



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**EFFECTO DE MICROORGANISMOS
BIOCONTROLADORES Y ADITIVOS
ORGANICOS SOBRE EL
CAMANDULEO DE LA PAPA
OCASIONADA POR *Spongospora
subterranea f. sp. subterranea***

Paula Elisabeth Mesa Quijano

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agrarias
Maestría en Ciencias Agrarias
Bogotá D. C., Colombia
2016

EFEECTO DE MICROORGANISMOS BIOCONTROLADORES Y ADITIVOS ORGANICOS SOBRE EL CAMANDULEO DE LA PAPA OCASIONADA POR *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea*

Paula Elisabeth Mesa Quijano

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de: **Magister
en Ciencias Agrarias**

Directora:

Doctora Alba Marina Cotes Prado
Investigadora PhD.
Corpoica Centro de Investigación Tibaitatá

Codirectora:

Doctora Celsa García Domínguez
Profesora Asociada PhD.
Facultad de Ciencias Agrarias
Universidad Nacional de Colombia

Línea de Investigación:

Fitopatología

Grupo de Investigación:

Control biológico de plagas y enfermedades agrícolas

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agrarias
Maestría en Ciencias Agrarias
Bogotá D. C., Colombia
2016

“Late en cada hombre cierta tendencia, cierta especie de atracción hacia el Todo. Hay momentos en que uno quisiera confundirse con el aire, con el agua, con la brisa, en una palabra, ser todas la cosas. Y cuando el alma tiende con mayor pasión hacia el Todo, es cuando produce sus mejores obras”.

Fernando González

Agradecimientos

A mi madre e hija por ser el motor y la razón para crecer y luchar cada día de mi vida. A mi hermana Sandy por su apoyo incondicional y buenos consejos.

De manera especial agradecer a las Doctoras Alba Marina Cotes y Celsa García por todas sus enseñanzas, la dirección de este trabajo y el apoyo brindado durante este proceso.

A la Universidad Nacional de Colombia, a la Facultad de Ciencias Agrarias y a los docentes de la Maestría: Dr. Aquiles Darghan, Dra. Adriana Gonzáles y Dra. Sandra Gómez por el proceso de formación durante esta etapa académica.

A la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria sede Tibaitatá, por permitirme trabajar en el laboratorio e invernadero. Así mismo, al Doctor Mauricio Soto por su amplia colaboración y aportes que fueron muy valiosos en este trabajo. A los profesionales Cristian Vargas y Manuel Patiño por colaborarme a establecer algunos ensayos en invernadero.

A Samuel Moreno, Gilberto García a su esposa Leito e hija Valentina por recibirme fraternalmente en la finca Tibagota, Municipio de Subachoque y colaborarme en algunas ocasiones a regar los ensayos.

A la Fundación Ceiba y a la Gobernación de Cundinamarca por otorgarme el crédito beca para la realización de la Maestría.

Resumen

Spongospora subterranea f. sp. *subterranea* es un patógeno obligado que ocasiona la sarna polvosa y camanduleo de la papa, enfermedades limitantes en la producción a escala global y que no cuentan con prácticas de control efectivas. Con el propósito de ofrecer una alternativa para el manejo del camanduleo, se evaluó el efecto de control, individual y en mezcla de microorganismos y de aditivos orgánicos en el cultivar Diacol Capiro. Para tal fin, se establecieron ensayos en materas con suelo naturalmente infestado, evaluando a las ocho semanas el número de agallas por planta. La mayoría de biocontroladores disminuyeron en alguna proporción el número de agallas, pero solo se evidenció efecto significativo con *Trichoderma koningiopsis* Th003 y *Bacillus amyloliquefaciens* Bs006 en una réplica de cuatro, con un promedio en la reducción de agallas de 43.8 y 43.6 % respectivamente. Teniendo en cuenta la eficacia y avances en el desarrollo de un bioplaguicida se seleccionaron a Th003, Bs006 y *S. misionensis* Ac006, encontrándose que Th003 con Bs006 fue la mezcla que más redujo el camanduleo en 30.5 %, resultado que no fue diferente significativamente del producido en la evaluación individual. Entre los aditivos orgánicos, el quitosán al 0.5 % disminuyó significativamente el número de agallas en un 62.6 %. Al evaluar la mezcla de *T. koningiopsis* Th003 con quitosán se encontró significativamente la mayor reducción de agallas con 63.7 %. El presente trabajo permitió seleccionar tratamientos que evaluados de manera individual o en mezcla tienen potencial para el manejo de esta enfermedad.

