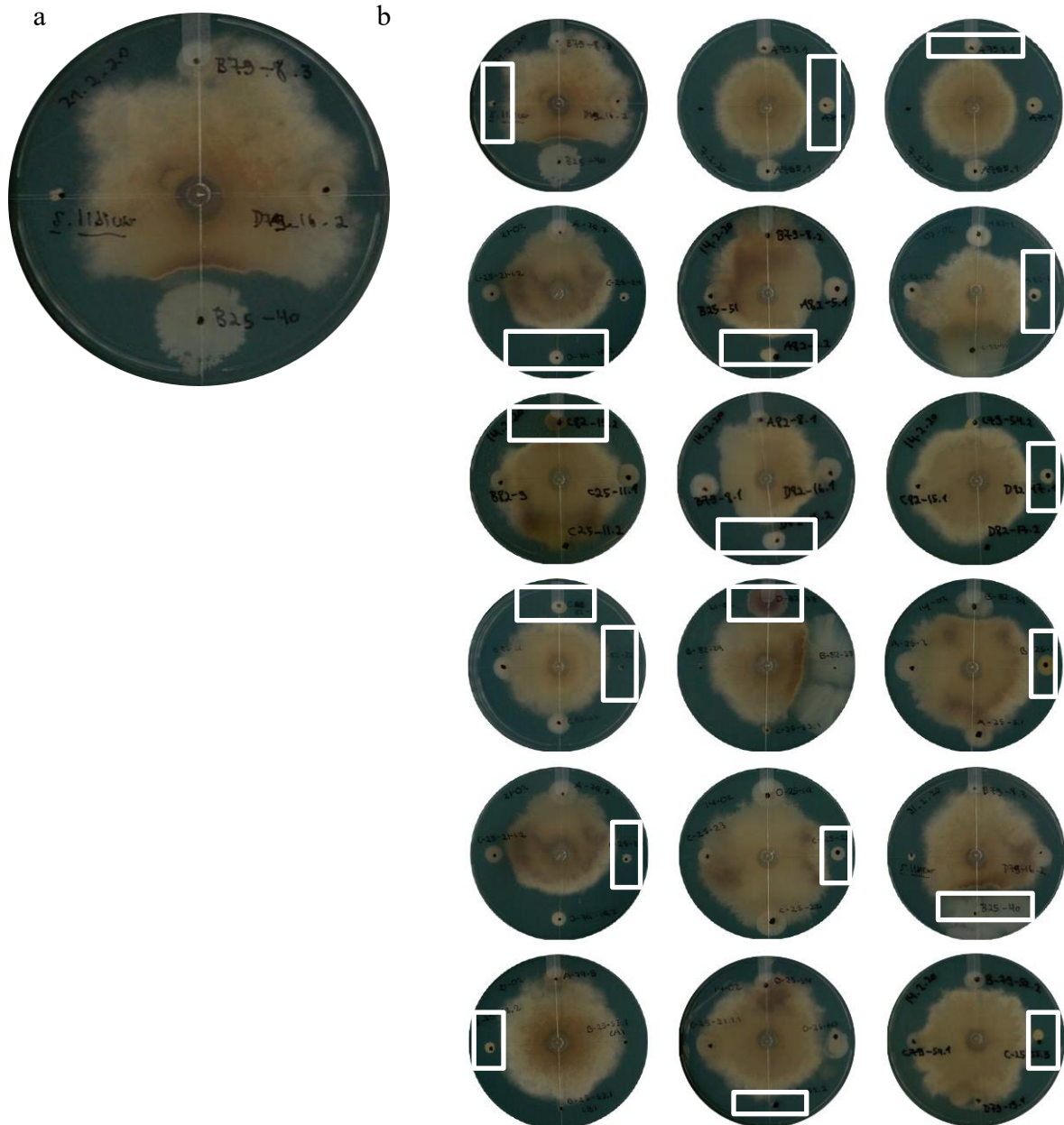


Figura 3: Cultivo de confrontación entre *Rhizoctonia solani* y endófitos microbianos aislados de tubérculos de *Solanum Phureja*

(a) B-25-40 y *Streptomyces lydicus* inhiben crecimiento del patógeno. Los endófitos B-79-8.3 y B-79-16.2 promueven el crecimiento de *Rhizoctonia solani*, (b) En total se encontró 18 endófitos con actividad de inhibición frente a *Rhizoctonia solani*. En la figura se señala con un recuadro las colonias que tienen actividad de inhibición en cada ensayo de confrontación contra el fitopatógeno.

