



UNIVERSIDAD TECNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

AREA BIOLÓGICA

TITULACIÓN DE BIOQUÍMICO FARMACEÚTICO

“Evaluación y selección de bacterias promotoras de crecimiento vegetal y su capacidad de antagonismo frente *Rhizoctonia solani*”

TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

AUTOR: Alba Arévalo, Tairi Andrehina

DIRECTOR: Vivanco Galván, Oscar Amable, BQF

LOJA-ECUADOR

2014

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DE TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

BQF.

Oscar Amable Vivanco Galván

DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo, denominado: "Evaluación y selección de bacterias promotoras de crecimiento vegetal y su capacidad de antagonismo frente a *Rhizoctonia solani*" realizado por Alba Arévalo Tairi Andrehina, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por se aprueba la presentación del mismo.

Loja, marzo del 2014.

f)

BQF. Oscar Amable Vivanco Galván
DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

DECLARACIÓN DE AUTORIA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo, Tairi Andrehina Alba Arévalo declaro ser autor (a) del presente trabajo de fin de titulación: Evaluación y selección de bacterias promotoras de crecimiento vegetal y su capacidad de antagonismo frente a *Rhizoctonia solani*, de la Titulación de Bioquímico Farmacéutico, siendo Oscar Amable Vivanco Galván director (a) del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f)

.....

Alba Arévalo Tairi Andrehina

190062454-3

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a Dios y a la Virgen del Cisne, quienes inspiraron mi espíritu durante todo mi transcurso de vida universitaria y a la conclusión con éxito de la misma. A mis padres Segundo y Wilma pilares fundamentales en mi formación, ustedes me dieron la vida, educación, apoyo y consejos; a mi hermano Jhimy; a mis tíos Edy y Mariuxi quienes son mis segundos padres, a Samael y Adrián por ser más que mis primos mis hermanos, en general a toda mi familia por su apoyo y palabras de aliento. A todos mis compañeros y amigos de estudio, a mis profesores.

Les dedico a ustedes hoy mi trabajo, dedicación y esfuerzo con todo mi cariño y mi amor, al igual que la felicidad que me causa terminar una etapa en mi vida profesional.

Tairi

AGRADECIMIENTOS

A Dios quien ha sido la guía constante y ha iluminado siempre mi camino; a mis Padres, por todo su amor, por estar ahí en todo momento de mi vida, por sus enseñanzas valiosas y por confiar en mí, todo esto es por ustedes; a mi hermano por sus ocurrencias y ánimos en todo momento.

A la Universidad Técnica Particular de Loja por formarnos personal y profesionalmente.

Al proyecto VALORAM por el financiamiento del presente trabajo de investigación.

Al Ing. Paul Loján y todo el personal que forman parte del grupo de Micorrizas, del Departamento de Ciencias Naturales por su disposición y ayuda prestada.

De manera especial al Bioquímico- Farmacéutico Oscar Vivanco, director de esta investigación y mi amigo, por su confianza, paciencia y ayuda.

A mi Familia, mis amigos y a todas las personas que hicieron posible alcanzar esta meta y logro importante en mi vida. Gracias

Tairi Andrehina Alba Arévalo

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARATULA.....	I
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DE TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN	II
DECLARACIÓN DE AUTORIA Y CESIÓN DE DERECHOS	III
DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTOS	V
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	VI
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ABREVIATURAS	X
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPITULO I	
1 ASPECTOS GENERALES	6
1.1 Rizósfera.....	6
1.2 Rizobacterias	6
1.3 Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR).....	7
1.3.1 <i>Azotobacter</i>	8
1.3.2 <i>Azospirillum</i>	9
1.3.3 <i>Acetobacter</i>	9
1.3.4 <i>Bacillus sp.</i>	9
1.3.5 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	9
1.3.6 <i>Actinomycetos</i>	10
1.4 Capacidades promotoras del crecimiento vegetal	11
1.4.1 Actividad antifúngica.....	11
1.4.2 Producción de ácido indol acético (AIA).....	11
1.4.3 Solubilización de fosfatos	12
1.4.4 Producción de sideróforos	13
1.4.5 Producción de metabolitos volátiles	14
1.4.6 Producción no simbiótica de nitrógeno.....	14
1.4.7 Producción de quitinasas.....	14
1.5 <i>Rhizoctonia solani</i>	15
1.5.1 Taxonomía de <i>Rhizoctonia solani</i>	15
1.5.2 <i>Rhizoctonia solani</i> como agente fitopatógeno	15
1.5.3 Ciclo de infección de <i>Rhizoctonia solani</i>	16

1.5.4	Control de <i>Rhizoctonia solani</i>	17
1.5.5	Cultivos afectados por <i>Rhizoctonia solani</i>	17
CAPITULO II		
2	MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
2.1	Lugar de muestreo y estudio	22
2.2	Material biológico	22
2.3	Preparación de medios de cultivo y reactivos.....	23
2.4	Multiplicación in Vitro del hongo fitopatógeno.....	23
2.5	Multiplicación <i>in vitro</i> de cultivos microbianos	23
2.6	Pruebas para capacidades promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) <i>in vitro</i>	24
2.6.1	Prueba de antagonismo en placa (<i>Rhizoctonia solani</i>).....	24
2.6.2	Prueba de producción de Ácido Indol Acético (AIA).....	24
2.6.3	Prueba solubilización de fosfato	25
2.7	Análisis de resultados	25
CAPITULO III		
3	RESULTADOS.....	26
3.1	Prueba de antagonismo en placa (<i>Rhizoctonia solani</i>).....	26
3.2	Prueba de producción de ácido indol acético (IAA)	26
3.3	Prueba solubilización de fosfato	28
CAPITULO IV		
4	DISCUSIÓN.....	31
4.1	Prueba de antagonismo en placa (<i>Rhizoctonia solani</i>).....	31
4.2	Prueba de producción de ácido indol acético (IAA)	31
4.3	Prueba solubilización de fosfato	32
CONCLUSIONES.....		34
RECOMENDACIONES		35
BIBLIOGRAFÍA.....		36
ANEXOS.....		44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Número, código, provincia y localidad procedentes de las muestras.	22
Tabla 2: Resultados de las 46 cepas evaluadas; (-) 0% de inhibición frente a <i>R. solani</i> , (+) 50-250 $\mu\text{g/ml}^{-1}$, (++) 300-450 $\mu\text{g/ml}^{-1}$ y (+++) 500-600 $\mu\text{g/ml}^{-1}$ de AIA.....	32
Tabla 3: Diluciones de ácido indol acético puro mas medios de cultivo (AIA).....	45
Tabla 4: Información de las cepas utilizadas para la evaluación PGPR.....	46
Tabla 5: Análisis de varianza, prueba de solubilizacion de fosfato.....	50
Tabla 6: Prueba de Scheffe, solubilización de fosfato.	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Cultivo de <i>R. solani</i> , en estado maduroformando esclerocios (coloración café) en medio PDA.....	16
Figura 2: Cultivo de <i>R. solani</i> con crecimiento total en caja (5 días de crecimiento) adecuada para la formulación de la prueba de antagonismo, en medio PDA.	23
Figura 3: Siembra en estriado de <i>Streptomyces</i> sp. en medio TSA, crecimiento apto para las pruebas de antagonismo, ácido indol acético y solubilización de fosfato.....	23
Figura 4: Bacterias inhibitorias de <i>Rhizoctonia solani</i> , E4-13 y E3-2 cepas representativas de la prueba Kruskal-Wallis.	26
Figura 5: Representación en barra de la concentración de AIA. A) Cepas en caldo TSB; B) Cepas en caldo TGE y C) Cepas en caldo nutritivo.	27
Figura 6: Solubilización de fosfato a los 30 días. Prueba de Scheffe, agrupamiento de medias, letras a, b, bc, c, d, e, f, fg y g. Tabla 6.....	28
Figura 7: Bacterias solubilizadoras de fosfato durante los 30 días de evaluación (15 días cada 48 horas).....	29
Figura 8: Cultivos bacterianos de la prueba de antagonismo: A. Cepa con 43,7% de inhibición, B. Presenta 0% de inhibición cajacubierta del patógeno <i>R. solani</i> y C. Es un control de la prueba.	47
Figura 9: Concentraciones de AIA puro en medio de cultivo TSB. Absorbancia en el espectrofotómetro.....	48
Figura 10: Concentraciones de AIA puro en medio de cultivo TGE. Absorbancia en el espectrofotómetro.....	48
Figura 11: Concentraciones de AIA puro en caldo nutritivo. Absorbancia en el espectrofotómetro.....	49
Figura 12: Prueba cualitativa producción de Acido Indol Acético, A. caldo TSB, B. caldo TGE y C. caldo nutritivo.....	49
Figura 13: Cultivo de cepas solubilizadoras de fosfato a las 48 horas de la siembra en medio NBRIP.....	51

ABREVIATURAS

PGPR:	Plant Growth Promoting Rhizobacteria.
TSA:	Trypticase Soy Agar.
PDA:	Potato Dextrose Agar.
TSB:	Tryptic Soy Broth.
TGE:	Tryptone Glucose Beef Extract.
NBPRIP:	National Botanical Research Institute's Phosphate Growth Medium.
AIA:	Acido indol acético.
ufc:	Unidades formadoras de coonias.
rpm:	Revoluciones por minuto.
nm:	Nanometros
CIP:	Centro Internacional de la Papa.

RESUMEN

Las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal intervienen en el crecimiento de plantas a través de la colonización del sistema radicular, suprimiendo la propagación de microorganismos de la rizosfera. *Rhizoctonia solani* es un hongo anamorfo de *Thanatephorus cucumeris* causante de enfermedades como pudrición y cancro de tallo en plantas cultivables como la papa *Solanum tuberosum* importante en la dieta mundial y económicamente en poblaciones que la cultivan como familias campesinas de la Sierra del Ecuador. En este estudio mediante tres pruebas *in vitro* analizamos rizobacterias como posibles controladoras del hongo fitopatógeno *R. solani*. Los análisis estadísticos se calcularon en el programa SPSS (porcentajes y ANOVA). De 46 cepas de rizobacteria, 17 resultaron antagonistas frente al fitopatógeno, *Streptomyces sp.* (E4-13) es la más representativa con 43,7% de inhibición de crecimiento; 19 producen AIA en la prueba cualitativa, sometiénolas a la cuantitativa, siendo *Serratia sp.* (E4-6) 600 ug/ml⁻¹ AIA en TSB, *Paenibacillus taichungensis* (E3-17) 550 ug/ml⁻¹ en TGE y *Streptomyces sp.* (E4-13) 600 ug/ml⁻¹ AIA en caldo nutritivo; 17 cepas solubilizaron fosfato mostrando mayor solubilización *Klebsiella sp.* (E3-3) y *Serratia sp.* (E4-6) con un halo de 6,3 cm.

Palabras clave: PGPR, *Rhizoctonia solani*, *Solanum tuberosum*, AIA.

ABSTRACT

The plant growth promoting rhizobacteria involved in the growth of plants through the colonization of the root system, suppressing the propagation of microorganisms in the rhizosphere. *Rhizoctonia solani* is a fungus anamorph *Thanatephorus cucumeris* causing diseases such as rot and stem canker in crop plants such as potato *Solanum tuberosum* important in the global diet and economically grown as populations in rural families of the Sierra the Ecuador. In this study using three *in vitro* tests analyze rhizobacteria as possible pathogen controlling the fungus *R. solani*. Statistical analyzes were calculated in SPSS (percentages and ANOVA). Of 46 strains of rhizobacteria, 17 were antagonistic against plant pathogen *Streptomyces* sp. (E4-13) is the most representative with 43.7 % growth inhibition, 19 produce IAA in the qualitative test, subjecting them to quantitative, with *Serratia* sp. (E4-6) 600 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$ IAA in TSB, *Paenibacillus taichungensis* (E3-17) 550 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$ TGE and *Streptomyces* sp. (E4-13) IAA 600 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$ in nutrient broth; 17 strains showing greater solubilized phosphate solubilizing *Klebsiella* sp. (E3-3) and *Serratia* sp. (E4-6) with a ring of 6.3 cm.

Keywords: PGPR, *Rhizoctonia solani*, *Solanum tuberosum* and IAA.

INTRODUCCIÓN

Existen microorganismos con efecto benéfico sobre las plantas, los cuales tienen un potencial considerable como biofertilizantes y como agentes de biocontrol. Pueden distinguirse tres grandes grupos: 1) fijadores de nitrógeno; 2) hongos micorrízicos y 3) rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, (PGPR: Plant Growth Promoting Rhizobacteria) (Kloepper *et al.*, 1989). Estas últimas son bacterias de vida libre del suelo que se localizan muy cerca de las raíces de las plantas y que tienen un efecto benéfico sobre el crecimiento de las mismas. Su acción sobre el crecimiento y desarrollo lo ejercen por diferentes mecanismos entre los que podemos citar: la fijación biológica de nitrógeno, la solubilización de fosfato, la producción de quelantes de hierro (sideróforos), de fitohormonas, de antibióticos, etc. (Romero *et al.*, 2003). Las hormonas promotoras del crecimiento vegetal, como lo es la auxina: ácido Indol Acético, induce la deformación y el aumento de pelos radiculares, logrando con esto una mayor captación de nutrientes y promoviendo en consecuencia el crecimiento y rendimiento de los cultivos (Dobbelaere, *et al.*, 2003).

Se ha establecido que las PGPR son rizobacterias promotoras del desarrollo, juegan un papel primordial en los cultivos permitiendo disminuir la utilización de fertilizantes químicos, aumentar el rendimiento, acortar ciclos de los cultivos y por consiguiente, reducir la contaminación ambiental (Dobbelaere, *et al.*, 2003).

El estudio de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGRP) es considerado como, una alternativa de mitigación a los problemas de contaminación del suelo; ya que nos permite determinar el efecto benéfico de las bacterias sobre el cultivo de *Solanum tuberosum*, que es uno de los cultivos involucrados, la papa es el tercer cultivo de importancia a nivel mundial después del arroz y el trigo; es un tubérculo básico en la dieta de la población y fuente de ingresos económicos para las familias campesinas de la Sierra (Pumisacho & Sherwood, 2002).

En los últimos años se ha hecho frecuente el uso de fertilizantes químicos, plaguicidas y fitohormonas sintéticas, como técnicas para mejorar la producción y rendimiento de los cultivos, cuyas técnicas representan un mayor gasto económico para el agricultor además de producir problemas ambientales y de salud por el uso indiscriminado de plaguicidas; por ello se plantea como alternativa la utilización de un método biológico que incremente la producción y rendimiento de los cultivos a través de la utilización de bacterias PGPR.

Desafortunadamente, el cultivo de *Solanum tuberosum* (papa) se encuentra expuesto a una serie de limitaciones, como la baja calidad o el empobrecimiento del suelo, el uso indiscriminado de agroquímicos, así como la presencia de plagas y fitopatógenos los cuales tienen como consecuencia la merma en la productividad y rentabilidad del cultivo. Es por ello

que es importante la investigación minuciosa de todas las alternativas que puedan aumentar la producción y favorecer el cultivo de *Solanum tuberosum* en favor de la economía de nuestro país. Esto ha estimulado el estudio de la posibilidad de disminuir el uso de agroquímicos, complementándolo con fertilización orgánica y el uso de inoculantes microbianos.

El desarrollo de este proyecto de investigación se basó en el objetivo de determinar las bacterias que cumplen de PGRP evaluandolas en pruebas de antagonismo frente al fitopatógeno *Rhizoctonia solani*, producción de ácido indol acético y solubilización de fosfato.

