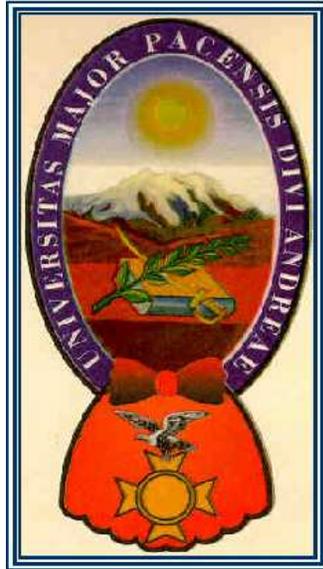


UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FARMACO BIOQUIMICAS



**EVALUACION DE LA ACTIVIDAD BIOLOGICA
INHIBITORIA DE HONGOS DE TIERRA SOBRE**

Rhizoctonia solani

***IN VITRO* Y EN PARCELAS DE CULTIVO DE PAPA**

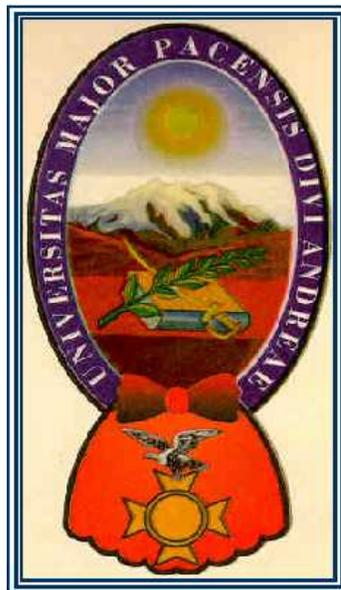
Tesis de Post grado para optar el título de Magister Scientiarum en Ciencias
Biológicas y Biomédicas en la mención de Biotecnología Microbiana

POSTULANTE: Nilse Emma Soliz Lazarte

La Paz – Bolivia

2004

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FARMACO BIOQUIMICAS



EVALUACION DE LA ACTIVIDAD BIOLOGICA
INHIBITORIA DE HONGOS DE TIERRA SOBRE

Rhizoctonia solani

IN VITRO Y EN PARCELAS DE CULTIVO DE PAPA

Tesis de Postgrado para optar el título de Magister Scientiarum en Ciencias
Biológicas y Biomédicas en la mención de Biotecnología Microbiana

POSTULANTE: Nilse Emma Soliz Lazarte

TUTORES: Alberto Giménez T. Ph.D.

M. Teresa Alvarez A. M.Sc.

La Paz – Bolivia

2004

DEDICATORIA

A la memoria de mi padre Leónidas

Con infinito amor y gratitud:

A mi Señora madre Emma

A mis hermanos Eldy, Guido y Saíd.

A mi amado esposo Ramiro

Porque sin su amor no lo habría logrado

*Al Dr. Alberto Giménez por la
admiración que me inspira,
por sus enseñanzas, paciencia y
confianza depositada en mí.*

*A la Dra. María Teresa Álvarez "TK"
por su orientación, consejo y
sobre todo por la amistad brindada*

*A Magaly Paz por su ayuda incondicional,
por todos los momentos compartidos. Gracias amiga!*

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Mayor de San Andrés por haberme acogido en sus aulas durante mi formación.

A la Maestría en Ciencias Biológicas y Biomédicas por haber hecho posible llevar a cabo mis inquietudes en la investigación.

Al Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas por acogerme en sus laboratorios y hacer posible la realización de la presente investigación.

Al Instituto Boliviano de Tecnología Nuclear por ser el lugar donde se realizaron las pruebas de campo del presente trabajo

A la Fundación: Promoción e Investigación de Productos Andinos (PROINPA) por habernos proporcionado el aislamiento de *Rhizoctonia solani*.

A los Ingenieros Rafael Murillo y Eliana Lara por su valioso aporte en la realización de las pruebas de campo de la presente investigación.

Al Ingeniero Giovana Plata por su valiosa colaboración.

A Marco Echenique y Emma Lecoña por su orientación y consejo en los ensayos de campo.

A mis compañeros del IIFB: Esther, Laura, Elvis, Crispin, María Esther, Vanesa, Ximena , Hugo, por todos los momentos compartidos.

A Ingrid, Janeth, Patricia, Vesna, Ana Cecilia, Noemí por el compañerismo en los momentos buenos y malos durante el post grado y a quienes deseo el mayor de los éxitos.

Al personal de Diagnoslab: Dr. Elvin Mollinedo, Dra. Rose Mary Rocha, Dra. Verónica Leytón, Dra. Briguitte Pardo, Sr. Adolfo Alejo, Sra. Marilyn Ordóñez, Srta. Inés Quino y Srta. Roxana Quino por el apoyo y comprensión en todo momento.

Al Dr. Enrique Terrazas por su colaboración y consejos.

INDICE

	Pag.
1. INTRODUCCION.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
2.1.Objetivo General.....	4
2.2.Objetivos Específicos.....	4
3. DISEÑO TEORICO.....	5
3.1. Modelo Teórico.....	5
3.2. Marco Teórico.....	6
3.2.1. El control Biológico.....	6
3.2.1.1. Definición.....	6
3.2.1.2. Papel de los antagonistas.....	7
3.2.1.3. Los hongos como agentes de biocontrol.....	7
3.2.1.4. Acción biorreguladora.....	9
3.2.1.5. El control biológico en Bolivia.....	11
3.2.2. La Papa.....	11
3.2.2.1. Origen e importancia.....	11
3.2.2.2. Importancia del cultivo de papa en Bolivia.....	13
3.2.2.3. Taxonomía y características de la planta.....	13
3.2.2.4. Ecofisiología de la producción de la papa.....	15
3.2.2.5. Exigencias del cultivo de papa.....	16
3.2.2.6. Enfermedades y plagas de la papa.....	18
3.2.2.7. Utilización y valor nutritivo.....	23
3.2.2.8. Certificación de la papa - semilla.....	25
3.2.3. Costra negra de la papa: (<i>Rhizoctonia solani</i>).....	27
3.2.3.1. Clasificación taxonómica.....	27
3.2.3.2. Grupos de anastomosis.....	28
3.2.3.3. Huéspedes y distribución geográfica.....	29
3.2.3.4. Morfología.....	30
3.2.3.5. Ecología y ciclo de la enfermedad.....	31

3.2.3.6. Síntomas.....	32
3.2.3.7. Prevención.....	35
4. MATERIAL Y METODOS.....	37
4.1. Aislamiento de <i>R. solani</i> y de hongos de tierra del CIN-Viacha.....	37
4.1.1. Determinación del área de trabajo.....	37
4.1.2. Aislamiento de <i>Rhizoctonia solani</i>	38
4.1.3. Aislamiento de hongos de tierra del CIN - Viacha.....	39
4.2. Determinación de las condiciones de cultivo óptimas y cinética de crecimiento de <i>Rhizoctonia solani</i>	39
4.2.1. Determinación de las condiciones de cultivo óptimas y cinética de crecimiento en medio de cultivo sólido de <i>R. solani</i>	39
4.2.2. Determinación de la cinética de crecimiento de <i>R. solani</i> en medio de cultivo líquido.....	42
4.3. Obtención de los filtrados de cultivo de los hongos del cepario del IIFB y del CIN - Viacha.....	42
4.3.1. Control de viabilidad y crecimiento de los hongos del cepario del IIFB.....	42
4.3.2. Obtención de los filtrados de cultivo de hongos del cepario del IIFB y del CIN - Viacha.....	43
4.4. Evaluación de la actividad biológica inhibitoria in vitro de los filtrados de cultivo de hongos del cepario del IIFB y del CIN - Viacha sobre <i>R. solani</i>	45
4.4.1. Evaluación de la actividad biológica inhibitoria in vitro de los filtrados de cultivo por el método de difusión en placa.....	45
4.4.2. Obtención de filtrados de cultivo de los hongos seleccionados, utilizando diferentes medios de cultivo.....	47
4.4.3. Evaluación de la actividad biológica inhibitoria in vitro de los filtrados de diferentes medios de cultivo de los hongos seleccionados sobre <i>R. solani</i> por el método de dilución en microplaca.....	48
4.4.4. Criterios de selección de la cepa del hongo a ser utilizado en las pruebas de campo.....	52
4.4.5. Prueba de inocuidad del hongo seleccionado en plantas de papa in vitro e in vivo.....	52
4.5. Evaluación de la actividad biológica inhibitoria del filtrado de cultivo del hongo seleccionado en parcelas de cultivo de papa.....	53
4.5.1. Determinación del área de trabajo.....	53
4.5.2. Preparación del terreno de cultivo.....	54

4.5.3. Obtención del filtrado de cultivo para ser evaluado en las parcelas de cultivo de papa.....	54
4.5.4. Distribución de los tratamientos.....	55
4.5.5. Siembra de la semilla de papa.....	56
4.5.6. Aplicación de los tratamientos.....	57
4.5.7. Cosecha de los tubérculos.....	57
4.5.8. Evaluación de las plantas de papa y los tubérculos – semilla.....	57
5. RESULTADOS Y DISCUSIONES	58
5.1. Aislamiento de <i>Rhizoctonia solani</i> y de hongos de tierra del CIN – Viacha.....	58
5.2.1. Determinación de las condiciones de cultivo óptimas y cinética de crecimiento de <i>Rhizoctonia solani</i>	58
5.2.2. Determinación de la cinética de crecimiento de <i>Rhizoctonia solani</i> en medio de cultivo líquido	61
5.3. Obtención de los filtrados de cultivo de los hongos del cepario del IIFB y del CIN – Viacha	65
5.4. Evaluación de la actividad biológica inhibitoria in vitro de los filtrados de cultivo de hongos del cepario del IIFB y del CIN – Viacha sobre <i>R. solani</i> ..	65
5.5. Evaluación de la actividad biológica inhibitoria in vitro de los filtrados de diferentes medios de cultivo de los hongos seleccionados con actividad sobre <i>Rhizoctonia solani</i>	68
5.6. Selección del hongo a ser utilizado en las pruebas de campo.....	71
5.7. Evaluación de la actividad biológica inhibitoria del filtrado de cultivo del hongo seleccionado en parcelas de cultivo de papa.....	71
5.8. Determinación del efecto del filtrado de cultivo sobre <i>Rhizoctonia solani</i> en parcelas de cultivo de papa.....	71
6. CONCLUSIONES.....	76
7. RECOMENDACIONES.....	79
BIBLIOGRAFIA.....	80
ANEXOS	

RESUMEN

Las enfermedades de las plantas son importantes porque causan daños económicamente significativos en la producción de alimentos, que pueden llevar a pérdidas parciales o totales de los cultivos. Si bien la aplicación de fertilizantes y pesticidas aumentaron los rendimientos, el equilibrio ambiental se ha visto comprometido, Hoy en día existe una creciente tendencia a la preservación del medio ambiente y el "control ecológico" ha tomado más fuerza. De esta manera el presente trabajo busca una alternativa para el control de la "costra negra" de la papa causada por el hongo *Rhizoctonia solani*, utilizando microorganismos como los hongos que produzcan compuestos con actividad biológica inhibitoria sobre este hongo fitopatógeno.

La presente investigación se realizó en dos partes, la primera consistió en la realización de ensayos in vitro, llevándose a cabo en el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB) y la segunda consistió en los ensayos in vivo, realizada en los campos de cultivo de papa del Centro de Investigaciones Nucleares (CIN) de la localidad de Viacha del departamento de La Paz.

Se evaluó la actividad biológica inhibitoria in vitro de filtrados de cultivo de 20 hongos pertenecientes al cepario del IIFB y 8 hongos aislados de tierra del CIN sobre *Rhizoctonia solani*, por el método de difusión y dilución. Para la obtención de los filtrados se cultivó a los hongos en estudio en diferentes medios de cultivo líquidos como el Caldo Papa Dextrosa, Caldo Saboraud, Caldo Glucosado de Saboraud, Caldo Miel de Abeja, Caldo Harina de Maiz, Caldo Czapek, Caldo Arroz y Caldo Zanahoria - Papa en condiciones estacionarias y de agitación a 150 r.p.m. a 28°C de temperatura. Se seleccionó el hongo: *Aspergillus sp.* (Código 3V) por poseer las siguientes ventajas: es más activo contra *R. solani*, es más fácil y económica la obtención del filtrado de su cultivo es proveniente de la localidad de Viacha, y no mostró patogenicidad en la planta de papa ni en el tubérculo, por lo tanto el filtrado de su cultivo fue utilizado en la realización de las pruebas de campo en las parcelas de cultivo de papa, en las cuales se aplicó periódicamente el filtrado, un testigo sin tratar y un testigo con tratamiento químico. Las plantas sin tratar produjeron un 71 % de tubérculos afectados por *R. solani*, las plantas que recibieron tratamiento con fungicidas químicos sistémicos y de contacto produjeron un 28% de tubérculos afectados y las plantas que recibieron tratamiento con el filtrado de cultivo aplicado cada 15 y cada 30 días produjeron un 36% y un 46% de tubérculos afectados por la enfermedad respectivamente, no existiendo una diferencia estadísticamente significativa entre el efecto que produjo el tratamiento con los controladores químicos y el filtrado de cultivo aplicado cada 15 días, sin embargo hubo diferencia significativa entre el efecto que produjo el tratamiento con los controladores químicos y el filtrado de cultivo aplicado cada 30 días. El tratamiento con el filtrado de cultivo de *Aspergillus sp.* (Código 3V) constituye una alternativa de tratamiento natural para el control de la "costra negra" de la papa causada por *R. solani*, debiéndose probar otras modalidades de aplicación del filtrado de cultivo y/o su combinación con un controlador químico, para reducir la dosis de éste último.

ABREVIATURAS

A	agitación
AG	Grupo de Anastomosis
AN	Agar Nutritivo
APD	Agar Papa Dextrosa
CIN	Centro de Investigaciones Nucleares
°C	Grados centígrados
CA	Caldo Arroz
CCK	Caldo Czapek
CGS	Caldo Glucosado de Saboraud
CHM	Caldo Harina de Maiz
CM	Caldo Miel de Abeja
CPD	Caldo Papa Dextrosa
CS	Caldo Saboreaud
E	Estacionario
IBTEN	Instituto de Ciencia y Tecnología Nuclear
IIFB	Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas
m.s.n.m.	Metros sobre el nivel del mar
N	Nitrógeno
PROINPA	Promoción e Investigación de Productos Andinos
r.p.m.	Revoluciones por minuto
TM	Toneladas Métricas
T/ha	Toneladas por hectárea

1. INTRODUCCION

Bolivia está entre los países con mayor biodiversidad del planeta, es un país que goza de clima variado, por ello su vegetación ofrece una inmensa variedad de grupos fitológicos, en este contexto la agricultura tradicional y de exportación es de vital importancia en la economía del país. Actualmente enfrentamos el desafío de la exportación de productos naturales, donde el mercado internacional exige productos de alta calidad y verdaderamente competitivos.

La eficiencia en la producción reclama un manejo racional, sostenible y económico de las enfermedades que afectan a los cultivos. Por ello las Instituciones dedicadas a la investigación deben dirigir sus esfuerzos a la generación, evaluación e implementación de prácticas culturales que permitan un incremento en los rendimientos con una utilización mínima de plaguicidas de origen químico.

Bolivia produce en promedio anualmente 693656 TM (año 2000) de papa, principalmente en los departamentos de La Paz (cuenca del altiplano), Oruro (altiplano sur), Potosí (norte de Potosí), Cochabamba (provincias Bolivia y Tapacarí), constituyéndose este producto en un alimento de consumo masivo por parte de la población boliviana.

Las enfermedades de las plantas son importantes para el hombre porque ellas causan daños económicamente significativos en la producción de alimentos. El tipo y cantidad de pérdidas causadas por las enfermedades varían con planta o su cosecha, el patógeno, la localidad, el medio ambiente, las medidas de control aplicadas o la combinación de estos factores que pueden llevar a pérdidas parciales o totales de la producción.

La expansión y crecimiento de la población demanda mas alimentos y por lo tanto una mayor cantidad de tierras destinadas a cultivos de interés económico. Si bien es cierto que la aplicación de fertilizantes y pesticidas han aumentado los rendimientos en el campo, el equilibrio ambiental se ha quebrado.

Los cultivos siguen siendo dañados por malezas, insectos y patógenos, generando pérdidas que se estiman en 13 – 20% de la producción mundial. En países desarrollados las pérdidas por pestes son de aproximadamente 25% en tanto que en países subdesarrollados éstas llegan al 40%.

Tradicionalmente para controlar enfermedades se han utilizado prácticas agrícolas sanitarias además de agentes químicos. No obstante la agricultura moderna se ha vuelto cada vez más dependiente de los pesticidas químicos para evitar pérdidas económicas. Esto ha significado

problemas de contaminación ambiental, alteración de la ecología y problemas de residuos en la cadena alimenticia.

Hoy en día existe una creciente tendencia a preservar el medio ambiente y control ecológico ha tomado cada vez más fuerza y el desarrollo de nuevos productos ha obligado a la comunidad científica a buscar alternativas como la búsqueda de compuestos menos tóxicos y de mayor rapidez de degradación.

Una alternativa que tuvo sus inicios alrededor de 1920 es el “control biológico”, utilizando microorganismos que puedan controlar patógenos en cultivos de interés económico.

Dentro de los factores que limitan la producción de papa, las enfermedades juegan un papel muy importante. En algunos casos, hace necesaria la aplicación de fungicidas para obtener una buena producción. En otros casos, como lo son las enfermedades del suelo, como la “maya”, el pie negro, la sarna y la roña, las medidas a tomar son básicamente preventivas como por ejemplo, la utilización de semilla producida en campos libres de la enfermedad y la siembra en terrenos que no hayan presentado síntomas de la enfermedad a prevenir.

Las enfermedades que revisten mayor importancia económica en la producción de papa son las enfermedades fungosas del suelo producidas por *Rhizoctonia solani*, este hongo afecta a la mayoría de los cultivos y está presente en todas las áreas productoras de papa, favoreciéndose más su desarrollo en los suelos húmedos y fríos esta enfermedad es denominada “costra negra de la papa”, que se caracteriza por la presencia de esclerocios en la superficie de los tubérculos afectados y cancro en el tallo (por las lesiones necróticas en los tallos), es una enfermedad que está presente en todas las zonas productoras de papa del mundo (Frank, 1981).

La enfermedad afecta la calidad culinaria y sanitaria de los tubérculos y desarrolla cuando las condiciones ambientales son favorables, constituyéndose en un serio problema y su control con fungicidas químicos es difícil.

En nuestro país en general se combaten a los hongos fitopatógenos utilizando productos agroquímicos sintéticos, a veces en cantidad desmesurada, que conduce a una acumulación de residuos químicos en plantas, tierra y agua hasta alcanzar niveles tóxicos para la salud humana y animal.

Además los pesticidas no permiten un control efectivo de muchas enfermedades producidas por fitopatógenos del suelo como es el caso de *R. solani*.

La utilización de microorganismos antagonistas o enmiendas orgánicas es una alternativa para mejorar la nutrición y resistencia de las plantas así como disminuir la incidencia de las enfermedades.

Muchos hongos compiten exitosamente como antagonistas o parásitos y el hombre ha empleado este conocimiento para el control de algunos fitopatógenos. Desde la década de 1950, los fitopatólogos han comprendido la potencialidad de los hongos para el biocontrol de enfermedades de las plantas, tanto solas como en combinación con los fungicidas. Muchas investigaciones han pasado desde una etapa experimental a una aplicación comercial en la última década (FAO, 1986). Este tipo de control que utiliza microorganismos antagonistas constituye un método más de control de enfermedades en plantas. Dentro de los microorganismos que se utilizan actualmente para el control biológico, destacan las especies de hongos del género *Trichoderma* (ejemplo: *T. harzianum* y *T. viride*) para el control de varias enfermedades causadas por fitopatógenos, su modo de acción consiste en consumir nutrientes disponibles y secretados por los tejidos de la planta, ejerce una acción de competencia por nutrientes y espacio.

Knight et al. (1977) indica que en la década de los sesenta, se presentaron ya algunos casos de resistencia de patógenos a fungicidas. En 1988 Eckert identificó más de sesenta géneros de hongos que habían presentado resistencia a más de doce grupos de fungicidas entre los cuales figuran: Benzimidazoles, Fenilamidas, y Dicarboximidas.

Es así que el presente trabajo de investigación, bajo los lineamientos de la biotecnología microbiana como ciencia, propone una solución alternativa, basada en la utilización de microorganismos que posean acción antimicrobiana contra *Rhizoctonia solani*, que a diferencia de la utilización de productos químicos no representan un peligro de toxicidad para el medio ambiente, así se constituirían en un recurso de control mucho más económico y una alternativa ecológica más favorable, además que estos agentes biológicos son selectivos y no dañan los cultivos infectados.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GENERALES

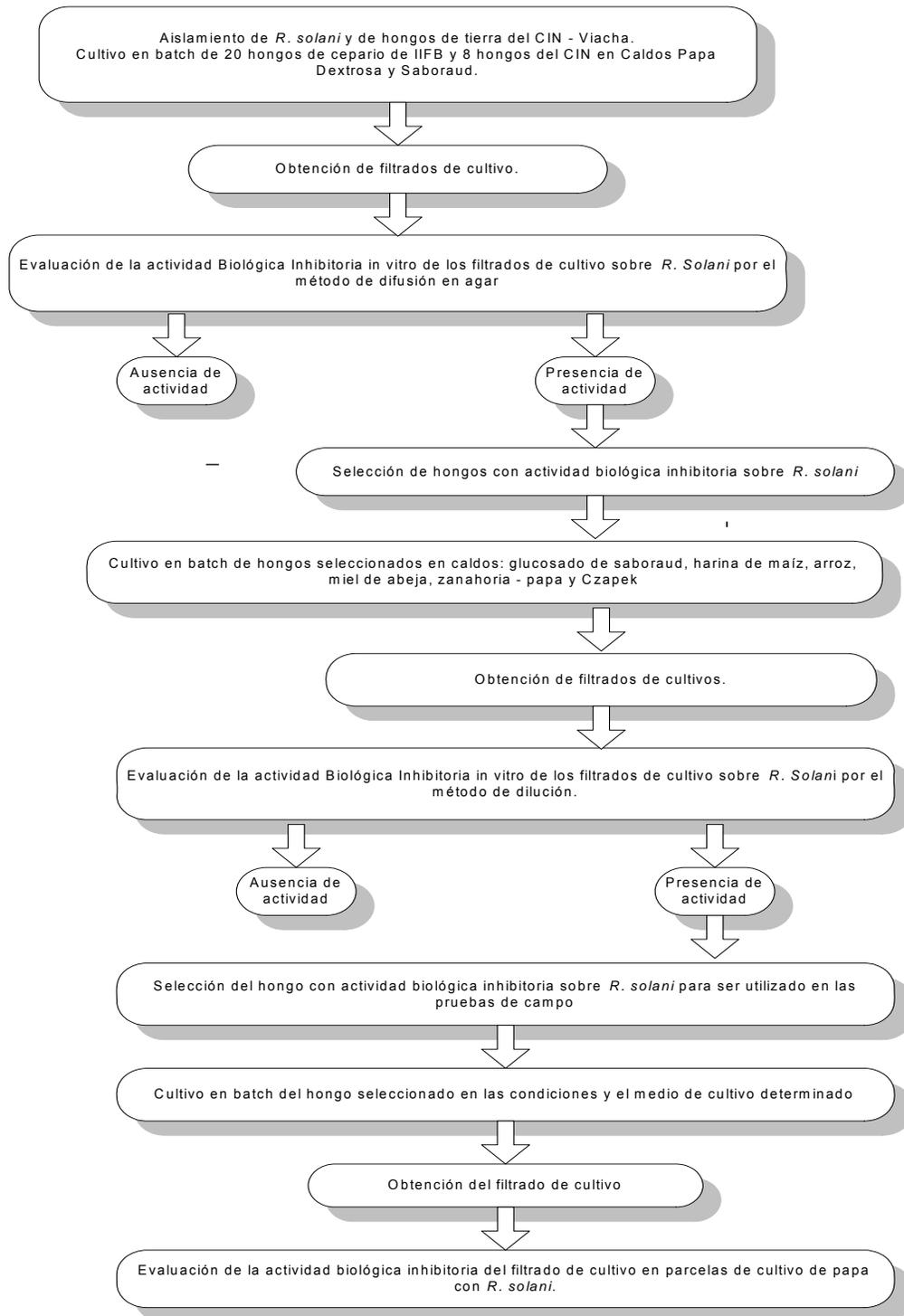
1. Evaluar la actividad biológica inhibitoria de filtrados de cultivo de hongos de tierra sobre *Rhizoctonia solani*.
2. Evaluar la efectividad del filtrado de cultivo seleccionado por su actividad biológica inhibitoria in vitro sobre *Rhizoctonia solani*, en parcelas de cultivo de papa.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Aislar *Rhizoctonia solani* a partir de tierra y plantas de papa enfermas y determinar su cinética de crecimiento.
2. Aislar hongos provenientes de tierra destinada al cultivo de papa del CIN de la localidad de Viacha del departamento de La Paz.
3. Obtener filtrados de cultivo de hongos del cepario del IIFB y del CIN, a partir de su cultivo en batch en condiciones de agitación y estacionarias.
4. Evaluar la actividad biológica inhibitoria in vitro de los filtrados de cultivo sobre *R. solani*.
5. Seleccionar hongos cuyo cultivo produjo filtrados con actividad biológica inhibitoria in vitro sobre *R. solani*.
6. Obtener filtrados de cultivo de los hongos seleccionados, utilizando diferentes medios de cultivo líquidos: Glucosado de Saboraud, Harina de Maíz, Arroz, Miel de Abeja, Zanahoria Papa y Czapek, en condiciones de agitación y estacionarias.
7. Seleccionar un hongo y las condiciones de su cultivo para obtener el filtrado con actividad biológica inhibitoria in vitro sobre *R. solani* para su aplicación en los estudios de campo.
8. Evaluar la actividad biológica inhibitoria del filtrado de cultivo del hongo seleccionado incubado en las condiciones ya determinadas.