Palabras clave: enfermedad, protozoo, biocontrol e interacción biológica.

Abstract

Spongospora subterranea f. sp. *subterranea* is an obligate pathogen which causes powdery scabies and root galls in potato, which limit global production since there are no effective control measures. With the aim of offering a control alternative we evaluated the control efficacy of individual and mixtures of microorganisms and organic additives on the Diacol Capiro cultivar. Potted plants in naturally infested soil were used to assay control efficacy by counting the number of root galls after eight week. Most microorganisms reduced the number of galls but only *Trichoderma koningiopsis* Th003 and *Bacillus amyloliquefaciens* Bs006 showed a significant reduction in one of four replicate (43.8 and 43.6 % respectively). Due to their efficacy and advances in technological developments, Th003, Bs006 and *S. misionensis* Ac006, were chosen for mixture assays. The mix of Th003 with Bs006 showed the strongest reduction in gall number (30.5 %), which was not significantly different from the individual microbials. Of the organic additives, 0.5 % chitosan significantly reduced the number of galls by 62.6 %. Among the mixtures of microbials and organic additives, the mix of Th003 with chitosan had the largest, and significant effect (63.7 %). This study identified treatments, which either individually, or as a mixture, have potential in root galls control.

Keywords: disease, protozoan, biocontrol, biological interactions

Contenido

Pág.

Resumen	IX
Abstract.....	X
Lista de figuras.....	XIV
Lista de tablas	XV
Lista de abreviaturas.....	XVI
Introducción	1
1. Justificación	5
2. Hipótesis.....	7
3. Objetivos.....	9
3.1 Objetivo General.....	9
3.2 Objetivos Específicos.....	9
4. Marco teórico.....	11
4.1 Sarna polvosa y camanduleo de la papa	11
4.1.1 Origen y distribución de <i>S. subterranea</i> en el mundo	11
4.1.2 Biología y ciclo de vida de <i>S. subterranea</i>	11
4.1.3 Síntomas en raíces y tubérculos	14
4.1.4 Factores para el desarrollo de la enfermedad	16
4.2 Manejo de la enfermedad	17
4.2.1 Mejoramiento genético por resistencia al protozoario	17
4.2.2 Control químico de <i>S. subterranea</i>	19
4.2.3 Rotación de cultivos con plantas trampa	19
4.2.4 Control biológico de <i>S. subterranea</i> con el uso de microorganismos	19
4.2.5 Otras alternativas en el control de <i>S. subterranea</i>	23
5. Materiales y Métodos	27
5.1 Características generales de los ensayos	27
5.2 Bioensayos con los microorganismos.....	28

5.3 Matriz de decisión para seleccionar biocontroladores	29
5.4 Bioensayos de mezcla entre los microorganismos	29
5.5 Ensayos con los aditivos orgánicos.....	29
5.6 Ensayos con los microorganismos y aditivos orgánicos en mezcla	30
5.7 Matriz de decisión para seleccionar las mezclas	30
5.8 Evaluación del camanduleo y variables de crecimiento vegetal	31
5.9 Análisis de resultados	31
5.10 Análisis estadístico.....	32
6. Resultados	33
6.1 Actividad biocontroladora de ocho microorganismos.....	33
6.2 Selección de biocontroladores – matriz de decisión	36
6.3 Actividad biocontroladora de la mezcla de microorganismos	37
6.4 Efecto de tres aditivos orgánicos a diferentes concentraciones	40
6.5 Actividad biocontroladora de la mezcla de microorganismos y aditivos orgánicos	42
6.6 Matriz de decisión para seleccionar las mezclas	44
7. Discusión.....	47
8. Conclusiones y recomendaciones	57
8.1 Conclusiones.....	57
8.2 Recomendaciones.....	58
8.3 Perspectivas.....	59
Bibliografía	61
A. Anexo: Procedencia de los microorganismos seleccionados.....	78
B. Anexo: Análisis combinado para las réplicas establecidas en el tiempo.....	79
C. Anexo: Análisis estadístico variables de desarrollo vegetal ensayo de eficacia con los biocontroladores	81
D. Anexo: Análisis estadístico variables de desarrollo vegetal ensayo de eficacia con los aditivos orgánicos	84
E. Anexo: Análisis estadístico desarrollo de agallas ensayo de eficacia con los biocontroladores.....	86
F. Anexo: Análisis estadístico de la relación porcentual en la mezcla de biocontroladores	88
G. Anexo: Análisis estadístico desarrollo de agallas ensayo de eficacia con los aditivos orgánicos	89