CAPITULO I

1 ASPECTOS GENERALES

1.1 Rizósfera

Existe una delgada capa de suelo que rodea la raíz de las plantas, esta es un área muy importante y activa para la actividad de la raíz y el metabolismo que se conoce como la rizosfera (Saharan & Nehra, 2011). En 1904 Hiltner definió la rizósfera como la parte del suelo donde el sistema radical induce la proliferación microbiana. Esta región, comprende entre 1–2 mm de suelo a partir de la superficie de la raíz; en esta región del suelo ocupada por las raíces de las plantas crecen una comunidad microbiológica diversa y dinámica, cuya actividad se vincula con distintos procesos relacionados con el agua, nutrición mineral, intercambio de cationes y producción de exudados, entre muchos otros, que la hacen diferente del resto del suelo en sus propiedades físicas, químicas y biológicas (Reyes, 2011).

En la rizosfera, las bacterias son los microorganismos más abundantes (Antoun & Prevost, 2005). Las comunidades bacterianas de la rizósfera tienen un eficiente sistema de absorción y catabolismo de compuestos orgánicos que se encuentran en las raíces. A su vez existen bacterias que tienen la habilidad de adherirse a la superficie de las raíces obteniendo así el máximo beneficio de los exudados radicales (rizoplano) y otras que penetran el tejido radical (endófitas) y tienen acceso directo a los compuestos orgánicos ahí presentes, evitando de esta forma todo tipo de competencia existente en la rizósfera o en el suelo (Tilak *et al.*, 2005).

1.2 Rizobacterias

Las rizobacterias son bacterias de la rizosfera, capaces de multiplicarse y colonizar todos los nichos ecológicos que se encuentran en las raíces en todas las etapas de crecimiento de la planta, en la presencia de una microflora competidora (Antoun & Kloepper, 2001).

Los microorganismos que colonizan la rizosfera se pueden clasificar en función de sus efectos sobre las plantas y la forma en que interactúan con las raíces (Saharan & Nehra, 2011), teniendo un efecto neutro, perjudicial o beneficioso sobre el crecimiento de la planta; la presencia de rizobacterias neutrales en la rizosfera probablemente no tiene ningún efecto sobre el crecimiento de la planta, sin embargo, las rizobacterias perjudiciales afectará negativamente al crecimiento y desarrollo de las plantas a través de la producción de metabolitos como fitotoxinas, a través de la competencia por los nutrientes o la inhibición de los efectos beneficiosos de las micorrizas (Sturz & Christie, 2003); en cambio, las rizobacterias que habitan en las raíces de las plantas y ejercen un efecto positivo que va

desde los mecanismos de influencia directa a un efecto indirecto y beneficiosas para las plantas se denomina PGPR (Kloepper *et al.*,1980).

1.3 Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR)

En respuesta a la necesidad de generar cultivos limpios, con trazas mínimas o nulas de agroquímicos que afecten la salud humana a largo plazo, se ha venido implementado el uso de los microorganismos benéficos del suelo, que pueden promover el crecimiento de las plantas y también evitar la infección del tejido vegetal por patógenos; estos microorganismos pueden encontrarse en asociaciones simbióticas o de vida libre que están asociados a las partículas del suelo generando interacciones con las raíces de las plantas, en la zona de la rizósfera (Peña & Reyes, 2007).

Las reguladoras de crecimiento vegetal (PGPR) pueden promover el crecimiento vegetal de dos tipos, directos e indirectos (Tilak *et al.*, 2005).

Los mecanismos directos son aquellos en donde los microorganismos actúan sobre la planta, dentro de estos encontramos la producción de promotores de crecimiento vegetal (también llamados fitohormonas), como auxina, giberelinas y citoquininas (Rivieros, 2008). La producción de estos metabolitos, también generan una mejor regulación de estomas, lo que evita su deterioro el cual está asociado a depresión del crecimiento y síntomas de marchitamiento en la planta; ocasionan también un desarrollo radical más ramificado jugando un papel fundamental en la absorción del agua y en el mejoramiento de la nutrición al aumentar su acceso a los nutrientes en el suelo (Rivieros, 2008). Adicionalmente, las PGPR pueden promover el crecimiento vegetal mejorando la disponibilidad de nutrientes en el suelo mediante solubilización de fósforo, fijación de nitrógenos y producción de sideróforos (Tilak *et al.*, 2005; Bobadilla & Rincón, 2008). Igualmente se ha demostrado que las rizobacterias ayudan a disminuir la resistencia a la conductividad hidráulica, lo cual le da a las plantas una mayor tolerancia a periodos de sequía (Rivieros, 2008).

Los mecanismos indirectos son aquellos en donde el microorganismo es capaz de inhibir diferentes patógenos que interfieren con el desarrollo de la planta (Tilak *et al.*, 2005.) Fitopatógenos como hongos y bacterias son neutralizados de diversas maneras, como competencia por el espacio o los nutrientes, o también por la producción de metabolitos antibióticos o secreción de diversas enzimas hidrolíticas que degradan la pared celular de los patógenos (Reyes *et al.* 2008). También se ha evidenciado la producción de sideróforos que proporcionan alta afinidad para captar y concentrar iones férricos. Estas moléculas son producidas típicamente por bacterias, hongos y plantas monocotiledóneas en respuesta al estrés por concentraciones limitantes de hierro en el ambiente (Perez *et al.*, 2007). Debido a que la biodisponibilidad de hierro es limitada en el suelo, la producción de sideróforos juega

un papel importante en la competencia por este recurso, ya que, en general, los sideróforos producidos por bacterias tienen una mayor afinidad a este elemento que los producidos por hongos, limitando así a posibles patógenos (Compant *et al.*, 2005). Otro mecanismo indirecto es el incremento de la capacidad de respuesta sistémica de la planta frente a los patógenos (Vessey, 2003).

En general; las PGPR pueden ser: Bioprotectores (supresión de enfermedades de plantas), Biofertilizantes (aumentar la capacidad de adquisición de nutrientes) y bioestimulantes (producción de fitohormonas) (Kloepper *et al.*, 1989).

Aunque los estudios con microorganismos como *Pseudomonas fluorescens* se habían basado únicamente en la utilización de su potencial como biocontrolador de fitopatógenos habitantes del suelo, los esfuerzos ahora comienzan a concentrarse en la capacidad de los PGPR de promover el desarrollo vegetal, utilizándolos en la obtención de plantas más saludables y con mejores rendimientos de cultivo (Dey *et al.*, 2006). También se incluyen en estos estudios un número de especies bacterianas pertenecientes a géneros como *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Acetobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus* (Dey *et al.*, 2004; Tilak *et al.*, 2005), actinomicetos (El-Tarabily & Sivasithamparam, 2006), *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Rhizobium* y *Serratia* (Tilak *et al.*, 2005).

1.3.1 *Azotobacter*.

La morfología celular de *Azotobacter* es constantemente variable ya que cambia según las condiciones ambientales existentes, es decir, es una bacteria pleomórfica. A su vez, se ha determinado que una de las formas de sobrevivencia de esta bacteria en condiciones desfavorables, es a través de la formación de quistes, que le confieren resistencia (Beijerinck, 1901). Las células bacterianas de *Azotobacter* pueden tener una forma bacilar con bordes romos hasta elipsoidales o cocoides, son aerobias Gram negativas (Toro *et al.*, 1997).

Fijan nitrógeno hasta en condiciones microaerobias (2% oxígeno); la fijación depende de la presencia de enzimas nitrogenasas que contengan Fe; algunas de estas especies son móviles, otras pueden producir también pigmentos solubles o insolubles en agua (Toro *et al.*, 1997).

La mayoría de aislamientos de *Azotobacter* provienen del suelo, pero existen también algunas de ambientes acuáticos, las colonias son viscosas, convexas, lisas o arrugadas y poseen pequeñas inclusiones granulares, y el color depende del medio de cultivo, pueden llegar a medir de 2–6 mm de diámetro en 5 días a una temperatura de 28 a 30° C (Toro *et al.*, 1997).

La familia Azotobacteriaceae se compone de dos géneros, *Azomonas* (no forman quiste) con tres especies (*A. agilis*, *A. insignis* y *A. macrocytogenes*) y *Azotobacter*

(formando un quiste) que comprende 6 especies, *A. chroococcum*, *A. vinelandii*, *A. beijerinckii*, *A. nigricans* y *A. armeniacus paspali* (Tilak *et al.*, 2005).

Azotobacter han tenido muy buenos resultados al ser utilizadas para mejorar los cultivos pues no necesariamente son beneficiosas por su capacidad de fijar de nitrógeno sino que además posee propiedades anexas, ya que bajo ciertas condiciones ambientales son capaces de solubilizar fosfatos y sintetizar sustancias estimuladoras del crecimiento en las plantas, entre ellas, vitaminas y hormonas vegetales, como el ácido indol acético (AIA) que intervienen directamente sobre el desarrollo de las planta, lo que hace considerar a este género bacteriano como PGPR (Toro *et al.*, 1997 y Tilak *et al.*, 2005).

1.3.2 *Azospirillum.*

Rizobacterias de vida libre y considerados como colonizadores de la raíz en general; los miembros del género *Azospirillum* fijan el nitrógeno en condiciones microaerófilas, se les atribuye principalmente a un mejor desarrollo de las raíces debido a la producción de sustancias estimuladoras del crecimiento y en consecuencia un aumento de las tasas de absorción de agua y minerales (Dewan *et al.*, 1979).

1.3.3 *Acetobacter.*

Acetobacter ha ganado importancia como un inoculante para la caña de azúcar, ya que esta bacteria la coloniza con éxito (Yamada *et al.*, 1997). La familia Acetobacteriaceae incluye géneros *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconoacetobacter* y *Acidomonas* (Muthukumarasamy *et al.*, 2000).

1.3.4 *Bacillus sp.*

Estos microorganismos se caracterizan por ser bacterias Gram positivas con forma bacilar, aerobias estrictos o anaerobias facultativas que en condiciones estresantes forman una endoespora central, que deforma la estructura de la célula (Kokalis-Burelle *et al.*, 2006); esta forma esporulada es resistente a las altas temperaturas y a los desinfectantes químicos corrientes (Kokalis-Burelle *et al.*, 2006). Esta bacteria es capaz de generar un efecto benéfico en el crecimiento de las plantas por diversos mecanismos, en donde se encuentran la producción de sustancias antibióticas, producción de lipopéptidos que actúan como biosurfactantes, solubilización de fosfatos y reducción de enfermedades en las plantas (Kokalis-Burelle *et al.*, 2006).

1.3.5 *Pseudomonas fluorescens.*

Esta bacteria es un cocobacilo Gram negativo, ampliamente conocido por ser una PGPR (Zhang *et al.*, 2002). Abundan en la superficie de las raíces, ya que son versátiles en su metabolismo y pueden utilizar varios sustratos producidos por las mismas, pero no

establecen una relación simbiótica con la planta (Zhang *et al.*, 2002). Entre sus mecanismos de acción se encuentran el aumento de la toma de agua y nutrientes por la planta, la solubilización de fosfatos, la producción de reguladores del crecimiento vegetal y el control biológico de patógenos, dado fundamentalmente por la producción de sideróforos, la antibiosis y la inducción de resistencia a la planta, mediante la producción de ácido salicílico, el cual actúa como una molécula de señalización que activa la resistencia sistémica inducida (RSI) que es muy similar a la resistencia sistémica adquirida (RSA) (Zhang *et al.*, 2002).

1.3.6 Actinomicetos.

Los actinomicetos representan un grupo de microorganismos ampliamente distribuido en ecosistemas naturales y tienen gran importancia en la participación de la degradación de la materia orgánica, además de ciertas propiedades fisiológicas que los hacen particulares (Ghanem *et al.*, 2000).

Estos microorganismos son abundantes en el suelo, sin embargo, son encontrados también en ambientes acuáticos, dulces y marinos (Leiva *et al.*, 2004). Dentro de sus características particulares se encuentra la de producir un olor típico a suelo húmedo debido a la producción de un metabolito denominado geosmina, además presenta una actividad metabólica alta, producen terpenoides, pigmentos y enzimas extracelulares con las que son capaces de degradar la materia orgánica de origen vegetal y animal (Ezziyyani *et al.*, 2004).

Los actinomicetos constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos, son bacterias Gram positivas que se caracterizan por su capacidad de formar filamentos ramificados. El orden de los Actinomycetales comprende 63 géneros, constituyendo aproximadamente del 20-60% de la población microbiana del suelo (Ezziyyani *et al.*, 2004).

Actualmente, los actinomicetos se encuentran incluidos en el Dominio Bacteria debido a las siguientes razones: su pared celular está compuesta por peptidoglicano, el diámetro de sus hifas es inferior al de los hongos (0,5 a 2,0 μm), son sensibles a los antimicrobianos, pero presentan resistencia a los antifúngicos y la disposición de su material genético es típicamente procariótico (Sylvia, 2005). Estas bacterias son aerobias y algunas anaerobias facultativas, pudiéndose encontrar en el suelo, animales y el hombre. Frecuentemente alcanzan grandes densidades poblacionales en suelos con alto contenido de materia orgánica y amplias reservas de carbono asimilable y humus (Fernández, 1988).

La mayoría de los actinomicetos son mesófilos y su crecimiento se registra entre 25 a 30° C, sólo algunas son especies termófilas de *Streptomyces* sp., *Thermomonospora* sp. Y *Thermoactinomyces* sp., son capaces de crecer aunque el efecto de la alta temperatura posiblemente sea letal para el microorganismo si está acompañado de humedad (Stanley, 1994; El-Tarabil & Sivasithampara, 2006).

La adición de materia orgánica a los suelos estimula la multiplicación y actividad de los actinomicetos (Titus & Pereira, 2007). Los suelos alcalinos y neutros resultan ser más favorables para el desarrollo de estas bacterias; los actinomicetos al ser principalmente aerobios se desarrollan favorablemente en suelos bien aireados, suelos con humedades entre 80 y 90% son perjudiciales para su desarrollo (Titus & Pereira, 2007).

El género *Streptomyces* ha sido descrito como colonizador de la rizósfera, capaz de ejercer biocontrol sobre hongos fitopatógenos, producir sideróforos, sustancias promotoras del crecimiento vegetal *in vitro*, promover la nodulación y ayudar a los bacteroides como *Rhizobium* a la asimilación del hierro en la fijación de nitrógeno en leguminosas, lo cual contribuye indirectamente a las PGPR (Tokala *et al.*, 2002).

Numerosos estudios demuestran la importancia de los actinomicetos sobre todo de *Streptomyces* sp., como controlador de hongos fitopatógenos del suelo y promoción de crecimiento en plantas; por este motivo, los métodos comúnmente utilizados para el aislamiento y recuento de cepas de actinomicetos provenientes de suelo o rizosfera utilizados para biocontrol o promoción de crecimiento en plantas, tratan exclusivamente con aquellos adecuados para las especies de *Streptomyces* (El-Tarabil y Sivasithampara 2006).

1.4 Capacidades promotoras del crecimiento vegetal

1.4.1 Actividad antifúngica.

Las PGPR mejoran el crecimiento de las plantas mediante la prevención de la proliferación de fitopatógenos, algunas PGPR sintetizan antibióticos antifúngicos, por ejemplo: *P. fluorescens* produce floroglucinol 2,4 -diacetil que inhibe el crecimiento de hongos fitopatógenos (Nowak-Thompson *et al.*, 1994), ciertos PGPR degradan el ácido fusárico producida por *Fusarium* sp. agente causal de la marchitez (Toyoda & Utsumi, 1991). En los últimos años, *Pseudomonas fluorescentes* se ha sugerido como potencial agente de control biológico debido a su capacidad para colonizar la rizosfera y proteger a las plantas contra una amplia gama de importantes enfermedades fúngicas agronómicas como negro de raíz la podredumbre de tabaco (Voisard *et al.*, 1989), la raíz de la pudrición de guisante (Papavizas & Ayers, 1974), la raíz de la pudrición de trigo, la podredumbre de la remolacha (Kumar *et al.*, 2002).