3. DISEÑO TEORICO

3.1 Modelo Teórico



3. 2 Marco Teórico

3.2.1 El Control Biológico

3.2.1.1 Definición

Baker y Cook definen el control biológico como la reducción del inoculo o de la actividad del patógeno ejercido por uno o más microorganismos en forma natural, a través del manejo del ambiente, del hospedero o del antagonista o por la introducción de uno o más antagonistas. Señalan además que el control biológico rara vez erradica al patógeno, pero sí reduce su población o su capacidad patogénica. Actualmente existen productos comerciales formulados en base a microorganismos.

La estabilidad ecológica inherente a los ecosistemas naturales y su autorregulación característica, se pierden cuando el hombre modifica las comunidades naturales a través de la ruptura del frágil tejido de interacciones a nivel de comunidades. De todas formas, esta ruptura puede ser reparada restituyendo los elementos reguladores perdidos en la comunidad.

A través de la adición o el incremento de la biodiversidad que funcionan en los ecosistemas agrícolas. Una de las razones más importantes para restaurar y/o mantener la biodiversidad en la agricultura, es que presta una gran variedad de servicios ecológicos. Uno de estos servicios es la regulación de la abundancia de organismos indeseables a través de la predación, el parasitismo y la competencia (Altieri, 1994). Predadores, parásitos y patógenos actúan como agentes de control natural que bien manejados pueden regularla población de componentes indeseables o no aptos en un agroecosistema particular. Esta regulación se llama "control biológico" y DeBach (1964) la define como "la acción de parásitos, predadores o patógenos que mantiene la densidad de la población de un organismo plaga en un promedio menor del que ocurriría en su ausencia".

En un sentido amplio y según la definición de Cook y Baker el control biológico involucraría todas aquellas prácticas tendientes a disminuir la incidencia de indeseables microorganismos excluyendo el control químico. El control biológico en un sentido más restringido es el uso de microorganismos antagonistas que interfieren en la supervivencia de patógenos o en el desarrollo de actividades determinantes de enfermedad o en el control de plantas o malezas indeseables.

En la naturaleza existe una interacción continua entre los potenciales patógenos y sus antagonistas de forma tal que estos últimos contribuyen a que no haya enfermedad en la mayoría de los casos, es decir, el control biológico funciona naturalmente. En condiciones naturales los microorganismos están en un equilibrio dinámico en la superficie de las plantas.

3.2.1.2 Papel de los antagonistas

No es fácil determinar con precisión los mecanismos que intervienen en las interacciones entre los antagonistas y los patógenos sobre la planta o en las heridas. En general los antagonistas no tienen un único modo de acción y la multiplicidad de modos de acción es una característica a seleccionar en un antagonista. Esto se debe a que los riesgos de seleccionar en un antagonista, esto se debe a que los riesgos de seleccionar al patógeno por resistencia al antagonista se reducen al actuar éste último por varios mecanismos. El riesgo de resistencia se reduce también mediante el uso de combinaciones de antagonistas de diferente modo de acción.

3.2.1.3. Los Hongos como agentes de biocontrol

Ya en los años 30 Wiending demostró que especies de *Trichoderma* podían parasitar y producir antibióticos contra *Rhizoctonia solani* y sugirió que los hongos saprófitos podrían ser utilizados para el control de los patógenos en condiciones de campo. Desde estos estudios las especies el género *Trichoderma* es el más ampliamente investigado de todos los fungicidas potenciales.

Aunque los hongos con frecuencia son perjudiciales para la economía humana, sus actividades beneficiosas sobrepasan con mucho su impacto negativo. Un área de la biotecnología agrícola en la cual los hongos muestran un potencial considerable es el control biológico de hongos patógenos, insectos y malas hierbas, proporcionando una alternativa a los pesticidas químicos. Puesto que todas las plagas tienen antagonistas naturales, el control biológico debería ser relativamente directo.

Ejemplos de agentes de biocontrol usados comercialmente o en condiciones casi comerciales contra patógenos que se reproducen en el suelo o que infectan las raíces

Agente de control	Enfermedad	Cosecha
<i>Phlebia gigantea</i>	Podredumbre de raíces por Heterobasidióon	Pino
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	Agallas de corona	Rosas, otros
<i>Trichoderma harzianum</i>	Podredumbre blanca	Cebolla
<i>Bacillus subtilis</i>	Podredumbre del tallo	Clavel
<i>Sporidesmium sclerotivorum</i>	Caída de la lechuga	Lechuga
<i>Gaeumannomyces graminis</i>	Marchitamiento de cereales	Trigo
<i>Talaromyces flavus</i>	Marchitamiento por <i>Verticillium</i>	Berenjena

Los hongos poseen un conjunto de características que los hacen agentes de biocontrol potencialmente ideales, debido a que:

- Muchas especies saprófitas antagonizan representantes de todos los organismos patógenos de plantas.
- Los hongos pueden desarrollarse rápidamente en medios de cultivo de forma que pueden ser producidas económicamente grandes cantidades para ser liberados principalmente como esporas o fragmentos de micelio en el medio ambiente. Estos inoculantes germinan o crecen para producir micelio activo que puede parasitar y por otra parte inhibir la plaga sin dañar a los organismos no diana.

El mantenimiento de un inoculo suficientemente grande tiende a limitar la efectividad de los agentes de biocontrol en los suelos, por el contrario tal inoculo efectivo es más fácil de conseguir en la horticultura práctica donde las condiciones del ambiente son más fáciles de controlar.

Las esporas de especies de *Trichoderma* pueden ser fácilmente producidas en laboratorio.

También han sido evaluados con fines de biocontrol los hongos parasitarios como agentes que actúan sobre otros hongos. *Trichoderma* puede ser utilizado para este propósito, aunque la producción de antibióticos, por ejemplo gliotoxina, también parece estar implicada en hacer que los miembros de este género tengan éxito como agentes de biocontrol. Especies de *Gliocladium* también producen gliotoxinas y pueden ser utilizados para proteger a las plantas contra especies patógenas de *Fusarium*, *Verticillium* y *Diplodia*. Una auténtico control empleando micoparasitismo puede conseguirse utilizando *Pythium nunn*, que ataca miembros patógenos del mismo género como *Pythium ultimum*, se enrolla y lo lisa, cuando ataca a *Rhizoctonia solani*, sin embargo forma estructuras a modo de pinzas, las cuales parasitan las hifas del patógeno. Otro ejemplo de biocontrol con éxito de hongos patógenos por hongos parasíticos es proporcionado por el uso de *Coniothyrium minitans* para controlar *Sclerotinia sclerotiorum*. Otro ejemplo en el cual un hongo saprófito ha sido utilizado para controlar un patógeno es proporcionado por el sistema lechuga – *Sclerotinia minor* – *Sporidesmium sclerotivorum*, la lechuga es el huésped del patógeno *Sclerotinia minor* y todos los tipos y cultivos son susceptibles a su infección, el antagonista *Sporidesmium sclerotivorum* aislado del suelo puede utilizar una serie de sustratos de carbono y sus esporas pueden ser producidas en grandes cantidades; son agentes de biocontrol casi perfectos. En la naturaleza actúa como un parásito obligado de los esclerotios de las especies *Sclerotinia* y de *Botrytis cinerea*. Las esporas del hongo germinan en respuesta a la presencia de esclerotios y entonces los tubos germinativos penetran y matan el esclerotio. La infección da lugar a un aumento de actividad glucanasa en el patógeno de forma que su matriz intracelular, que consiste mayoritariamente de glucano se degrada. También se produce glucosa y esto soporta el

crecimiento de *Sporidesmium sclerotivorum*, a partir de este alimento base el agente de biocontrol puede crecer e infectar otros esclerotios.

3.2.1.4. Acción biorreguladora

Se han descrito varios mecanismos de acción de los antagonistas para controlar el desarrollo de patógenos. Ellos son: antibiosis, competencia por espacio o por nutrientes, interacciones directas con el patógeno (micoparasitismo, lisis enzimática) e inducción de resistencia.

- Competencia

Un importante y posible mecanismo de acción antagónica es la competencia. Se puede definir competencia como el desigual comportamiento de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, siempre y cuando la utilización del mismo por uno de los organismos reduzca la cantidad disponible para los demás. Un factor esencial para que exista competencia es que haya “escasez” de un elemento, si hay exceso ni hay competencia.

- Competencia y nutrientes

La competencia más común es por nutrientes, oxígeno o espacio. *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum* son dos hongos de postcosecha típicamente dependientes de los nutrientes. Son hongos necrotróficos y sus esporas requieren de nutrientes exógenos para poder germinar y comenzar el crecimiento de las hifas antes de penetrar al sustrato. Estos nutrientes los encuentran en las heridas de las frutas y es allí donde la competencia microbiana actúa inhibiendo el desarrollo de estos hongos.

Droby y colaboradores en 1987 por ejemplo, estudiaron el mecanismo de antagonismo de una cepa de *Pichia guillermondii* cuando se aplica sobre heridas de pomelos para controlar el ataque por *Penicillium digitatum*, en dicho trabajo concluyen que la competencia por nutrientes es uno de los mecanismos mediante los cuales se logra un efectivo control del patógeno en las heridas (Droby et al. 1987)

- Competencia y espacio

La competencia por espacio también ha sido reportada: Wilson y colaboradores en 1996 mencionan que las levaduras son efectivas colonizadoras de la superficie de plantas y destaca la

producción de materiales extracelulares (en especial polisacáridos) que restringen el espacio para la colonización por otros microorganismos.

- Interacción directa con el patógeno

Existen dos tipos de interacciones directas entre los antagonistas y los patógenos. Ellas son el parasitismo y la predación.

- Parasitismo

El término parasitismo se refiere al hecho de que un microorganismo parasite a otro. Puede ser definido como una simbiosis antagónica entre organismo. El parasitismo consiste en la utilización del patógeno como alimento por su antagonista. Generalmente se ven implicadas enzimas extracelulares tales como: quitinasas, celulasas, Beta 1,3 glucanasas y proteasas que rompen las estructuras de los hongos parasitados. Los ejemplos más conocidos de hongos hiperparásitos son *Trichoderma* y *Gliocladium*. Ambos ejercen su acción mediante varios mecanismos entre los que juega un rol importante el parasitismo. Hongos del género *Trichoderma* han sido muy estudiados como antagonistas de patógenos de suelos como *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Sclerotium cepivorum* y existen varias formulaciones comerciales desarrolladas a partir de ellos.

- Predación

En el caso de la predación el antagonista se alimenta de materia orgánica entre la cual ocasionalmente se encuentra el patógeno.

El uso de los hongos como agentes de biocontrol de plagas es atractivo debido a que proporciona una alternativa a los pesticidas químicos.

Puesto que todas las plagas tienen antagonistas naturales, el control biológico debería ser relativamente directo. Los hongos poseen un conjunto de características que los hacen agentes de biocontrol potencialmente ideales:

1. Muchas especies saprófitas antagonizan representantes de todos los organismos de las plagas, incluyendo los organismos patógenos de plantas.
2. Los hongos pueden desarrollarse fácilmente en medios de cultivo de forma que pueden ser producidas económicamente grandes cantidades para ser liberadas como esporas o como

fragmentos de micelio en el medio ambiente. Estos inoculantes germinan para producir micelio activo que puede parasitar y por otra parte inhibir la plaga sin dañar a los organismos no diana.

Ya en los años 30 Wiending demostró que especies de *Trichoderma* podían parasitar y producir antibióticos contra *Rhizoctonia solani*, el hongo patógeno de las raíces. Las esporas de *Trichoderma* pueden ser fácil y económicamente producidas en el laboratorio.

3.2.1.5. El Control Biológico en Bolivia

En Bolivia ya se cuenta con productos para el control biológico que ya han sido probados y que se constituyen en una verdadera opción para el agricultor pequeño, mediano y grande. La empresa Probioma investiga, produce, transfiere y capacita el uso de bioreguladores para el control biológico de las plagas agrícolas. Los biorreguladores son microorganismos presentes en el medio natural que permiten el control de las plagas agrícolas. En esa dirección, la producción de soya actualmente está incorporando en el tratamiento de semilla el uso de biorreguladores producidos en Santa Cruz. El Tricodamp, un hongo micoparásito, es ideal en el tratamiento preventivo para proteger la semilla del ataque de hongos. En Santa Cruz alrededor de 200 toneladas de semilla han sido protegidas biológicamente contra enfermedades.

3.2.2. La Papa

3.2.2.1. Origen e importancia

El Contador de Mercedes del emperador Carlos V, Agustín de Zárate, menciona por primera vez la papa en su escrito “Historia del descubrimiento y conquista del Perú”, al igual que el jesuita Acosta en su “Historia Natural y Moral de las Indias”, el inca Garcilaso de la Vega menciona también la papa y el chuño en sus “Comentarios Reales” (Lisboa 1609).

El Padre Cobo dio una información amplia sobre el Alto Perú, dice en su “Historia del Nuevo Mundo” escrita en 1653 de la papa: “ en toda la sierra y tierra fría del Perú donde no se coge maíz ni las demás semillas y legumbres que se dan en tierras templadas son las cementeras ordinarias que hacen los indios de unas raíces llamadas papas”.

Otro dato nos suministra el cirujano Martín Delgar en sus manuscritos sobre la “Virtud de las hierbas del Perú” referente a la papa es: papas llaman los naturales a unas raíces que son como turmas de tierra, aunque es sustancia mas blanca y densa, comida ordinaria de toda la gente del Perú y que desde el año 1662 se introdujo en Madrid. La papa fue introducida en España en 1565, siendo nuestro país el centro de expansión del tubérculo a toda Europa. El gran incremento del cultivo fue a principios del siglo XIX.

Todos los documentos que acabamos de ver nos muestran que la papa es originaria de Bolivia, de donde se ha esparcido al resto del mundo. La papa ha sido introducida en el resto de Europa el siglo XVI. Hallazgos arqueológicos en Perú de hace 8000 años atrás indican el uso de la papa por pueblos aborígenes. En Monte Verde, sur de Chile, hallazgos de 12000 años atrás indican el consumo de la papa por pueblos ancestrales.

La papa habría sido llevada a Europa en el siglo XVI, datos indicados por Hawkes (1992) la señalan en cultivo en España alrededor de 1570 y se la indica como proveniente de Perú, vía Cartagena de las Indias a España. Bukasov (1933) informa que la antigua papa europea tiene su origen en la papa del sur de Chile (chiloé) por su morfología y respuesta fitoperiódica.

Diversos investigadores han opinado y aun discuten sobre el origen de la antigua papa europea sin embargo las variedades generadas alrededor de 1850 hacia delante, en Europa y Norteamérica tienen fuerte influencia de variedades nativas de Chile.

En la actualidad la papa es consumida en casi todos los pueblos del mundo y es junto al trigo, maíz y arroz uno de los cuatro cultivos básicos en la alimentación humana.

Antecedentes mundiales de 1991- 1993 señalan que 275.4 millones de toneladas se produjeron en 18.13 millones de hectáreas, con un rendimiento promedio de 15 T/ ha.

La Federación Rusa, China, Polonia e India presentaron superficies entre 3.3 y 10 millones de hectáreas. Sus rendimientos fluctuaron entre 11 y 17 T/ha.

Los países con mayores rendimientos en orden decreciente son los Países Bajos con 42 T/ha, EEUU con 36 T/ha, Alemania con 33T/ha. La década del 90 se caracteriza por una disminución de la papa fresca y un sostenido aumento de demanda de productos procesados (papas fritas, papas en hojuelas, papas prepeladas envasadas, etc.). La papa destinada al consumo animal, en esta misma década ha disminuido por desplazamiento de la explotación agrícola familiar hacia la producción de mayor escala y especialización. Elevados costos de procesamiento de la papa y precios más competitivos de los cereales.

En cuanto al uso de la papa - semilla, la tendencia de todas las áreas productoras del mundo es economizar al máximo su uso, debido a que este insumo es el más oneroso de la producción. Dentro de estas tendencias está el plantar parte del tubérculo y no la totalidad de este, la mejor calidad del producto y el crecimiento del uso de la semilla sexual.

El comercio internacional indica, para este periodo una importación mundial de 7 millones de toneladas y una exportación de 7.5 millones de toneladas. En América Latina se importaron 297 mil toneladas y se exportaron 74 mil toneladas. El valor de importación fue de US\$120 millones.

3.2.2.2. Importancia del cultivo de papa en Bolivia

Soria y Bestra (1992) indican que el cultivo de papa es el alimento básico en Bolivia, el consumo promedio fluctúa entre 80 y 100 Kg/persona/año. Según la Secretaría Nacional de Agricultura (1996), la superficie destinada al cultivo de papa es de aproximadamente 125481 ha que representa el 10% de la superficie nacional cultivada, la mayor concentración se halla en el altiplano y valles interandinos por encima de los 2500 m.s.n.m. seis de los nueve departamentos de Bolivia (La Paz, Cochabamba, Potosí, Oruro, Chuquisaca y Tarija). El Programa de Investigación de la Papa (1992) da a conocer que cerca del 70% de la producción se consume en estado fresco, 10% en forma de chuño (papa deshidratada) y el 20% se destina para semilla.

3.2.2.3 Taxonomía y características de la planta

La papa pertenece a:

- División:	<i>Angiospermas</i>
- Clase:	<i>Cotiledóneas</i>
- Subclase:	<i>Metaclamídeas</i>
- Orden:	<i>Tubiflorales</i>
- Familia:	<i>Solanaceae</i>
- Género:	<i>Solanum</i>
- Sección:	<i>Petota</i>
- Serie:	<i>Tuberosa</i>
- Especie:	<i>Tuberosum</i>

El cultivo de la planta de papa se halla extendido por todo el mundo a excepción de los países tropicales. La papa es americana y su distribución es desde el sur del cañón de Colorado en Estados Unidos de Norteamérica pasando por todos los países con cordillera andina.

La mayor variabilidad genética de especies se concentra en el área de la meseta peruano-boliviana y de las 183 especies de este género el 74.3% es diploide, el 3.8% es triploide, el 14.8% es tetraploide, el 1.6% es pentaploide y el 5.5% es hexaploide.

La papa es planta herbácea anual. Sus raíces son muy ramificadas, finas y largas, dependiendo su desarrollo de que el suelo esté o no mullido. La papa es una planta dicotiledónea, pero puede ser considerada como perene potencial debido a su capacidad de reproducirse vegetativamente por medio de tubérculos.

Esta planta está compuesta por una parte que crece sobre el suelo, en el que destacan tallos, hojas, flores y frutos. La otra que crece subterráneamente corresponde a papa madre (tubérculo - semilla), estolones, tubérculos y raíces.

El fruto de la papa es una baya de forma redonda alargada, cortiforme ovalado o cónico, este puede contener desde ninguna a 300 o 400 amarillas o castaño amarillentas, pequeñas ovales y uniformes, de estas se pueden generar nuevas variedades vía selección.

Las plantas nacidas de semilla y de tubérculo no son idénticas. De la semilla nace una plántula con una raíz principal y dos o aún tres cotiledones. La planta originada de un tubérculo es un clon, no tiene raíz principal ni cotiledones ya que nace de una yema. Las raíces de un clon, son por tanto adventicias y estas nacen en grupos de tres a cuatro de los nudos de los estolones.

- Tubérculos y estolones

Morfológicamente el tubérculo es un tallo subterráneo acortado engrosado y provisto de yemas u ojos en las axilas de sus hojas escamosas. En cada ojo existe normalmente 3 yemas aunque en ocasiones pueden ser más. Una yema es en consecuencia una rama lateral del tallo subterráneo con entrenudos no desarrollados y todo el tubérculo un sistema morfológico ramificado y no una simple rama.

Los ojos se concentran con mayor frecuencia hacia el extremo distal (corona o roseta) siendo a la vez más profundos en esta región.

Las yemas de esta región normalmente se desarrollan primero. Cuando la yema apical es removida o muerta, otras yemas son estimuladas a desarrollar. Cada ojo es capaz de producir un infinito número de brotes, dependiendo del tamaño del tubérculo y de la reserva de hidratos de carbono.

- Tallo

El tallo, grueso, fuerte, anguloso, con una altura que varía entre 0,5 y 1 m, se origina en las yemas del tubérculo.

A la vez que tallos aéreos, la planta tiene tallos subterráneos. Los primeros son de color verde. Contienen un alcaloide tóxico, la solanina, que puede formarse también en los tubérculos cuando éstos se exponen prolongadamente a la luz. Los tallos subterráneos o estolones, relativamente cortos, se convierten en su extremidad en tubérculos.

- Hojas

Las hojas son imparipinadas, consta de nueve o más folíolos, cuyo tamaño es tanto mayor cuanto más alejados se encuentran del nudo de inserción.

- Fruto

El fruto es una baya redondeada de color verde, que se vuelve amarilla al madurar.

3.2.2.4. Ecofisiología de la producción de papa

La parte aérea de la planta de papa desarrolla el proceso fotosíntesis - respiración, necesario para formar hidratos de carbono que serán transportados a zonas de crecimiento aéreo (follaje, brotes, flores y fruto) y subterráneo (raíces, estolones y tubérculos).

Para que este proceso se efectúe en forma óptima, se requiere de luz, temperatura, humedad y nutrientes los que deben estar en el medio donde la planta se desarrolle. La asimilación neta es calculada por la sustracción de los hidratos de carbono usados en la respiración de los hidratos de carbono producidos en la fotosíntesis.

Aunque la papa puede multiplicarse por semillas y por esquejes, en la práctica, la multiplicación es siempre vegetativa, haciéndose por medio de los tubérculos que producen brotes en las yemas u ojos. La germinación de la papa, su crecimiento y la producción de tubérculos depende de sustancias químicas elaboradas por la papa, que actúan en dosis muy débiles. Se les conoce con el nombre de "sustancias de tuberización".

La formación de sustancias de tuberización por hojas y tallos depende de la variedad y, también, de la temperatura y de la duración de la luz diaria (fotoperiodo). En días cortos se producen más sustancias de tuberización que en días largos, en los cuales aumenta el crecimiento vegetativo de la planta.

En determinadas circunstancias en que hay tuberización y crecimiento, puede ocurrir que, porque existan condiciones meteorológicas favorables, porque se abone con un exceso de fertilizantes nitrogenados u otra circunstancia, la planta puede crecer más deprisa que se produce la sustancia de tuberización, cayendo entonces la concentración de ésta por debajo del nivel mínimo y deteniéndose la tuberización. Cuando se elabora más sustancia de tuberización, vuelve a retrasarse el crecimiento y aparece nuevamente la tuberización, estamos entonces en el caso de "rebrote".

Se ha demostrado que el vigor del crecimiento de la planta está estrechamente unido al de los brotes de los cuales proceden. Por eso tiene gran interés plantar tubérculos cuyos brotes han alcanzado una fase de crecimiento activo, obteniéndose entonces una nascencia rápida y vigorosa.

Si los tubérculos se encuentran en una fase de crecimiento lento, entonces, no nace generalmente más que un solo brote en el ápice del tubérculo (dominancia apical).

3.2.2.5 Exigencias del cultivo de papa

La papa es planta que requiere humedad abundante y regular, vegeta bien donde hay temperaturas templadas y humedad ambiente. Sufre con las temperaturas excesivas y es particularmente sensible a la sequía. Sin embargo, la humedad, del aire favorece los ataques de mildiu, por lo que debe tenerse en cuenta esta circunstancia. En periodo de intensa tuberización puede necesitar hasta 80 metros cúbicos de agua por hectárea por día.

Se huela a temperaturas inferiores a -2°C . El crecimiento de los brotes empieza a los 2°C y es máximo entre 20 y 25°C .

Aunque es muy exigente en agua, un exceso de ésta produce disminución de su riqueza en fécula y favorece el desarrollo de enfermedades, tales como el mildiu y podredumbre.

En cuanto a suelos, la papa prefiere tierras mullidas y aireadas. Son mejores los suelos arenosos que los arcillosos. Vegeta mejor entre valores de pH comprendidos entre 5,5 y 7, condiciones que suelen darse más en los terrenos arenosos. Es planta que tolera una fuerte acidez ($\text{pH}=5$).

Puede vegetar también en terrenos arcillo - calizos, llegando a tolerar un pH igual e incluso superior a 8. En suelos calizos es donde son más frecuentes los ataques de sarna. Son indicados los suelos ricos en humus o materia orgánica; en cambio, son malos los suelos fuertes y compactos.

- Abonado

La papa responde muy bien a las aportaciones orgánicas. Por otra parte, un estercolado mejora las condiciones físicas del suelo, lo que beneficia el desarrollo del tubérculo. El estiércol debe ser incorporado algún tiempo antes de la siembra para que no favorezca el desarrollo de las enfermedades, sobre todo la sarna. Cuando no se haya estercolado previamente, y para una producción de 30.000 kg, un buen abonado puede ser, por hectárea cultivada, de 150 unidades de N, 100 unidades de P_2O_5 y 300 unidades de K_2O . Estas cantidades pueden disminuir sensiblemente, si se cultiva después de una leguminosa, si existían cantidades en el suelo de materia orgánica, fósforo o potasio, etc.

Como ya sabemos, las funciones del ácido fosfórico en la planta son: adelantar la madurez, aumentar la riqueza en fécula de la papa y favorecer el desarrollo radicular. En cambio, el potasio, favorece la formación de azúcares, la asimilación clorofílica y facilita la migración de la fécula de los órganos verdes a los tubérculos.

Se puede hacer una enmienda de cal, pues ésta favorece el desarrollo de la papa, pero esta enmienda debe hacerse 1 ó 2 años antes de la siembra pues si se hace antes puede producir sarna común.

Algunas veces la papa acusa la carencia de magnesio, aunque normalmente los estiércoles suelen contener este elemento. Hay que tener cuidado con los abonos cuantiosos de potasio, pues bloquean al magnesio. Los abonos conviene que lleven azufre, pues la papa es bastante exigente en este elemento; así, abonaremos principalmente con superfosfatos, sulfatos, etc.

- Elección y preparación del terreno

La papa requiere un terreno bastante mullido, así que las labores preparatorias del terreno serán en profundidad, y de tal manera que el terreno quede muy fino.