H. Anexo: Análisis estadístico de la relación porcentual en la mezcla de biocontroladores y aditivos orgánicos	90
I. Anexo: Resumen presentación XVII Congreso de la Asociación Latinoamericana de la Papa.	91

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1: Distribución global de <i>Spongospora subterranea</i>	10
Figura 2: Ciclo de vida tentativo de <i>Spongospora</i>	11
Figura 3: Síntomas de la sarna polvosa de la papa.....	12
Figura 4: Pelos radicales de <i>Solanum tuberosum</i> con <i>Spongospora subterranea</i>	13
Figura 5: Camanduleo de la papa ocasionada por <i>Spongospora subterranea</i>	13
Figura 6: Flujograma general de trabajo para evaluar el efecto individual y en mezcla de microorganismos y aditivos sobre el camanduleo de la papa.....	27
Figura 7: Efecto de los biocontroladores sobre el número de agallas en plantas de <i>Solanum tuberosum</i> cv. Diacol Capiro crecidas a la intemperie en Subachoque.....	32
Figura 8: Efecto de la mezcla de biocontroladores sobre el número de agallas en plantas de <i>Solanum tuberosum</i> cv. Diacol Capiro crecidas a la intemperie en Subachoque.....	36
Figura 9: Efecto de tres aditivos orgánicos en diferentes concentraciones sobre el número de agallas en plantas de <i>Solanum tuberosum</i> cv. Diacol Capiro crecidas a la intemperie en Subachoque	38
Figura 10: Efecto de la mezcla de biocontroladores y aditivos orgánicos sobre el número de agallas en plantas de <i>Solanum tuberosum</i> cv. Diacol Capiro crecidas a la intemperie en Subachoque.....	40

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1: Efecto de biocontroladores sobre la formación de agallas producidas por <i>Spongospora subterranea</i> en plantas de <i>Solanum tuberosum</i> cv. Diacol Capiro en dos réplicas establecidas a la intemperie en Subachoque.....	34
Tabla 2: Matriz de decisión para seleccionar los biocontroladores.....	35
Tabla 3: Efecto de la mezcla de biocontroladores sobre la formación de agallas producidas por <i>Spongospora subterranea</i> en plantas de <i>Solanum tuberosum</i> cv. Diacol Capiro en dos réplicas establecidas a la intemperie en Subachoque.....	37
Tabla 4: Interacciones microbianas sobre la formación de agallas producidas por <i>Spongospora subterranea</i> en plantas de <i>Solanum tuberosum</i> cv. Diacol Capiro en dos réplicas establecidas a la intemperie en Subachoque.	37
Tabla 5: Efecto de aditivos orgánicos sobre la formación de agallas producidas por <i>Spongospora subterranea</i> en plantas de <i>Solanum tuberosum</i> cv. Diacol Capiro en las dos réplicas establecidas a la intemperie en Subachoque.....	39
Tabla 6: Efecto de la mezcla de biocontroladores y aditivos orgánicos sobre la formación de agallas producidas por <i>Spongospora subterranea</i> en plantas de <i>Solanum tuberosum</i> cv. Diacol Capiro en dos réplicas establecidas a la intemperie en Subachoque.....	41
Tabla 7: Interacciones sobre la formación de agallas en la raíz por <i>Spongospora subterranea</i> en plantas de <i>Solanum tuberosum</i> cv. Diacol Capiro en dos réplicas establecidas en materas a la intemperie en Subachoque.	42
Tabla 8: Matriz de decisión para seleccionar las mezclas de biocontroladores y de los aditivos orgánicos con los biocontroladores.....	43