1.4.2 Producción de ácido indol acético (AIA).

La formación de órganos en la planta y su consecuente desarrollo, están mediados por factores internos de vital importancia (García Breijo, 2006). Los reguladores del crecimiento en las plantas son conocidos como hormonas vegetales; pequeñas moléculas que afectan el desarrollo y crecimiento vegetal a muy bajas concentraciones (García Breijo, 2006). Se sabe que los niveles endógenos hormonales generan cambios en los procesos fisiológicos, que

repercuten en la floración, fructificación y rebrote de hojas principalmente. Las hormonas vegetales pertenecen a cinco grupos conocidos de compuestos que ocurren en forma natural, cada uno de los cuales exhibe propiedades fuertes de regulación en el crecimiento de las plantas. En este grupo se incluyen auxinas, etileno, giberelinas (GA), citoquininas y ácido abscísico, todas son moléculas que se encuentran en un rango de peso molecular entre 28 Da (etileno) y 346 Da (GA) (Kamara, 2001).

Las auxinas son responsables de la división, la extensión y diferenciación de las células y los tejidos de las plantas; las fitohormonas de este grupo estimulan la germinación de las semillas y de los tubérculos; aumentan la tasa de xilema y la formación de raíces; están presentes en procesos de control de crecimiento vegetativo, el tropismo, florecimiento, y fructificación de las plantas, y también afecta a la fotosíntesis, la formación de pigmento, la biosíntesis de varios metabolitos y la resistencia a factores de estrés (Dörffling, 1982).

La auxina típica es el ácido indol acético (AIA), la promoción del desarrollo del sistema radical es característico de este tipo de reguladores de crecimiento vegetal y es uno de los parámetros utilizados para determinar la efectividad de las bacterias rizosféricas (Patten & Glick, 2002). El AIA es similar en estructura al aminoácido triptófano y probablemente es éste el precursor del AIA formado en la planta viva, sin embargo, en las bacterias, la producción de AIA ocurre también a partir del triptófano pero por medio de la indol-acetamida (Patten & Glick, 2002).

La habilidad para sintetizar ácido indol acético (AIA) ha sido detectada en diversos géneros bacterianos rizosféricos y epifitos tales como: *Azospirillum*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Alcaligenes*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Acetobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Xanthomonas* (Tsavkelova *et al.*, 2006), así como algunas especies del género *Streptomyces* (Manulis *et al.*, 1994).

1.4.3 Solubilización de fosfatos.

Según Wakelin *et al.*, 2004, Gerretsen demostró inicialmente que la actividad microbiológica en la rizosfera podía disolver Pi (fosfato inorgánico) poco soluble e incrementar el crecimiento de las plantas; posteriormente se demostró que muchas especies bacterianas y fúngicas tienen actividad solubilizadora de P. En forma consistente, se ha señalado incrementos en la biodisponibilidad de P cuando existen aumentos paralelos en la actividad microbiana del suelo (Wakelin *et al.*, 2004).

Varios estudios han puesto en evidencia la capacidad solubilizadora de fosfatos por diferentes especies microbianas (Khan *et al.*, 2007; Khan *et al.*, 2010, Zaidi *et al.*, 2009).

Entre las bacterias solubilizadoras destacan los géneros: *Pseudomonas*, *Bacillus*,

Rhizobium, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aereobacter*, *Flavobacterium*, *Enterobacter*, *Pantotea*, *Klebsiella*, *Rhodobacter*, *Arthrobacter*, *Serratia* y *Erwinia* (Khan *et al.*, 2007); mientras en los hongos se mencionan principalmente, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Fusarium* y levaduras (Khan *et al.*, 2010). Además, en comparación con las bacterias, se ha registrado que los hongos poseen, en general, mayor capacidad de solubilización de P, sin embargo, la concurrencia de diferentes actividades metabólicas bacterianas que redundan en beneficio de las plantas, ha incrementado el interés en su estudio (Khan *et al.*, 2010). Entre los mecanismos ampliamente aceptados como responsables de la solubilización del P mineral se tienen la producción de ácidos orgánicos y la producción fisiológica de protones, y la producción y excreción de fosfatasas ácidas para la mineralización del Po (fosfato orgánico). *Xanthomonas campestris* fue registrada hace poco y por primera vez como solubilizador de fosfatos por Sharan *et al.*, 2008.

1.4.4 Producción de sideróforos.

Los sideróforos (del griego *sideros phoros* “portadores o acarreadores de hierro”), los sideróforos microbianos son moléculas secretadas por microorganismos en condiciones de deficiencia de hierro para secuestrar el hierro de su entorno; son moléculas de bajo peso molecular de 0.5 a 1.0 kDa, solubles en soluciones acuosas a pH neutro (Dybas *et al.*, 1995) que son sintetizados por bacterias, principalmente Gram negativas, hongos, levaduras y algunas plantas (fitosideróforos), particularmente gramíneas (Drechsel & Jung, 1998) y que actúan como agentes quelantes específicos de Fe³⁺. La característica principal de este tipo de moléculas es que poseen una elevada constante de disociación de hierro, que oscila entre 10²² y 10⁵⁵ (Neilands, 1995). La síntesis de estas moléculas incrementa cuando los microorganismos se encuentran en condiciones limitativas de hierro (Ratledge & Dover, 2000; Clark, 2004).

Es a través de la síntesis de sideróforos que algunas bacterias presentes en el suelo influyen de manera positiva en el crecimiento de las plantas, por ello existen numerosas referencias que describen el uso de bacterias asociadas con plantas para estimular su crecimiento y como agentes mejoradores del suelo y de la sanidad vegetal (Welbaum *et al.*, 2004).

Algunas bacterias ambientales capaces de producir sideróforos son: *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Streptomyces* y *Nocardia* (Torres *et al.*, 2000; Knosp *et al.*, 1984; Page & Shivprasad, 1995; Müller & Raymond, 1984).

1.4.5 Producción de metabolitos volátiles.

Los microorganismos constituyen un enorme reservorio natural aún no totalmente explotado para el control de enfermedades de las plantas, por esto es que diferentes hongos filamentosos, levaduras y bacterias han sido citados y utilizados como antagonistas (Saharan & Nehra, 2011). Los mecanismos de antagonismo primeramente detectados en la rizosfera son antibiosis, hiperparasitismo y competencia. Numerosos microorganismos asociados a las plantas, que han resultado ser eficientes antagonistas para el control de patógenos, han demostrado estimular el crecimiento de una gran variedad de hospedantes (Saharan & Nehra, 2011). Tal es el caso de cepas de los géneros *Trichoderma* (hongos promotores del crecimiento vegetal PGPF); entre las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) los géneros *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus* y *Serratia* (Saharan & Nehra, 2011).

1.4.6 Producción no simbiótica de nitrógeno.

La fijación de nitrógeno atmosférico (N₂) es un proceso indispensable para el desarrollo de la planta; dicho elemento es primordial en la formación de estructuras como los ácidos nucleicos, aminoazúcares, aminoácidos, entre otros; a nivel microbiano, el complejo nitrogenasa ha sido ampliamente estudiado en la fijación del elemento, pues se presentan en varias bacterias de tipo rizosférico (Zahir, 2004). La fijación biológica de nitrógeno con microorganismos del suelo es considerada uno de los principales mecanismos por la cual las plantas encuentran beneficio de la asociación, uno de los beneficios más estudiados es la relación mantenida con mecanismos diazotróficos, que proveen a la planta de nitrógeno y está en retorno, proporciona fuente de carbono disponible por los exudados (Zahir, 2004).

1.4.7 Producción de quitinasas.

La quitina es un polisacárido compuesto de unidades de N-acetilglucosamina que están unidas entre sí por enlaces β -1,4, y como la celulosa, tiene una función estructural y se encuentra en la pared celular de los hongos y en el exoesqueleto de muchos invertebrados (Bhattacharya *et al.*, 2007). Las quitinasas o enzimas quitinolíticas son enzimas capaces de hidrolizar la quitina a monómeros de N-acetil glucosamina (GlcNAc) y los organismos quitinolíticos son capaces de degradar la quitina por hidrólisis de enlaces glucosídicos, esta enzima es producida o liberada por plantas y microorganismos (Bhattacharya *et al.*, 2007; Makoi & Ndakidemi, 2008).

Las enzimas líticas disuelven o dañan polímeros estructurales como quitina y β -1-3-glucanos, y se espera que tengan un efecto adverso sobre el desarrollo de los hongos

fitopatógenos, ya que poseen este tipo de polímeros en la pared celular (Michel-Aceves *et al.*, 2005). La atención en la producción de quitinasas microbianas tiene un incremento reciente debido a su gran potencial de aplicación (Bhattacharya *et al.*, 2007). Las quitinasas están involucradas también en el control biológico de insectos por mecanismos presumiblemente similares a los que se esperan para el control de los hongos fitopatógenos, debido a que son capaces de degradar estructuras vitales como la membrana de insectos o por la liberación de compuestos que desencadenan respuestas de defensa en la planta (Gohel *et al.*, 2006; Bhattacharya *et al.*, 2007).

Registros de microorganismos capaces de producir enzimas líticas y ejercer biocontrol por este mecanismo incluyen hongos o bacterias como *Trichoderma* sp., *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Paenibacillus* sp., *Streptomyces* sp. *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Trichoderma atroviride*, *Stenotrophomonas* sp., *Serratia marcescens*, *Streptomyces viridodlasticus*, *Streptomyces halstedii*, *Micromonospora carbonacea* (Compant *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2005; Joo, 2005; Liu *et al.*, 2011; O'Kennedy *et al.*, 2011).

1.5 *Rhizoctonia solani*

1.5.1 Taxonomía de *Rhizoctonia solani*.

Su taxonomía es confusa y controversial, debido a que su morfología es muy sencilla y sus rasgos fisiológicos y patológicos varían mucho lo que dificulta la delimitación taxonómica del grupo (Parmeter & Whitney, 1970); la forma del género *Rhizoctonia* se considera como un conjunto heterogéneo de taxones de hongos filamentosos que no producen esporas asexuales y comparten un número de características en común en sus estados anamórficos (González, 2002). El grupo incluye algunos importantes patógenos como *Thanatephorus cucumeris* (teleomorfo) (Frank) Donk (anamorfo=*Rhizoctonia solani* Kühn) (González *et al.*, 2006).

Su clasificación taxonómica actual es: Ceratobasidiaceae, Cantharellales, Incertae sedis, Agaricomycetes, *Agaricomycotina*, *Basidiomycota*, *Fungi*; según el (<http://www.indexfungorum.org> visto el 7- Marzo -2014).

1.5.2 *Rhizoctonia solani* como agente fitopatógeno.

Rhizoctonia sp. es un hongo fitopatógeno del suelo con un amplio intervalo de hospedadores; sobrevive de distintas formas: como saprofito sobre restos orgánicos, como parásito en las raíces y otros órganos de plantas y en forma pasiva, como esclerocios (Cline *et al.*, 2005), como patógeno ataca principalmente en tejido estresado y debilitado del hospedante, causando pudrición en raíces, tallos, tubérculos, etc (Agrios, 1998). La fase sexual se forma cuando hay suficiente humedad, teniendo aspecto de mildiú fino que se

desarrolla sobre el suelo, hojas y tallos infectados (Agrios, 1998). Los basidios tienen forma de barril con cuatro esterigmas, cada una de las cuales produce una basidiospora ovoide; el micelio estéril de *R. solani* es incoloro en estado juvenil y de amarillo a color café claro en estado maduro formando esclerocios que son estructuras de resistencia del patógeno (Cline *et al.*, 2005) (**Figura 1**), consta de células largas y produce ramificaciones que crecen formando un ángulo recto con respecto a la hifa principal, estrechándose ligeramente a nivel de la bifurcación con un septo cerca de ésta (Agrios, 1998).

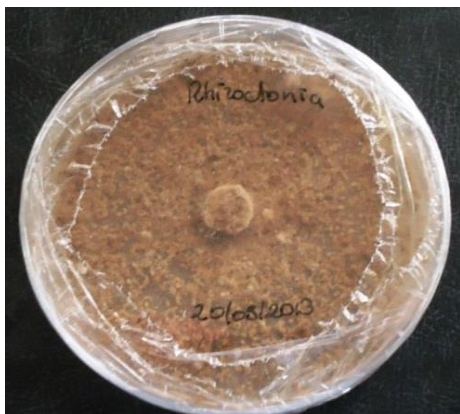


Figura 1: Cultivo de *R. solani*, en estado maduro formando esclerocios (coloración café) en medio PDA

Fuente: Autora

R. solani es una especie “colectiva” que consta de por lo menos cuatro grupos no emparentados, los cuales se distinguen entre sí debido a que la fusión de hifas que entran en contacto, sólo se produce entre los aislados de un mismo grupo de anastomosis. El resultado de esta fusión es una hifa heterocariótica bajo ciertas condiciones. La mayoría de las células resultantes de la anastomosis quedan incluidas en la vacuola y mueren tomando la apariencia de una zona clara en el punto de unión de las dos colonias. Este proceso es la expresión de una incompatibilidad somática o vegetativa, la cual limita la exogamia a unos pocos apareamientos compatibles (Cline *et al.*, 2005).

1.5.3 Ciclo de infección de *Rhizoctonia solani*.

El hongo se mantiene de un año a otro, como esclerocios y como micelio en residuos de cosecha que se encuentran en el suelo (SINAVISMO, 2012). En la siembra de papa del siguiente año y en presencia de condiciones favorables de humedad, los esclerocios germinan y el micelio desarrolla infectando los brotes y tallos que se encuentran en estado de pre y/o post emergencia (Gutiérrez & Torres 1990). Las raíces y los estolones son también afectados durante el desarrollo de las plantas y la formación de esclerocios sobre la superficie de los nuevos tubérculos ocurre en condiciones de suficiente humedad y

temperatura óptima de 18°C, sin embargo, el máximo desarrollo de esclerocios se produce cuando los tubérculos que se encuentran listos para ser cosechados se mantienen en el campo por un tiempo prolongado (Gutiérrez & Torres 1990).

1.5.4 Control de *Rhizoctonia solani*.

1.5.4.1 Control biológico.

Entre los enemigos naturales de *R. solani*, los más eficientes son *Trichoderma harzianum*, *Rhizoctonia* binucleada (Gutiérrez & Torres 1990) y *Verticillium biguttatum*, aunque en la práctica el control biológico debe ser considerado solo como un componente del control integrado

1.5.4.2 Control químico.

El uso de fungicidas (aplicados al suelo o como desinfectantes de tubérculos), no incrementa los rendimientos, pero, incrementa la calidad sanitaria de los tubérculos (Gutiérrez & Torres 1990).

1.5.5 Cultivos afectados por *Rhizoctonia solani*.

R. solani ataca a cultivos de alfalfa, kiwi, frutilla, maní, pimiento, soja, sorgo, tabaco, tomate, fréjol y principalmente al cultivo de papa donde causa la enfermedad de Rizoctoniasis o costra negra (SINAVISMO, 2012).

1.5.5.1 La papa.

La papa (*Solanum tuberosum* L.) cultivada y silvestre se encuentra en las tierras altas de los Andes de América del Sur. El centro de domesticación del cultivo se encuentra en los alrededores del Lago Titicaca, cerca de la frontera actual entre Perú y Bolivia. Existe evidencia arqueológica que prueba que varias culturas antiguas, como la Inca, la Tiahuanaco, la Nazca y la Mochica, cultivaron la papa (Pumisacho & Sherwood, 2002).