Se recomienda hacer estercolado previo y que éste sea muy hecho. La dosis óptima se encuentra entre 25-30 tm de estiércol por hectárea. Si se sobrepasase esta cifra se obtendría un desarrollo de vegetación exagerado (no deseado) y una reducción de la tuberización.

El agricultor para sembrar, puede elegir entre hacerlo con las papas más pequeñas de la campaña anterior, o adquirir papas de siembra, que son las que están declaradas aptas por el Ministerio de Agricultura y están controladas por la Subdirección General de semillas.

Estas papas están etiquetadas y precintadas y en ellas se han reconocido las condiciones de sanidad (libres de virus), vigor vegetativo y pureza.

La dosis adecuada de semilla utilizada en la plantación varía entre los 2.000 y los 2.500 Kg por ha. Cada papa, o trozo de la misma debe tener un mínimo de dos yemas. Se trata de conseguir una densidad de plantas de 55.000 a 65.000 plantas/ha. Se pueden poner dos tipos de marcos para esta densidad de plantación: 75 cm x 25 cm ó 80 cm x 20 cm.

La profundidad de la plantación puede ir desde los 5 a los 15 cm, dependiendo del tipo de suelo, aunque lo más normal es que se ponga a una profundidad de unos 7-8 cm; después de nacida se irán haciendo aporcados sucesivos.

La siembra se puede hacer a mano (ya en desuso), con el arado (haciendo la siembra cada dos surcos, aunque cada vez se utilizan más las máquinas sembradoras que pueden ser arrastradas por el tractor o ir suspendidas. Después de la siembra, es conveniente hacer un rulado para aplastar la tierra alrededor de la simiente.

3.2.2.6. Enfermedades y plagas de la papa

Existe una multiplicidad de enfermedades que atacan al cultivo de papa, patógenos que por lo general están presentes en el suelo o pueden ser portados por el tubérculo - semilla no sano.

Los agentes patógenos se multiplicarán a medida que el huésped sea abundante, en la medida que un suelo esté siendo utilizado como monocultivo o se use papa - semilla de mala calidad, se aumentará el inóculo en el suelo y también las pérdidas por baja del rendimiento.

Una regla general y útil es de usar papa - semilla comprobadamente sana (certificada) y rotación de cultivo.

La alta temperatura y riego favorecen el desarrollo de vectores y enfermedades, por lo cual los controles químicos deben ser más intensos. La sanidad del cultivo es importante para obtener un producto de alta calidad. Reconocer el tipo de enfermedades que atacan los cultivos es una necesidad para conseguir la protección adecuada y la calidad sanitaria.

Los síntomas las enfermedades y el diagnóstico preciso requiere de métodos de identificación en laboratorio. Sin embargo se pueden dividir estos síntomas en pudriciones secas y húmedas, ambas provocadas por hongos o bacterias, enanismos, encarrujamientos clorosis, decoloraciones, las que pueden constituir una sintomatología de virosis.

- Hongos

Los hongos producen pudriciones secas en la planta y el tubérculo y la pueden matar, dentro de estas se tiene:

- Tizón tardío

Enfermedad provocada por el hongo *Phytophthora infestans* y se desarrolla rápidamente cuanto existe temperaturas bajas y mucha humedad.

Los síntomas son mancha pequeñas color verde claro a oscuro de forma irregular, las lesiones progresan convirtiéndose en lesiones necróticas grandes de color castaño o negro hasta finalmente matar a la planta. Bajo condiciones de humedad se desarrolla una esporulación blanca, especialmente en el envés de las hojas, en la cara puede haber un anillo clorótico. Las plantas afectadas tienen un olor característico. Los tubérculos afectados presentan áreas irregulares hundidas, donde la piel toma un color castaño a rojizo. Hacia el interior dependiendo del grado de ataque, se presenta pudrición granular seca de color castaño.

Esta enfermedad es de carácter destructivo, es favorecido por temperaturas de 15-20°C así como por periodos largos de humedad sobre el follaje. Las fuentes de infección de nuevas plantas ocurre por: tubérculo - semilla, cultivos enfermos de papa vecinos y otras plantas hospederos.

Se previene evitando la época de lluvias, usando tubérculo - semilla sano, destruyendo las fuentes del inóculo, plantando en época adecuada, entierro profundo de desechos de papa y follaje enfermo, usando variedades resistentes, aplicar fungicidas a tiempo.

- Tizón temprano

Enfermedad provocada por *Alternaria solani* el cual desarrolla en alta temperatura y humedad. Los síntomas son: aparición de manchas necróticas en las hojas de color marrón a negro de diferentes tamaños y con anillos concéntricos característicos, en los tubérculos las lesiones son oscuras, hundidas de forma circular e irregular, las lesiones pueden aumentar de tamaño durante el almacenaje. Es de distribución mundial y se propaga por cultivos vecinos enfermos. Se previene

favoreciendo el desarrollo de plantas vigorosas, rotación de cultivos, control con fungicidas, dejar madurar los tubérculos antes de extraerlos del suelo y evitar su manipuleo antes de la plantación.

- Costra negra

Enfermedad provocada por *Rhizoctonia solani*, cuyas características se mencionan posteriormente en la revisión sobre este hongo

- Fusariosis

Enfermedad típica de papas almacenadas provocada por *Fusarium sp.* Las papas presentan un moho algodonoso y ligeramente rosado. Este hongo desarrolla muy bien de 15-20°C y con humedad ambiente superior al 70%. Los síntomas: a nivel de una herida aparece una zona deprimida más oscura, la piel del tubérculo se agrieta y pliega en círculos concéntricos más o menos ondulados. Al cortar el tubérculo en dos presenta una pudrición negruzca junto a la formación de cavidades, el tubérculo se momifica y adquiere una textura granulosa, esta enfermedad se produce por lesiones, heridas o cortes al tubérculo. El control de la enfermedad se realiza evitando heridas en la papa, almacenar con ventilación.

- Sarna polvorienta

Causada por *Spongospora subterranea*, aunque desarrolla mejor en condiciones de clima frío y húmedo se la encuentra prácticamente en todo lugar donde se cultiva papa.

La infección se presenta con pústulas de color castaño purpúreo, que se extiende formando lesiones levantadas en forma de granitos.

- Gangrena

Causada por *Phoma exigua*. Causa problemas en clima húmedo y templado, donde se forman pequeñas depresiones oscuras en la superficie del tubérculo, que después se agrandan, los tejidos afectados se descomponen formando masas oscuras y cavidades que pueden contener un micelio de color gris. Para prevenir esta enfermedad de debe destruir tempranamente el follaje, cosecha de tubérculos maduros, almacenar inicialmente a 18°C.

- Mancha de la cáscara

Causado por *Polycystalum pustulans Syn Oospora pustulans*, cuando los tubérculos utilizados como semilla están afectados por esta enfermedad, se producen grandes fallas y retardo en la emergencia.

En los tubérculos almacenados se observan manchas individuales o en grupos, negro a púrpuras, ligeramente levantadas de 2 mm de diámetro, se previene con el uso de fungicidas adecuados.

- Sarna plateada

Producido por *Helminthosporium solani Syn Spondylocladium atrovirens*, los tubérculos afectados presentan un brillo plateado característico, si el área comprometida es extensa, el

tubérculo se deshidrata, se previene aplicando un buen drenaje, usar tubérculo – semilla sano, usar fungicida adecuado, cosechar tan pronto los tubérculos estén maduros.

- Carbón de la papa

Causado por *Angiosporum solani* *Syn* *Tecaphora solani*, los tubérculos afectados presentan en su superficie hinchamientos verrugosos, que al seccionarlos muestran lóculos castaño oscuro, las agallas que se forman, tienen la apariencia de tubérculos deformados y pueden estar localizados además en los brotes tallos y estolones. Una vez instalado en el planta el patógeno origina tumores, los que se desarrollan debido a la hipertrofia del floema externo y parénquima de tallos y estolones. El daño ocasionado o por esta enfermedad puede comprometer al 90% de la producción.

El patógeno se dispersa por el uso de papa - semilla contaminada por la enfermedad, por agua de riego y suelo infestado. El desarrollo de la enfermedad es favorecido por la presencia de alta humedad en el suelo, la alta salinidad incrementa la infección, igual que el monocultivo., el mejor método de prevenir es el uso de papa – semilla sana, uso de variedades resistentes, rotaciones largas , la erradicación debe aplicarse cuando los focos son pequeños, usando Bromuro de metilo, Basamid, Busan seguido de rotación larga.

- Bacterias

Las bacterias por lo general provocan pudriciones húmedas, provocando manchas difusas, extendiéndose a nivel de las yemas o talón de grietas más o menos profundas con una coloración oscura a nivel vascular y una textura gomosa de la pulpa. Frecuentemente hay un mucus blanquecino exudado por el tubérculo, que puede emitir un olor nauseabundo y al final se descompone totalmente.

Estas bacterias pueden pertenecer a varios géneros: *Phytophthora*, *Erwinia*, *Pseudomonas marginalis*, *Pseudomonas solanacearum*, *Corynebacterium*, *Clostridium*, *Bacillus*, etc. Otras bacterias no patogénicas (*Pseudomonas fluorescens*) pueden entrar igual a la licuación del tubérculo, sin embargo ellas están asociadas a la gangrena y fusariosis.

- Sarna común

Ocasionado por *Streptomyces scabies*, es clasificada como bacteria, su similitud con hongos se debe a su morfología, es un organismo aerobio, en medios de cultivo produce filamentos y melanina que es un pigmento, esta bacteria requiere alta temperatura y suelos secos. La enfermedad se previene usando técnicas sanitarias uso de papa – semilla sano, mantener el suelo húmedo rotación de cultivos y mantenimiento de un bajo pH, el tratamiento del suelo incluye fertilizantes sulfurados, aplicaciones de pentacloronitrobenzeno o urea formaldehído.

- Pié negro y pudrición blanca

Causado por *Erwinia caratovora* var. *Atroséptica*, también pueden ocasionarla *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Clostridium* sp., *Flavobacterium pectinovorum*, se ven favorecidas por una alta humedad y temperaturas entre 18 – 19°C. Los síntomas se caracterizan por una pudrición como de tinta negra, marchitez de hojas, pudrición de tallos, se previene tratando la papa – semilla con fungicidas y desinfectar el equipo usado para cortar el tubérculo – semilla, realizar plantaciones poco profundas.

- Marchitez bacteriana

Causado por *Pseudomonas solanacearum* (*Ralstonia*), el síntoma típico es la marchitez, enanismo y amarillamiento del follaje. La presencia de gotas de apariencia lechosa que exudan del xilema seccionado es otro signo de la enfermedad. Los tallos subterráneos, estolones y raíces de plantas con síntomas foliares leves alcanza rápidamente la marchitez a temperatura sobre los 25°C.

- Virus

Los virus provocan en la planta anomalías que no llevan a la muerte de la planta: encorramientos enanismo, decoloraciones, tubérculos más pequeños y deformes.

Como estos patógenos no matan a la planta la degeneran y hacen que su rendimiento sea menor y lo más grave es que cada tubérculo hijo transmite para siempre la enfermedad.

Existen muchos virus que tienen la denominación de letras por ejemplo PLRV significa Potato Leaf Roll Virus, que corresponde al virus del enrollamiento de la hoja, sin embargo en la legislación de certificación de papa – semilla se señalan como virus graves a: PVY, PVX, PLRV; virus leves: PVA, PVS. Los virus de papa pueden ser transmitidos de plantas infectadas a sanas por:

- Contacto o transferencia de jugo infectado
- Por semilla o polen
- Por vectores como áfidos, saltahojas, hongos y nemátodos

La transmisión de los virus puede realizarse vía mecánica es decir por contacto entre plantas, por maquinaria, animales y ropa de operarios. Probablemente esto ocurre por transmisión de plantas sanas vía heridas ocasionadas durante el manejo del cultivo. Los virus que se transmiten mecánicamente son: PVX, PVS, APMV, APLV, TMV y el viroide del tubérculo puntado PSTV.

La transmisión por áfidos es la de mayor prevalencia, pues los dos virus PVY y PLRV son los de mayor distribución y más graves al cultivo.

Los virus son transmitidos en pocos minutos por áfidos que están probando al huésped.

- Insectos

- Escarabajo de la papa (*Leptinotarsa decemlineata* coleóptero devoran ferozmente las hojas, pudiendo destruir toda): las larvas de este una plantación dejando sólo los tallos de las plantas.
- Pulgones de la papa: sus daños fundamentales son que transmiten enfermedades viróticas. Los pulgones más comunes en la papa son: pulgón verde del duraznero (*Myzus persicae*), pulgón de estría verde de la papa (*Macrosiphum euphorbiae*), pulgón de manchas verdes (*Aulacorthum solani*).
- Polilla de la papa: no sólo ataca a la papa sino a otras muchas solanáceas como el pimiento, la berenjena, el tomate o el tabaco. Los daños se deben a las galerías que las larvas hacen dentro de los órganos aéreos (en el campo) y a las galerías que hacen en los tubérculos que además son puerta de entrada de enfermedades criptógamas (en el almacén).
- Rosquilla negra (*Prodenia*): es una plaga polífaga, la oruga, que es la que hace el daño, come las partes verdes de la planta. Suelen comer por la noche o en días nublados; tienen carácter gregario y arrasaron por donde pasan.
- Gusanos del suelo (*Agrotis segetum*): principalmente son los denominados gusanos grises y blancos los que devoran los tubérculos.
- Alacrán cebollero (*Gryllotalpa gryllotalpa*): Causa graves daños a la planta de la papa. Lo más normal para combatirlo es utilizar cebos a base de fluosilicato.
- Nematodo dorado (*Heterodera rotochiensis*): es el nematodo que mayores daños causa en la papa, aunque no el único. Las larvas penetran en las raíces formando quistes de pequeño tamaño.

3.2.2.7. Utilización y valor nutritivo

La papa es un tallo subterráneo, succulento que presenta un alto contenido de hidratos de carbono, vitaminas y minerales.

Principales componentes de la papa, rango y media

Componentes	Rango %	Media
Agua	63.2 – 86.9	75.05
Sólidos totales	13.1 – 36.8	23.7
Proteínas (nitrógeno total+6.25)	0.7 – 4.6	2
Glicoalcaloides	0.2 – 41	3-10(mg/100g)
Grasa	0.02 – 0.20	0.12
Azúcares reductores	0.0 – 5.0	0.3
Total carbohidratos	13.3 – 30.53	21.9
Fibra cruda	0.17 – 3.48	0.71
Acidos orgánicos	0.4 – 1.0	0.6
Cenizas	0.44 – 1.9	1.1
Vitamina C	1 – 54 mg/100g	10-25 mg/100g

Pese al bajo contenido proteico de la papa, este tiene un alto valor biológico. Es rico en leucina, lisina e isoleucina. Es limitante en metionina y cistina. Presenta un alto contenido de vitamina C, tiamina, riboflavina y niacina.

Las papa tiene ventajas y desventajas comparativas en relación a otros cultivos alimenticios, tiene:

- Gran habilidad para producir mas calorías y proteínas por unidad de superficie y por día que muchos otros cultivos.
- Mayor calidad nutricional en general que cualquier otro cultivo alimenticio.
- Gran flexibilidad para producir en una gran diversidad de climas.
- Requerimientos relativamente bajos de agua.
- Gran germoplasma disponible para el mejoramiento.

Dentro de las desventajas se tiene:

- Gran contenido de agua en los tubérculos que lo hace un producto muy voluminoso, perecible y de corta vida para un almacenamiento a largo plazo.
- Este gran volumen dificulta su transporte.
- Dependencia de los tubérculos y en gran cantidad para su plantación.
- Menor valor nutritivo por kilo de producto crudo de cereales.

En la alimentación animal se tiene consumo fresco crudo y/o precocido, deshidratado, subproducto industrial como el bagazo proveniente de la obtención del almidón.

Por último el uso de la forma generalizada de multiplicarse es el tubérculo- semilla.

Para el consumo humano los tubérculos son importantes y estos se desarrollarán con una óptima asimilación de hidratos de carbono.

La mayor producción está en relación directa con un tiempo breve de plantación a emergencia con el fin de iniciar a la brevedad el proceso fotosintético, por tal razón medidas como prebrotación, plantación superficial y plantar en suelos temperados (sobre 10°C) acelerará este proceso.

Una vez emergida la planta y hasta su cobertura plena (canopia cerrada) la fotosíntesis neta conseguida es usada en el crecimiento general de la planta, tanto su parte aérea como radicular y estolonífera. Dicho desarrollo es de alta intensidad de uso de nutrientes y al igual que el proceso anterior debe tenderse a hacerlo lo más corto posible ya que ambos procesos han estado construyendo la fábrica que deberá trabajar a plena capacidad para la etapa final de tuberización y llenado. Prácticas como una mayor densidad de plantación, suministro adecuado de nutrientes, abastecimiento oportuno de agua, clima con temperaturas de 18 a 20°C y una alta intensidad lumínica favorecerán este desarrollo acelerado.

En la tercera fase todo el proceso fotosintético debe traducirse en acumulación de hidratos de carbono formados en los tubérculos, a proveer la energía para la respiración.

El conseguir rendimientos máximos estará en directa relación con una máxima fotosíntesis neta diaria y que esta ocurra en un tiempo bastante prolongado.

Ayudan a esta fase un adecuado abastecimiento de agua, temperaturas diurnas entre 18 a 24°C y temperaturas nocturnas bajo los 15°C.

Después de la plantación o aún antes el tubérculo semilla desarrolla brotes y raíces. Si el tubérculo/semilla ha desarrollado brotes antes de plantación, formará inmediatamente raíces y la emergencia se acelera. La humedad del suelo es necesaria para la formación de raíces y el temprano crecimiento de la planta. Baja humedad y baja temperatura la emergencia se retrasa.

La temperatura ideal de brotación es de 18°C. Temperaturas inferiores retrasan la brotación y emergencia y temperaturas superiores, pueden estresar el tubérculo y generar enfermedades.

3.2.2.8. Certificación de la papa – semilla

- Definición

Se indica a la semilla como el “origen del suceso” y ello reviste una connotación relevante esencial en cualquier proceso agrícola.

Cualquier planta inicia su desarrollo a partir de una semilla, o de una parte vegetativa de la planta en cuestión. Así hablamos de reproducción generativa (vía semilla sexual) o reproducción vegetativa (vía parte asexual).

La papa cultivada (*Solanum tuberosum ssp tuberosum*) es una planta que se multiplica comercialmente, en forma vegetativa, a través del tubérculo. Esta forma de producción la hace susceptible a innumerables patógenos que deterioran su rendimiento, deforman su follaje o simplemente la matan.

El abastecimiento del tubérculo – semilla que reúna ciertas cualidades, tradicionalmente ha sido realizado por agricultores y/o empresas insertos en una región adecuada a tal fin.

- Objetivos de la certificación

Los objetivos de la certificación son garantizar:

- La alta sanidad de la cosecha, especialmente a enfermedades virosas que son transmitidas por el tubérculo – semilla
- Procedencia: que corresponda a papas bajo el régimen de certificación y no a otras producciones.
- Pureza: que corresponda a la variedad específica y no a otra ni a mezcla de variedades.
- Calibre: que corresponde a uno de calibre semilla (28 – 55 mm de diámetro) para garantizar un número adecuado de plantas por unidad de superficie.

Estos objetivos se consiguen son:

- Regiones de producción normal
 - Estar libre de enfermedades cuarentenarias, entre estas están aquellas provocadas por *Pseudomonas solanacearum*, *Globodera rostochiensis*, *Angiosorus solani* y *Corynebacterium sepedonicum*.
 - Baja incidencia de enfermedades comunes como *Streptomyces scabies*, *Rhizoctonia solani*, *Erwinia sp.* y otras.
 - Baja actividad de insectos portadores de virus durante el desarrollo del cultivo. Los áfidos son propagadores de virus durante el desarrollo del cultivo.
 - Amplia rotación del cultivo
 - Clima y suelo adecuado traducido en temperaturas, fotoperiodo, humedad y ventosidad.
 - Aislamiento de otros cultivos, sobre todo huertas, en donde se encuentran gran cantidad de insectos.
 - Conocimiento técnico del manejo productivo y tecnologías adecuadas al proceso.
- Etapas de certificación de papa – semilla

Las etapas de la certificación son las siguientes:

- Prebásica: es la semilla obtenida a partir del material parental a través de un número limitado de generaciones fijadas por el creador con información al organismo certificador, de modo que abastezca de suficiente semilla básica.

- Básica: es aquella proveniente de semillas prebásicas, producida bajo la responsabilidad del dueño de la variedad y que cumpla con las normas establecidas. El destino es la producción de semillas certificadas.
- Certificada 1° y 3° generación: es el producto de la multiplicación de la semilla básica, producida bajo el régimen de certificación que cumple con las normas establecidas de acuerdo a su etapa.
- Corriente: es aquella que sin ser certificada cumple con los requisitos que establece el reglamento y con las normas pertinentes.

3.2.3. Costra negra de la papa: (*Rhizoctonia solani*)

Rhizoctonia solani

3.2.3.1 Clasificación taxonómica

Rhizoctonia solani es un hongo que pertenece a:

- Reino: *Mycetae*
- División: *Eumycota*
- Subdivisión: *Deuteromycotina (Hongo imperfecto)*
- Clase: *Agonomycetes*
- Orden: *Agonomycetales*
- Género: *Rhizoctonia*
- Especie: *solani*

Este hongo no produce esporas asexuales (conidios) y solo ocasionalmente produce esporas sexuales (basidiosporas), que hacen que esta especie sea un Basidiomiceto al que se denominó *Thanatephorus cucumeris*.

Este hongo fue originalmente descrito por Julios Kühn en plantas de papa el año 1858. Se caracteriza porque no produce conidias, su reproducción es por fragmentación. Esta familia de hongos son saprófitos y parásitos de plantas, las células son multinucleadas y la base de la células que da origen a una ramificación tiene una constricción.

Debido a que *R. solani* y otras especies de *Rhizoctonia* no producen conidias y rara vez producen basidiosporas, su clasificación ha sido dificultosa. En 1960 los investigadores observaron diferencias morfológicas del hongo en cultivos in vitro en varias especies de plantas, que llevaron a una necesidad de clasificar a *Rhizoctonia*. En 1969 Parmeter y colegas en la Universidad de California reintrodujeron el concepto de "anastomosis hifal", para caracterizar e identificar al género *Rhizoctonia*. El concepto implica a aislamientos de *Rhizoctonia* que tienen la capacidad de reconocer un punto de unión (anastomosis)

Grupos de anastomosis de *Rhizoctonia spp.* binucleada y multinucleada

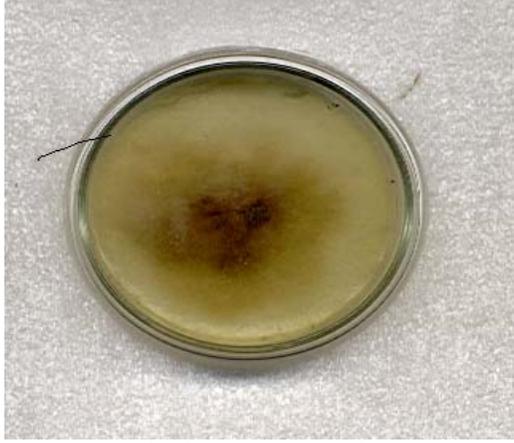
Se sabe ahora que *R. solani* es una especie “colectiva” (George Agrios) que consta por lo menos de cuatro (y quizá de más) cepas mas o menos emparentadas. Dichas cepas se distinguen entre sí debido a que las **anastomosis** (fusión de hifas que entran en contacto) solo se producen entre los aislados de un mismo **grupo de anastomosis**. Después de que ha ocurrido la anastomosis, la cual puede detectarse con un microscopio, se forma una hifa heterocariota, bajo ciertas condiciones, a partir de una de las células que se anastomosan. Sin embargo en la vasta mayoría de las anastomosis, de cinco a seis células localizadas a cualquier lado de las células que se han fusionado quedan incluidas en una vacuola y mueren y toman la apariencia de una zona clara en el punto de unión de dos colonias. Esta “reacción destructiva” entre los aislados de un mismo grupo de anastomosis es la expresión de una incompatibilidad somática o vegetativa, ésta incompatibilidad limita la exogamia (mezcla de cepas) a unos pocos apareamientos compatibles. La existencia de los grupos de anastomosis en *R. solani* representa el aislamiento genético de las poblaciones en cada grupo.

Aún cuando los diferentes grupos de anastomosis no sean totalmente específicos de su hospedante, muestran algunas tendencias bastante definidas: los aislados de un grupo de anastomosis (AG1) producen pudrición de las semillas y del hipocotilo y tizones de tejidos aéreos de muchas especies vegetales; los aislamientos del grupo AG2 ocasionan un cancro de los cultivos que producen raíces comestibles, etc. El reconocimiento de la existencia de los grupos de anastomosis y de su mayor o menor especificidad por el hospedante ha sido importante para determinar el grupo de anastomosis del aislamiento que debe utilizarse para llevar a cabo inoculaciones dirigidas al mejoramiento de diferentes cultivos para obtener resistencia a *Rhizoctonia*.

El criterio de anastomosis hifal ha sido usado extensamente para la clasificación de los aislamientos de *Rhizoctonia* en grupos taxonómicos distintos llamados grupos de anastomosis. En la práctica la anastomosis hifal es determinada de varias maneras, la práctica más común es dejar crecer dos aislamientos de *Rhizoctonia* entre dos portaobjetos, el área de emergencia de la hifa es luego microscópicamente examinada para determinar las interacciones hifales.

Si el par de aislamientos pertenece al mismo grupo de anastomosis se produce una fusión hifal (anastomosis), la ausencia de fusión hifal indica que entre los dos aislamientos existe una gran diferencia genética (pertenecen a diferente especie por ejemplo). Poco se conoce acerca de los mecanismos genéticos que controlan este proceso de reconocimiento en *Rhizoctonia*. Se han asignado 12 grupos de anastomosis. La anastomosis hifal y métodos moleculares están siendo utilizados para estudiar la taxonomía, ecología y patología de *R. solani*.