Lista de abreviaturas

Símbolos

Unidad SI	Término
t	tonelada
ha	hectárea
g	gramo
mm	milímetro
µm	micrómetro
mL	mililitro
mg	miligramo
min	minutos
°C	grados Celcius
cv.	cultivar, cultivares

Abreviaturas

Abreviatura	Término
PMTV	Potato Mop top Virus
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
dds	Días después de siembra
DCA	Diseño Completamente al Azar
BCA	Bloques Completos al Azar
PDA	Potato Agar Dextrosa
LB	Luria Bertani
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid
SAR	Sistemic Acquired Resistance
SIR	Sistemic Induced Resistance
PGPRs	Plant Growth Promoting Rhizobacteria

Introducción

El cultivo de la papa es originaria de la cordillera de los Andes, siendo actualmente base de la alimentación humana llegando a ser el cuarto producto agrícola sembrado en más de 100 países (MAVDT y Fedepapa, 2004). En Colombia se cultiva en las zonas altas de las tres cordilleras, siendo los departamentos de Cundinamarca, Boyacá y Nariño los mayores cultivadores, con el 80 % del área sembrada y de la producción Nacional (ICA, 2011). Sin embargo, las condiciones climáticas prevalecientes en nuestro país, el manejo ineficiente del cultivo, entre otros factores ha llevado al aumento de pérdidas de rendimientos por la alta incidencia de enfermedades tanto foliares como edáficas, siendo económicamente importantes como habitantes naturales del suelo, la sarna polvosa o camanduleo ocasionada por el protozoario *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea*, Rizoctoniasis o Costra negra de la papa ocasionada por *Rhizoctonia solani*, Mortaja blanca o palomillo por *Rosellinia* sp., pata negra agente causal *Pectobacterium atrosepticum*, pudrición blanda del tubérculo ocasionada por *Pectobacterium carotovorum* y la sarna común por *Streptomyces scabies* (ICA, 2011).

Recientemente se ha identificado que *S. subterranea* ocasiona tres distintas enfermedades en las plantas de papa: sarna polvosa en los tubérculos, disfunción de la membrana de la raíz e hiperplasia de la raíz conocida comúnmente como camanduleo de la papa (Falloon *et al.*, 2016). La infección en raíces por *S. subterranea* disminuye el área de intercambio de las raíces, lo que afecta el crecimiento de la planta y disminuye el área foliar efectiva, reduciendo la translocación de nutrientes hacia los tubérculos y finalmente reduce la producción (Fallon *et al.*, 2005; Shah *et al.*, 2011; Falloon *et al.*, 2016). Además, este fitopatógeno puede servir como vector del virus Potato Mop Top Virus (PMTV) uno de los problemas virales prevalentes en la región Andina y que presenta carácter cuarentenario para diferentes países del mundo (Jones y Harrison, 1969; Santala *et al.*, 2010). Hasta la fecha *S. subterranea* se encuentra a nivel global y sigue habiendo nuevos registros en diferentes países, por lo cual las enfermedades ocasionadas por este fitopatógeno representan un gran impacto económico en la

producción Mundial de papa (Turka y Bimšteine, 2011; Vakalounakis *et al.*, 2014; Kanetis *et al.*, 2015; Mallik y Gudmestad, 2015). En Washington, USA, los rendimientos de las variedades con tubérculos de color rojo se reduce en algunos ciclos del cultivo entre 5-12 t.ha⁻¹ por infecciones en las raíces ocasionadas por *S. subterranea* (Nitzan *et al.*, 2008). Falloon *et al.*, (2016) evidenciaron reducción del peso de los tubérculos por planta en un 42 % con la inoculación e infección de *S. subterranea* en las raíces. En Australia las pérdidas debido a la sarna polvosa se estimaron en \$13.4 millones.año⁻¹ o aproximadamente en el 4 % del valor de la producción bruta (Wilson, 2014). En Colombia la diseminación de *S. subterranea* se viene incrementando, como resultado de la deficiente calidad de la semilla utilizada (Gil *et al.*, 2011), siendo la primer fuente de diseminación del patógeno, el cual una vez establecido en el suelo, produce una gran cantidad de esporosoros, estructuras de resistencia que pueden sobrevivir por varios años en el suelo y se convierten en el inóculo primario de la enfermedad en los siguientes ciclos del cultivo (De Boer, 2000a; Van De Graaf *et al.*, 2005; Merz, 2008).