La papa es una planta dicotiledónea, herbácea anual y potencialmente perenne (debido a la capacidad de reproducción del tubérculo), presenta un sistema aéreo y un sistema subterráneo; está conformada por el tallo, hojas, flores y frutos, el segundo por raíces, estolones y tubérculos (Arce, 2002).

1.5.5.2 La papa en el Ecuador.

La papa es una importante fuente de ingresos para las comunidades rurales y su componente fundamental de la economía nacional (Pumisacho & Sherwood, 2002). Los agricultores han reconocido el valor de las raíces y tubérculos en términos de producción de energía cosechada por hectárea por día, de los cuales la papa es el más eficiente entre los

cultivos comestibles comunes. La calidad y cantidad de las sustancias nutritivas del tubérculo varían por variedad de papa y condiciones de campo (Pumisacho & Sherwood, 2002).

La papa es la principal fuente de alimento para los habitantes de las zonas altas del país, con un consumo anual per cápita que fluctúa según las ciudades: 122 kg en Quito, 80 kg en Cuenca y 50 kg en Guayaquil. El 90% de la papa a nivel nacional se consume en estado fresco (Pumisacho & Sherwood, 2002).

En el Ecuador el cultivo de papa alcanza una superficie de 47494ha (INEC, 2002), con un rendimiento promedio de 6 y 7 t/ha (Andrade, 2002). Únicamente en la provincia del Carchi, se obtienen mayores rendimientos, con un promedio de 21,7 t/ha (Andrade, 2002).

La producción de papa en Ecuador se distribuye en tres zonas geográficas: norte, centro, y sur. Las diferencias agroecológicas están determinadas no por la latitud, sino por las relaciones entre clima, fisiografía y altura (Pumisacho & Sherwood, 2002).

El cultivo de papa en el país se desarrolla en terrenos irregulares, en laderas hasta con más de 45% de pendiente y en un rango de altitud de 2400 a 3800msnm en los pisos interandinos y subandinos (Andrade, 2002, citado por Pumisacho & Sherwood, 2002).

1.5.5.3 Principales Enfermedades del cultivo de papa.

Hay enfermedades que se observan en las hojas, en el tallo y otras en las papas o tubérculos, cada una de éstas puede tener un manejo o control diferente, no todas las enfermedades se controlan con el mismo producto, además, hay algunas enfermedades que no tienen productos químicos para aliviar la planta, tal es el caso de los virus (Castro & Contreras, 2011).

1.5.5.3.1 Costra negra y cancro del tallo.

Causado por *Rhizoctonia solani* Kühn; este es un hongo que afecta de diferentes maneras al cultivo de la papa, se observa presencia de necrosis en partes tiernas de plantas jóvenes, tallos y estolones, esta patología es conocida como “Cancro” (Castro & Contreras, 2011). Los brotes que emergen, igualmente se infectan, desarrollándose un cancro en la base del tallo, el que puede presentar depresiones profundas, produciendo un estrangulamiento de este, suscitándose una gran diversidad de síntomas secundarios, incluyendo, retardo en el desarrollo de la planta, arrosetamiento del ápice, necrosis cortical del tejido leñoso, pigmentación púrpura de las hojas y formación de tubérculos aéreos (Castro & Contreras, 2011).

Hay otras enfermedades del cultivo de papa causada por hongos esta la Roña afectado por el patógeno *Spongospora subterranea* (Wallr.) exclusivo de la planta de papa, se caracteriza porque forma “quistosoros” o “masas de esporas”, los cuales contienen las esporas de

resistencia; la enfermedad se presenta en raíces, estolones y tubérculos, pero no afecta al follaje (Castro & Contreras, 2011); el Tizón tardío, causado por *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary presenta pequeñas manchas irregulares de color verde pálido a verde oscuro; estas pequeñas manchas irregulares que se desarrollan generalmente en los bordes y en el ápice de los folíolos crecen rápidamente, dando lugar a lesiones necróticas grandes de color marrón a negro, rodeadas de un halo amarillento (Castro & Contreras, 2011). Tizón Temprano o mancha negra de la hoja afectado por *Alternaria solani* se presenta en plantas desarrolladas cuando los tubérculos empiezan a formarse, siendo raro ver cultivos jóvenes atacados por el hongo. Este patógeno ataca principalmente las hojas y rara vez los tubérculos, necesitando temperaturas que alternen con períodos húmedos o lluviosos. El síntoma característico es la aparición de manchas irregulares oscuras rodeadas de un halo amarillento, que se desarrolla como anillo. Las manchas aumentan de tamaño y en ataques fuertes se juntan hasta ennegrecer completamente las hojas (Castro & Contreras, 2011).

CAPITULO II

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Lugar de muestreo y estudio

Las muestras bacterianas utilizadas en este estudio fueron aisladas de la rizosfera del cultivo de la papa en etapa de floración, procedentes de las provincias de Cañar, localidad de Nueva Esperanz; Azuay, localidad de La Paz y Loja, localidades de Gualedel y Carboncillo, ubicadas al sur del Ecuador. (Tabla 1).

Tabla 1: Número, código, provincia y localidad procedentes de las muestras

Muestra	Provincia	Localidad	Número de Muestras
E1	Loja	Gualedel	3
E2	Loja	Carboncillo	7
E3	Azuay	La Paz	20
		Nueva	
E4	Cañar	Esperanza	16
Total			46

Las muestras de suelo fueron cultivadas en un medio específico, en donde se pudieron aislar 46 bacterias; el ensayo se realizó en los laboratorios de la Universidad Técnica Particular de Loja, dentro del proyecto VALORAM.

2.2 Material biológico

Se empleó la cepa del hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani* procedentes del Centro Internacional de la Papa (CIP) Región Quito- Ecuador, conservada en caja de cultivo con medio Potato Dextrose Agar (PDA). Las cepas bacterianas fueron identificadas a nivel de género a través del análisis de secuencia del gen 16S rRNA, luego se determinó la similitud de secuencia usando el BLAST del GenBank, obteniendo: *Staphylococcus pasteurii*, *Bacterium* sp., *Bacillus licheniformes*, *Bacillus* sp., *Paenibacillus macquariensis*, *Paenibacillus chondroitinus*, *Paenibacillus taichungensis*, *Paenibacillus* sp., *Sporosarcina* sp., *Klebsiella* sp., *Microbacterium oxydans*, *Deinococcus* sp., Enterobacteriaceae, *Planococcus* sp., *Dermacoccaceae* sp., *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus* sp., *Serratia* sp. y *Stenotrophomonas* sp. las mismas que permanecieron -80°C para su conservación.

2.3 Preparación de medios de cultivo y reactivos

Los diferentes medios utilizados fueron agares y caldos (**Anexo 1**) que se preparan de acuerdo a las instrucciones del fabricante ajustando el pH requerido y finalmente autoclavando a 121°C por 15 minutos para dispensar en placas mono-Petri.

2.4 Multiplicación in Vitro del hongo fitopatógeno

Para la replicación se toma 1cm de diámetro del hongo *Rhizoctonia solani* y se lo coloca en una nueva placa con medio PDA, se incuba a 28°C y se dejan crecer durante cinco días previos al ensayo (**Figura 2**).



Figura 2: Cultivo de *R. solani* con crecimiento total en caja (5 días de crecimiento) adecuada para la formulación de la prueba de antagonismo, en medio PDA

Fuente: Autora

2.5 Multiplicación in vitro de cultivos microbianos

Las bacterias fueron descongeladas y reactivadas al ser sembradas en medio TSA a una temperatura de 28°C por un tiempo entre 24 y 48 horas (**Figura 3**).

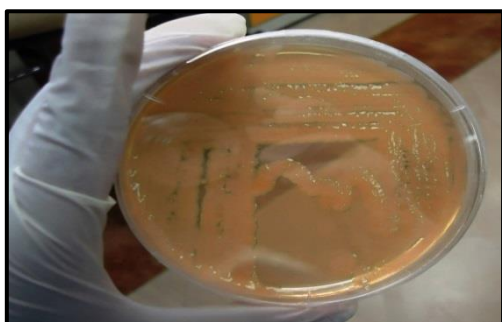


Figura 3: Siembra en estriado de *Streptomyces* sp. en medio TSA, crecimiento apto para las pruebas de antagonismo, ácido indol acético y solubilización de fosfato

Fuente: Autora

2.6 Pruebas para capacidades promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) *in vitro*

2.6.1 Prueba de antagonismo en placa (*Rhizoctonia solani*).

Para la siguiente prueba se colocó en cada tubo de ensayo 2 ml del caldo nutritivo, con un asa se tomó varias colonias (pasadas 48 horas de la siembra) y se suspendió en el caldo hasta tener una concentración aproximada de células de 10^8 unidades formadoras de colonias (ufc); se sembró tres gotas de 5 μ l de suspensión (10^8 ufc/ml) equidistantemente en los márgenes de la placa de medio PDA.

Las placas con los hongos previamente crecidos se perforaron utilizando un obturador de 1cm de diámetro. Los discos se colocaron en el centro de las placas sembradas con la bacteria, a razón de un disco para cada placa y dos réplicas (placas) por cepa, paralelamente se realizan placas control de hongo sin bacterias, luego se incubaron a 28°C durante siete días.

La evaluación consistió en mediciones del diámetro de las colonias de los hongos crecidos en presencia de la bacteria. Para calcular el porcentaje de inhibición de crecimiento se miden siguiendo la fórmula propuesta por Royse & Ries (1978).

$$\% \text{ Inhibición} = \left(\frac{(R-r) \times 100}{R} \right)$$

Donde, r es el radio de la colonia de hongos creciente hacia la colonia bacteriana y R es el radio máximo de la colonia de hongos podría cubrir (el radio de la placa Petri).

2.6.2 Prueba de producción de Ácido Indol Acético (AIA)

Se tomó una colonia de la cepa a evaluar y se siembra en medio de cultivos específicos para cada cepa: TGE (*Bacillus*), caldo de nutrientes (*Actinomicetos*), TSB (*Pseudomona* y *Azotobacter*) además cada medio suplementado con L- triptófano, los tubos deben permanecer a 150 rpm y a una temperatura de 28° C por 7 días. El tiempo de incubación va de acuerdo al tipo de microorganismo, por ejemplo; *pseudomonas* y *bacillus* 3 días, actinomicetos 5 días y *azotobacter* 4 días. Se realizaron medidas cualitativas y cuantitativas, de la siguiente manera:

Prueba cualitativa

Después del tiempo de incubación se colocó por duplicado en cada pocillo de una microplaca de ELISA, 100 μ L de cultivo de bacteria y 300 μ L de reactivo de Salkowsky, así como también un control con caldo sin bacteria y reactivo. Luego la microplaca es colocada

en la oscuridad por 15 min a fin de que el reactivo reaccione. Después de este tiempo se observa el viraje de color de cada pocillo donde el color varía entre suave rosa y rojo, lo que indica la presencia de ácido indol acético (IAA). Los resultados se expresan en una escala de intensidades de colores diferentes. En base a este resultado se seleccionaran las cepas que serán sometidas a la prueba cuantitativa (Gordon & Weber, 1950).

Prueba cuantitativa

Para tener un cálculo más exacto de la cantidad de IAA producido por cada cepa, se debe realizar una curva de calibración control con los caldos utilizados para el crecimiento de cada microorganismo. Para realizar dicha curva se prepararon diluciones con los caldos (TGE, TSB y caldo nutritivo) y la solución de ácido indol acético stock (**Tabla 3**); para revelar se debe añadir 2µl de reactivo Salkowsky a cada una de las concentraciones, luego de 15 min. en la obscuridad, medir la absorbancia de cada concentración a una longitud de onda de 490 nm en el espectrofotómetro.

Para probar las cepas de bacterias, el procedimiento de incubación es el mismo que para la prueba cuantitativa. Después de la incubación cada tubo con bacterias tiene que ser centrifugado (8000 rpm por 15 min); y mezclar 100 µl de sobrenadante con 200 µl de reactivo de Salkowsky y 15 minutos en la oscuridad. Cada tubo tiene que ser medido a 490 nm con el espectrofotómetro. Finalmente, con la ecuación de la curva estándar de la concentración de IAA se calcula cada lectura.

2.6.3 Prueba solubilización de fosfato

Con el extremo del palillo de tomó una colonia de la cepa de bacteria del medio TSA luego de 24h de incubación y se la introduce en el medio NBRIP. Se realizó por triplicado para cada cepa.

La lectura del halo se realizó cada 48h durante 30 días, desde la formación de un halo transparente alrededor de las colonias, lo que indica la solubilización del fosfato del medio.

2.7 Análisis de resultados

En el caso de antagonismo en placa se evaluó el porcentaje de inhibición entre las cepas bacterianas, descartando las cepas resultantes en 0% de inhibición. En la prueba de ácido indol acético (AIA) se comparó la absorbancia resultante con la curva exponencial estándar (medio de cultivo TSB, TGE y caldo nutritivo) de concentraciones de AIA puro leídas en el espectrofotómetro (**Figuras 9, 10 y 11**). En la solubilización de fosfato se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba Scheffe, con un nivel de significancia de 0,05 %. El análisis se realizó con el programa estadístico SPSS 17.0 para las 3 pruebas.

CAPITULO III

3 RESULTADOS

3.1 Prueba de antagonismo en placa (*Rhizoctonia solani*)

De las 46 cepas evaluadas, 17 resultaron, inhibitoras del crecimiento de *Rhizoctonia solani* (Figura 4), el porcentaje máximo de inhibición fue de 43,7%, registrada en la cepa E4-13 perteneciente a *Streptomyces* sp. seguida de la cepa E3-2 *Sporosarcina* sp. con 29,6%. En la Tabla 2, se puede observar los porcentajes de inhibición obtenidos; E1-3 (25,9%) *Bacillus* sp., E3-16 (25,9%) *Secondary endosymbiont*, E4-8 (19,25%) *Bacillus* sp., E2-4 (18,5%) *Bacterium* sp., E4-4 (18,5%) *Rhodococcus erythropolis*, E3-3 (17,7%) *Klebsiella* sp., E4-14 (16,66%) *Leifsonia* sp., E3-9 (12,9%) *Paenibacillus chondroitinus*, E3-10 (11,11%) *Bacillus licheniformis*, E4-6 (11,11%) *Serratia* sp., E4-15 (11,11%) *Paenibacillus taichungensis*, E3-13 (9,25%) *Paenibacillus taichungensis*, E3-8 (9,25%) *Bacterium* sp., E4-16 (7,37%) *Bacterium* sp. y E4-2 (5,55%) *Dermacoccaceae* sp. En la Figura 4, se muestra el resultado de las cepas destacadas E4-13 (*Streptomyces* sp.) y E3-2 (*Sporosarcina* sp.) resultantes del análisis con Kruskal-Wallis, prueba no paramétrica con un nivel de significancia de $P= 0,017$ entre los tratamientos, por tener mejor distribución entre sus medias.