3.2.3 3. Huéspedes y distribución geográfica



Rhizoctonia es un hongo habitante del suelo y tiene como hospederos una gran variedad de plantas, en las cuales ocasiona enfermedad, incluyendo malezas, a casi todas las hortalizas y plantas florales, varios cultivos mayores y también a las plantas perenes tales como los pastos para césped, arbustos y árboles. *Rhizoctonia solani* afecta la mayoría de las plantas, otras especies de *Rhizoctonia*, por ejemplo *R. crocorum* ataca sólo órganos subterráneos de muchas hortalizas y plantas de ornato y las partes enfermas de la planta muestran una coloración violeta o rojo debido al color púrpura del micelio del hongo.

La rizoctoniasis es una enfermedad ampliamente distribuida en las zonas de producción de papa del mundo y de Bolivia, alcanzando incidencias hasta del 90% en los departamentos de Cochabamba, Chuquisaca, Potosí, Oruro, La Paz y Tarija. Plantas severamente afectadas con rizoctoniasis muestran una disminución en rendimiento hasta de un 96%. El efecto en la calidad es altamente significativo en relación al de las plantas sanas. Puede ocasionar cosechas de 80% de tubérculos pequeños y deformes y solo 20% de tamaño regular.

3.2.3.4 Morfología

El micelio vegetativo de *R. solani* es de un color marrón claro cuando el cultivo es joven a medida que va envejeciendo va tornándose más café. En papa – dextrosa - agar, *R. solani* produce colonias de color marrón claro y apariencia estromática, que no desarrolla micelio aéreo ni esclerocios, pero si forma células de tipo monilioide inmersas en un crecimiento de aspecto herrumbroso. Las observaciones realizadas con microscopía de luz normal de alta resolución, demostraron que las células vegetativas del hongo son multinucleadas. El número de núcleos varía de 3 a 8, siendo 5 el promedio registrado en las células terminales y en las otras células.

El micelio está compuesto de hifas segmentadas en células individuales divididas por un septo que posee un poro, a través del cual se produce el movimiento e intercambio de componentes del citoplasma y organelos como las mitocondrias. Las hifas frecuentemente son ramificadas con un ángulo de 90° con respecto a la hifa principal, conteniendo usualmente mas de tres núcleos por célula, la anatomía del poro septal y el número de núcleos celulares han sido utilizados para diferenciar *R. solani* de otras especies de *Rhizoctonia*.

R. solani rara vez produce un estado perfecto de basidiomiceto conocido como *Thanatephorus cucumeris*, esta fase se forma cuando hay suficiente humedad y tiene el aspecto de un mildiu fino que se desarrollo sobre el suelo, hojas y tallos infectados que se encuentran por encima del suelo. Los basidios tienen una forma de barril, se forman sobre una capa membranosa de micelio y tienen cuatro esterigmas cada uno de los cuales produce una basidiospora ovoide.

3.2.3.5 Ecología y ciclo de la enfermedad

Rhizoctonia solani se reproduce asexualmente y existe primariamente como micelio vegetativo o esclerotios. Las estructuras sexuales y basidiosporas (teleomorph) fueron descritas por primera vez en detalle por Prillieux y Delacroiz en el año 1891. El estadio sexual de *R. solani* ha recibido varios nombres desde entonces, pero ahora es conocido como *Thanatephorus cucumeris*.

R. solani puede sobrevivir en el suelo y en tejidos vegetales por muchos años en forma de pequeñas estructuras café de forma irregular (1 a 3 mm de diámetro) llamados esclerotios. *R. solani* también puede sobrevivir como saprofito en forma de micelio colonizando suelo rico en materia orgánica. Los esclerotios o micelio presentes en el suelo o tejidos vegetales germinan para producir hifas que pueden atacar un amplio rango de plantas. El hongo es atraído hacia las plantas por estimulantes químicos producidos por ellas mismas o por descomposición de residuos vegetales, luego del contacto del hongo con la planta, este continúa creciendo en la superficie externa de la planta llegando a producir enfermedad con la ayuda de una estructura que penetra la célula vegetal; el hongo consume los nutrientes del vegetal para continuar creciendo. En el proceso de infección participa también enzimas extracelulares producidas por el hongo que degradan varios componentes de la pared celular vegetal (celulosa, quitina y pectina) así el hongo mata las células

vegetales y sus hifas continúan creciendo hasta colonizar el tejido muerto, frecuentemente formando esclerotios, que constituyen nuevos inóculos, que iniciarán un nuevo ciclo celular que se repite cuando están disponibles nuevos substratos.

El hongo se mantiene de un año a otro como esclerocios y como micelio en residuos de cosecha que se encuentran en el suelo. 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. 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.

3.2.3.6 Síntomas

Rhizoctonia solani ataca primariamente varias partes de la planta, desde la raíz, tallos, hojas y frutos. La enfermedad por *Rhizoctonia* es iniciada por el micelio o esclerotios, las basidiosporas sirven como agentes de dispersión del hongo, que germinan para producir las hifas que infectan las hojas durante los periodos de alta humedad.

La enfermedad afecta solo los tejidos jóvenes de brotes, tallos y estolones.

- En plantas: La enfermedad afecta a los brotes del tubérculo. Los brotes afectados muestran en la base lesiones necróticas de color marrón, que cuando son profundas los estrangulan. Sin embargo aún en este estado, la planta puede desarrollar desde la parte inferior del tallo estrangulado, brotes nuevos que si no son afectados emergen finalmente del suelo. Si las lesiones son mas o menos superficiales, la planta afectada se muestra débil y crece lentamente. Luego cuando las plantas llegan a ser adultas, muestran amarillamiento y encarrujamiento de las hojas apicales, las lesiones necróticas o canchales interfieren el normal movimiento de nutrientes dando lugar a la formación de tubérculos aéreos en las axilas de las hojas. Los tubérculos aéreos sin embargo no son exclusivos de esta enfermedad, porque también se forman por una serie de otras causas como el bloqueo de los haces vasculares causado por daños mecánicos, corte parcial del tallo causado por insectos o por patógenos como *Verticillium*. Otro de los síntomas asociados con la rizoctoniasis es el encarrujamiento de las hojas apicales y esto último ocurre cuando las raíces están afectadas.
- En tubérculos: En la superficie de los tubérculos maduros se forman esclerotes de color negro a castaño oscuro. Los esclerotes toman forma de terrones, de ahí su nombre de costra negra, pueden presentar también agrietaduras, mal formaciones, concavidades y necrosis en el extremo de unión con el estolón.

- En estolones: La enfermedad ataca a los estolones, ocasionando lesiones necróticas que pueden estrangularlos o matarlos. Cuando esto ocurre, los tubérculos que están en pleno desarrollo quedan pequeños.
- En raíces: La enfermedad afecta las raíces y como consecuencia produce encarrujamiento de las hojas apicales. En algunos casos este síntoma puede ser confundido con el producido por el virus del enrollamiento de la papa (PLRV).
- En la base del tallo: Durante el desarrollo de la planta en suelos infestados, se puede observar la presencia de una capa miceliana de color blanco - grisáceo en la base de los tallos, desde el nivel del suelo hacia arriba en una longitud aproximada de 10 cm. En esta capa se encuentran las estructuras que corresponden a la fase sexual del hongo, la misma que no produce ningún daño a la planta ya que al frotarse con la yema de los dedos del tallo que estuvo cubierto con esta capa se muestra completamente sano.
- En tubérculos: En la superficie de los tubérculos afectados se observa la presencia de costras negras, llamadas esclerocios que son las estructuras de conservación del hongo, las costras negras le dan un mal aspecto a los tubérculos y en un mercado exigente, los tubérculos afectados son rechazados.
- En Plántulas: La enfermedad afecta las plántulas procedentes de semilla botánica, cuando las plántulas de papa se han desarrollado en bandejas o en campos de almácigos son transplantadas al campo, son severamente afectadas por un complejo de patógenos entre los cuales se encuentra *R. solani*.

En condiciones favorables de humedad (alta) y de temperaturas (16-18°C) estas estructuras germinan e infectan a la planta de papa. La enfermedad ataca al cultivo de papa en tres estadios de desarrollo:

- En la brotación
- En el desarrollo vegetativo
- En la tuberización
- En la brotación

Los daños más severos se producen poco después de la siembra, especialmente en suelos fríos y húmedos.

El hongo ataca los ojos y brotes subterráneos anulando o retardando su emergencia, dando como consecuencia campos con fallas en la emergencia, desigualdad en el crecimiento, plantas débiles y por lo tanto reducción del rendimiento.

- En el desarrollo vegetativo

En los tallos y estolones el hongo ataca ocasionando canchales que pueden llegar a estrangularlos, pudiendo dar como efecto:

- Coloración purpúrea de las hojas apicales (antocianescencia)

- Enrollamiento de las hojas apicales
- Engrosamiento de las yemas axilares en donde se producen tubérculos aéreos
- Reducción en la producción

La fase sexual se presenta en la superficie de los tallos cuando hay suficiente humedad, por encima de la línea del suelo, formando una capa tenue blanco plumiza de apariencia polvorienta que se desprende fácilmente al frotarla con los dedos. El tejido que queda por debajo se presenta sano. Esta fase que el agricultor denomina “pantalón blanco”, no ocasiona daño económico.

- En la tuberización

Los síntomas en los tubérculos son los que se observan con mayor frecuencia afectando su calidad. Una de las manifestaciones es la formación de la piel escamosa que empieza en los ojos o en el extremo más joven del tubérculo y consiste en el resquebrajamiento de la piel en forma de red con mallas de diferente tamaño que pueden llevar a agrietaduras, concavidades y malformaciones del tubérculo.

Sobre la superficie de los tubérculos el hongo produce masas compactas de micelio (filamentos que constituyen el cuerpo del hongo) llamadas “esclerotes” de color negro o castaño oscuro que pueden ser de diferentes tamaños y formas y sobre los que normalmente se adhiere la tierra. Estos pueden ser fácilmente extraídos con la uña no siendo afectada la piel del tubérculo. La madurez del tubérculo así como los niveles altos de humedad y sobre todo la falta de drenaje tienden a incrementar la formación de esclerotes sobre los tubérculos.

3.2.3.7 Prevención

Utilizar tubérculos - semilla libres de la enfermedad

Tratar los tubérculos – semilla con productos químicos

Realizar prácticas culturales que permitan una rápida emergencia

Evitar la siembra en suelos húmedos y poco drenados

Realizar rotación de cultivos especialmente con cereales

- Control químico de la rizoctoniasis

Entre las medidas de control la más efectiva al presente es el control químico, este es conveniente también aplicarlo en los tubérculos – semilla. Las ventajas del tratamiento químico con fungicidas a los tubérculos – semilla antes de la siembra son:

- Mayor emergencia
- Mayor uniformidad en el desarrollo de las plantas en la parcela
- Mayor número de tallos por parcela
- Menor porcentaje de tallos afectados

- Menor intensidad de daño en estolones
- Incremento en los rendimientos
- Menor incidencia e intensidad de daño por piel escamosa y esclerotes sobre los tubérculos, lo cual refleja en una mejor calidad de los tubérculos – semilla

Los fungicidas utilizados para el control de la rizoctoniasis son el Thiabendazol 60% (Tecto 600), Thiabendazol 60% más Iprodione 50% (Tecto 600 más Rovral), Pencycuron 25% (Monceren), Pencycuron 20% más Captan 50% (Monceren CA). Varios fungicidas incluyendo algunos de contacto (iproditiones y el clorotalonil) y sistémicos (carboxina, triadimefon y tiofanato de metilo) al parecer proporcionan un control de las enfermedades por *Rhizoctonia* en algunos cultivos.

Es conveniente rotar los fungicidas recomendados para el tratamiento de tubérculos – semilla en campañas sucesivas en una misma parcela. Es decir que si en una parcela determinada en una campaña se utiliza un fungicida, en la siguiente campaña utilizar otro fungicida. Esto es con el propósito de no favorecer la posibilidad de desarrollo de poblaciones de *Rhizoctonia solani* o de otros patógenos del suelo resistentes a alguno de los fungicidas.

En Bolivia se tiene evidencia de que el fungicida Pencycuron actúa algo mejor para la fase de esclerotes y el fungicida Thiabendazol en las fases de ataque a brotes y canchros. Esto podría orientar la selección del fungicida de acuerdo a la fase más problemática en una parcela determinada.

- Control biológico de la rizoctoniasis

Se viene realizando esfuerzos por desarrollar métodos de control biológico de las enfermedades por *Rhizoctonia*. *Rhizoctonia* es parasitado por varios microorganismos como los hongos *Trichoderma*, *Gliocladium*, y *Laetisaria*, varias mixobacterias del suelo y por nemátodos micófagos como *Aphelenchus avenae*. Entre los enemigos naturales de *R. solani* los más eficientes son *Trichoderma harzianum*, *Rhizoctonia binucleada* y *Verticillium biguttatum*. Especies del género *Trichoderma* podrían parasitar y producir antibióticos contra *Rhizoctonia solani*.

La adición de estos organismos a los suelos infestados por *Rhizoctonia* o el tratamiento de las semillas, tubérculos y trasplantes con suspensiones de esporas o micelio de los hongos hipovirulentos o antagonistas o bien con las mixobacterias antes de realizar la siembra, disminuye de manera considerable la incidencia y severidad de la enfermedad en cultivos como la zanahoria, frijol, clavel y la papa.

4. MATERIAL Y METODOS

Los ensayos experimentales in vitro se llevaron a cabo en los laboratorios del Instituto de Investigaciones Farmaco Bioquímicas (IIFB) de la Universidad Mayor de San Andrés.

Las pruebas de campo se realizaron en los campos de cultivo de papa del Centro de Investigaciones Nucleares (CIN), una Institución que tiene como una de sus funciones producir semilla prebásica de papa, dependiente del Instituto de Ciencia y Tecnología Nuclear (IBTEN) ubicado en el cantón Surimanta aledaño a la localidad de Viacha de la provincia Ingavi del departamento de La Paz, a 3853 m.s.n.m., 16° 39' Latitud Sur y 68° 18' Longitud Oeste. El clima de la región es frío, con una temperatura media anual de 7.1°C, una temperatura mínima absoluta de -3.4°C y una temperatura máxima de 16.6°C, una humedad relativa media anual de 57.8%.

La Fundación: Promoción e Investigación de Productos Andinos (PROINPA) del departamento de Cochabamba, nos proporcionó el aislamiento de *Rhizoctonia solani*, la que constituyó nuestra cepa de referencia.

4.1 Aislamiento de *Rhizoctonia solani* y de hongos de tierra del CIN – Viacha

4.1.1 Determinación del área de trabajo

La recolección de muestras de plantas de papa y de tierra se realizó en el CIN, ubicado en la localidad de Viacha de la provincia Ingavi del departamento de La Paz.

4.1.2 Aislamiento de *Rhizoctonia solani*

4.1.2.1 Recolección de muestras

Para el aislamiento de *R. solani*, se recolectaron plantas de papa con signos de rizoctoniasis, raíces y tallos que presentaban estrangulación y necrosis, tubérculos con costras negras y ojos ciegos característicos de la enfermedad, además de tierra circundante a dichas plantas.

4.1.2.2 Siembra de las muestras en medios de cultivo

De los límites de las lesiones de tallo y raíces se cortaron fragmentos de 1 cm de longitud aproximadamente y de los tubérculos se separaron las zonas de la costra, las cuales fueron

sumergidas por 2 minutos en una solución de hipoclorito de sodio (1.0%), lavadas varias veces en agua destilada estéril, secadas y transferidas asépticamente a placas Petri de 10 cm de diámetro con medio Agar Papa Dextrosa (APD) (20 ml) (ANEXO 1). Las placas se incubaron a 15 – 20°C por el lapso de 5 a 10 días, hasta observar el desarrollo de colonias fungosas.

4.1.2.3. Aislamiento e identificación

Las colonias sospechosas de *R. solani* se subcultivaron en otras placas Petri de 10 cm de diámetro con medio APD (20 ml) y se incubaron a 15 – 20°C, hasta lograr su pureza.

La colonia de *R. solani* así aislada se identificó macroscópica y microscópicamente por el método de la cinta scotch que consiste en disponer de una gota de hidróxido de potasio (10%) o azul de metileno (ANEXO 1) sobre un portaobjeto, con la ayuda de la parte pegajosa de la cinta scotch se logra adherir a ésta el micelio de la colonia fungosa a identificar ejerciendo una leve presión sobre la colonia. La cinta posteriormente es colocada sobre un portaobjeto y se procede a la observación al microscopio primeramente con un aumento de 10X luego con un aumento de 40X comparándola con nuestra cepa de referencia.

4.1.3 Aislamiento de hongos de tierra del CIN - Viacha

4.1.3.1 Recolección de muestras

Para el aislamiento de hongos de tierra del CIN, se colectaron terrones de tierra de diferentes partes del Instituto: 3 de campo abierto, 3 de las camas protegidas y 3 del invernadero.

4.1.3.2 Siembra de las muestras de tierra en los medios de cultivo

Se sembró una alícuota de 100 ul de una suspensión de tierra (3g) en solución fisiológica estéril (5 ml) en una placa Petri de 10 cm de diámetro con medio APD (20 ml). Las placas se incubaron a 15 – 20°C por el lapso de 5 a 10 días, hasta observar el desarrollo de colonias fungosas.

4.1.3.3. Aislamiento e identificación

Las diferentes colonias así obtenidas se aislaron y purificaron tomando una porción superficial de cada masa de micelio y traspasándolas a otra placa Petri de 10 cm de diámetro

con medio APD (20 ml) y se incubaron a 15 – 20°C por el lapso de 5 a 10 días. Este procedimiento se repitió hasta lograr la pureza de los hongos.

Los hongos así aislados se identificaron por el método de la cinta scotch ya mencionada y se almacenaron para los ensayos posteriores.

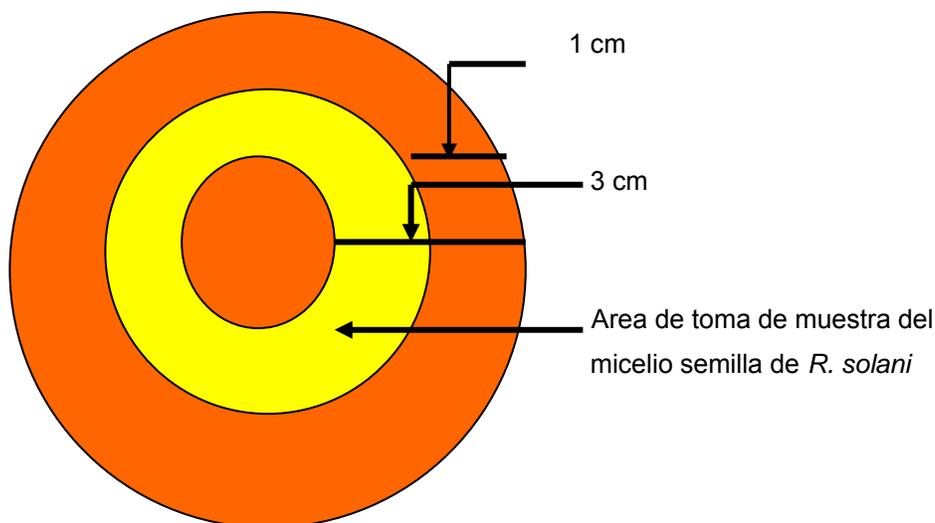
4.2 Determinación de las condiciones de cultivo óptimas y cinética de crecimiento de *Rhizoctonia solani*

4.2.1 Determinación de las condiciones de cultivo óptimas y cinética de crecimiento en medio de cultivo sólido de *R. solani*.

4.2.1.1 Obtención del micelio semilla

Para todos los ensayos in vitro con *R. solani*, se utilizó como inóculo de este hongo un micelio semilla que consistió en un trozo de agar de 4 mm de diámetro con micelio de *R. solani*, obtenido con la ayuda de un sacabocados de una superficie comprendida entre 1 y 3 cm del borde externo de una placa Petri de 10 cm de diámetro con medio APD (20 ml), que contenía micelio de *R. solani* después de 5 a 10 días de incubación a 15 – 20°C de temperatura. (Fig. N°1)

Fig. N°1: Esquema del área de toma de muestra del micelio semilla de *R. solani* en una placa Petri



4.2.1.2 Determinación de la temperatura óptima de desarrollo de *R. solani*

- Se colocó el micelio semilla de *R. solani* en el centro de 9 placas Petri de 10 cm de diámetro con medio APD (20 ml), 3 de ellas se incubaron a 12°C, 3 a 14°C, 3 a 16°C, 3 a 18 ° C, 3 a 20°C, 3 a 25°C y 3 a 28°C de temperatura, por el lapso de 5 a 10 días.
- Se determinó en cada placa orientaciones fijas: Norte, Sur, este y Oeste. Con una regla milimetrada se procedió a medir cada 24 horas el crecimiento del frente hifal en las cuatro orientaciones hasta que el micelio llegue al borde externo de la placa, con estos resultados se calculó el área de avance micelial y la tasa de crecimiento expresado en cm^2/h , con dichos datos se construyeron las curvas de crecimiento. Del área de crecimiento total se descontó el área del inóculo inicial es decir el área del micelio semilla. Con el fin de determinar la temperatura óptima en la cual *R. solani* desarrolla con mayor rapidez.

4.2.1.3 Determinación de la influencia de la luz en el desarrollo de *R. solani*

- Se colocó el micelio semilla de *R. solani* en el centro de 6 placas Petri de 10 cm de diámetro con medio APD (20 ml).

- Las placas se incubaron a 16 – 25°C por el lapso de 5 a 10 días, 3 de ellas expuestas a una lámpara de luz halógena y 3 en oscuridad.
- Se determinó en cada placa orientaciones fijas: Norte, Sur, este y Oeste. Con una regla milimetrada se procedió a medir cada 24 horas el crecimiento del frente hifal en las cuatro orientaciones hasta que el micelio llegue al borde externo de la placa, con estos resultados se calculó el área de avance micelial y la tasa de crecimiento expresado en cm²/h, con dichos datos se construyeron las curvas de crecimiento. Del área de crecimiento total se descontó el área del inóculo inicial es decir el área del micelio semilla. Con el fin de determinar si la luz influye en el desarrollo de *R. solani*.

4.2.1.4 Determinación del medio de cultivo óptimo para el desarrollo de *R. solani*

- Se colocó el micelio semilla de *R. solani* en el centro de 9 placas Petri de 10 cm de diámetro, 3 de ellas con medio APD (20 ml), 3 con agar Saboraud (20 ml) (ANEXO 1) y 3 con agar nutritivo (20 ml) (ANEXO 1).
- Todas las placas se incubaron a 16 – 25°C por el lapso de 5 a 10 días.
- Se determinó en cada placa orientaciones fijas: Norte, Sur, Este y Oeste. Con una regla milimetrada se procedió a medir cada 24 horas el crecimiento del frente hifal en las cuatro orientaciones hasta que el micelio llegue al borde externo de la placa, con estos resultados se calculó el área de avance micelial y la tasa de crecimiento expresado en cm²/h, con dichos datos se construyeron las curvas de crecimiento. Del área de crecimiento total se descontó el área del inóculo inicial es decir el área del micelio semilla.
Con el fin de determinar en qué tipo de medio de cultivo *R. solani* desarrolla con mayor rapidez.

Las tasas de crecimiento micelial se obtuvieron de la siguiente manera:

- Se obtuvo el promedio de los radios en las cuatro orientaciones: Norte, Sur, Este y Oeste de todas las placas Petri utilizadas por cada día hasta que el micelio alcanzó el borde externo de la placa.

- Se calculó el área del micelio en cm² para cada día con la fórmula:

$$\text{Area} = \pi \times \text{radio}^2$$

- Luego se obtuvo la tasa de crecimiento micelial en cm²/h con la siguiente fórmula:

$$\text{Tasa de crecimiento micelial (cm}^2/\text{h)} = \text{Area (cm}^2\text{)}/\text{tiempo transcurrido (horas)}$$

- Finalmente se obtuvo el promedio de todas las tasas obtenidas de cada día.

- Los datos para las determinaciones de las tasas de crecimiento micelial se muestran en los ANEXOS 3 al 5.

4.2.2 Determinación de la cinética de crecimiento de *R. solani* en medio de cultivo líquido

- Se dispuso de 4 matraces Erlenmeyer (150 ml), 2 de ellos con Caldo Papa Dextrosa (CPD) (50 ml) y 2 con Caldo Saboraud (50 ml).
- Se colectó una muestra del medio de cultivo (5 ml) de cada matraz y se la almacenó en un vial estéril a 4°C.
- Se inoculó 4 matraces con el micelio semilla de *R. solani*. Dos matraces: uno con medio CPD y otro con Caldo Saboraud se incubaron en condiciones de agitación en un Shaker a una velocidad de 150 r.p.m. por un lapso de 7 días. Los otros dos matraces: uno con medio CPD y el otro con Caldo Saboraud se incubaron en condiciones estacionarias por el lapso de 14 días.
- La temperatura de incubación de los 4 matraces fue de 20°C. (Tabla N°1).

Tabla N°1: Distribución de los matraces para la determinación de la cinética de crecimiento de *R. solani* en medio líquido.

Cultivo en Batch	Medio de Cultivo		Tiempo de incubación	Temperatura incubación
	CPD	C. Saboraud		
Agitación	1 Matraz	1 Matraz	7 días	18°C
Estacionario	1 Matraz	1 Matraz	14 días	18°C

- Las tomas de muestra de los medios de cultivo se realizaron de la siguiente manera:
- Matraces en agitación: Se tomaron 7 muestras del medio de cultivo (5 ml) en tubos de ensayo estériles, cada 24 horas durante 7 días.
- Matraces en estacionario: Se tomaron 7 muestras de medio de cultivo (5 ml) en tubos de ensayo estériles, cada 48 horas durante 14 días.
- Inmediatamente colectadas las muestras se centrifugaron a 3500 r.p.m. por 15 minutos.
- Los sobrenadantes se almacenaron en viales estériles a 4°C debidamente rotulados con el tiempo de toma de muestra, condiciones de incubación y el medio de cultivo del cual se extrajo la muestra.