La interacción de *S. subterranea* con el ambiente antes de que llegue el huésped no es muy conocida y las características biológicas del patógeno como, prolongada persistencia en el suelo, alto y rápido potencial reproductivo y la habilidad de infectar hospederos alternos, impiden el desarrollo de medidas eficaces para su manejo (Falloon, 2008). Así mismo, no se han desarrollado variedades resistentes, no existen fungicidas de síntesis química para su control y no se han establecido prácticas culturales eficaces (Qu y Christ, 2006; Falloon, 2008). Por otra parte, este cultivo presenta la mayor demanda de fungicidas e insecticidas para el control de sus problemas fitosanitarios, y el segundo en utilización de fertilizantes (ICA, 2011). Sin embargo, cada vez son mayores las restricciones sobre el uso de compuestos químicos, debido a sus efectos toxicológicos, a los residuos en los tubérculos, a la contaminación del medio ambiente y a la aparición de patógenos e insectos resistentes, por lo que se requiere del desarrollo de soluciones efectivas, de bajo costo y amigables con el medio ambiente (ICA, 2011).

El uso de microorganismos biocontroladores y enmiendas orgánicas ha tenido gran atención en los últimos años para el manejo de diferentes enfermedades, debido a que se ha identificado efectos indirectos sobre la enfermedad mediante la inducción de respuestas de defensa en las plantas contra el ataque del patógeno, además los biocontroladores pueden tener efectos directos sobre el desarrollo de estos mediante

relaciones antagónicas o parasíticas (Benítez *et al.*, 2004; Franco *et al.*, 2013; Chowdhury *et al.*, 2015; Poomthongdee *et al.*, 2015). Es así como Nielsen y Larsen, (2004) demostraron el potencial de *Trichoderma harzianum* para reducir las infecciones de la raíz de tomate causadas por *S. subterranea* en condiciones de materas bajo invernadero, aplicando al suelo las formulaciones del biocontrolador mezcladas con esporosoros del patógeno.

En Colombia, Hoyos *et al.* (2008) demostraron que *Trichoderma asperellum* bajo condiciones controladas, promovió el crecimiento de plantas de papa y redujo el número de nódulos de *S. subterranea* en las raíces. En condiciones de campo Restrepo *et al.*, (2009) evaluaron los efectos de dos biocontroladores potenciales (*T. harzianum* y *Pseudomonas fluorescens*), un consorcio de micorrizas y viruta de pino sobre el control de *S. subterranea* en papa Diacol Capiro que es muy susceptible a la sarna polvosa. Estos tratamientos redujeron la incidencia en un 27 % en raíces y 2.1 % en tubérculos, sin embargo, no encontraron diferencias significativas de la severidad entre los tratamientos, tanto en raíces como tubérculos. Bastidas (2010) luego de inocular con 10 aislamientos de *Pseudomonas* spp., obtuvo niveles de control entre el 20 y 76 % en términos de reducción de agallas en la raíz, según la especie hospedera y el aislamiento bacteriano empleado bajo condiciones de invernadero.

Otras alternativas de control de *S. subterranea* son las sustancias de origen natural que actúan en forma preventiva, por inducción de resistencia en el huésped, o por estimulación de la flora benéfica del suelo, es el caso del biocarbón (Elad *et al.*, 2010), quitina (Cohen, 2001) y quitosán (Sánchez *et al.*, 2007; Nunes da Silva *et al.*, 2014). Además, el uso de estas sustancias naturales puede llegar a potenciar la acción de los microorganismos antagonistas (Tian *et al.*, 2000; Matsubara *et al.*, 2002).