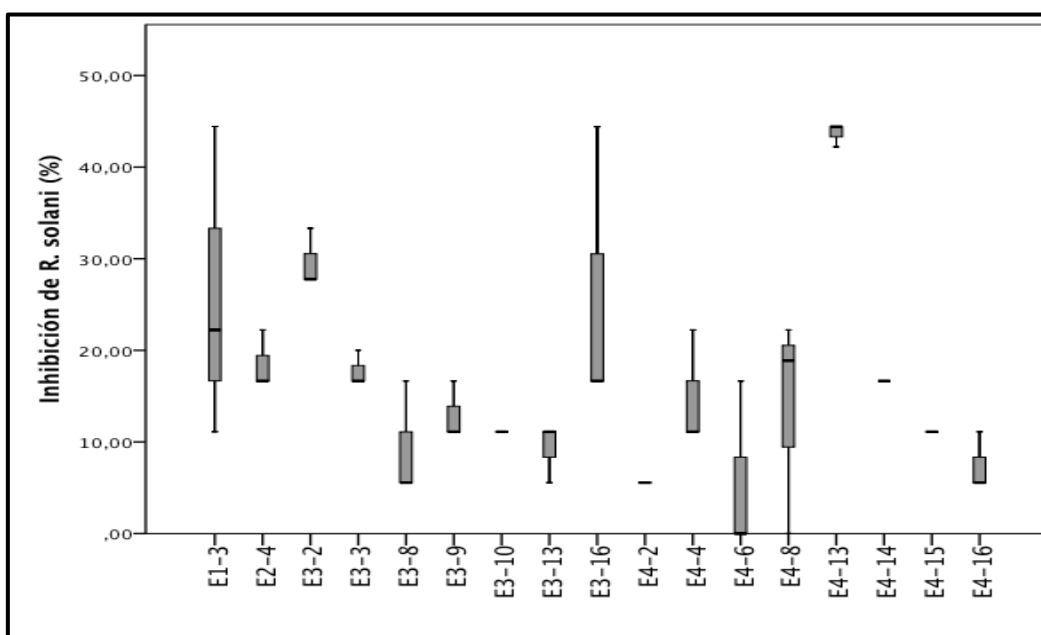


Figura 4: Bacterias inhibitoras de *Rhizoctonia solani*, E4-13 y E3-2 cepas representativas de la prueba Kruskal-Wallis

Fuente: Autora

3.2 Prueba de producción de ácido indol acético (IAA)

La capacidad para producir esta auxina fue evaluada mediante una prueba de carácter cualitativo y cuantitativo para todas las cepas. De las 46 cepas evaluadas el 41,3% (19 cepas) fueron positivas en la prueba cualitativa con el reactivo de Salkowski empleado ya

que es un método colorimétrico que permite la oxidación de los compuestos indólicos por sales férricas, cuando la respuesta es positiva se obtiene una coloración rosada que va desde el rosa claro a intenso dependiendo de la concentración del ácido indolacético presente (Bernal *et al.*, 2000) (**Figura 12**); siendo 8 en (TSB), 7 en (TGE) y 4 en caldo nutritivo. Por lo tanto para la prueba cuantitativa se tomaron en cuenta aquellas que resultaron positivas en la cualitativa. Siendo las cepas E4-6 > 600 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$ (*Serratia* sp.) y E4-5 < 600 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$ (*Rhodococcus erythropolis*) las más representativas en el tratamiento de TSB (**Figura 5 A**), E3-17 550 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$ (*Paenibacillus taichungensis*) y E1-3 500 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$ (*Bacillus* sp.) en el tratamiento de TGE (**Figura 5 B**); la cepa E4-13 (*Streptomyces* sp.) y E3-14 (*Paenibacillus taichungensis*) en el tratamiento de caldo nutritivo a una concentración > 600 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$ AIA (**Figura 5 C**).

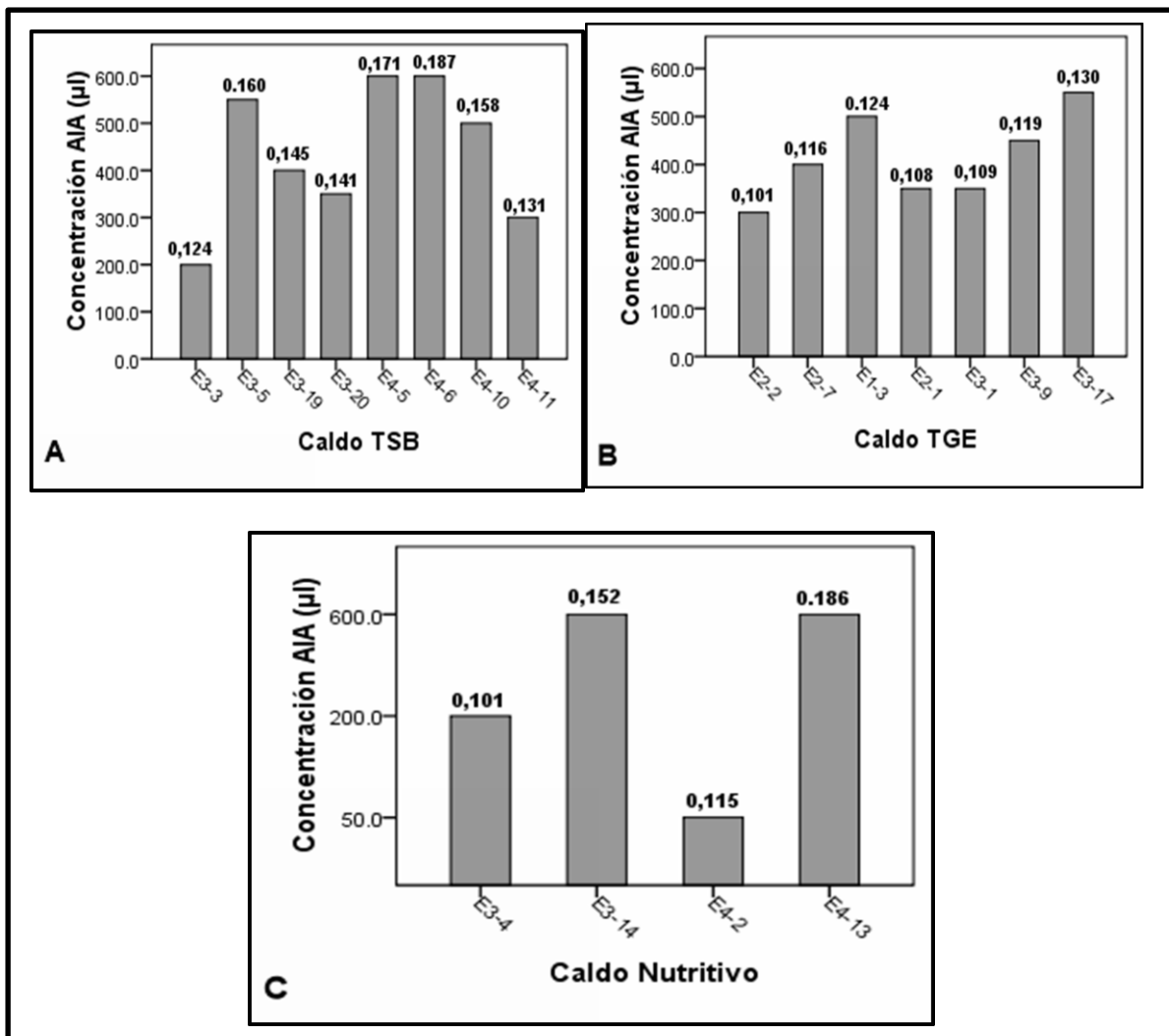


Figura 5: Representación en barra de la concentración de AIA. **A)** Cepas en caldo TSB; **B)** Cepas en caldo TGE y **C)** Cepas en caldo nutritivo

Fuente: Autora

3.3 Prueba solubilización de fosfato

El 36,9% (17 cepas), de las 46 evaluadas (**Tabla 2**) mostraron la presencia de halos de solubilización variando entre 3 y 6,3 cm, siendo las cepas E2-3 (*Sporosarcina* sp.) con 6,3 cm, E3-3 (*Klebsiella* sp.) 6,3 cm, E3-18 (*Paenibacillus taichungensis*) 6,3 cm y E4-6 (*Serratia* sp.) con 6,3 cm (**Figura 6**). En cuanto al comportamiento de las cepas con respecto al crecimiento del halo de solubilización, se observa en la **Figura 7**, desde que comenzó y continuó incrementándose hasta el día 22, manteniéndose estable hasta el día 30, último día de evaluación.

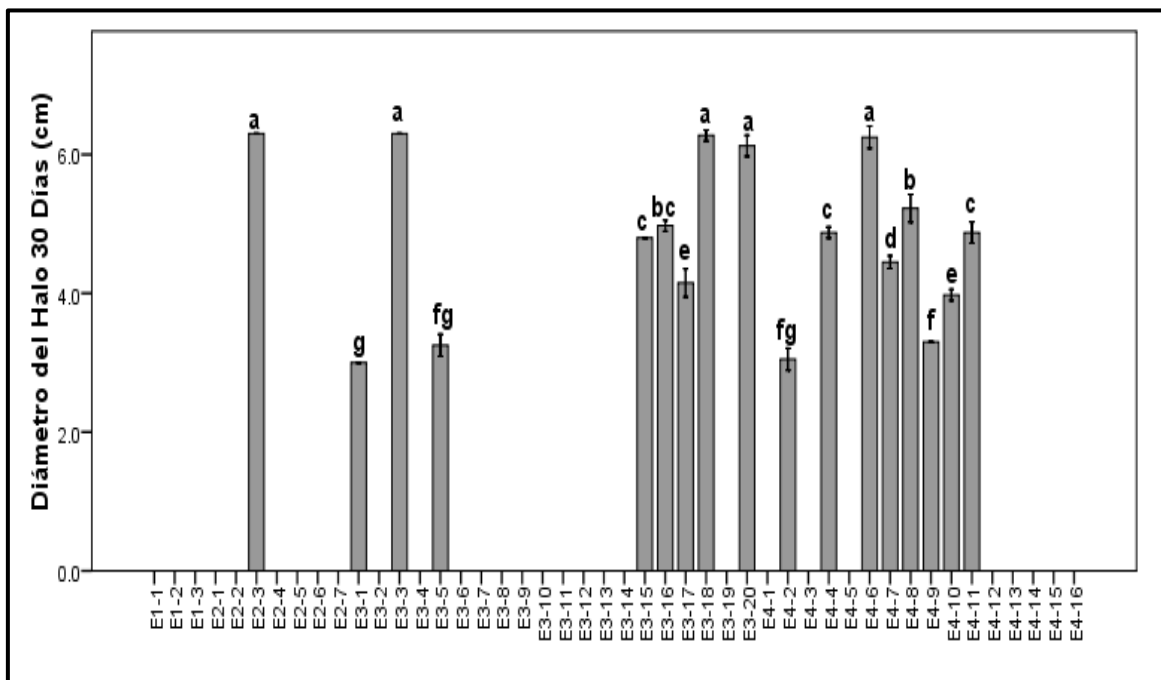


Figura 6: Solubilización de fosfato a los 30 días. Prueba de Scheffe, agrupamiento de medias, letras a, b, bc, c, d, e, f, fg y g. **Tabla 6**

Fuente: Autora

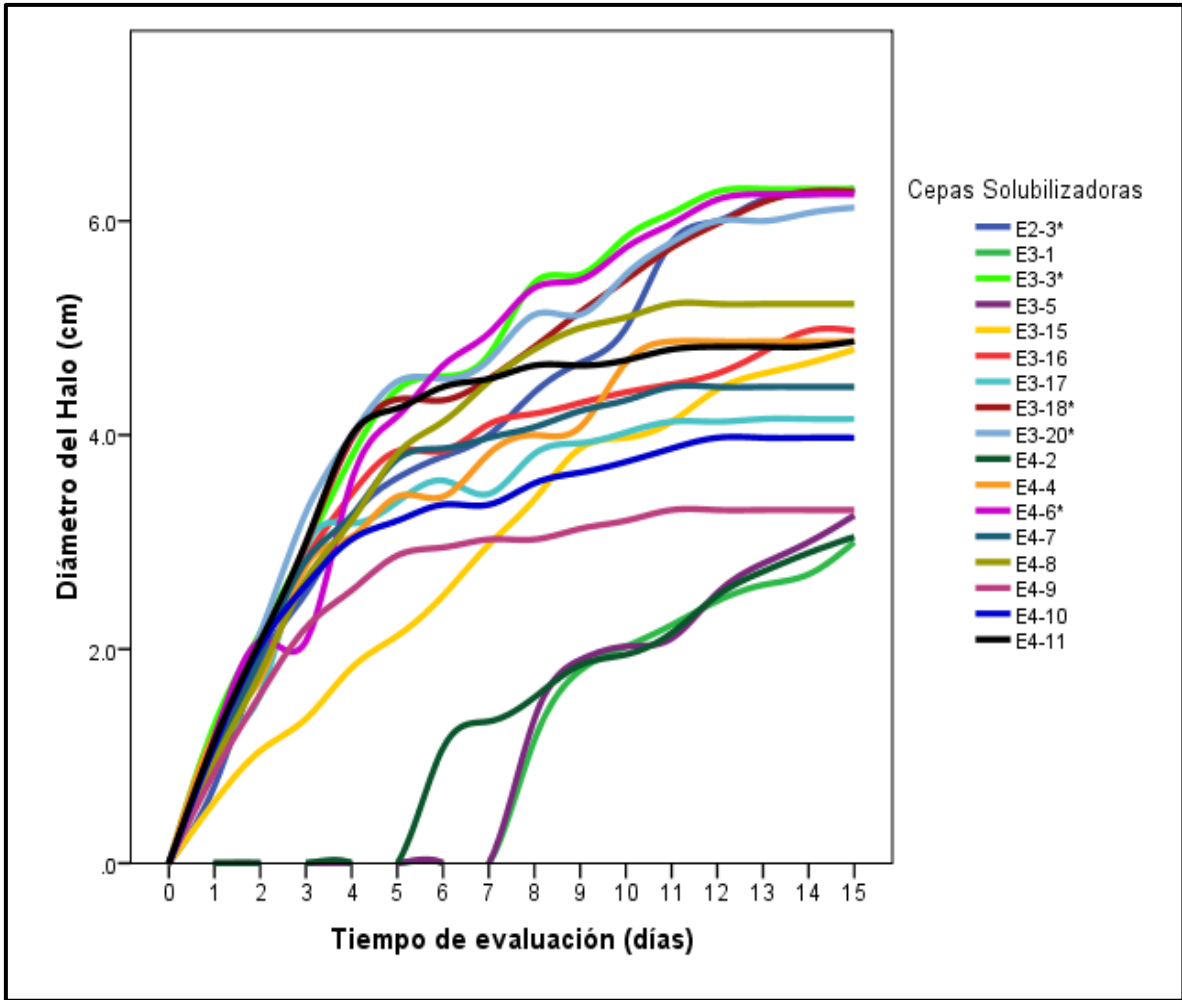


Figura 7: Bacterias solubilizadoras de fosfato durante los 30 días de evaluación (15 días cada 48 horas)

Fuente: Autora

CAPITULO IV

4 DISCUSIÓN

4.1 Prueba de antagonismo en placa (*Rhizoctonia solani*)

El trabajo desarrollado por Bendt *et al.*, 2001 menciona que los actinomicetos endófitos suprimen hongos patógenos de trigo, incluyendo *R. solani*, *Pythium* sp. y *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, tanto in vitro como en las plantas, indicando su uso potencial como agentes de control biológico, concordando con los resultados obtenidos donde *Streptomyces* sp., *Rhodococcus erythropolis*, *Leifsonia* sp., *Dermacoccaceae* sp. todos los actinomicetos presentaron inhibición contra *R. solani*. Recalcando que el porcentaje mayor de inhibición fue *Streptomyces* sp. el cual se aproxima al presentado por Dávila, M. *et al.*, (2013), donde las bacterias del género *Streptomyces* sp., dieron como resultados 53,08% de inhibición frente a *Rhizoctonia*, datos no muy lejanos a los obtenidos en el presente trabajo; la actividad quitinolítica está implicada en la actividad de biocontrol de varias bacterias, incluyendo. *Streptomyces* sp. (Quecine, *et al.*, 2008). El estudio de Ibañez, F. *et al.*, (2011) demostró que las Enterobacterias produce aminoácidos, etileno, AIA, y también inhibe el crecimiento de hongos patógenos, corroborando con las cepas evaluadas *Secondary endosymbiont*, *Klebsiella* sp., *Serratia* sp. (enterobacterias) como antagonistas. Sin embargo, pese a estos resultados, según los trabajos de Ulacio *et al.*, (2002) y García *et al.*, (2002), el microorganismo antagonista por excelencia contra *Rhizocotonia solani* es *Trichoderma harzianum*, del cual se fabrican productos comerciales.