4.2.2.1 Determinación de la variación del pH

- A tiempo de tomar las muestras de medio de cultivo en cada tiempo, se determinaron sus pH, con la ayuda de una cinta pHmetro.

4.2.2.2 Determinación de la variación de la concentración de glucosa

- La determinación de la concentración de glucosa se efectuó en todas las muestras recolectadas, por el método enzimático colorimétrico de la glucosa oxidasa. (ANEXO 2)

4.3 Obtención de los filtrados de cultivo de los hongos del cepario del IIFB y del CIN – Viacha

4.3.1 Control de viabilidad y crecimiento de los hongos del cepario del IIFB

- Previamente a la obtención de los filtrados de cultivo de los hongos del IIFB, fue necesario comprobar su viabilidad, ya que se encontraban como esporas criopreservadas a -20°C , en un medio de cultivo con leche.
- Se inoculó una alícuota de la suspensión de esporas criopreservadas (200 μl) en tubos de ensayo con Caldo Saboraud (2 ml). Incubamos los tubos a $25 - 28^{\circ}\text{C}$ de temperatura por aproximadamente 7 días o hasta observar el desarrollo de micelio fungoso.
- El micelio de los hongos así obtenidos se inocularon en tubos de ensayo que contenían Agar Saboraud en pico de flauta.
- Los tubos se incubaron a $25 - 28^{\circ}\text{C}$ para permitir el desarrollo del hongo y luego se almacenaron para obtener a partir de su cultivo los filtrados a ser evaluados en su actividad inhibitoria in vitro sobre *R. solani*.

4.3.2 Obtención de los filtrados de cultivo de hongos del cepario del IIFB y del CIN - Viacha

4.3.2.1 Obtención y recuento de esporas

- Se dispuso de 20 hongos pertenecientes al cepario del IIFB y 8 hongos aislados de tierras de cultivo de papa del CIN – Viacha (Tabla N° 2)

Tabla N°2: Hongos del cepario del IIFB y hongos aislados del CIN- Viacha

HONGOS DEL CEPARIO DEL IIFB		HONGOS DEL CIN - VIACHA	
CODIGO	IDENTIFICACION	CODIGO	IDENTIFICAICON
8	<i>Aspergillus sp.</i>	3V	<i>Aspergillus sp.</i>
10	No identificado	4V	<i>Streptomyces sp.</i>
11	<i>Rhopalomyces sp.</i>	5V	<i>Acaulopage sp.</i>
16	<i>Fusarium sp.</i>	6V	<i>Syncephalastrum sp.</i>
18	<i>Basidiobotrys sp.</i>	7V	No identificado
30	No identificado	8V	No identificado
34	No identificado	9V	No identificado
36	<i>Gliocephalis sp.</i>	10V	No identificado
38	<i>Streptomyces sp.</i>		
67	<i>Penicillium sp.</i>		
88	No identificado		
138	No identificado		
162	<i>Periconia sp.</i>		
160	<i>Geotrichum sp.</i>		
174	No identificado		
170	<i>Verticillium sp.</i>		
176	<i>Aspergillus sp.</i>		
220	<i>Trichoderma sp.</i>		
277	<i>Cefalosporium sp.</i>		
483	<i>Haloporangium sp.</i>		

- Se dispuso de 20 hongos del cepario del IIFB y 8 hongos aislados del CIN en tubos con Agar Sabraud en pico de flauta.
- De cada hongo se obtuvo una suspensión de esporas mediante lavado con tampón Tankuay (ANEXO 1).
- Realizando diluciones con el mismo tampón se preparó una suspensión con una concentración de 1×10^6 esporas/ml, el recuento de las esporas se realizó con la ayuda de una cámara de Neubauer.

4.3.2.2 Inoculación en los medios de cultivo

- Para cada hongo se dispuso de 4 matraces Erlenmeyer (250 ml), 2 de ellos con Caldo Papa Dextrosa (CPD) (200 ml) y 2 con Caldo Sabraud (200 ml).
- Los 4 matraces se inocularon con 200 ul de la suspensión de esporas ya preparada.
- Un matraz con CPD y otro con Caldo Sabraud se incubaron en condiciones de agitación en un Shaker a una velocidad de 150 r.p.m. por un lapso de 7 días; los otros 2 matraces: uno con

CPD y otro con Caldo Saboraud se incubaron en condiciones estacionarias por un lapso de 14 días.

- La temperatura de incubación para los 4 matraces fue de 28°C. (Tabla N°3).

Tabla N°3: Disposición de los matraces para la obtención de los filtrados de cultivo de hongos del cepario del IIFB y del CIN.

Cultivo en Batch	Medio de Cultivo		Tiempo de incubación	Temperatura de incubación
	CPD	C. Saboraud		
Agitación	1 Matraz	1 Matraz	7 días	28°C
Estacionario	1 Matraz	1 Matraz	14 días	28°C

- Las tomas de muestra de los filtrados de cultivo se realizaron de la siguiente manera:
 - Matraces en agitación: Se tomaron 7 muestras del medio de cultivo (10 ml) en tubos de ensayo estériles, cada 24 horas durante 7 días.
 - Matraces en estacionario: Se tomaron 7 muestras de medio de cultivo (10 ml) en tubos de ensayo estériles cada 48 horas durante 14 días.
- Inmediatamente colectadas las muestras se centrifugaron a 3500 r.p.m. por 15 minutos.
- Los sobrenadantes así obtenidos constituyen los filtrados de cultivo, los cuales se almacenaron en viales estériles a – 20°C, debidamente rotulados con el código del hongo, tiempo de toma de muestra, condiciones de incubación y el medio de cultivo del cual se extrajo la muestra, para posteriormente evaluar su actividad inhibitoria in vitro sobre *R. solani*.

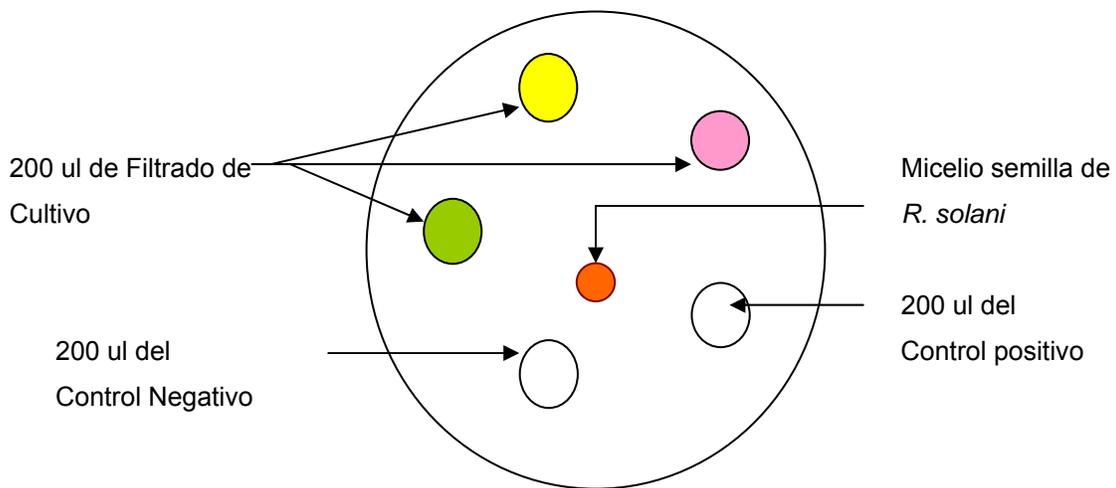
4.4 Evaluación de la actividad biológica Inhibitoria in vitro de los filtrados de cultivo de hongos del cepario del IIFB y del CIN- Viacha sobre *R. solani*

4.4.1 Evaluación de la actividad biológica inhibitoria in vitro de los filtrados de cultivo por el método de difusión en placa

- La evaluación de la actividad biológica inhibitoria de los filtrados de cultivo obtenidos se realizó por el método de difusión en agar, que consiste en:

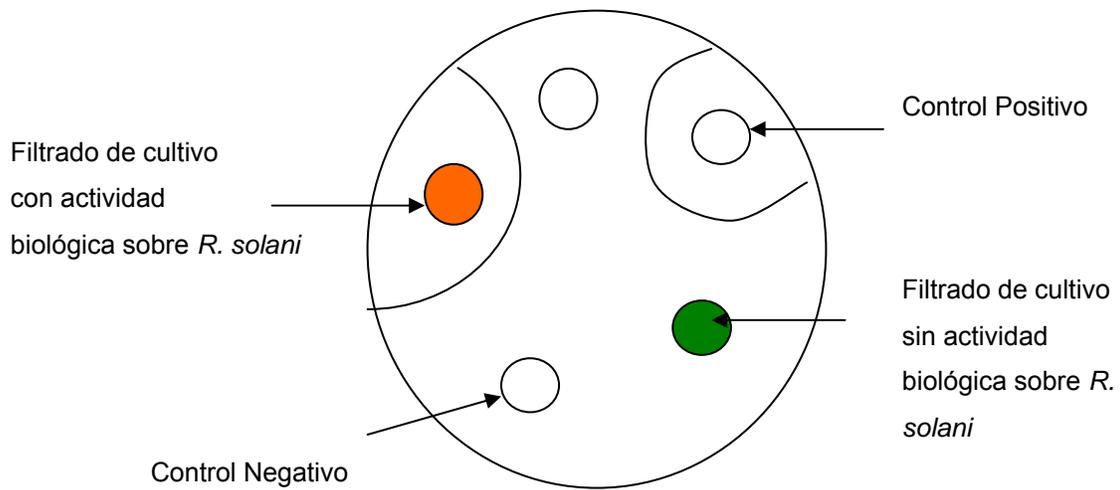
- En placas Petri de 10 cm de diámetro con medio APD (20 ml) se realizaron 5 horadaciones o pozos en el agar, con la ayuda de un sacabocados de 1 cm de diámetro, ubicados equidistantemente en cada extremo de la placa a 1 cm del borde externo. (Fig. N° 2).
- En el centro de la placa se colocó el micelio semilla de *R. solani*.
- En uno de los 5 pozos se colocó una solución de fungicida químico: Benlate (0.035%) (200 ul) como control positivo, en otro pozo CPD (200 ul) como control negativo.
- En los otros 3 pozos se colocaron 200 ul de los filtrados de cultivo a ser evaluados.
- Las placas Petri se incubaron a 16 – 25°C por el lapso de 5 a 10 días hasta que el micelio de *R. solani* llegue al borde externo de la placa.

Fig. N° 2: Esquema de la evaluación de la actividad biológica inhibitoria de los filtrados de cultivo sobre *R. solani* por el método de difusión en placa.



- Las relaciones de antagonismo o la presencia de actividad biológica inhibitoria se observaron cuando el micelio de *R. solani* dejó de desarrollar en las proximidades del pozo que contenía el filtrado con actividad biológica sobre *R. solani*. Por el contrario cuando el micelio desarrolló con normalidad, cubriendo totalmente el área cercana al pozo hasta alcanzar el borde externo de la placa Petri, significó que el filtrado no poseía actividad biológica sobre *R. solani*. (Fig. N° 3).

Fig N° 3: Presencia y ausencia de actividad biológica inhibitoria sobre *R. solani* de los filtrados de cultivo por el método de difusión en placa



- Los hongos del cepario del IIFB y del CIN que produjeron un filtrado de su cultivo con actividad biológica inhibitoria sobre *R. solani* fueron seleccionados para los ensayos posteriores.

4.4.2. Obtención de filtrados de cultivo de los hongos seleccionados, utilizando diferentes medios de cultivo

- Se dispuso de los hongos seleccionados en tubos de ensayo con Agar Saboraud en pico de flauta. A partir de estos se obtuvo una suspensión de esporas con 1×10^6 esporas/ml de tampón Tanquay.
- Para cada hongo se dispuso de 10 matraces Erlenmeyer (250 ml), 2 de ellos con Caldo Czapek (CCK), 2 con Caldo Glucosado de Saboraud, 2 con Caldo Harina de Maiz (CHM), 2 con Caldo Miel (CM) y 2 con Caldo Arroz (CA), con 200 ml de cada medio de cultivo por matraz.
- Los 10 matraces de inocularon con 200 μ l de la suspensión de esporas ya preparada.
- Un matraz de cada par de tipo de medio de cultivo se incubó en condiciones de agitación en un Shaker a una velocidad de 150 r.p.m. por el lapso de 7 días. Y el otro matraz se incubó en condiciones estacionarias por el lapso de 14 días.
- La temperatura de incubación para todos los matraces fue de 28°C. (Tabla N°4).

Tabla N°4: Disposición de los matraces para la obtención de los filtrados de cultivo de los hongos seleccionados, utilizando diferentes medios de cultivo.

Cultivo en Batch	Medio de Cultivo					Tiempo de incubación	Temperatura de incubación
	CCK	CGS	CHM	CM	CA		
Agitación	1 Matraz	1 Matraz	1 Matraz	1 Matraz	1 Matraz	7 días	28°C
Estacionario	1 Matraz	1 Matraz	1 Matraz	1 Matraz	1 Matraz	14 días	28°C

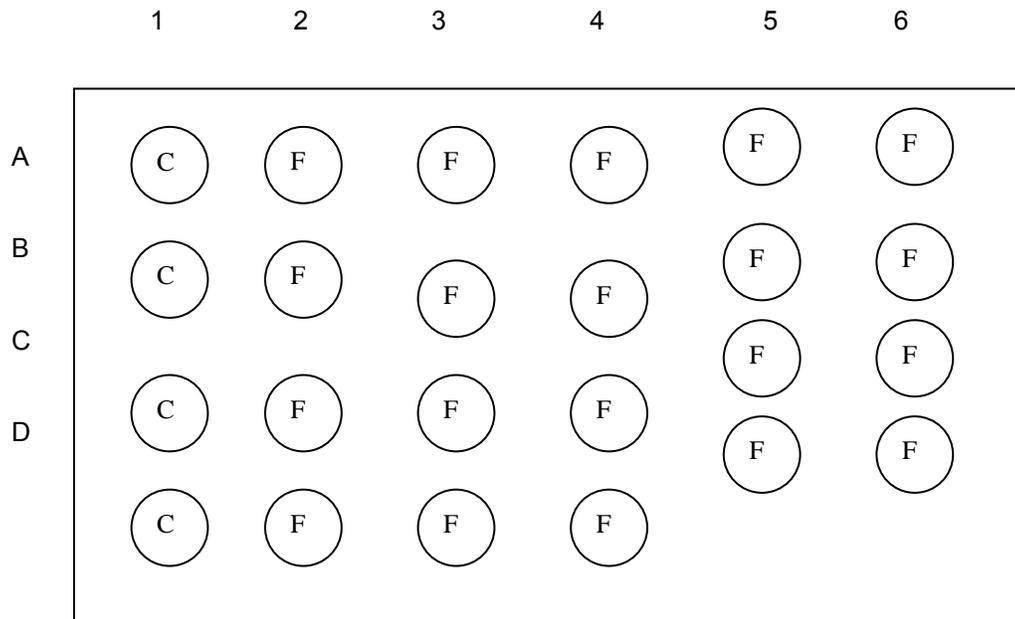
- Las tomas de muestra de los filtrados de cultivo se realizaron de la siguiente manera:
 - Matraces en agitación: Se tomaron 7 muestras del medio de cultivo (10 ml) en tubos de ensayo estériles, cada 24 horas durante 7 días.
 - Matraces en estacionario: Se tomaron 7 muestras de medio de cultivo (10 ml) en tubos de ensayo estériles cada 48 horas durante 14 días.
- Inmediatamente colectadas las muestras se centrifugaron a 3500 r.p.m. por 15 minutos.
- Los sobrenadantes que constituyen los filtrados de cultivo se almacenaron en viales estériles a – 20°C, debidamente rotulados con el código del hongo, tiempo de toma de muestra, condiciones de incubación y el tipo de medio de cultivo del cual se extrajo la muestra, para posteriormente evaluar su actividad inhibitoria in vitro sobre *R. solani* y determinar si existen diferencias de dicha actividad, cuando los hongos seleccionados se dejan desarrollar en diferentes medios de cultivo líquidos para hongos.

4.4.2 Evaluación de la actividad biológica inhibitoria in vitro de los filtrados de diferentes medios de cultivo de los hongos seleccionados sobre *R. solani* por el método de dilución.

- La evaluación de la actividad biológica inhibitoria de los filtrados de diferentes medios de cultivo obtenidos se realizó por el método de dilución, que consiste en la incorporación del ingrediente activo en el medio de cultivo (APD).
- Este ensayo se realizó en microplacas de 24 pozos. La evaluación de la actividad para los controles positivo, negativo y de los filtrados de cultivo, se realizó por duplicado.
- Se colocó Caldo Papa Dextrosa (CPD) (1 ml) en los dos primeros pozos de la microplaca como control positivo de crecimiento, donde se espera el desarrollo del micelio de *R. solani*, (Pozos: A1 y B1). Posteriormente en los siguientes dos pozos hacia abajo, se colocó una solución de

un fungicida químico: Benlate (0.035%) (1 ml) como control negativo de crecimiento, donde no se espera que *R. solani* desarrolle, (Pozos: C1 y D1). En los demás pozos se colocó 1 ml de una dilución $\frac{1}{2}$ de los filtrados de cultivo provenientes del CPD. (Fig. N° 4). Es decir cada microplaca nos sirvió para evaluar 10 filtrados de cultivo.

Fig. N°4: Distribución de los controles positivo, negativo y filtrados de cultivo en una microplaca de 24 pozos.



Donde C+: Dilución $\frac{1}{2}$ del fungicida químico Benlate en CPD: (0.035%) (1 ml)

C -: Caldo Papa Dextrosa (1 ml)

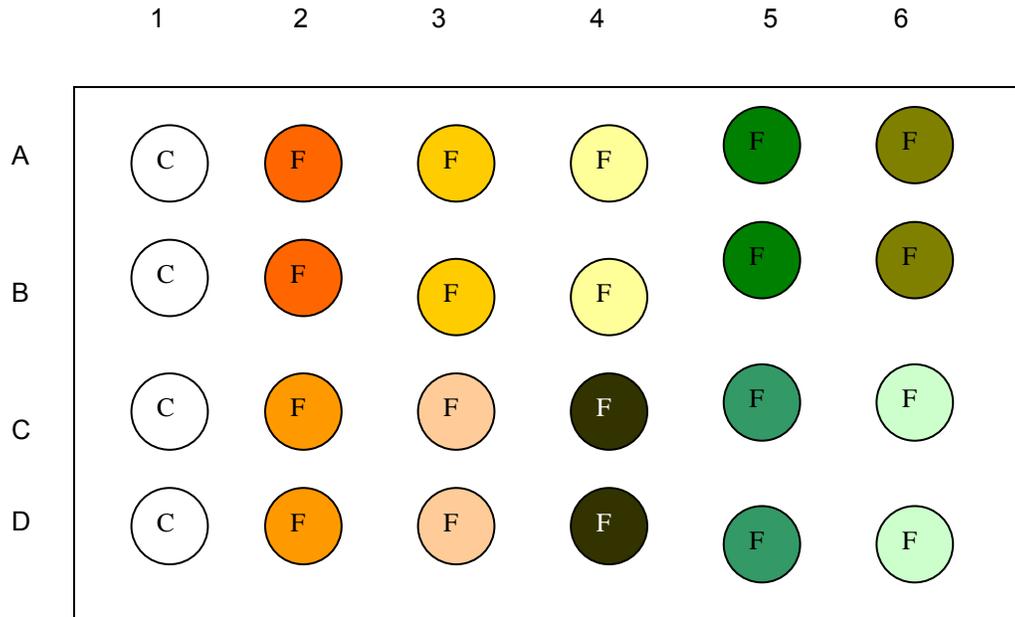
F: Dilución $\frac{1}{2}$ de los filtrados de cultivo en CPD (1ml)

- Luego se procedió a colocar en cada uno de los 24 pozos el micelio semilla de *R. solani*.
- Las microplacas de incubaron a 16 – 25°C de temperatura por aproximadamente 6 días, o hasta que el micelio de *R. solani* cubra el área de los pozos C -.
- La evaluación de los resultados se realizó de la siguiente manera:
 - Presencia de actividad biológica inhibitoria: Se observó como la ausencia de desarrollo de *R. solani* en aquellos pozos que contenían un filtrado de cultivo con actividad biológica inhibitoria.
 - Ausencia de actividad biológica inhibitoria: Se observó el desarrollo del micelio de *R. solani* en aquellos pozos que contenían un filtrado de cultivo sin actividad biológica inhibitoria.
- Finalmente se determinó la potencia inhibitoria de los filtrados de cultivo con actividad biológica sobre *R. solani*:
- El ensayo se realizó en forma similar al anterior, mediante la realización de diluciones seriadas de los filtrados de cultivo con actividad: 1/ 2, 1/ 4, 1/8, 1/16, 1/32 y 1/64 con CPD; con el fin de determinar hasta qué dilución el filtrado de cultivo aún presenta actividad biológica inhibitoria

sobre *R. solani*, siendo este filtrado considerado como el de mayor potencia y el hongo que lo produce será igualmente seleccionado.

- Para los controles positivo, negativo y para cada dilución del filtrado de cultivo, se trabajó por duplicado, es decir que una microplaca de 24 pozos nos sirvió para evaluar 2 filtrados de cultivo.
- Se colocó Caldo Papa Dextrosa (CPD) (1 ml) en los dos primeros pozos de la microplaca como control positivo de crecimiento, donde se espera el desarrollo del micelio de *R. solani*, (Pozos: A1 y B1). Posteriormente en los siguientes dos pozos hacia abajo, se colocó una solución de un fungicida químico: Benlate (0.035%) (1 ml) como control negativo de crecimiento, donde no se espera que *R. solani* desarrolle, (Pozos: C1 y D1). En los demás pozos se colocó las diferentes diluciones de los filtrados de cultivo a ser evaluados (1 ml). (Fig. N° 5).

Fig. N°5: Distribución de los controles positivo, negativo y las diluciones seriadas de los filtrados de cultivo en una microplaca de 24 pozos.



Donde:

Pozos: A1 y B1: Control Positivo C+: Dilución $\frac{1}{2}$ del fungicida químico Benlate en CPD: (0.035%) (1 ml)

Pozos: C1 y D1: Control Negativo C-: Caldo Papa Dextrosa (1 ml)

Pozos A2 y B2: Dilución 1/ 4 del filtrado de cultivo con actividad en CPD (1ml)

Pozos C2 y D2: Dilución 1/ 8 del filtrado de cultivo con actividad en CPD (1ml)

Pozos A3 y B3: Dilución 1/ 16 del filtrado de cultivo con actividad en CPD (1ml)

Pozos C3 y D3: Dilución 1/ 32 del filtrado de cultivo con actividad en CPD (1ml)

Pozos A4 y B4: Dilución 1/ 64 del filtrado de cultivo con actividad en CPD (1ml)

- Luego se procedió a colocar en cada uno de los 24 pozos el micelio semilla de *R. solani*.
- Las microplacas de incubaron a 16 – 25°C de temperatura por aproximadamente 6 días, o hasta que el micelio de *R. solani* cubra el área del pozo.
- La evaluación de los resultados se realizó de la siguiente manera:
 - Presencia de actividad biológica inhibitoria: Se observó como la ausencia de desarrollo de *R. solani* en aquellos pozos que contenían la dilución del filtrado de cultivo que aún posee actividad biológica inhibitoria.
 - Ausencia de actividad biológica inhibitoria: Se observó el desarrollo del micelio de *R. solani* en aquellos pozos que contenían la dilución del filtrado de cultivo sin actividad biológica inhibitoria.
 - Ausencia de actividad biológica inhibitoria: Se observó el desarrollo del micelio de *R. solani* en aquellos pozos que contenían la dilución del filtrado de cultivo sin actividad biológica inhibitoria.

4.4.4 Criterios de selección de la cepa del hongo a ser utilizado en las pruebas de campo

Para la selección del hongo a ser utilizado en las pruebas de campo se tomaron en cuenta los siguientes aspectos:

- Se seleccionó el hongo que produce un filtrado de cultivo cuya dilución más alta es aún capaz de inhibir el desarrollo de *R. solani* in vitro.
- Se dio preferencia al hongo cuyo filtrado de cultivo presentó actividad biológica inhibitoria sobre *R. solani* in vitro, que sea proveniente de la localidad de Viacha, con el fin de no romper el equilibrio microbiano, introduciendo cepas fúngicas que no se encontraban en ese lugar.
- Debido a que el filtrado de cultivo deberá obtenerse en mayor volumen:
- El medio de cultivo seleccionado deberá ser de preferencia de composición lo más simple posible, para que su preparación en grandes volúmenes sea económico, es así que se dio

preferencia a los medios de cultivo: Caldo Papa Dextrosa, Caldo Arroz, Caldo Miel, Caldo Harina de Maíz, y Caldo Zanahoria Papa.

- Se dio preferencia a las condiciones de cultivo estacionarias, por la mayor comodidad que representa esta variante en relación a las condiciones de agitación, pensando en una posible implementación del proceso en el campo, transfiriendo tecnología que no resulte cara ni compleja de instalar.
- Analizando estos aspectos se eligió al hongo *Aspergillus sp.* (Código 3V), aislado de los campos de siembra de papa del CIN de la localidad de Viacha, debido a que en condiciones de cultivo estacionarias y en Caldo Papa Dextrosa, su filtrado de cultivo posee buena actividad biológica inhibitoria sobre *R. solani* in vitro, además de que este hongo no es dañino para la planta de papa, esto se determinó de la siguiente manera:

4.4.5. Prueba de inocuidad del hongo seleccionado en plantas de papa in vitro e in vivo

- Debido a que el filtrado de cultivo del hongo seleccionado a ser aplicado en las parcelas de plantas de papa no estará totalmente libre de esporas, fue necesario verificar la inocuidad del hongo seleccionado: *Aspergillus sp.* para la planta de papa, realizándose los siguientes experimentos:
- Ensayo in vitro: Se tomaron muestras de plantas de papa de los campos de cultivo del CIN: tubérculo, raíz, hojas y tallos, se cortaron fragmentos de raíces y tallos de 1 cm de longitud aproximadamente y fragmentos de tubérculos y hojas que fueron sumergidas por 5 minutos en solución de hipoclorito de sodio (1.0%), lavados varias veces en agua destilada estéril, secados y transferidos asépticamente a placas Petri de 10 cm de diámetro que contenían círculos de papel filtro estériles humedecidos con agua destilada estéril. Cada muestra se colocó en dos placas Petri, para tener un testigo al que no se aplicó las esporas de *Aspergillus sp.*
- Se preparó una suspensión de esporas de *Aspergillus sp.* con una concentración de 10^6 esporas/ml en solución fisiológica estéril.
- Esta suspensión se inoculó en diferentes lugares de la planta (20 ul).
- Se incubaron las placas Petri a 25 – 30°C por el lapso de 10 días, humedeciendo el papel filtro con agua destilada estéril de vez en cuando para evitar que se seque y el fragmento vegetal permanezca fresco más tiempo para realizar las observaciones.