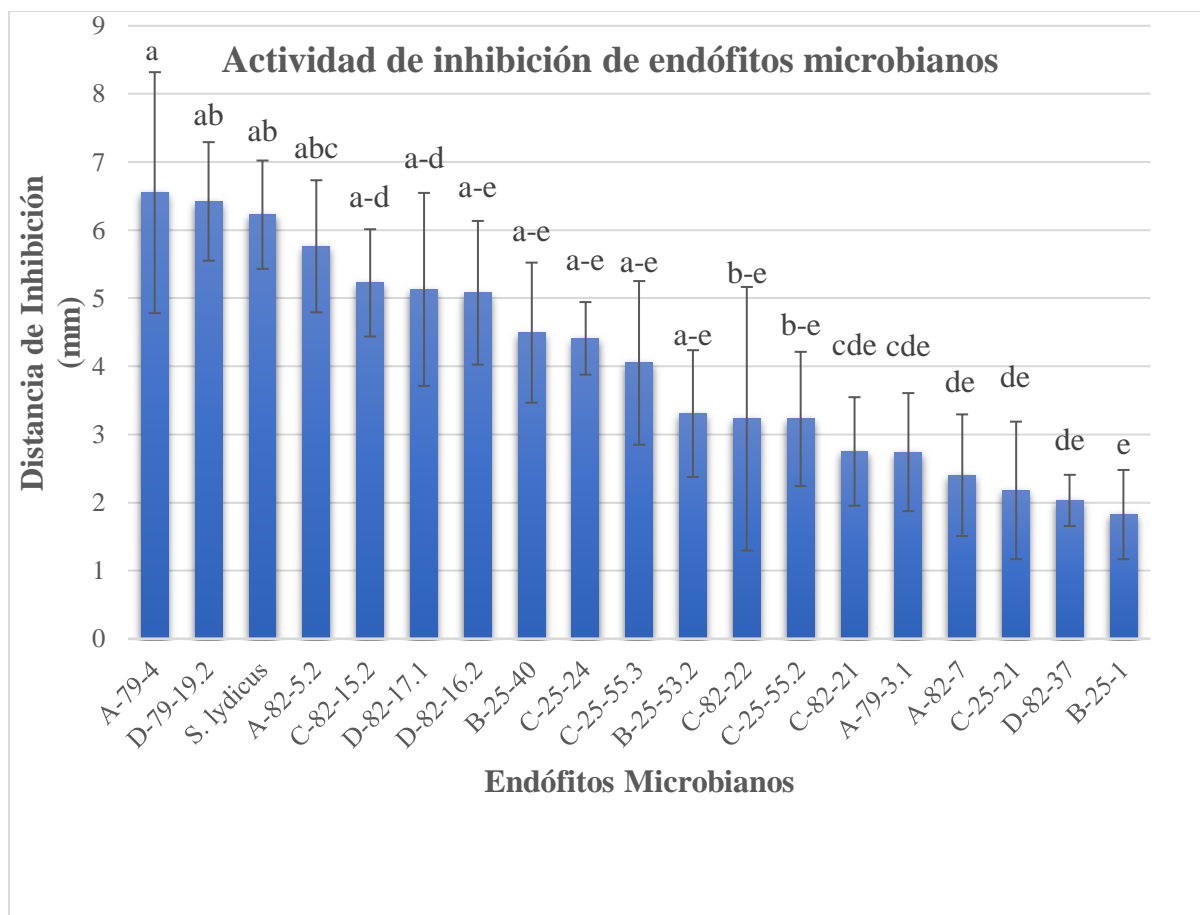


Figura 4: Evaluación *in vitro* de la distancia de inhibición entre los endófitos microbianos frente al fitopatógeno *Rhizoctonia solani*

La gráfica muestra las medias de la distancia de inhibición (mm) formada por cada endófito con potencial antifúngico. Las barras de error indican la desviación estándar del valor promedio de la distancia. Las letras en la parte superior de cada barra indican los grupos al cual pertenece cada endófito. Los 10 endófitos que conforman el (grupo a), más el control positivo (*Streptomyces lydicus*), indican que tienen un mayor potencial para inhibir el crecimiento del fitopatógeno *Rhizoctonia solani*. La información se obtuvo a partir de ANOVA y Tukey con un nivel de significancia del 95%.