4.2 Prueba de producción de ácido indol acético (IAA)

Tsavkelova, *et al.*, (2006) cita las bacterias con habilidad de sintetizar AIA: *Azospirillum* spp., *Agrobacterium* spp., *Azotobacter* spp., *Alcaligenes* spp., *Enterobacter* spp., *Erwinia* spp., *Acetobacter* spp., *Rhizobium* spp., *Bradyrhizobium* spp., *Herbaspirillum* spp., *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Xanthomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Arthrobacter*, *Klebsiella*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas*, *Microbacterium*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Streptomyces* y algunos actinomicetos, entre otras; las cepas evaluadas están dentro de estas por lo tanto productoras de AIA.

Dobbelaere *et al.*, (2003) menciona que la capacidad de sintetizar AIA ha sido atribuida a bacterias de suelo asociadas a plantas y se ha estimado que alrededor del 80% de las bacterias aisladas de la rizósfera pueden producir AIA. La mayor producción de AIA es de 600 $\mu\text{g/ml}^{-1}$, comparando con el estudio de Sarwar & Kremer, (1995), donde midieron la producción de AIA en bacterias procedentes de la rizósfera, resultando 0,36 a 0,6 mg/mL^{-1} de AIA, ratificando los datos obtenidos en este trabajo.

Cabe recalcar, que Hernández *et al.* (2004) midieron entre 5,30 y 21,53 mg/mL⁻¹ de AIA en un conjunto de cepas de *Burkholderia* y *Pseudomonas fluorescens* y que estimularon el crecimiento de plantas de maíz.

4.3 Prueba solubilización de fosfato

Rodríguez & Fraga, (1999). Existen 13 géneros de bacterias con la capacidad de solubilizar fosfato: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium*, *Mesorhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Erwinia*. El rango de solubilización estuvo entre 3- 6,3 cm, estos resultados concuerdan con los reportados por Clavijo, *et al.*, (2012) donde los halos de solubilización varían entre 0,31 y 5,84 cm en los géneros: *Burkholderia*, *Erwinia*, *Raoultella* y *Klebsiella*, enterobacterias; similar a las cepas de investigación *Klebsiella* y *Serratia* sp. (enterobacterias). Estos resultados también concuerdan con los reportados por Rico, (2009) donde los halos de solubilización varían de 0,11 cm a 5,43 cm producidos por las cepas de *Azotobacter*. En términos de capacidad solubilizadora de fosfatos, *Pseudomonas* es uno de los géneros bacterianos más eficientes, aporta Naik *et al.*, (2008).

Tabla 2: Resultados de las 46 cepas evaluadas; (-) 0% de inhibición frente a *R. solani*, (+) 50-250 µg/ml⁻¹, (++) 300-450 µg/ml⁻¹ y (+++) 500-600 µg/ml⁻¹ de AIA.

Cepas	Especie identificada	% inhibición <i>R.</i>		Solubilización PO4
		<i>solani</i>	Productoras AIA	halo (cm)
E1-1	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	-	-	0
E1-2	<i>Bacterium sp.</i>	-	-	0
E1-3	<i>Bacillus sp.</i>	25.9	++	0
E2-1	<i>Paenibacillus macquariensis</i>	-	++	0
E2-2	<i>Sporosarcina sp.</i>	-	+	0
E2-3	<i>Sporosarcina sp.</i>	-	-	6.3
E2-4	<i>Bacterium sp.</i>	18.5	-	0
E2-5	<i>Bacterium sp.</i>	-	-	0
E2-6	<i>Paenibacillus sp.</i>	-	-	0
E2-7	<i>Bacillus sp.</i>	-	-	0
E3-1	<i>Sporosarcina sp.</i>	-	++	3
E3-2	<i>Sporosarcina sp.</i>	29.6	-	0
E3-3	<i>Klebsiella sp.</i>	17.7	+	6.3
E3-4	<i>Microbacterium oxydans</i>	-	+	0
E3-5	<i>Deinococcus sp.</i>	-	++	3.2
E3-6	<i>Paenibacillus sp.</i>	-	-	0
E3-7	<i>Bacterium sp.</i>	-	-	0

E3-8	<i>Bacterium sp.</i>	9.25	-	0
E3-9	<i>Paenibacillus chondroitinus</i>	12.9	++	0
E3-10	<i>Bacillus licheniformis</i>	11.11	-	0
E3-11	<i>Paenibacillus taichungensis</i>	-	-	0
E3-12	<i>Paenibacillus sp.</i>	-	-	0
E3-13	<i>Paenibacillus taichungensis</i>	9.25	-	0
E3-14	<i>Paenibacillus taichungensis</i>	-	+++	0
E3-15	<i>Paenibacillus taichungensis</i>	-	-	4.8
E3-16	<i>Secondary endosymbiont</i>	25.9	-	5
E3-17	<i>Paenibacillus taichungensis</i>	-	+++	4.2
E3-18	<i>Paenibacillus taichungensis</i>	-	-	6.3
E3-19	<i>Bacterium sp.</i>	-	++	0
E3-20	<i>Bacterium sp.</i>	-	++	6.2
E4-1	<i>Planococcus sp.</i>	-	-	0
E4-2	<i>Dermacoccaceae sp.</i>	5.55	+	3
E4-3	<i>Rhodococcus sp.</i>	-	-	0
E4-4	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	18.5	-	4.8
E4-5	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	-	+++	0
E4-6	<i>Serratia sp.</i>	11.11	+++	6.3
E4-7	<i>Stenotrophomonas sp.</i>	-	-	4.5
E4-8	<i>Bacillus sp.</i>	19.25	-	5.1
E4-9	<i>Paenibacillus sp.</i>	-	-	3.3
E4-10	<i>Rhodococcus sp.</i>	-	+++	3.9
E4-11	<i>Bacterium sp.</i>	-	+	4.8
E4-12	<i>Serratia sp.</i>	-	-	0
E4-13	<i>Streptomyces sp.</i>	43.7	+++	0
E4-14	<i>Leifsonia sp.</i>	16.66	-	0
E4-15	<i>Paenibacillus taichungensis</i>	11.11	-	0
E4-16	<i>Bacterium sp.</i>	7.37	-	0

CONCLUSIONES

- ✓ De las 46 cepas bacterianas evaluadas, 17 resultaron antagonistas frente al fitopatógeno; 19 se manifestaron como productoras de ácido indol acético y 17 se revelaron como solubilizadoras de fosfatos.

- ✓ *Streptomyces sp.* mostró mayor capacidad antagónica frente a *Rhizoctonia solani*.
- ✓ De acuerdo a los resultados obtenidos en la prueba de producción de ácido indol acético, las cepas *Serratia sp.* y *Rhodococcus erythropolis* en medio de cultivo TSB, *Bacillus sp.* y *Paenibacillus taichungensis* en medio de cultivo TGE y *Streptomyces sp.* en caldo nutritivo presentaron mayor capacidad de producir AIA.

- ✓ *Klebsiella* y *Serratia sp.* fueron las cepas con mayor capacidad para solubilizar fosfatos.

- ✓ *Serratia sp.* registrada con el código E4-6, se exhibe como antagonista contra *Rhizoctonia solani*, productora de ácido indol acético y solubilizadora de fosfato.

RECOMENDACIONES

- ✓ Las pruebas de antagonismo *in vitro* requieren ser corroboradas en condiciones de invernadero y campo, porque no siempre las bacterias que actúan como antagonistas bajo condiciones controladas tienen la capacidad potencial de usarse en el control biológico.

- ✓ Estimular la investigación sobre el uso de microorganismos en el control de enfermedades vegetales y así reducir la aplicación de diferentes compuestos químicos que aumentan el costo de las producciones, a contaminación de los alimentos y el deterioro del medio ambiente.

- ✓ La utilización de PGPR contribuirá en el crecimiento positivo de la producción de papa y la capacidad de adaptarse a las condiciones de clima de diferentes regiones del planeta dando como resultado las mejoras tecnológicas en los sistemas de producción y comercialización.

BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. (1998). Fitopatología. Editorial LIMUSA S.A. de C.V. Grupo Noriega Editores. Balderas, Mexico. 838 p.
- Andrade, H. (2002). Requerimientos cuantitativos para la industrialización de la papa. *Revista INIAP*. (9): 21-23.
- Antoun, H., & Kloepper, J. W. (2001). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR), in: Encyclopedia of Genetics, Brenner, S. and Miller, J.H., eds., Academic Press, N.Y., pp.1477-1480.
- Antount, H. & Prévost, D. (2005). Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. Ed. Springer. *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*, 1–38.
- Arce, A. (2002). El cultivo de la patata. 2da Edición. Ed. Mundi-Prensa. España. pp. 41-69.
- Beijerinck, M. W. (1901). Uber Oligonitrophile Mikroben. *Zbl. Bakt., Abt.7*, 561. En: Buchanan, R. E.1925. General Systematic Bacteriology. First edition. William & Wilkins. Co. pp. 194
- Bendt, A., Hueller, H., Kammel, U., Helmke, E., Schweder, T. (2001). Cloning, expression, and characterization of a chitinase gene from the Antarctic psychrotolerant bacterium *Vibrio* sp. strain Fi: 7. *Extremophiles* **5**, 119–126.
- Bernal, J., Valencia, P., Guineth, S. (2000). Isolation of Enterobacteria, Azotobacter sp. and Pseudomonas sp., Producers of Indole-3-Acetic Acid and Siderophores, from Colombian Rice Rhizosphere. *Revista Latinoamericana de Micro- biología.*, p. 42,171-176.
- Bhattacharya, D., A. Nagpure, R., Gupta, K. (2007). Bacterial Chitinases: Properties and Potential. *Critical Reviews in Biotechnology*, 27(1): 21-28.
- Bobadilla, C. & Rincón, S.C. (2008). Aislamiento y producción de bacterias fosfatos solubilizadoras a partir de compost obtenido de residuos de plaza. *Microbiólogo Industrial*. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Página 16.
- Castro, I. & Contreras, A. (2011). Manejo de plagas y enfermedades en el cultivo de la papa. Imprenta Austral, Valdivia- Chile 72 páginas.
- Clark, B. L. (2004). Characterization of a catechol-type siderophore and the detection of a possible outer membrane receptor protein from *Rhizobium leguminosarum* strain IARI 312. *East Tenn. St. Univ.* 43:154-244.
- Clavijo, C., Chipana, V., Centeno, J., Zúñiga, D., Guillén, C. (2012). Aislamiento, caracterización e identificación de bacterias diazotróficas de la rizósfera del cultivo de *Olea europea* “olivo” en Tacna Perú. *Ecología Aplicada*. vol.11, n.2, pp. 89-102.

- Cline, E., Farr D., Rossman A., Palm M., McCray E. (2005). Fungal Nomenclature Database, Systematic Botany & Mycology Laboratory, ARS, USDA.
- Compant, S., Duffy, J. Nowak, C., Clément, Barka, E. (2005). Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (9): 4951–4959.
- Dávila, M., Gallegos, G., Hernández, F., Ochoa, Y., Flores, A. (2013). Actinomicetos antagónicos contra hongos fitopatógenos de importancia agrícola. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* Vol.4 Núm.8 p. 1187-1196.
- Dewan, G., Subba Rao, N. (1979). Seed inoculation with *Azospirillum brasilense* and *Azotobacter chroococcum* and the root biomass of rice (*Oryza sativa* L). *Plant and Soil*, 53 (Suppl 3): 295– 302.
- Dey, R., Pal, K.K., Bhatt, D.M., Chauhan, S.M. (2006). Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiological Research*, 159: 371-394.
- Dobbelaere, S., Vanderleyden, J., Okon, Y. (2003). Plant growth promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Science* 22(2):107-149.
- Dörffling, K. (1982). *Das Hormonsystem der Pflanzen*, Stuttgart: Thieme.
- Drechse, I H. & Jung, G. (1998). Peptide siderophores. *J. Peptide Sci.* 4:147-181.
- Dybas, M., Tatar, G., Criddle, C. (1995). Localization of carbon tetrachloride transformation activity of *Pseudomonas* sp strain KC. *Appl. Env. Microbiol.* 61:758-762.
- El-Tarabil, K.A. & Sivasithampara, K. (2006). Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Soil Biology & Biochemistry*, 38: 1505–1520.
- Ezziyyani, M., Pérez, C., Requena, M., Ahmed, A. & Candela, M. (2004). Evaluacion del biocontrol de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annuum* L.) por tratamiento con *Burkholderia cepacia*. *Anales de Biología* 26: 61-68.
- Fernández, C. (1998). Vida microbiana en el suelo. Ed. Pueblo y Educación. Habana, Cuba. pp. 306-331.
- García Breijo, F. (2006). *Biología y Botánica, Parte III: El funcionamiento de las plantas.* Universidad Politecnica de Valencia.

- García, R., García, A. & Garnica, C. (2002). Distribución, Incidencia y Alternativas de Control de *Rhizoctonia solani* en el Cultivo de Papa en el Estado Mérida, Venezuela. *Revista Latinoamericana de la Papa* 13: 24- 40.
- Ghanem, N., Sabry, S., El-sherif, Z. & El-Ela, A. (2000). Isolation and Enumeration of marine Actinomycetes from seawater and sediments in Alexandria. *Applied and Environmental Microbiology* 46: 105-111.
- Gohel, V., Singh, A., Vimal, M., Ashwini, P., & Chhatpar, H. (2006). Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. *African Journal of Biotechnology* 5: 54–72.
- González, D. (2002). Estado actual de la taxonomía de *Rhizoctonia solani* Kühn. *Revista Mexicana de Fisiopatología*. Instituto de ecología. Volumen 20, número 2.
- González, V., Portal, M. & Rubio, V. (2006). Review. Biology and Systematics of the form genus *Rhizoctonia*. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 4(1), 55-79.
- Gutiérrez, P. & Torres, H. (1990). Control biológico de *Rhizoctonia solani* con *Rhizoctonia binucleada*. *Fitopatología* 25: 45-50.
- Hernández, A., Rives, N., Caballero, A., Hernández, A. N. & Heydrich, M. (2004). Caracterización de rizobacterias asociadas al cultivo del maíz en la producción de metabolitos del tipo AIA, sideróforos y ácido salicílico. *Revista Colombiana de Biotecnología* 6(1): 6-13.
- <http://www.indexfungorum.org>
- Huang, C.J., T.K. Wang, S.C. Chung y C.Y. Chen. (2005). Identification of an antifungal chitinase from a potential biocontrol agent, *Bacillus cereus* 28-9. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 38(1): 82-88.
- Ibañez, F., Machado, Z., Soto, H., lochevet, E. & Ramos, H. (2011). Endophytic and rhizospheric enterobacteria isolated from sugar cane have different potentials for producing plant growth-promoting substances. *Revista Springer. Plant Soil* 353:409–417.
- INEC (Instituto Nacional De Estadísticas y Censos). (2002). III Censo Nacional Agropecuario. Resultados Nacionales. Volumen 1. Ecuador. INEC-MAC-SICA.
- Joo, G.J. (2005). Purification and characterization of an extracellular chitinase from the antifungal biocontrol agent *Streptomyces halstedii*. *Biotechnology Letters* 27: 1483-1486.
- Kamara, A. (2001). Nutrición, regulación del crecimiento y desarrollo vegetal. Integración de tecnológicos y recomendaciones agropecuarias de Kamara.