- Finalmente se observó si el hongo inoculado en las diferentes muestras de la planta producía algún daño en el tejido vegetal, comparando con el testigo sin aplicación de las esporas del hongo.
- Ensayo in vivo: En los campos de cultivo de papa del CIN se tenían plantas de papa en forma aislada producto de la germinación de semillas no cosechadas, en el follaje de estas plantas y en la tierra circundante a donde nacía el tallo, se aplicó la suspensión de esporas de *Aspergillus sp.* de una concentración de 10^6 esporas/ml (50 ml) por planta en 4 plantas, con la ayuda de un aspersor mecánico.
- Al cabo de 15 días se observó si el hongo había producido algún tipo de daño en la planta, comparando con otras plantas a las que no se les aplicó el hongo.

4.5 Evaluación de la actividad biológica inhibitoria del filtrado de cultivo del hongo seleccionado en parcelas de cultivo de papa

4.5.1. Determinación del área de trabajo

- Las pruebas de campo se realizaron en los campos de cultivo de papa del CIN de la localidad de Viacha, una localidad ubicada en la provincia Ingavi del departamento de La Paz.
- El ensayo se realizó en las estaciones de verano – otoño, durante los meses de noviembre del año 2002 al mes de mayo del año 2003.

4.5.2. Preparación del terreno de cultivo

- Se dispuso de dos parcelas de tierra cada una de 20 m^2 de superficie, denominadas camas protegidas de producción de semilla de papa. Ambas camas estaban rodeadas por una pared de aproximadamente 1 m de altura, construida de adobe (bloques hechos de barro a manera de ladrillos) esto nos permitió tener las áreas de ensayo en forma aislada para un manejo más controlado, además que proveen un área de protección contra las heladas, creando un microclima favorable.
- A la tierra de ambas camas se aplicaron con anterioridad materia orgánica vegetal, que consistió en tierra húmeda proveniente de las cumbres nevadas del departamento de La Paz. Debido a que la papa responde bien al aporte de materia orgánica, este estercolado mejora las condiciones físicas del suelo, lo que beneficia el desarrollo del tubérculo. Este aporte

orgánico a la tierra debió ser incorporado algún tiempo antes de la siembra para evitar el desarrollo de las enfermedades de la planta de papa.

- Se procedió a remover la tierra de ambas camas con el objeto de aflojarla, eliminar malezas e incorporar nitrógeno y oxígeno.

4.5.3. Obtención del filtrado de cultivo para ser evaluado en las parcelas de cultivo de papa

4.5.3.1. Preparación del inóculo

- Se dispuso del hongo seleccionado (Código 3V) identificado como *Aspergillus sp.* aislado del CIN – Viacha en tubos con APD en pico de flauta.
- De cada tubo se obtuvo una suspensión de esporas mediante lavado con tampón Tankuay (ANEXO 1).
- Realizando diluciones con el mismo tampón se preparó otra suspensión con una concentración de 1×10^6 esporas/ml, el recuento de las esporas se realizó con la ayuda de una cámara de Neubauer.

4.5.3.2. Preparación del medio de cultivo

- Para la primera aplicación en las parcelas de cultivo de papa del CIN – Viacha se preparó 5 litros de medio de cultivo líquido: CPD en 6 matraces Erlenmeyer (1 litro).

4.5.3.3 Inoculación del hongo seleccionado en los medios de cultivo

- Los 6 matraces se inocularon con 1.6 ml de la suspensión de esporas ya preparada.
- Los 6 matraces se incubaron en condiciones estacionarias por un lapso de por lo menos 2 semanas, hasta que el medio de cultivo adquiriera el color amarillo característico luego de las cuales la colonia del hongo que desarrolló se separó del medio de cultivo obteniéndose así el filtrado de cultivo a ser evaluado en las parcelas de cultivo de papa.
- La temperatura de incubación para los 6 matraces fue de 28°C.

Obtención de los sobrenadantes de cultivo para ser aplicados en el campo



4.5.4. Distribución de los tratamientos

- Utilizando láminas de lata, cada cama protegida se dividió en ocho partes, para tener un total de 16 unidades experimentales.
- El diseño experimental consistió en aplicar cuatro tratamientos con cuatro repeticiones de cada uno y 30 plantas por unidad experimental; los tratamientos fueron identificados como: T+, T-, C15 y C30 y su distribución en ambas camas protegidas es la siguiente:

FigN°6: Distribución de los tratamientos: testigos sin tratar, testigo con tratamiento químico y tratamiento con el filtrado de cultivo en las dos camas de cultivo.

Cama N° 1

T +	T -	C15	C30	C15	C30	T +	T -
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Cama N° 2

T -	C15	C30	T+	T -	C15	C30	T +
-----	-----	-----	----	-----	-----	-----	-----

Donde:

T +: Testigos que recibieron tratamiento con un fungicida de origen químico.

En estas cuatro unidades se aplicó cada 30 días fungicidas comerciales de origen químico, intercalando un fungicida de acción sistémica: Bravo 500 (dosis: 1 ml/l agua, 5 litros) con otro fungicida de contacto: Ramcaf 200 (dosis de 1 g/l, 5litros).

T -: Testigos que no recibieron ningún tratamiento antifúngico

C15: En estas 4 unidades se aplicó el filtrado de cultivo (5 l) cada 15 días

C30: En estas 4 unidades se aplicó el filtrado de cultivo (5 l) cada 30 días

Para la aplicación de los fungicidas y filtrados de cultivo se utilizó una bomba de aspersion manual.

4.5.5. Siembra de la semilla de papa

- El mes de noviembre del año 2002, luego de preparar la tierra se aplicó un insecticida químico: Lorsdan (5l), con la ayuda de una bomba de aspersion manual.
- Se aplicó el fungicida químico de acción sistémica (5l) a las unidades T + y el filtrado de cultivo (2l) a las unidades C15 y C30, con la ayuda de una bomba de aspersion manual.
- Se sembró 240 tubérculos – semilla de papa de la variedad Waych' a.
- En cada unidad experimental se realizaron manualmente 4 surcos, entre los cuales se sembró a una densidad de 30 tubérculos – semilla por unidad experimental, teniéndose un total de 240 tubérculos – semilla sembrados en ambas camas protegidas. La profundidad de la plantación fue de alrededor de 10 cm de profundidad.
- Referente a las necesidades de agua, no se tuvo la necesidad de aplicar riego ya que por la época el aporte de agua provino solamente de las lluvias. Siendo que el exceso de humedad detiene el desarrollo de los tubérculos y favorece enfermedades criptogámicas como el mildiu o la podredumbre (de ahí que la papa prefiera los suelos sueltos y bien drenados).

4.5.6. Aplicación de los tratamientos

- Durante el mes de diciembre al mes de abril se aplicaron mensualmente y en forma intercalada el fungicida químico de acción sistémica (5l) con el fungicida químico de contacto (5l) y el filtrado de cultivo cada 15 y 30 días en cada una de las unidades correspondientes según la distribución ya mencionada.

- En las unidades T+ y C30 se realizaron un total de 5 aplicaciones de fungicida químico. En las unidades C15 se realizó un total de 10 aplicaciones del filtrado de cultivo.

4.5.7. Cosecha de los tubérculos

- La recolección de los tubérculos se realizó a principios del mes de mayo del año 2003, en forma manual.
- Los tubérculos – semilla se recolectaron en forma separada por cada tratamiento, obteniéndose cuatro grupos: los tubérculos – semilla que provinieron de las unidades T +, T-, C15 y C30.

4.5.8. Evaluación de las plantas de papa y los tubérculos – semilla

- El mes de marzo del año 2003 cuando las plantas presentaron considerable altura y follaje, se evaluaron los signos de la enfermedad, observando si existía la formación de tubérculos aéreos, necrosis, estrangulación en los tallos o amarillamiento de las hojas
- Una vez finalizada la cosecha de los tubérculos – semilla, con la ayuda de una balanza se obtuvo el peso de cada uno de los 4 grupos. De cada grupo se seleccionaron y separaron los tubérculos con signos de rizoctoniasis, observando la presencia de ojos ciegos, deformación, presencia de costras negras. Finalmente se obtuvo los pesos parciales de los tubérculos sanos y de los enfermos.
- Con los pesos se obtuvo los rendimientos de cada unidad experimental y el porcentaje de tubérculos enfermos o afectados con rizoctoniasis de cada unidad, para determinar si el filtrado de cultivo aplicado tuvo acción en el control de la rizoctoniasis, en relación al testigo con tratamiento químico y al testigo sin tratar.

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1 Aislamiento de *Rhizoctonia solani* y de hongos de tierra del CIN - Viacha

A partir de las costras negras de tubérculos de papa afectados con rizoctoniasis se aisló una colonia de *Rhizoctonia solani* que en medio APD produjo una colonia marrón claro característica, siendo identificada macroscópica, microscópicamente por la ramificación de las hifas con un ángulo de 90° que fue el medio para identificar al hongo como *R. solani*. y por comparación con nuestra cepa de referencia como *R. solani*.

Un total de 12 muestras de tierra fueron recolectadas de los terrenos destinados al cultivo de papa del CIN de la localidad de Viacha, a partir de las cuales se aislaron 10 hongos: *Alternaria sp.*, *Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.*, *Streptomyces sp.*, *Acaulopage sp.*, *Actinomycece sp.* y 4 hongos no identificados.

Los filtrados de cultivo de estos hongos fueron evaluados como posibles antagonistas in vitro de *R. solani*, excepto *Alternaria sp.* y *Fusarium sp.* debido a su potencial patogenicidad para los cultivos de papa, *Alternaria sp.* por ser causante del tizón temprano de la papa y *Fusarium sp.* por producir la fusariosis de la papa.

5.2 Determinación de las condiciones de cultivo óptimas y cinética de crecimiento de *Rhizoctonia solani*

5.2.1 Determinación de las condiciones de cultivo óptimas y cinética de crecimiento en medio de cultivo sólido de *R. solani*

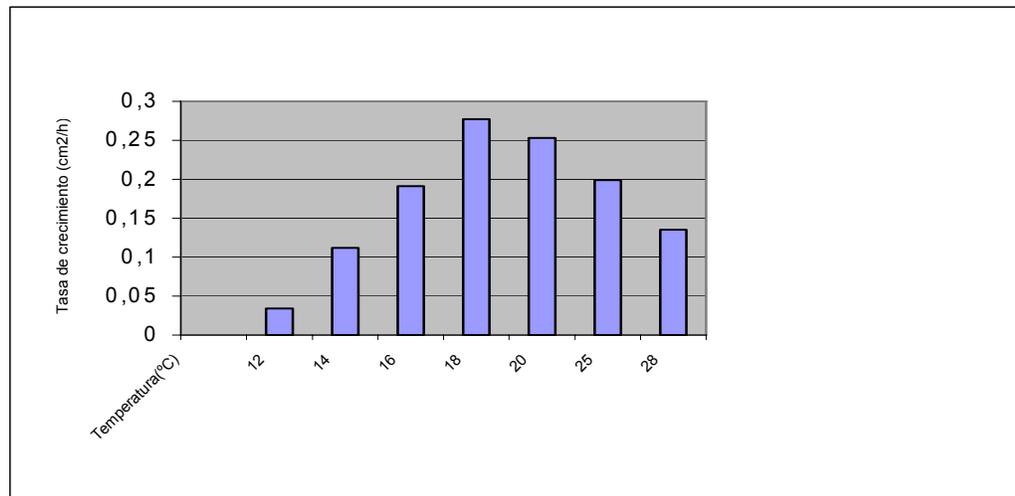
5.2.1.1 Determinación de la temperatura óptima de desarrollo de *R. solani*

Tres parámetros cardinales describen la influencia de la temperatura en el crecimiento de los hongos, las cuales son: temperatura mínima, temperatura óptima y temperatura máxima.

Las curvas de crecimiento (Figura N° 7) provenientes del desarrollo de *R. solani* a 12°C, 14°C, 16°C, 18°C, 20°C, 25°C y 28°C, muestran una forma típica de crecimiento exponencial como producto de la dinámica enzimática del organismo sujeto a fluctuaciones de temperatura. Los resultados de las mediciones diarias del crecimiento del frente hifal se muestran en el ANEXO N° 3. Se observó que *R. solani* muestra una tasa de crecimiento micelial muy baja (0.012) cuando

desarrolla a 12°C, la tasa de crecimiento micelial se va incrementando gradualmente en proporción al incremento de la temperatura hasta llegar a una tasa de crecimiento micelial máxima (0.277) cuando desarrolla a 18°C, la tasa de crecimiento micelial va disminuyendo nuevamente cuando *R. solani* desarrolla a temperaturas mayores a los 28°C. Con este experimento pudimos determinar que la temperatura mínima de crecimiento de *R. solani* es de 16°C, la temperatura óptima de 18°C y la temperatura máxima de 25°C.

Figura N°7: Crecimiento micelial de *R. solani* en diferentes temperaturas.



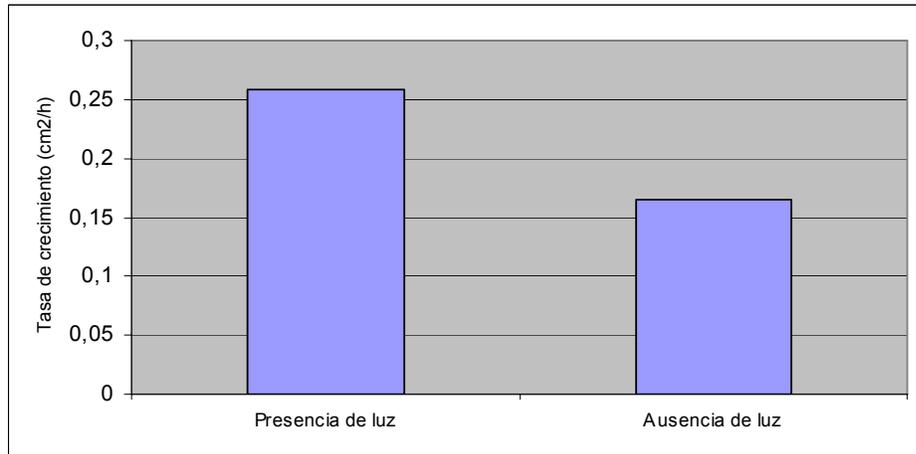
5.2.1.2 Determinación de la influencia de la luz en el desarrollo de *R. solani*

Muchos hongos muestran una marcada dependencia de ciertas longitudes de onda del espectro visible para la descarga de sus estructuras reproductivas, ya que determinadas longitudes de onda precisas intervienen en la activación de varias secuencias bioquímicas relacionadas con la producción de energía para el desarrollo de las estructuras de reproducción.

Los resultados de las mediciones diarias del crecimiento del frente hifal de *R. solani* en presencia y ausencia de luz se muestran en el ANEXO N° 4 y la gráfica de las tasas de crecimiento micelial en la Figura N° 8.

Se observó que *R. solani* desarrolla con mayor rapidez en presencia de luz blanca (tasa de crecimiento micelial de 0.258 cm²/h) que en ausencia de luz blanca (tasa de crecimiento micelial de 0.1654 cm²/h) incubado a 18°C de temperatura.

Figura N° 8: Crecimiento micelial de *R. solani* en presencia y ausencia de luz.

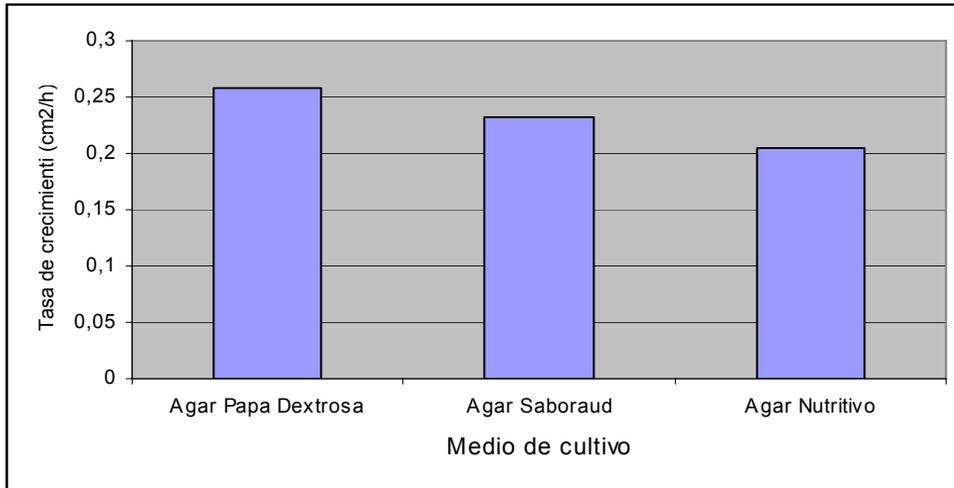


5.2.1.3 Determinación del medio de cultivo sólido óptimo para el desarrollo de *R. solani*

La variedad de plantas que por alguna razón no producen alguna de las sustancias esenciales para la supervivencia de un patógeno serían resistentes al patógeno ya que éste necesitaría de esa sustancia. Así para que *R. solani* infecte una planta esta última debe contar con alguna sustancia necesaria para la formación de un “colchón de hifas” a partir del cual *R. solani* envía hacia la planta sus hifas de penetración. De esta manera se observó que *R. solani* desarrolla con mayor rapidez en el medio de cultivo sólido: Agar Papa Dextrosa (APD) (tasa de crecimiento micelial de 0.258 cm²/h), en comparación con su desarrollo en Agar Nutritivo (tasa de crecimiento micelial de 0.205 cm²/h) y a su desarrollo en Agar Sabouraud (tasa de crecimiento micelial de 0.233 cm²/h). Constituyéndose el APD en el medio de cultivo sólido más apropiado para promover un buen desarrollo de *R. solani*, seguido del Agar Sabouraud que por ser más ácido (pH 5.6) que el Agar Nutritivo (pH 7.2) promueve mejor el desarrollo de los hongos.

La gráfica de las tasas de crecimiento de *R. solani* en los tres medios de cultivo se muestran en la Figura N° 9 y los resultados de las mediciones diarias del crecimiento del frente hifal se muestran en el ANEXO N° 5.

Figura N° 9: Crecimiento micelial de *R. solani* en diferentes medios de cultivo

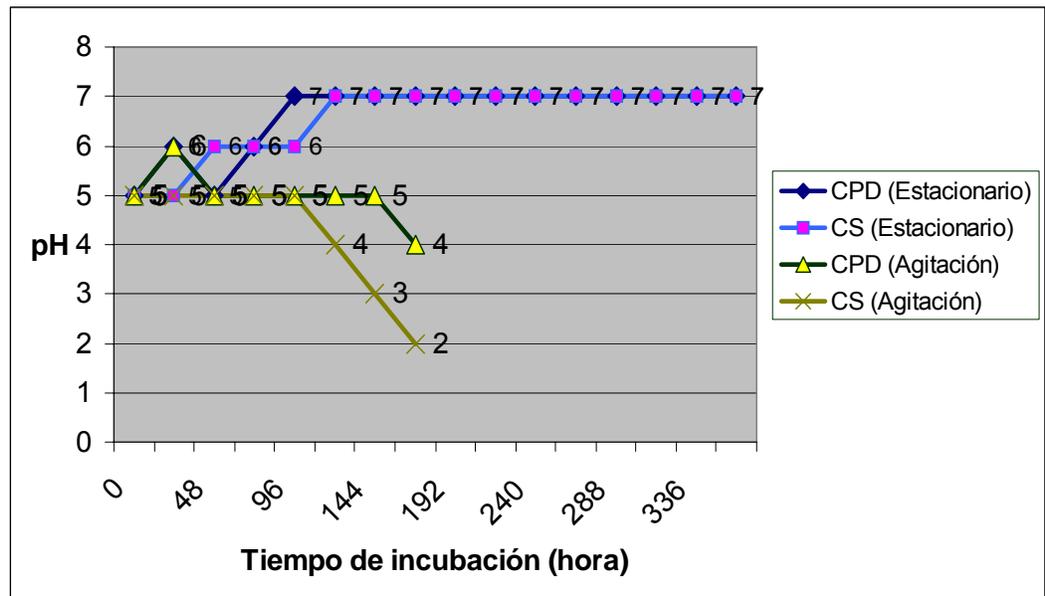


5.2.2 Determinación de la cinética de crecimiento de *R. solani* en medio de cultivo líquido

5.2.2.1 Determinación de la variación del pH

Los resultados de la variación del pH cuando *R. solani* desarrolla en batch en los medios de cultivo líquidos: Caldo Papa Dextrosa (CPD) y Caldo Saboraud (CS), en condiciones de agitación y estacionarias se muestran en las Figuras N° 10.

Figura N° 10: Variación del pH del CPD y CS cuando *R. solani* desarrolla en condiciones de agitación y estacionarias.

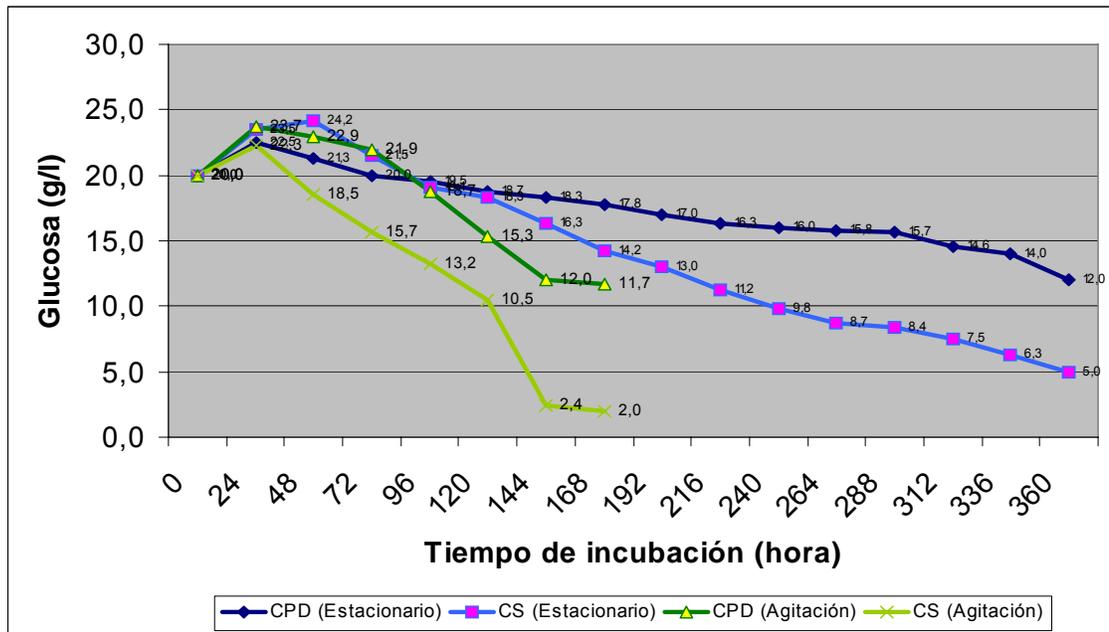


En este experimento se observó que el desarrollo de *R. solani* un medios de cultivo líquido como el CPD y CS produce la variación de su pH en diferente proporción cuando desarrolla en condiciones de agitación y estacionarias. Podemos indicar que las condiciones impuestas, al desarrollo del hongo como las condiciones de agitación y estacionarias influyen en el metabolismo del hongo ya que los cambios del pH en ambas condiciones en el mismo tipo de medio de cultivo fueron diferentes.

5.2.2.2 Determinación de la variación de la concentración de glucosa

Los resultados de la variación de la concentración de glucosa cuando *R. solani* desarrolla en batch en condiciones de agitación y estacionarias se muestran en las Figuras N°11.

Figura N° 11: Variación de la concentración de glucosa del CPD y CS cuando *R. solani* desarrolla en condiciones de agitación y estacionarias.



En este experimento podemos observar que el desarrollo de *R. solani* en CPD y en CS produce una disminución de la concentración de glucosa del medio de cultivo, ya que esta es utilizada por el hongo como fuente de carbono. Sin embargo el grado de la disminución de la concentración de glucosa varía en estos dos tipos de medios de cultivo cuando la condición de la incubación es en condiciones de agitación o estacionarias, observamos que en condiciones de agitación el consumo de la glucosa es más activo que en condiciones estacionarias, disminuyendo más rápidamente la concentración de glucosa. La variación de la concentración de glucosa varía también de acuerdo al tipo de medio de cultivo, es así que en el CS se observa que la glucosa disminuye mucho más que en el CPD en el mismo tiempo de incubación y con el mismo inóculo.

Estas observaciones nos permitieron pensar que podríamos obtener mayor variedad de metabolitos secundarios con posible actividad biológica inhibitoria sobre *R. solani*, si cultivamos los hongos del cepario del IIFB y los aislados del CIN - Viacha en diferentes condiciones de cultivo y también en diferentes tipos de medios de cultivo líquidos, para evaluar la actividad de los filtrados de cultivo obtenidos.

5.3 Obtención de los filtrados de cultivo de los hongos del cepario del IIFB y del CIN – Viacha

Se evaluó un total de 28 hongos: 20 hongos del cepario del IIFB y 8 hongos aislados de tierras del CIN – Viacha. A partir de su cultivo en batch en medios de cultivo líquidos CPD y CS en condiciones de agitación y estacionarias, se obtuvo un total de 784 filtrados de cultivo, 392 de los cuales provinieron del CPD y 392 del CS para ser evaluados en su actividad biológica inhibitoria in vitro sobre *R. solani*.

5.4 Evaluación de la actividad biológica inhibitoria in vitro de los filtrados de cultivo de hongos del cepario del IIFB y del CIN – Viacha sobre *R. solani*

Los resultados de la evaluación de la actividad biológica inhibitoria in vitro de los filtrados de cultivo obtenidos por el método de difusión en placa se muestran en la Tabla N° 5

Tabla N° 5: Actividad biológica inhibitoria de los filtrados de cultivo obtenidos por el método de difusión en placa

HONGOS DEL CIN – VIACHA			
CODIGO	IDENTIFICACION	ACTIVIDAD SOBRE <i>R. solani</i>	FILTRADO DE CULTIVO CON ACTIVIDAD SOBRE <i>R. solani</i>
3V	<i>Aspergillus sp.</i>	Positivo	CPD (A,E) - CS (A,E)
4V	<i>Streptomyces sp.</i>	Negativo	-
5V	<i>Acaulopage sp.</i>	Negativo	-
6V	<i>Syncephalastrum sp.</i>	Positivo	CPD (A,E)
7V	No identificado	Negativo	-
8V	No identificado	Negativo	-
9V	No identificado	Positivo	CPD (A,E) - CS (A)
10V	No identificado	Negativo	-

Donde:

CPD (A,E): CPD obtenido de los matraces incubados en agitación y estacionarias.

CPD (A): CPD obtenido del matraz incubado en condiciones de agitación.

CPD (E): CPD obtenido del matraz incubado en condición estacionaria.

CS (A,E): CS obtenido de los matraces incubados en agitación y estacionarias.

CS (A): CS obtenido del matraz incubado en condiciones de agitación.

CS (E): CS obtenido del matraz incubado en condición estacionaria.

HONGOS DEL CEPARIO DEL IIFB			
CODIGO	IDENTIFICACION	ACTIVIDAD SOBRE <i>R. solani</i>	FILTRADO DE CULTIVO CON ACTIVIDAD SOBRE <i>R. solani</i>
8	<i>Aspergillus sp.</i>	Negativo	-
10	No identificado	Negativo	-
11	<i>Rhopalomyces sp.</i>	Negativo	-
16	<i>Fusarium sp.</i>	Negativo	-
18	<i>Basidiobotrys sp.</i>	Negativo	-
30	No identificado	Positivo	CPD (A,E) - CS (E)
34	No identificado	Negativo	-
36	<i>Gliocephalis sp.</i>	Negativo	-
38	<i>Streptomyces sp.</i>	Positivo	CPD (A,E) - CS (E)
67	<i>Penicillium sp.</i>	Negativo	-
88	No identificado	Positivo	CPD (A)
138	No identificado	Positivo	CPD (A,E) - CS (A,E)
162	<i>Periconia sp.</i>	Negativo	-
160	<i>Geotrichum sp.</i>	Negativo	-
174	No identificado	Negativo	-
170	<i>Verticillium sp.</i>	Positivo	CPD (A,E) - CS (A,E)
176	<i>Aspergillus sp.</i>	Positivo	CPD (E) - CS (E)
220	<i>Trichoderma sp.</i>	Positivo	CPD (A,E) - CS (A,E)
277	<i>Cephalosporium sp.</i>	Negativo	-
483	<i>Haloporangium sp.</i>	Negativo	-

El 36% de los hongos evaluados presentaron actividad biológica inhibitoria sobre *R. solani* in vitro, es decir 10 de los 28 hongos evaluados presentaron actividad biológica. De los 20 hongos evaluados pertenecientes al cepario del IIFB 7 presentaron actividad inhibitoria y de los 8 hongos del CIN – Viacha 3 presentaron actividad inhibitoria in vitro sobre *R. solani*.

Como se observa en la Tabla N°5 todos los casos la actividad biológica inhibitoria sobre *R. solani* estuvieron presentes en filtrados de cultivo provenientes del CPD y en menor proporción en los provenientes del CS, además que la actividad inhibitoria se presentó mayormente en los filtrados de cultivo obtenidos de cultivos en agitación en relación a los obtenidos de cultivos en estacionario.

En la Tabla N° 6 se observa que la actividad inhibitoria sobre *R. solani* se presentó en los filtrados de cultivo obtenidos a partir del tercer día de incubación de cultivos en agitación y a partir del quinto día en filtrados de cultivo obtenidos de cultivos en estacionario.

Tabla N° 6: Filtrados de cultivo líquidos con actividad biológica inhibitoria sobre *R. solani*

HONGOS DEL CEPARIO DEL IIFB				
CODIGO	IDENTIFICACION	FILTRADOS DE CULTIVO CON ACTIVIDAD SOBRE <i>R. solani</i>		
		CPD	CS	
30	No identificado	4A - 7A		
		6E - 7E	7E - 14E	
38	<i>Streptomyces sp.</i>	3A - 7A		
		4E - 14E	7E - 14E	
88	No identificado	5A, 6A		
138	No identificado	3A - 7A	3A - 7A	
		4E - 14E	4E - 14E	
170	<i>Verticillium sp.</i>	3A - 7A	4A - 7A	
		5E - 14E	6E - 14E	
176	<i>Aspergillus sp.</i>			
		5E - 14E	4E - 14E	
220	<i>Trichoderma sp.</i>	3A - 7A	5A - 7A	
		3E - 14E	5E - 14E	
HONGOS DEL CIN - VIACHA				
CODIGO	IDENTIFICACION	FILTRADOS DE CULTIVO CON ACTIVIDAD SOBRE <i>R. solani</i>		
		CPD	CS	
3V	<i>Aspergillus sp.</i>	4A - 7A	5A - 7A	
		5E - 14E	7E - 14E	
6V	<i>Syncephalastrum sp.</i>	5A - 7A		
		6E - 14E		
9V	No identificado	5A - 7A	5A - 7A	
		5E - 14E		

Donde:

4A – 7A: Significa que presentaron actividad biológica inhibitoria sobre *R. solani* los filtrados obtenidos de cultivos en agitación desde el cuarto al séptimo día de incubación.

5E – 14E: Significa que presentaron actividad biológica inhibitoria sobre *R. solani* los filtrados obtenidos de cultivos en estacionario desde el quinto al décimo día de incubación. De esta manera se abreviaron los demás casos.

Los hongos cuyos códigos designados fueron 38 (*Streptomyces sp.*), 138 (no identificado), 170 (*Verticillium sp.*) y 3V (*Aspergillus sp.*) produjeron filtrados de cultivo de color amarillo provenientes de CPD y en menor intensidad de pigmentación los filtrados de cultivo de CS, y el hongo 9V (no identificado) produjo un pigmento verde fosforescente. Estos pigmentos fueron apareciendo en el medio de cultivo en forma gradual a medida que pasaban los días de incubación y el grado de coloración fue más intenso en los filtrados provenientes de cultivos en agitación en relación a los provenientes de cultivos en estacionario. El grado de pigmentación amarilla también se relacionó con la actividad inhibitoria sobre *R. solani*, es así que los filtrados de cultivo obtenidos en los primeros 3 días de incubación cuando la pigmentación no era muy intensa la actividad inhibitoria no fue evidente a diferencia de los filtrados de cultivo obtenidos a partir del sexto día de incubación donde la pigmentación fue más intensa, lo que se relaciona con una evidente actividad inhibitoria sobre *R. solani*. Estas observaciones nos inducen a pensar que los pigmentos producidos posiblemente serían los responsables de conferir la actividad inhibitoria sobre *R. solani* en los filtrados de cultivo.

Los filtrados de cultivo que produjo el hongo cuyo código asignado fue el 220 (*Trichoderma sp.*) presentaron una leve pigmentación verdusca, con una evidente actividad inhibitoria de los filtrados de cultivo obtenidos del CPD desde el tercer día de incubación. Apareciendo la actividad más tardíamente, es decir desde el quinto día de incubación en filtrados de cultivo provenientes del CS.

Los hongos cuyos códigos fueron 30 (No identificado), 88 (No identificado), 176 (*Aspergillus sp.*) y 6V (*Syncephalastrum sp.*) produjeron filtrados de cultivo con actividad pero sin pigmento.

5.5 Evaluación de la actividad biológica inhibitoria in vitro de los filtrados de diferentes medios de los hongos seleccionados con actividad sobre *R. solani*

De los 10 hongos que produjeron filtrados de cultivo con actividad sobre *R. solani* se seleccionaron 4, debido a que fueron activos en un mayor número de filtrados obtenidos a partir de su cultivo. (Tabla N°7)

Tabla N°7. Hongos seleccionados para obtener filtrados de diferentes medios de cultivo.

HONGOS DEL CEPARIO DEL IIFB		HONGOS DEL CIN - VIACHA	
CODIGO	IDENTIFICACION	CODIGO	IDENTIFICAICON
138	No identificado	3V	<i>Aspergillus sp.</i>
170	<i>Verticillium sp.</i>		
220	<i>Trichoderma sp.</i>		

Se obtuvieron un total de 336 filtrados producto del cultivo de los cuatro hongos seleccionados en los diferentes medios de cultivo utilizados: Caldo Papa Dextrosa (CPD), Caldo Saboraud (CS), Caldo Arroz (CA), Caldo Glucosado de Saboraud (CGS), Caldo Harina de Maiz (CHM), Caldo Zanahoria Papa (CZP), Caldo Miel (CM) y Caldo Czapek (CCK).

Los resultados de la evaluación de la actividad biológica inhibitoria in vitro de los filtrados de cultivo obtenidos que se realizó por el método de dilución en microplaca se muestran en la Tabla N° 8.

Tabla N° 8: Actividad biológica inhibitoria de los filtrados de diferentes medios de cultivo sobre

R. solani

CODIGO	IDENTIFICACION	FILTRADOS DE CULTIVO CON ACTIVIDAD INHIBITORIA SOBRE <i>R. solani</i>							
		CPD	CS	CA	CGS	CHM	CZP	CM	CCK
138	No identificado	3A (1/16)	3A (1/2)	3A (1/2)	4A (1/2)	-	-	-	-
		4A (1/16)	4A (1/4)	4A (1/2)	5A (1/2)	-	-	-	-
		5A (1/32)	5A (1/8)	5A (1/2)	6A (1/2)	-	-	-	-
		6A (1/64)	6A (1/8)	6A (1/4)	7A (1/2)	-	-	-	-
		7A (1/64)	7A (1/8)	7A (1/4)		-	-	-	-
		4E (1/2)	4E (1/2)			-	-	-	-
		5E (1/2)	5E (1/2)			-	-	-	-
		6E (1/2)	6E (1/2)			-	-	-	-
		7E (1/2)	7E (1/2)			-	-	-	-
		8E (1/4)	8E (1/2)			-	-	-	-
		9E (1/4)	9E (1/2)			-	-	-	-
		10E (1/4)	10E (1/2)			-	-	-	-
		11E (1/4)	11E (1/2)			-	-	-	-
		12E (1/4)	12E (1/2)			-	-	-	-
		13E (1/4)	13E (1/2)			-	-	-	-
		14E (1/4)	14E (1/2)			-	-	-	-
170	<i>Verticillium sp.</i>	3A (1/4)	4A(1/4)	5A (1/4)	5A (1/4)	5A (1/2)	4A(1/4)	-	-
		4A(1/4)	5A (1/8)	6A (1/8)	6A (1/4)	6A (1/2)	5A (1/8)	-	-
		5A (1/8)	6A (1/8)	7A (1/8)	7A (1/4)	7A (1/2)	6A (1/8)	-	-
		6A (1/8)	7A (1/16)				7E (1/8)	-	-
		7A (1/16)						-	-
		5E (1/2)	6E (1/2)	6E (1/2)			5E (1/2)	-	-
		6E (1/2)	7E (1/2)	7E (1/2)			6E (1/2)	-	-
		7E (1/2)	8E (1/4)	8E (1/4)			7E (1/2)	-	-
		8E (1/4)	9E (1/4)	9E (1/4)			8E (1/4)	-	-
		9E (1/4)	10E (1/4)	10E (1/4)			9E (1/4)	-	-
		10E (1/4)	11E (1/4)	11E (1/4)			10E (1/8)	-	-
		11E (1/4)	12E (1/8)	12E (1/4)			11E (1/8)	-	-
		12E (1/4)	13E (1/8)	13E (1/4)			12E (1/8)	-	-
		13E (1/4)	14E (1/8)	14E (1/4)			13E (1/8)	-	-
		14E (1/4)					14E (1/8)	-	-
220	<i>Trichoderma sp.</i>	3A (1/4)	4A (1/4)	3A (1/4)	4A (1/2)	6A (1/4)	4A (1/4)	-	-
		4A (1/4)	5A (1/4)	4A (1/4)	5A (1/2)	7A (1/4)	5A (1/8)	-	-
		5A (1/8)	6A (1/4)	5A (1/8)	6A (1/4)		6A (1/8)	-	-
		6A (1/8)	7A (1/4)	6A (1/8)	7A (1/4)		7A (1/8)	-	-
		7A (1/8)		7A (1/8)				-	-
		7E (1/4)	7E (1/4)	7E (1/4)	8E (1/4)	8E (1/4)	7E (1/4)	-	-
		8E (1/4)	8E (1/4)	8E (1/4)	9E (1/4)	9E (1/4)	8E (1/4)	-	-

		9E (1/4)	9E (1/4)	9E (1/4)	10E (1/4)	10E (1/4)	9E (1/4)	-	-
		10E (1/4)	10E (1/4)	10E (1/4)	11E (1/4)	11E (1/4)	10E (1/4)	-	-
		11E (1/4)	11E (1/4)	11E (1/4)	12E (1/4)	12E (1/4)	11E (1/8)	-	-
		12E (1/4)	12E (1/8)	12E (1/8)	13E (1/4)	13E (1/4)	12E (1/8)	-	-
		13E (1/4)	13E (1/8)	13E (1/8)	14E (1/4)	14E (1/4)	13E (1/8)	-	-
		14E (1/4)	14E (1/8)	14E (1/8)			14E (1/8)	-	-
3V	<i>Aspergillus sp.</i>	4A (1/8)	5A (1/8)	4A (1/8)	5A (1/4)			-	-
		5A (1/8)	6A (1/8)	5A (1/8)	6A (1/4)			-	-
		6A (1/16)	7A (1/8)	6A (1/8)	7a (1/4)			-	-
		7A (1/16)		7A (1/8)				-	-
		6E (1/4)	7E (1/4)	6E (1/4)	6E (1/4)			-	-
		7E (1/4)	8E (1/4)	7E (1/4)	7E (1/4)			-	-
		8E (1/4)	9E (1/8)	8E (1/4)	8E (1/4)			-	-
		9E (1/8)	10E (1/8)	9E (1/4)	9E (1/4)			-	-
		10E (1/8)	11E (1/8)	10E (1/4)	10E (1/8)			-	-
		11E (1/8)	12E (1/8)	11E (1/4)	11E (1/8)			-	-
		12E (1/8)	13E (1/8)	12E (1/4)	12E (1/8)			-	-
		13E (1/8)	14E (1/8)	13E (1/4)	13E (1/8)			-	-
		14E (1/8)		14E (1/4)	14E (1/8)			-	-

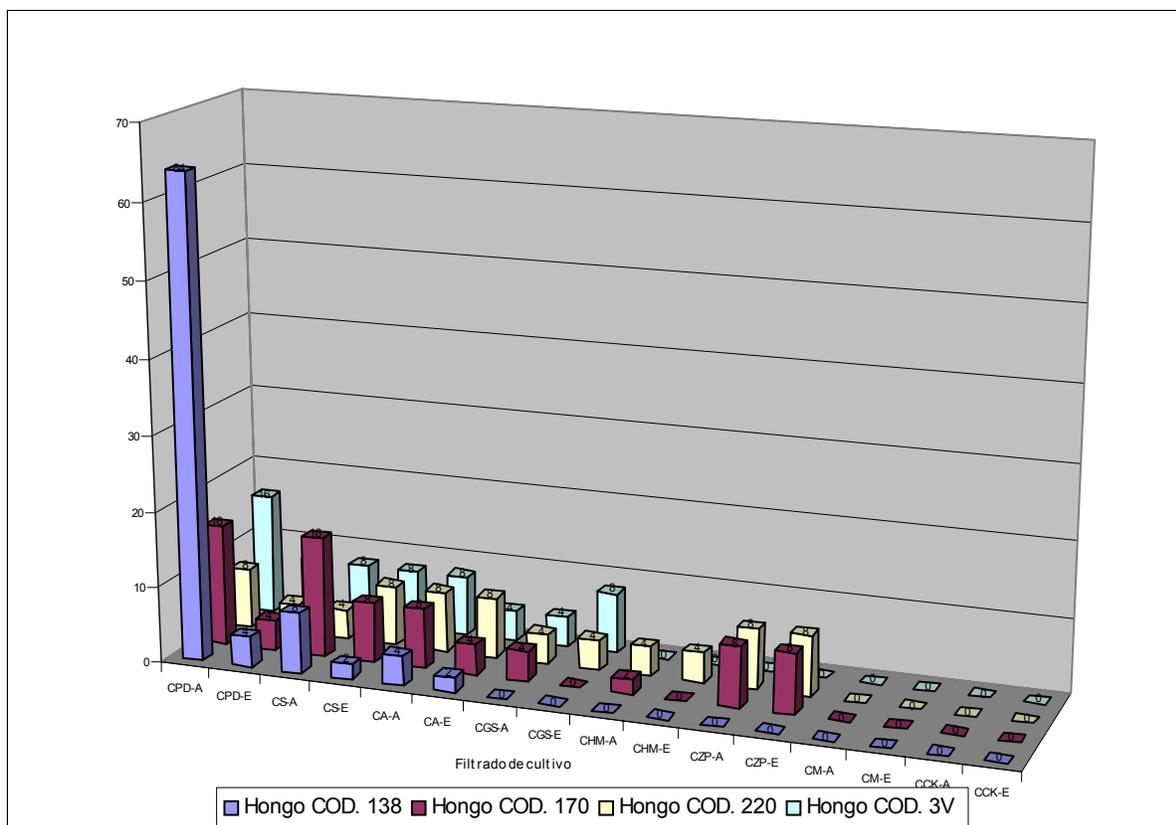
La siguiente tabla muestra las diluciones máximas de los filtrados de cultivo de los 4 hongos seleccionados donde aún se observa su actividad inhibitoria sobre *R. solani*.

Tabla N° 9: Diluciones máximas de los filtrados de cultivo que presentan actividad sobre *R. solani*.

		CPD		CS		CA		CGS		CHM		CZP
		A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A
		138	No identificado	1 64	1 4	1 8	1 2	1 4		1 2		
170	<i>Verticillium sp.</i>	1 16	1 4	1 16	1 8	1 8	1 4	1 4		1 2		1 8
220	<i>Trichoderma sp.</i>	1 8	1 4	1 4	1 8	1 8	1 8	1 4	1 4	1 4	1 4	1 8
3V	<i>Aspergillus sp.</i>	1 16	1 8	1 8	1 8	1 8	1 4	1 4	1 8			

De los resultados obtenidos podemos observar que el cultivo de los hongos seleccionados en los diferentes medios de cultivo, produce filtrados con actividad inhibitoria sobre *R. solani* en 6 de los 8 medios de cultivo utilizados como el CPD, CS, CA, CGS, CHM y CZP, no presentándose actividad alguna en filtrados de cultivo provenientes de los medios CM y CCK. Los hongos *Verticillium sp* y *Trichoderma sp.* son los hongos que producen filtrados de cultivo con actividad inhibitoria sobre *R. solani* en la mayoría de los medios de cultivo utilizados, es decir cuando se cultivan en CPD, CS, CA, CGS, CHM y CZP.

Por otro lado se presentó un mayor número de filtrados de cultivo con actividad sobre *R. solani*

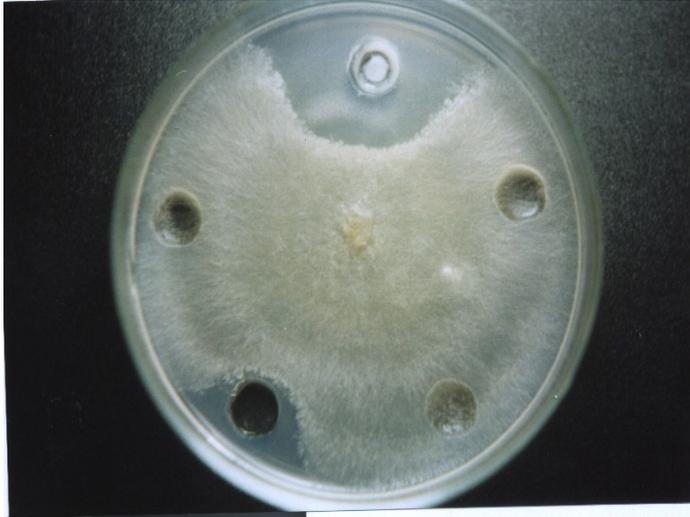


cuando estos provinieron de cultivos en agitación en relación a los provenientes en estacionario, además se observó que los filtrados provenientes de cultivos en agitación presentaron actividad hasta diluciones mayores que los filtrados con actividad provenientes de cultivos en estacionario, lo que indica que en general el metabolito o metabolitos responsables de la actividad inhibitoria se producirían en mayor cantidad en cultivos en agitación.

Los hongos cuyos códigos son 138 (no identificado), 170 (*Vestricillium sp.*) y 3V (*Aspergillus sp.*) produjeron filtrados de cultivo de color amarillo cuando se cultivaron en CPD, CA, CS, CGS y en menor intensidad de pigmentación los filtrados de cultivo de CHM y CZP. Estos pigmentos fueron apareciendo en el medio de cultivo en forma gradual a medida que pasaban los días de incubación y el grado de coloración fue más intenso en los filtrados provenientes de cultivos en agitación en relación a los provenientes de cultivos en estacionario. El grado de pigmentación amarilla también se relacionó con la actividad inhibitoria sobre *R. solani*, es así que los filtrados de cultivo obtenidos en los primeros días de incubación cuando la pigmentación no era muy intensa la actividad inhibitoria se presentó en diluciones menores a diferencia de los filtrados de cultivo obtenidos a partir del quinto día de incubación donde la pigmentación fue más intensa, lo que se relacionó con una evidente actividad inhibitoria sobre *R. solani* en diluciones mayores del filtrado de cultivo. Estas observaciones nos inducen a pensar que los pigmentos producidos posiblemente serían los responsables de conferir la actividad inhibitoria sobre *R. solani* en los filtrados de cultivo.

Evaluación de la actividad biológica inhibitoria de los sobrenadantes de cultivo sobre *R. solani* por el método de difusión en placa.

Presencia de actividad inhibitoria sobre *R. solani* de uno de los sobrenadantes de cultivo evaluados:



Ausencia de actividad inhibitoria sobre *R. solani* de los sobrenadantes de cultivo evaluados:



Evaluación de la actividad biológica inhibitoria de los sobrenadantes de cultivo seleccionados sobre *R. solani* por el método de dilución en microplaca.



5.6 Selección del hongo a ser utilizado en las pruebas de campo

Tomando en cuenta los criterios de selección detallados en la parte de metodología se seleccionó al hongo cuyo código asignado fue el 3V (*Aspergillus sp.*) principalmente porque fue aislado de las tierras de cultivo de papa del CIN – Viacha y debido a que el filtrado de cultivo en CPD proveniente del cultivo en condiciones estacionarias donde sería más práctico obtener el filtrado en mayores volúmenes, presentó actividad inhibitoria sobre *R. solani* hasta una dilución 1/8.

Producto de los ensayos para evaluar la inocuidad de este hongo sobre la planta de papa se observó que no produce ninguna alteración ni daño tanto en el follaje, tallo, fruto, ni raíz de la planta.

5.7. Evaluación de la actividad biológica inhibitoria del filtrado de cultivo del hongo seleccionado en parcelas de cultivo de papa.

Se evaluaron los signos de rizoctoniasis de los tubérculos de papa cosechados, provenientes de las 240 plantas de papa sembradas en las cuatro unidades experimentales del CIN – Viacha:

T + : Testigos que recibieron tratamiento con fungicidas químicos

T - : Testigos que no recibieron ningún tratamiento con antifúngicos

C15: Unidades en las que se aplicó el filtrado de cultivo obtenido cada 15 días

C 30: Unidades en las que se aplicó el filtrado de cultivo obtenido cada 30 días.

5.8. Determinación del efecto del filtrado de cultivo sobre *R. solani* en parcelas de cultivo de papa

La evaluación del porcentaje de tubérculos con signos de rizoctoniasis causados por *R. solani* fue el parámetro más apropiado para la determinación del efecto de la aplicación de los diferentes tratamientos, por la consistencia en la relación entre el daño en los tubérculos y la presencia de patógeno. La determinación del rendimiento en peso de los tubérculos que produjo cada unidad experimental fue otro parámetro para evaluar la presencia de la enfermedad ya que *R. solani* ocasiona una disminución en la producción del número de tubérculos por planta de papa o en la muerte de una planta entera, la tabla N° 8 muestra los resultados obtenidos de las evaluaciones.

Tabla N° 8 Promedio del porcentaje de tubérculos de papa afectados por *R. solani* cosechados de las diferentes unidades experimentales y rendimientos de cada unidad experimental.