- Khan, M. S., Zaidi, A. & Wani, P. (2007). Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture – a review. *Agron. Sustain. Dev.*, 27: 29-43.
- Khan, M.S., Zaidi, A., Ahemad, M., Oves, M., Wani, P.A. (2010). Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi – current perspective. *Arch Agron Soil Scien*, 56(1): 73–98.
- Kloepper JW, Leong J, Teintze M, Schroth MN, (1980). Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growthpromoting rhizobacteria. *Nature*, 286: 885–886.
- Kloepper J. W., Lifshitz, R. & Zablutowitz, R. M. (1989). Free living bacteria inocula for enhancing crop productivity. *Trends in Biotechnology*7:39-43.
- Knosp, O., Von Tigerstrom, M. & Page, W. (1984). Siderophore –Mediated Uptake of Iron in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology* 159: 341-347.
- Kokalis-Burelle, N., Kloepper, J.W. & Reddy, M.S. (2006). Plant growthpromoting rhizobacteria as transplant amendments and their effects on indigenous rhizosphere microorganisms. *Applied Soil Ecology*, 31: 91–100.
- Kumar, NR., Arasu, VT., & Gunasekaran, P. (2002). Genotyping of antifungal compounds producing plant growth-promoting rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens*. *Current Science*, 82 (Suppl 12): 1465-1466.
- Leiva, S., Yañez, M., Zaror, L., Rodríguez, H. & García, H. (2004). Actividad Antimicrobiana de actinomicetes aislados desde ambientes acuáticos del sur de Chile. *Revista médica de Chile* 132: 151-159
- Liu, Y., J. Tao, Y., Yan, B., Li, H. & Li, C. (2011). Biocontrol Efficiency of *Bacillus subtilis* SL-13 and Characterization of an Antifungal Chitinas. *Chinese Journal of Chemical Engineering* 19(1): 128-134.
- Makoi, J.H. & Ndakidemi, P. A. (2008). Selected soil enzymes: examples of their potential roles in the ecosystem. *African Journal of Biotechnology* 7: 181-191.
- Manulis, S., Shafrir, H., Epstein, E., Lichter, A. & Barash, I. (1994). Biosíntesis of indole-3-acetic acid via the indole-3-acetamide pathway in *Streptomyces* spp. *Micriobiology* 140: 1045-1050.
- Michel-Aceves, A.C., M.A. Otero-Sánchez, O. RebolledoDomínguez, R. Lezama- Müller, G. & Raymond, K. (1984). Specificity and Mechanism of Ferroxinamine-Mediated Iron Transport in *Streptomyces pilosus*. *Journal of Bacteriology* 160: 304-312.
- Müller, G. & Raymond, K. (1984). Specificity and Mechanism of Ferroxinamine-Mediated Iron Transport in *Streptomyces pilosus*. *Journal of Bacteriology* 160: 304-312.

- Muthukumarasamy, R., Revathi, G. & Vadivelu, M. (2000) *Acetobacter diazotrophicus*: prospects and potentialities – An overview. In *Recent Advances in Biofertilizer Technology* (eds Yadav, A. K., Motsara, M. R. and Ray Chaudhury, S.), Society for Promotion & Utilization Resources & Technology, New Delhi, pp. 126–153.
- Naik, P. R., Raman, G., Narayanan, K. B., Sakthivel, N. (2008). Assessment of genetic and functional diversity of phosphate solubilizing fluorescent pseudomonads isolated from rhizospheric soil. *BMC Microbiol.* 8, p. 230.
- Neilands, J. B. (1995). Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem.* 270:26723-26726.
- Nowak-Thompson, B., Gould, S., Kraus, J. and Loper, J. (1994). Production of 2, 4-diacetylphloroglucinol by the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Canadian Journal of Microbiology*, 40 (Suppl 12): 1064–1066.
- O'Kennedy, M.M., B.G. Crampton, M. Lorito, E. Chakauya, W.A. Breese, J.T. Burger y F.C. Botha. (2011). Expression of a β -1,3-glucanase from a biocontrol fungus in transgenic pearl millet. *South African Journal of Botany* 77: 335–345.
- Page, W. & Shivprasad, S. (1995). Iron binding to *Azotobacter salinestris* melanin, iron mobilization and uptake mediated by siderophores. *Biometals* 8: 59-64
- Papavizas, G.C. & Ayers, W. (1974). *Aphanomyces* species and their root diseases in pea and sugarbeet. A Review, US Department of Agriculture, Washington DC.
- Parmeter, J. & Whitney, H. (1970). Taxonomy and nomenclature of the imperfect state. J. R. Parmeter (ed). *Rhizoctonia solani: Biology and Pathology*. University of California Press. Berkeley, CA, USA. 225p.
- Patten, C. & Glick, B. (2002). Role of *Pseudomonas putida* Indol acetic acid in Development of the Host Plant Root System. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 3795-3801
- Peña, H. & Reyes, I. (2007). Aislamiento y evaluación de bacterias fijadoras de nitrógeno y disolventes de fosfatos en la promoción del crecimiento de la lechuga (*Lactuca sativa* L.) *Interciencia* vol. 32 n.8.
- Perez, S., Cabirol, N., George, R., Zamudio, L.S. & Fernández, F.J. (2007). O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *Journal of Microbiological Methods*. 70:127–131
- Pumisacho & Sherwood. (2002). El cultivo de la papa en el Ecuador, INIAP, CIP, Ecuador, pp. 21-161.

- Quecine, M., Araujo, W., Marcon, J., Gai, C., Azevedo, J. & Pizzirani-Kleiner, A. (2008). Chitinolytic activity of endophytic *Streptomyces* and potential for biocontrol. *Letters in Applied Microbiology*. Volume 47, Issue 6, pp. 486–491.
- Ratledge, C. & Dover, L. (2000). Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:881-941.
- Reyes, I. (2011). La micorriza arbuscular (MA) centro de la rizosfera: comunidad microbiológica dinámica del suelo. Depto. de Biología, División de CBS. UAM Iztapalapa.
- Reyes, I., Alvares, L., El- Ayuobi H. & Valery, A. (2008). Selección y evaluación de rizobacterias promotoras del crecimiento en pimentón y maíz. *Bioagro* vol 20(1). Páginas 37- 48.
- Rico, M. (2009). Capacidad promotora de crecimiento vegetal por bacterias del género *Azotobacter* y Actinomicetos aislados de cultivos de *Solanum tuberosum* Linnaeus, 1753 (Papa) cultivados en zonas altoandinas del Perú. Tesis Biólogo. UNMSM.
- Rivieros, J.A. (2008). Evaluacion de microorganismos con potencial en biofertilización para un cultivo de uchuva (*Physalis peruviana* L.) en etapas de semillero y vivero. Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. Página 11 – 12.
- Rodriguez H, R Fraga (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol. Adv.* 17:319-339.
- Romero, A., Correa, O., Moccia, S. & Rivas, J. (2003). Effect of *Azospirillum* mediated plant growth promotion on the development of bacterial diseases on fresh-market and cherry tomato. *Journal of Applied Microbiology* 95: 832-838.
- Royse, D. & Ries, S. (1978). The influence of fungi isolated from peach twigs on the pathogenicity of *Cytospora cincta*. *Pyhtopathology* 68: 603-607.
- Saharan, B. & Nehra, V. (2011). Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. *Life Sciences and Medicine Research*, Volume: LSMR-21
- Sarwar, M. & Kremer, R.J. (1995). Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. *Letters in Applied Microbiology* 20(5): 282-285.
- Sharan, A., Shikha, Singh Darmwal, N. & Gaur, R. (2008). *Xanthomonas campestris*, a novel stress tolerant, phosphate-solubilizing bacterial strain from saline–alkali soils. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(6): 753-759.

- Sistema Nacional de Vigilancia y Monitoreo de Plagas (SINAVISMO). (2012). Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Buenos Aires, Argentina.
- Stanley, Y. (1994). The Family Streptomycetaceae. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore USA: USA: Ed. Williams & Wilkins. pp. 2344-2347.
- Sturz, A. V., & Christie, B. R. (2003). Beneficial microbial allelopathies in the root zone: the management of soil quality and plant disease with rhizobacteria, *Soil Till. Res.* 72:107-123.
- Sylvia, D. (2005). Principles and applications of soil microbiology. Second Edition. Pearson/Prentice Hall. New Jersey, USA. pp. 259 – 306.
- Tilak, K., Ranganayaki, N., Pal, R., Saxena, K., Nautiyal, S., Mittal, S., Tripathi, A. & Johri, B. (2005). Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Current Science* 89: 136-150
- Titus, A. & Pereira, G. (2007). The role of Actinomycetes in coffee plantation ecology. www.ineedcoffe.com
- Tokala, K., Strap, C., Jung, D., Crawford, L., Salove, L., Deobald, F., Bailey, J. & Morra, J. (2002). Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Applied and Environmental Microbiology* 68: 2161-2171.
- Toro, M., Azcón, R., & Barea, J. (1997). Improvement of arbuscular mycorrhiza development by inoculation of soil with phosphate-solubilizing rhizobacteria to improve rock phosphate bioavailability (32P) and nutrient cycling. *Applied Environmental Microbiology* 63: 4408–4412.
- Torres, M., Valencia, S., Bernal, J. & Martinez, P. (2000). Isolation of Enterobacteria, *Azotobacter* sp. and *Pseudomonas* sp., Producers of Indole-3-Acetic Acid and Siderophores, from Colombian Rice Rhizosphere. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 42: 171-176.
- Toyoda, H. & Utsumi, R. (1991). Method for the prevention of *Fusarium* diseases and microorganisms used for the same. US Patent No. 4, 988, p. 586.
- Tsavkelova, E., Klimova, Y., Cherdyntseva, S. & Netrusov, A. (2006). Microbial Producers of Plant Growth Stimulators and Their Practical Use: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology* 42: 117-126

- Ulacio, D., Salas, J., Querales, P. & Sanabria M. (2002). Microbiota del suelo de zonas productoras del papa del estado de Mérida y su relación con *Rhizoctonia solani*. *Bioagro* 14: 11-16
- Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255: 571–586.
- Voisard, C., Keel, C., Haas, D. & Defago, G. (1989). Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. *The EMBO Journal*, 8 (Suppl 2): 351–358.
- Wakelin, S. A., Warren, R. A., Harvey, P. R. & Ryder, M. H. (2004). Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. closely associated with wheat roots. *Biol. Fert. Soils*, 40: 36–43.
- Welbaum, G. Sturz, A., Dong, Z. & Nowak, J. (2004). Fertilizing soil microorganisms to improve productivity of agroecosystems. *Crit. Rev. Plant Sci.* 23:175-193.
- Yamada, Y., Hoshino, K. & Ishikawa, T. (1997). The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: The elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to generic level. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61, 1244– 1251.
- Zahir, A., Arshad, M. & Frankenber, W. (2004). Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Applications and perspectives in Agricultura. *Advances in agronomy.* 81:97-108.
- Zaidi, A., Khan, M. S., Ahemad, M., Oves, M. and Wani, P. A. (2009). Recent advances in plant growth promotion by phosphate-solubilizing microbes. *Microbial strategies for crop improvement.* Springer-Verlag, Berlin. 23-50 pp.
- Zhang, S., Moyne, A.L., Reddy, M.S. Y Kloupper, J.W. (2002). The role of salicylic acid in induced systemic resistance elicited by plant growth-promoting rhizobacteria against blue mold of tobacco. *Biological Control*, 25: 288–296.

ANEXOS

Anexo 1: Preparación de agares y caldos.

Trypticase Soy Agar: Pesar 40 g y disolver en 1000 mL de agua destilada, agitar hasta disolver totalmente, ajustar pH 7.3 ± 0.2 . Autoclave a 121°C durante 15 minutos, dispensar en placas mono-petri

Potato Dextrose Agar: Pesar 39 g del polvo y disolver en 1000 mL de agua destilada. Ajustar pH 5.6 ± 0.2 , autoclave a 121°C por 15 minutos y dispensar en placas mono-petri.

National Botanical Research Institute's Phosphate Growth Medium: Pesar 10 g de glucosa, 5 g de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 0,1 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,25 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g KCl, 5,0 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 5,0 g de agar; mezclar todo en 1000 mL de agua destilada agitando para su completa disolución, ajustar pH 7,0. Autoclave a una temperatura de 121°C por 15 minutos. Dispensar.

Tryptic Soy Broth: Pesar 30 g y disolver en 1000 mL de agua destilada. Ajustar pH 7.3 ± 0.2 . Autoclave a 121°C por 15 minutos.

Tryptone Glucose Beef Extract: Pesar 18 g y disolver en 1000 mL de agua destilada, ajustar pH 7 ± 0.2 . Autoclave a 121°C por 15 minutos.

Caldo Nutritivo: Pesar 8 g y disolver en 1000 mL de agua destilada, ajustar pH 6.8 ± 0.2 . Autoclave a 121°C por 15 minutos.

Reactivo de Salkowsky: Se prepara el reactivo de Salkowsky al 0,01 M de FeCl_3 en 36% de H_2SO_4 (disolver 0,162 g de FeCl_3 en 36 ml de H_2SO_4 aforado a 100 ml de H_2O).

Solución Acido Indol Acético (AIA) Stock: pesar 10 mg de Ácido indol acético puro y disolver en 10 ml de agua destilada.

Tabla 3: Diluciones de ácido indol acético puro mas medios de cultivo (AIA).

5µl	+	995µl medio (normal TSB, TGE y caldo nutritivo)
50µl	+	950µl medio (normal TSB, TGE y caldo nutritivo)
100µl	+	900µl medio (normal TSB, TGE y caldo nutritivo)
150µl	+	850µl medio (normal TSB, TGE y caldo nutritivo)
200µl	+	800µl medio (normal TSB, TGE y caldo nutritivo)
250µl	+	750µl medio (normal TSB, TGE y caldo nutritivo)
300µl	+	700µl medio (normal TSB, TGE y caldo nutritivo)
350µl	+	650µl medio (normal TSB, TGE y caldo nutritivo)
400µl	+	600µl medio (normal TSB, TGE y caldo nutritivo)
450µl	+	550µl medio (normal TSB, TGE y caldo nutritivo)
500µl	+	500µl medio (normal TSB, TGE y caldo nutritivo)
550µl	+	450µl medio (normal TSB, TGE y caldo nutritivo)
600µl	+	400µl medio (normal TSB, TGE y caldo nutritivo)

Tabla 4: Información de las cepas utilizadas para la evaluación PGPR.