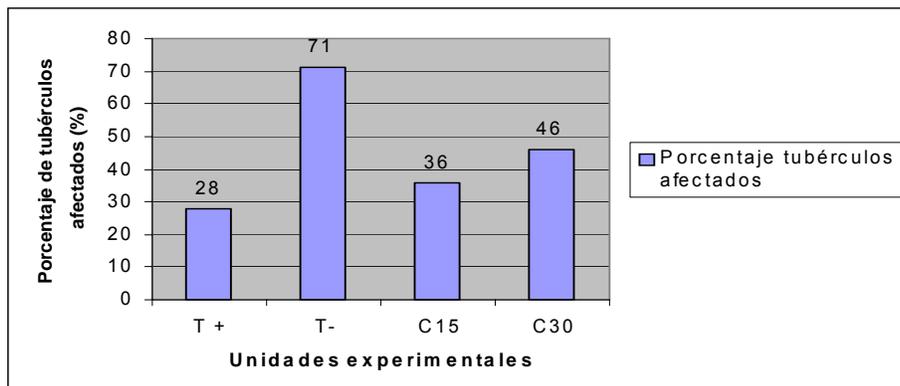
Unidad Experimental	Tratamiento aplicado	Dosis	Porcentaje de Tubérculos afectados	Rendimiento Kg
4 T+	Bravo 500	1ml/l (5l) cada 30 días	28%	30 Kg
	Ramcaf	1g/l (5l) cada 30 días		
4 T-			71%	12 Kg
4 C15	Filtrado de cultivo	(5l) cada 15 días	36%	24 Kg
4 C30	Filtrado de cultivo	(5l) cada 30 días	46%	19 Kg

Observamos que las unidades experimentales T + produjeron un rendimiento de 30 Kg de tubérculos de papa con un porcentaje de 28 % de tubérculos afectados por *R. solani*,

seguido de las unidades experimentales C15 que produjeron un rendimiento de 24 Kg con un porcentaje de 36% de tubérculos afectados, finalmente las unidades C 30 produjeron un rendimiento de 19 Kg con un porcentaje de 46% de tubérculos afectados por la enfermedad y las unidades que no recibieron tratamiento antifúngico T – produjeron solamente 12 kg con un porcentaje del 71% de tubérculos afectados por la enfermedad, como podemos observar en la Figura N° 14.

Todos los tratamientos T +, C15 y C30 ejercieron cierto control de la rizoctoniasis con respecto al testigo que no recibió tratamiento antifúngico T-.

Figura N° 14 Rendimiento y porcentaje de tubérculos afectados por *R. solani* en las diferentes unidades experimentales.



El análisis estadístico de varianza, (Tabla N° 9, 10 y 11) mostró diferencias significativas ($P \leq 0.05$) de los resultados de las evaluaciones de las parcelas que recibieron tratamiento: T+, C15 y C30 con respecto al testigo sin tratar: T-. Es decir los tratamientos con fungicidas químicos y con el filtrado de cultivo influyeron significativamente con respecto al testigo sin tratar.

Se observó que la presencia de la enfermedad fue menos pronunciada en presencia de tratamiento con fungicidas químicos, seguido del tratamiento con el filtrado de cultivo aplicado cada 15 días y finalmente en presencia del filtrado de cultivo aplicado cada 30 días.

Tabla N° 9: Porcentaje de tubérculos de papa afectados por *R. solani* cosechados de cada unidad experimental.

Unidad Experimental	T+	T-	C15	C30	Total
Parcela 1	20	75	38	50	
Parcela 2	27	68	44	45	
Parcela 3	20	65	33	43	
Parcela 4	35	78	30	48	
Total	112	286	145	186	729
Media	28	71	36	46	45

Tabla N°10 Análisis de varianza de los tratamientos con fungicidas químicos y con el filtrado de cultivo sobre *R. solani* en parcelas de cultivo de papa

Fuente de variación	SC	g.l.	CM	RV	F	
					P≤0,01	P≤0,05
Entre muestras	4275,1875	4	1425,0625	46,37	5,41	3,26
Dentro de las muestras	368,75	12	30,724			
Total	4643,9375	16				

SC: Suma de cuadrados

CM: Cuadrado de medias

g.l: Grados de libertad

RV: Razón de varianza

F: Valor crítico de F

Tabla N° 11 Diferencias entre medias (valor absoluto) del porcentaje de tubérculos afectados de las parcelas T+, T-, C15 y C30.

	T+	T-	C15	C30
T+	0	43	8	18
T-	43	0	35	25
C15	8	35	0	10
C30	18	25	10	0

Aplicando la prueba de Tukey o prueba DVS (diferencia verdaderamente significativa) (Tabla N° 12) observamos que los tratamientos con fungicidas químicos y con el filtrado de cultivo aplicado cada 15 y 30 días fueron significativamente diferentes con respecto al testigo sin tratar. Además se observó que no existe diferencia significativa en el efecto de control de la enfermedad entre el tratamiento con fungicida químico y el tratamiento con el filtrado de cultivo aplicado cada 15 días, sin embargo si existe diferencia significativa entre el tratamiento con los fungicidas químicos y el filtrado de cultivo aplicado cada 30 días, por lo que podemos afirmar que es importante tomar en cuenta el intervalo de tiempo entre aplicaciones del filtrado de cultivo, para obtener mejores resultados en el control de la enfermedad.

La aplicación de antifúngicos de origen químico resultaron tener mejor efecto en el control de la enfermedad, aunque no estadísticamente significativos con respecto al filtrado de cultivo aplicado cada 15 días, debido posiblemente a que su modo de acción es más amplio ya que se aplicó en forma alterna fungicidas sistémicos y de contacto.

intervalo de tiempo entre aplicaciones del filtrado de cultivo, para obtener mejores resultados en el control de la enfermedad.

La aplicación de antifúngicos de origen químico resultaron tener mejor efecto en el control de la enfermedad, aunque no estadísticamente significativos con respecto al filtrado de cultivo aplicado cada 15 días, debido posiblemente a que su modo de acción es más amplio ya que se aplicó en forma alterna fungicidas sistémicos y de contacto.

6. CONCLUSIONES

6.1. Aislamiento de *Rhizoctonia solani* y de hongos del CIN - Viacha

A partir de las costras negras de tubérculos de papa afectados por la rizoctoniasis se aisló una cepa de *R. solani*, y a partir de muestras de tierra del CIN – Viacha se aislaron un total de 10 hongos: *Alternaria sp.*, *Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.*, *Streptomyces sp.*, *Acaulopage sp.* y 4 hongos no identificados.

6.2. Determinación de las condiciones de cultivo óptimas y cinética de crecimiento de *R. solani*

R. solani mostró tasas de crecimiento micelial mayores cuando desarrolla entre 16 y 25 °C, y una tasa de crecimiento micelial máxima de 0.277 cm²/h cuando desarrolla a 18°C, siendo esta la temperatura óptima de crecimiento.

La máxima tasa de crecimiento micelial de *R. solani* fue de 0.256 cm²/h cuando desarrolla en presencia de luz y fue menor cuando desarrolla en ausencia de luz.

El medio de cultivo Agar Papa Dextrosa es el medio de cultivo más apropiado para el desarrollo de *R. solani* en relación al Agar Saboreaud y al Agar Nutritivo.

El pH del medio CPD disminuye desde 5 hasta 4 cuando el cultivo de *R. solani* se lleva a cabo en condiciones de agitación, sin embargo en condiciones estacionarias sube de 5 a 7. La variación del pH del CS en condiciones de agitación son mayores ya que disminuye desde 5 hasta 2 y en condiciones de agitación mas bien se observa un incremento del pH desde 5 hasta 7.

En condiciones de agitación y estacionarias el cultivo de *R. solani* tanto en el medio de cultivo CPD y en CS produce una disminución de la concentración de glucosa, observándose que en CS el consumo de glucosa es más acentuado que en CPD. Esto sugiere que el metabolismo del hongo difiere de acuerdo al tipo de medio de cultivo utilizado y las condiciones físicas en las cuales se lleva a cabo la incubación.

6.3. Evaluación de la actividad biológica inhibitoria in vitro de los filtrados de cultivo de hongos del cepario del IIFB y del CIN –Viacha sobre *R. solani*

Se evaluó un total de 28 hongos: 20 provenientes del cepario del IIFB y 8 aislados de tierras del CIN – Viacha. A partir del cultivo en batch en CPD y CS de estos hongos se obtuvo un total de 784 filtrados de cultivo en una primera instancia, que fueron evaluados en su actividad biológica inhibitoria sobre *R. solani* por el método de difusión en agar, producto de estos ensayos se seleccionaron cuatro hongos: 3 provenientes del cepario del IIFB y uno proveniente del CIN – Viacha por presentar actividad inhibitoria sobre *R. solani*. Los cuatro hongos seleccionados se cultivaron en batch en CA, CGS, CHM, CZP, CM y CCK y los filtrados de cultivo obtenidos fueron evaluados en su actividad biológica inhibitoria sobre *R. solani* por el método de dilución.

Los métodos de antagonismo probados permitieron observar que el filtrado de cultivo de *Aspergillus sp.* (Código 3V) un hongo aislado de los terrenos de cultivo de papa del CIN – Viacha mostró actividad biológica inhibitoria sobre *R. solani* in vitro cuando se lo cultiva en CPD y su actividad inhibitoria está presente hasta una dilución 1/8 del filtrado, además de no producir ningún efecto dañino en la planta de papa, por lo que es seleccionado para realizar las pruebas de campo.

Los géneros *Trichoderma sp.* (Código 220), *Verticillium sp.* (Código 170) y un hongo no identificado (Código 138) produjeron filtrados de cultivo con actividad inhibitoria sobre *R. solani* in vitro, lo que confirma el conocido poder antagónico de *Trichoderma* y *Verticillium* sobre *R. solani*.

El medio de cultivo CPD resultó ser el medio más apropiado para cultivar a *Aspergillus sp.* y obtener el filtrado de cultivo a ser evaluado en las parcelas de cultivo de papa sobre *R. solani*.

6.4. Determinación del efecto del filtrado de cultivo sobre *R. solani* en parcelas de cultivo de papa

El parámetro para determinar el efecto del filtrado de cultivo sobre *R. solani* en parcelas de cultivo de papa fue determinar el porcentaje de tubérculos con rizoctoniasis y el rendimiento en peso (Kg) de tubérculos producidos por cada unidad experimental, es decir las unidades con tratamiento antifúngico químico, las unidades que recibieron tratamiento con el filtrado de cultivo y las unidades sin tratar.

El tratamiento con fungicidas químicos produjo un rendimiento de 30 Kg de papa con un 28% de tubérculos afectados por *R. solani*, seguido del tratamiento con el filtrado de cultivo aplicado cada 15 días tuvo un rendimiento de 24Kg de papa con un 36% de tubérculos afectados, por su parte el tratamiento con el filtrado de cultivo aplicado cada 30 días con 19 Kg de papa y un 46% de tubérculos afectados por la enfermedad y finalmente el testigo sin tratar produjo solo 12 Kg de papa, con un 71% de tubérculos afectados.

En las pruebas de campo todos los tratamientos aplicados, fueron significativamente superiores al testigo que no recibió tratamiento en el control de la rizoctoniasis.

No hubo diferencia significativa entre el tratamiento con fungicidas químicos y el tratamiento con el filtrado de cultivo aplicado cada 15 días, sin embargo fue mejor el tratamiento con fungicida químico en relación al filtrado de cultivo cuando este se aplicó cada 30 días.

El filtrado de cultivo obtenido a partir del cultivo de *Aspergillus sp.* seleccionado es capaz de ejercer actividad biológica inhibitoria en cultivos de papa similar a los antifúngicos químicos, cuando se aplica al terreno de cultivo cada 15 días.

La aplicación de los tratamientos en las diferentes unidades experimentales, en T +, C15 y C30 influyeron significativamente en el control de la rizoctoniasis con respecto al testigo sin tratar T -.

Se observó que la presencia de la enfermedad fue menos pronunciada en presencia de tratamiento con fungicidas de origen químico, seguido del tratamiento con el filtrado de cultivo de *Aspergillus sp.* aplicado cada 15 días y finalmente en presencia del tratamiento con el filtrado de cultivo aplicado cada 30 días.

Los resultados sugieren la existencia de grandes perspectivas en el uso de tratamientos que integren productos naturales, ello significará disminuir la presión química y la acumulación de residuos tóxicos en la naturaleza.

7. RECOMENDACIONES

En estudios posteriores se sugiere evaluar el efecto del filtrado de cultivo en el control de la rizoctoniasis aplicando el filtrado de cultivo en forma más frecuente.

Se sugiere evaluar también el efecto del filtrado de cultivo cambiando la composición de los componentes del medio CPD, para determinar si la concentración exacta y óptima de cada componente a la cual el filtrado de cultivo posea una mayor actividad biológica inhibitoria sobre *R. solani*.

A futuro se debería obtener el espectro ultravioleta del filtrado de cultivo con actividad inhibitoria utilizado para tener datos cuantificados que relacionen la intensidad de pigmento del filtrado de cultivo con su actividad inhibitoria sobre *R. solani*.

Se considera importante para optimizar este trabajo en el futuro estudiar la relación interbiótica entre *Aspergillus sp.* y *R. solani*, caracterizando mejor el comportamiento de *Aspergillus sp.* in vitro y en campo.

Sería posible incrementar la eficiencia del filtrado de cultivo en el control de la enfermedad, aplicando esporas del hongo seleccionado *Aspergillus sp.* a los tubérculos – semilla antes de ser sembrados, también se podría probar el efecto de la aplicación de una combinación del filtrado de cultivo con fungicidas de origen químico de tal forma de disminuir la dosis de éste último, o se podría combinar los filtrados de cultivo que presentaron actividad inhibitoria sobre *R. solani*.

ANEXO N° 1

MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

TAMPON TANQUAY

KH ₂ PO ₄	0.075 g
Na ₂ HPO ₄	0.10 g
Glicerol	15 ml
Agua destilada	85 ml

Disolver la solución y esterilizar en autoclave a 121°C a 1.5 atmósferas por 15 minutos.

AGAR PAPA DEXTROSA (APD)

Glucosa	20 g
Papa pelada y picada	200 g
Agua destilada	1000 ml
Agar	

Disolver la solución y esterilizar en autoclave a 121°C a 1.5 atmósferas por 15 minutos.

AGAR SABORAUD

Bactoneopeptona.....	10g/l
Bacto dextrosa	20 g/l
PH	5.6
Agua destilada.....	1 l
Agar	18 g

Disolver la solución y esterilizar en autoclave a 121°C a 1.5 atmósferas por 15 minutos.

CALDO DE CZAPEK

Sacarosa.....	30g
Nitrato de sodio	2 g
Fosfato monoácido dipotásico.....	1 g
Sulfato de magnesio heptahidratado....	0.5 g
Cloruro potásico.....	0.5 g
Sulfato ferroso heptahidratado	0.01 g
Agua destilada.....	1000 ml

Las sales y el azúcar se disuelven en unos 900 ml de agua, tras lo cual se agrega el agar, se lleva el volumen a 1000 ml. Esterilizar a 110° C por 30 minutos.

CALDO GLUCOSADO DE SABORAUD

Peptona	10 g
Glucosa.....	40 g
Agua destilada	1000 ml

Colocar en un matraz Erlenmeyer de 100 ml de capacidad el arroz. Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

CALDO HARINA DE MAIZ

Harina de maíz.....	40 g
Agua destilada	1000 ml

Mezclar la harina y el agua destilada, hervir durante una hora, filtrar por gasa. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

CALDO MIEL

Miel de abejas	80 ml
Peptona	20 g
Agua destilada	1000 ml

Añadir la miel al agua destilada, mezclar bien, después añadir, el agar. Regular el pH a 5.5 , esterilizar a 121°C por 15 minutos.

CALDO ARROZ

Arroz.....	8 g
Agua destilada	25 ml

Colocar en un matraz Erlenmeyer de 100 ml de capacidad el arroz. Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

ANEXO Nº 2

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE GLUCOSA

GLUCOSA OXIDASA (TECO DIAGNOSTICS)

Principio:

Método enzimático para la determinación de la concentración de glucosa, utilizando glucosa oxidasa que cataliza la oxidación de la glucosa.

Procedimiento:

Preparar el reactivo de acuerdo a las instrucciones.

Disponer de tubos marcados como blanco, estándar y muestras

Pipetear 1 ml del reactivo en cada tubo y precalentar 4 minutos a 37°C.

Diluir las muestras 1:5 con agua destilada estéril.

Agregar 10 ul del estándar y muestra a su respectivo tubo y mezclar

Incubar a 37°C por 10 minutos.

Llevar a cero el espectrofotómetro con el reactivo, leer las absorvancias de todos los tubos a 500 nm.

Cálculos:

(A = Absorvancia)

(Concentración del estándar = 1 g/l)

$$\frac{A (\text{Muestra})}{A (\text{Estándar})} \times \text{Concentración del estándar (g/l)} \times 10 = \text{Concentración de la muestra (g/l)}$$

ANEXO Nº 3

DETERMINACION DE LA TEMPERATURA OPTIMA DE CRECIMIENTO DE *R. solani*

Temperatura 12°C

Día	Hora	Norte	Sur	Este	Oeste	Promedio (mm)	Area (cm2)	Tasa de crecimiento micelial (cm2/h)
0	0	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00		
1	24	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	0,196	0,008
2	48	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	0,283	0,006
3	72	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	0,503	0,007
4	96	5,00	4,50	4,50	4,00	4,50	0,636	0,007
5	120	6,00	6,50	6,00	6,50	6,25	1,208	0,010
6	144	7,00	7,50	8,00	8,00	7,63	1,815	0,013
7	168	8,00	9,00	10,00	10,00	9,25	2,659	0,016
8	192	8,50	9,00	11,00	11,00	9,88	3,079	0,016
9	216	9,00	10,00	11,00	11,50	10,38	3,333	0,015
10	240	10,00	12,00	12,50	12,00	11,63	4,227	0,018
11	264	11,00	13,00	13,00	13,50	12,63	4,988	0,019
12	288	12,00	15,00	14,00	14,00	13,75	5,896	0,020
13	312	13,50	16,00	16,00	15,50	15,25	7,258	0,023
14	336	14,00	16,00	16,00	16,00	15,50	7,548	0,022
15	360	14,00	17,00	17,00	16,00	16,00	8,042	0,022
16	384	16,00	19,00	18,00	17,00	17,50	9,621	0,025
17	408	17,00	20,00	19,00	17,50	18,38	10,636	0,026
18	432	18,00	21,00	20,00	18,00	19,25	11,581	0,027
19	456	19,00	22,00	21,00	19,00	20,25	12,819	0,028
20	480	20,00	23,00	22,00	19,00	21,00	13,854	0,029
21	504	21,00	24,00	25,00	20,00	22,50	15,904	0,032
22	528	23,00	26,00	28,00	23,00	25,00	22,396	0,042
23	552	25,00	28,00	30,00	26,00	27,25	22,243	0,040
24	576	27,00	31,00	33,00	29,00	30,00	28,274	0,049
25	600	30,00	33,00	35,00	31,00	32,25	32,573	0,054
26	624	32,00	35,00	37,00	32,00	34,00	36,317	0,058
27	648	33,00	37,00	38,00	33,00	35,25	38,926	0,060
28	672	34,00	38,00	40,00	35,00	36,75	42,314	0,063
29	696	36,00	39,00	42,00	36,00	38,25	45,843	0,066
30	720	38,00	40,00	43,00	37,00	39,50	49,017	0,064
31	744	40,00	41,00	44,00	39,00	41,00	52,810	0,067
32	768	41,00	42,00	45,00	41,00	42,25	55,947	0,068
33	792	43,00	43,00	45,00	43,00	43,50	59,447	0,071
34	816	45,00	45,00	45,00	45,00	45,00	63,617	0,073

Promedio	0,034
----------	-------

Temperatura 14°C

Día	Hora	Norte	Sur	Este	Oeste	Promedio (mm)	Area (cm2)	Tasa de crecimiento micelial (cm2/h)
1	0	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00		
2	24	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	0,283	0,012
3	48	6,00	5,00	6,00	6,00	5,75	1,039	0,022
4	72	9,00	9,00	10,00	10,00	9,50	2,835	0,039
5	96	14,00	13,00	14,00	15,00	14,50	6,158	0,064
6	120	19,00	18,00	18,00	20,00	18,75	11,045	0,092
7	144	24,00	22,00	21,00	25,00	23,00	16,619	0,115
8	168	35,00	33,00	33,00	37,00	34,50	37,393	0,223
	192	45,00	45,00	45,00	45,00	45,00	63,617	0,331

Promedio	0,112
----------	-------

Temperatura 16°C

Día	Hora	Norte	Sur	Este	Oeste	Promedio (mm)	Area (cm2)	Tasa de crecimiento micelial (cm2/h)
0	0	2	2	2	2	2		
1	24	3	3	3	3	3	0,283	0,012
2	48	7	6	7	8	7	1,539	0,032
3	72	15	14	14	16	14,8	6,835	0,095
4	96	27	26	25	28	26,5	22,062	0,23
5	120	36	35	34	38	35,8	40,152	0,335
6	144	45	45	45	45	45	63,617	0,442

Promedio	0,191
----------	-------

Temperatura 18°C

Día	Hora	Norte	Sur	Este	Oeste	Promedio (mm)	Area (cm2)	Tasa de crecimiento micelial (cm2/h)
0	0	2	2	2	2	2		
1	24	3	3	3	3	3	0,283	0,012
2	48	7	9	8	8	8	2,011	0,042
3	72	21	23	22	22	22	15,205	0,211
4	96	40	44	45	41	42,5	56,745	0,591
5	120	45	45	45	45	45	63,617	0,53

Promedio 0,277

Temperatura 20°C

Día	Hora	Norte	Sur	Este	Oeste	Promedio (mm)	Area (cm2)	Tasa de crecimiento micelial (cm2/h)
0	0	2	2	2	2	2		
1	24	3	3	3	3	3	0,283	0,012
2	48	8	8	9	9	8,5	2,27	0,047
3	72	22	21	23	23	22,3	15,553	0,216
4	96	39	35	40	36	37,5	44,179	0,46
5	120	45	45	45	45	45	63,617	0,53

Promedio 0,253

Temperatura 25°C

Día	Hora	Norte	Sur	Este	Oeste	Promedio (mm)	Area (cm2)	Tasa de crecimiento micelial (cm2/h)
0	0	2	2	2	2	2		
1	24	3	3	3	3	3	0,283	0,012
2	48	6	7	8	7	7	1,539	0,032
3	72	14	16	16	17	15,8	7,793	0,108
4	96	25	26	27	29	26,8	22,48	0,234
5	120	35	37	38	40	37,5	44,179	0,368
6	144	45	45	45	45	45	63,617	0,442

Promedio 0,199

Temperatura 28°C

Día	Hora	Norte	Sur	Este	Oeste	Promedio (mm)	Area (cm2)	Tasa de crecimiento micelial (cm2/h)
0	0	2	2	2	2	2		
1	24	4	3	3	4	3,5	0,385	0,016
2	48	7	6	5	7	6,3	1,227	0,026
3	72	10	11	8	12	10,3	3,301	0,046
4	96	14	16	16	19	16,3	8,296	0,086
5	120	20	18	28	26	23	16,619	0,138
6	144	31	29	38	38	34	36,317	0,252
7	168	45	45	45	45	45	63,617	0,379

Promedio 0,135

ANEXO Nº 4

DETERMINACION DE LA INFLUENCIA DE LA LUZ EN EL CRECIMIENTO DE *R. solani*

Presencia de luz

Día	Hora	Norte	Sur	Este	Oeste	Promedio (mm)	Area (cm ²)	Tasa de crecimiento micelial (cm ² /h)
0	0	2	2	2	2	2		
1	24	4	3	3	4	3,5	0,385	0,016
2	48	7	6	8	7	7	1,539	0,032
3	72	21	20	20	21	20,5	13,203	0,183
4	96	41	40	40	40	40,25	50,896	0,53
5	120	45	45	45	45	45	63,617	0,53

Promedio	0,258
----------	-------

Ausencia de luz

Día	Hora	Norte	Sur	Este	Oeste	Promedio (mm)	Area (cm ²)	Tasa de crecimiento micelial (cm ² /h)
0	0	2	2	2	2	2		
1	24	3	3	3	3	3	0,283	0,012
2	48	5	5	5	6	5,25	0,866	0,018
3	72	15	14	13	15	14,25	6,379	0,089
4	96	26	24	21	24	23,75	17,721	0,185
5	120	30	31	30	31	30,5	29,225	0,244
6	144	45	45	45	45	45	63,617	0,442

Promedio	0,165
----------	-------

ANEXO N° 5

DETERMINACION DEL MEDIO DE CULTIVO SOLIDO OPTIMO PARA EL CRECIMIENTO DE *R. solani*

Agar Papa Dextrosa

Día	Hora	Norte	Sur	Este	Oeste	Promedio (mm)	Area (cm ²)	Tasa de crecimiento micelial (cm ² /h)
0	0	2	2	2	2	2		
1	24	4	3	3	4	3,5	0,385	0,016
2	48	7	6	8	7	7	1,539	0,032
3	72	21	20	20	21	20,5	13,203	0,183
4	96	41	40	40	40	40,25	50,896	0,53
5	120	45	45	45	45	45	63,617	0,53

Promedio 0,258

Agar Saboraud

Día	Hora	Norte	Sur	Este	Oeste	Promedio (mm)	Area (cm ²)	Tasa de crecimiento micelial (cm ² /h)
0	0	2	2	2	2	2		
1	24	3	3	3	3	3	0,283	0,012
2	48	8	8	7	6	7,25	1,651	0,034
3	72	20	21	19	18	19,5	11,946	0,166
4	96	30	32	30	30	30,5	29,225	0,304
5	120	43	40	40	41	41	52,81	0,44
6	144	45	45	45	45	45	63,617	0,442

Promedio 0,233

Agar Nutritivo

Día	Hora	Norte	Sur	Este	Oeste	Promedio (mm)	Area (cm ²)	Tasa de crecimiento micelial (cm ² /h)
0	0	2	2	2	2	2		
1	24	3	3	3	3	3	0,283	0,012
2	48	7	8	6	7	7	1,539	0,032
3	72	16	17	14	16	15,8	7,793	0,108
4	96	27	28	25	26	26,5	22,062	0,23
5	120	35	36	33	34	34,5	37,393	0,312
6	144	41	42	40	40	40,8	52,168	0,362
7	168	45	45	45	45	45	63,617	0,379

Promedio 0,205