Información de las cepas				
Código	División	Familia	Género	Especie
E1-1	Bacteria	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	<i>pasteuri</i>
E1-2	Bacteria	No conocido	<i>Bacterium</i>	sp.
E1-3	Proteobacteria	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	sp.
E2-1	Bacteria	Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus</i>	<i>macquariensis</i>
E2-2	Bacteria	Planococcaceae	<i>Sporosarcina</i>	sp.
E2-3	Bacteria	Planococcaceae	<i>Sporosarcina</i>	sp.
E2-4	Bacteria	No conocido	<i>Bacterium</i>	sp.
E2-5	Bacteria	No conocido	<i>Bacterium</i>	sp.
E2-6	Bacteria	Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus</i>	sp.
E2-7	Proteobacteria	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	sp.
E3-1	Bacteria	Planococcaceae	<i>Sporosarcina</i>	sp.
E3-2	Bacteria	Planococcaceae	<i>Sporosarcina</i>	sp.
E3-3	Proteobacteria	Enterobacteriaceae	<i>Klebsiella</i>	sp.
E3-4	Actinobacteria	Microbacteriaceae	<i>Microbacterium</i>	<i>oxydans</i>
E3-5	Bacteria	Deinococcaceae	<i>Deinococcus</i>	sp.
E3-6	Bacteria	Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus</i>	sp.
E3-7	Bacteria	No conocido	<i>Bacterium</i>	sp.
E3-8	Bacteria	No conocido	<i>Bacterium</i>	sp.
E3-9	Bacteria	Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus</i>	<i>chondroitinus</i>
E3-10	Proteobacteria	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	<i>licheniformis</i>
E3-11	Bacteria	Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus</i>	<i>taichungensis</i>
E3-12	Bacteria	Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus</i>	sp.
E3-13	Bacteria	Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus</i>	<i>taichungensis</i>
E3-14	Bacteria	Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus</i>	<i>taichungensis</i>
E3-15	Bacteria	Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus</i>	<i>taichungensis</i>
E3-16	Proteobacteria	Enterobacteriaceae	<i>Secondary endosymbiont</i>	<i>curculio sikkimensis</i>
E3-17	Bacteria	Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus</i>	<i>taichungensis</i>
E3-18	Bacteria	Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus</i>	<i>taichungensis</i>
E3-19	Bacteria	No conocido	<i>Bacterium</i>	sp.
E3-20	Bacteria	No conocido	<i>Bacterium</i>	sp.

E4-1	Bacteria	No conocido	<i>Planococcus</i>	sp.
E4-2	Bacteria	Dermacoccaceae	<i>Dermacoccaceae</i>	sp.
E4-3	Bacteria	Nocardiaceae	<i>Rhodococcus</i>	sp.
E4-4	Bacteria	Nocardiaceae	<i>Rhodococcus</i>	<i>erythropolis</i>
E4-5	Bacteria	Nocardiaceae	<i>Rhodococcus</i>	<i>erythropolis</i>
E4-6	Bacteria	Enterobacteriaceae	<i>Serratia</i>	sp.
E4-7	Bacteria	Xanthomonadaceae	<i>Stenotrophomonas</i>	sp.
E4-8	Proteobacteria	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	sp.
E4-9	Bacteria	Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus</i>	sp.
E4-10	Bacteria	Nocardiaceae	<i>Rhodococcus</i>	sp.
E4-11	Bacteria	No conocido	<i>Bacterium</i>	sp.
E4-12	Bacteria	Enterobacteriaceae	<i>Serratia</i>	sp.
E4-13	Bacteria	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces</i>	sp.
E4-14	Bacteria	Microbacteriaceae	<i>Leifsonia</i>	sp.
E4-15	Bacteria	Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus</i>	<i>taichungensis</i>
E4-16	Bacteria	No conocido	<i>Bacterium</i>	sp.

Fuente: Autora

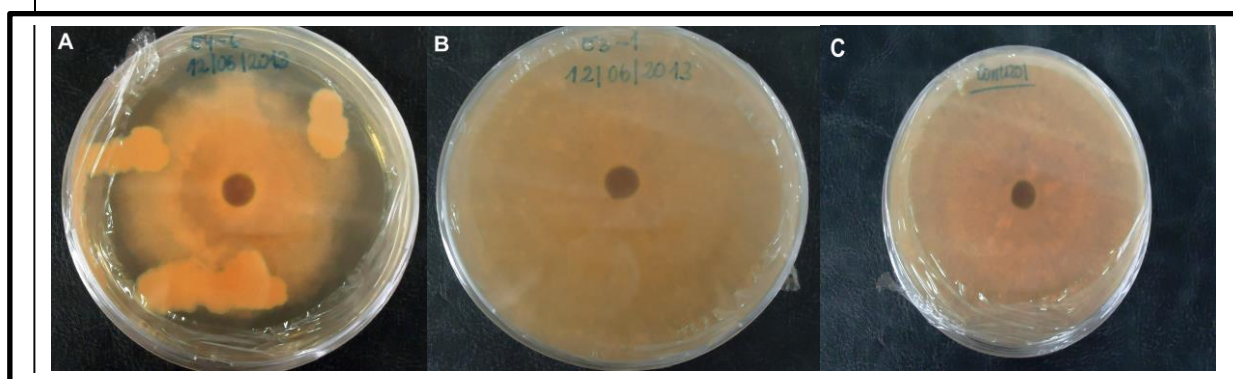


Figura 8: Cultivos bacterianos de la prueba de antagonismo: **A.** Cepa con 43,7% de inhibición, **B.** Presenta 0% de inhibición cajacubierta del patógeno *R. solani* y **C.** Es un control de la prueba.

Fuente: Autora

Curvas exponencial estándar de las concentraciones de Ácido indol acético puro en los diferentes medios de cultivo.

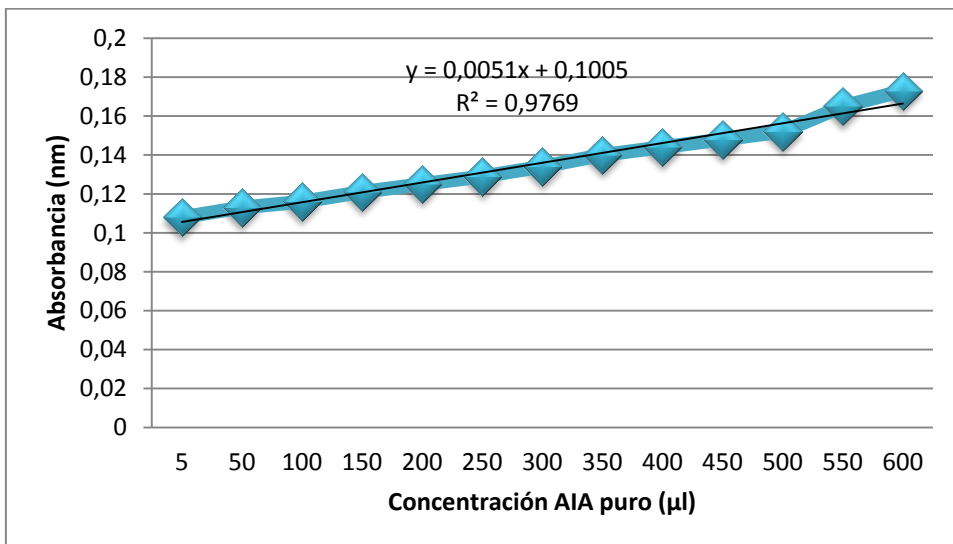


Figura 9: Concentraciones de AIA puro en medio de cultivo TSB. Absorbancia en el espectrofotómetro.

Fuente: Autora.

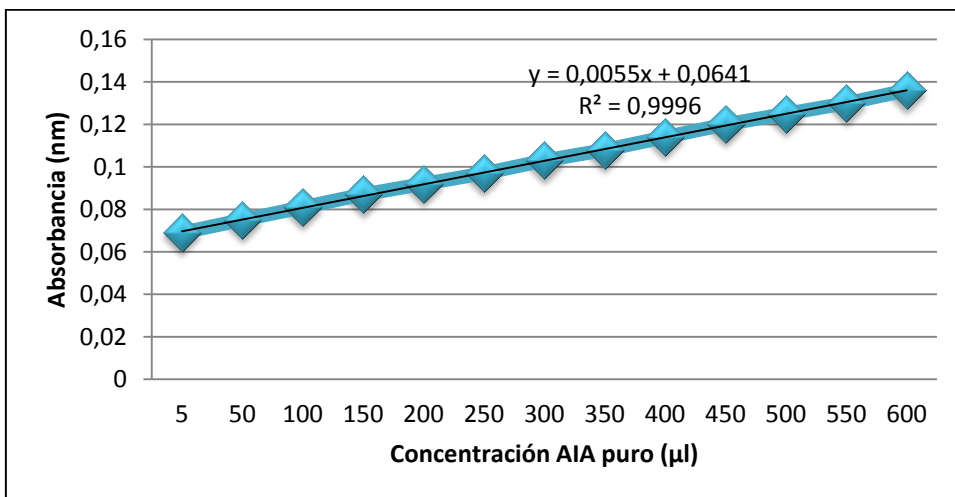


Figura 10: Concentraciones de AIA puro en medio de cultivo TGE. Absorbancia en el espectrofotómetro.

Fuente: Autora.

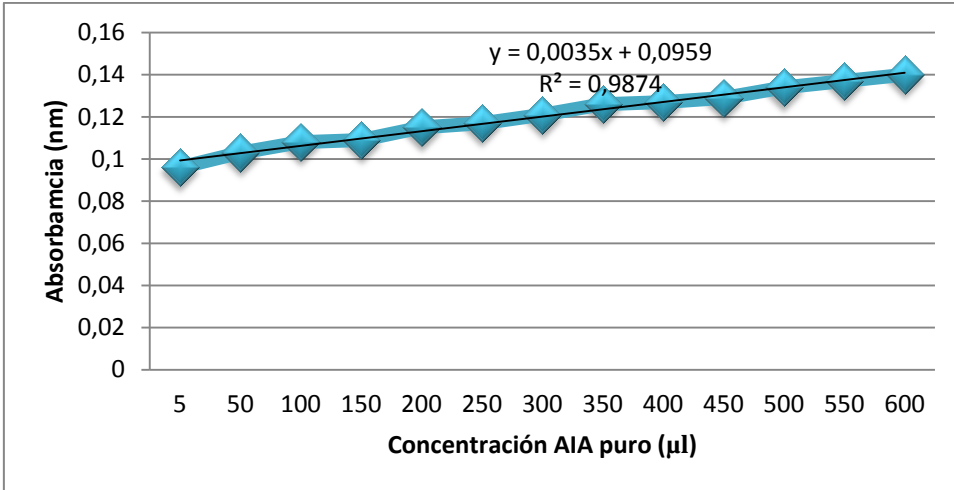


Figura 11: Concentraciones de AIA puro en caldo nutritivo. Absorbancia en el espectrofotómetro.
Fuente: Autora.



Figura 12: Prueba cualitativa producción de Acido Indol Acético, A. caldo TSB, B. caldo TGE y C. caldo nutritivo.
Fuente: Autora.

Tabla 5: Análisis de varianza, prueba de solubilización de fosfato.

ANOVA

Diámetro del Halo 30 Días

	Suma de cuadrados	df	Media de cuadrados	F	Sig.
Entre grupos	91.705	16	5.732	1034.725	.000
Dentro de los grupos	.283	51	.006		
Total	91.988	67			

Fuente: Autora.

Tabla 6: Prueba de Scheffe, solubilización de fosfato.

Diámetro del Halo 30 Días

Scheffe^a

Cepas Bacterianas	N	Nivel de Significancia= 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
E3-1	4	3.000						
E4-2	4	3.050	3.050					
E3-5	4	3.250	3.250					
E4-9	4		3.300					
E4-10	4			3.975				
E3-17	4			4.150				
E4-7	4				4.450			
E3-15	4					4.800		
E4-4	4					4.875		
E4-11	4					4.875		
E3-16	4					4.975	4.975	
E4-8	4						5.225	
E3-20	4							6.125
E4-6	4							6.250
E3-18	4							6.275
E2-3	4							6.300
E3-3	4							6.300
Sig.		.175	.175	.789	1.000	.789	.175	.789

Se muestran Medias para grupos en subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza Medias armónica Tamaño de la muestra = 4,000.

Fuente: Autora.

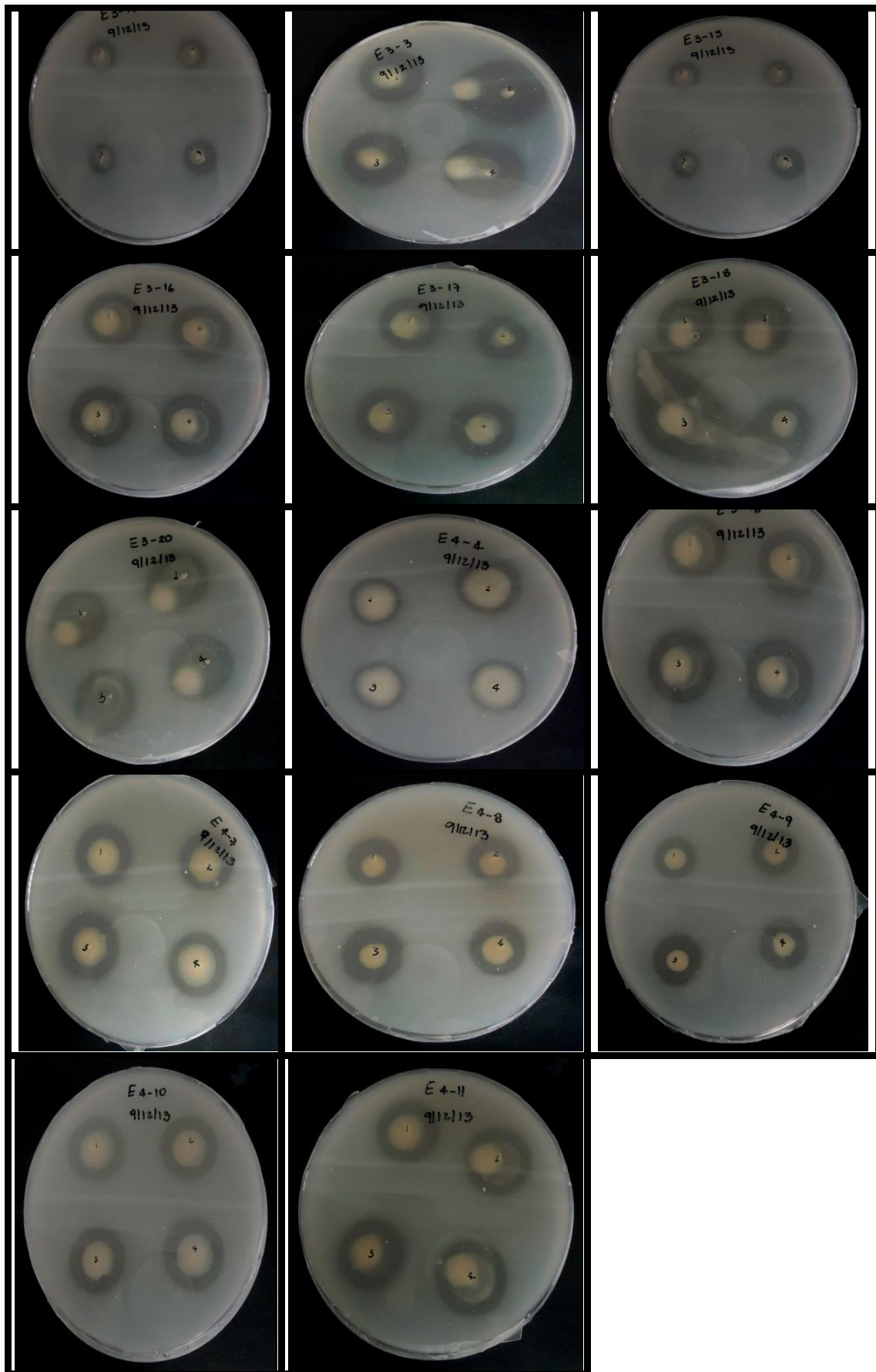


Figura 13: Cultivo de cepas solubilizadoras de fosfato a las 48 horas de la siembra en medio NBRIP.

Fuente: Autora.