El biocarbón, carbón vegetal producido por combustión de materia orgánica bajo condiciones de baja oxigenación, llamada pirolisis (Sohi *et al.*, 2009), es objeto de mucha atención desde los últimos años. La quitina es un polímero N-acetil D-glucosamina unido por enlace $\beta(1,4)$ que tiene propiedades físico-químicas y biológicas de gran interés en el área agrícola (Tharanathan y Kittur, 2003). Así mismo, el quitosán es un polímero de β -1,4-glucosamina, que se encuentra formando parte de la pared de hongos, en especial de los zigomicetos y se puede producir por desacetilación de la quitina presente en el

exoesqueleto de artrópodos (Winterowd y Sandford, 1995). El quitosán es el aminopolisacárido más abundante de origen natural, no es tóxico, es bioactivo, y ha sido objeto de estudio debido a sus características fisicoquímicas y actividad biológica (Goy *et al.*, 2009; Rabea *et al.*, 2003).

Se ha señalado que no existe un único método de control que por sí solo sea efectivo contra este patógeno y permita la reducción del inóculo o su capacidad de infección (Harrison *et al.*, 1997; De Boer, 2000b; Wale, 2000a) y se concuerda en que la solución al problema debe ser abordada de manera integral (Falloon, 2008). Por lo tanto, es necesario determinar el efecto de la mezclas de biocontroladores y aditivos orgánicos en el desarrollo del camanduleo, debido que se ha observado que las cepas difieren en sus modos de acción según las especies de plantas, además el suelo, la rizósfera y el interior de las raíces representan nichos para organismos funcionalmente diferentes (Van Loon *et al.*, 1998; Henry *et al.*, 2012; Wiesel *et al.*, 2014; Le Mire *et al.*, 2016).

Teniendo en cuenta los diferentes síntomas y limitantes del camanduleo de la papa ocasionado por *S. subterranea*, la presente investigación pretende determinar el efecto de diversos microorganismos y de algunos aditivos orgánicos, tanto individualmente como en mezcla, sobre la reducción del camanduleo de la papa en condiciones semicontroladas.

1. Justificación

Uno de los principales productos agrícolas en el país es la papa, con un área sembrada de 165.733 ha, una producción nacional de 2.582.147 t, y con una participación del 3.3 % en el PIB agropecuario. Además, la cadena de la papa en Colombia genera anualmente cerca de 264 mil empleos totales, en donde aproximadamente 100 mil familias se dedican a este cultivo, en 10 departamentos y 283 municipios (DANE, 2016). Sin embargo, el evidente cambio climático, el manejo ineficiente del cultivo, entre otros factores, ha contribuido a la diseminación de plagas y enfermedades, afectando negativamente la sanidad y productividad de la papa (ICA, 2011). Entre los patógenos asociados al suelo se encuentra *S. subterranea*, protozoo que afecta la calidad comercial de los tubérculos y ocasiona daños en las raíces, disminuyendo significativamente el rendimiento del cultivo (Fallon *et al.*, 2016). Además, este fitopatógeno puede servir como vector del virus PMTV (Santala *et al.*, 2010).

A pesar de que *S. subterranea* representa una gran problemática para la producción de papa, el manejo de la sarna polvosa y camanduleo de la papa es difícil de lograr debido a varios factores, entre los que se encuentran: sobrevivencia por varios años en el suelo (Fallon, 2008), no existen agroquímicos registrados para su control, el manejo cultural implica rotaciones de muchos años con cultivos específicos y no se encuentran variedades comerciales resistentes (Qu y Christ, 2006). Es importante resaltar que este cultivo presenta la mayor demanda de fungicidas para el control de sus problemas fitosanitarios, lo cual representa una fuente importante de contaminantes al medio ambiente y una alta probabilidad de tener residualidad en los tubérculos, afectando silenciosamente la salud humana (ICA, 2011).

Debido a la alta complejidad de este patosistema surge la necesidad e importancia de investigar, desarrollar y generar nuevas estrategias amigables con el medio ambiente y

de bajos costos de producción, que puedan ser incorporadas en programas de manejo integrado. En este sentido, varios estudios han identificado efecto de algunos microorganismos biocontroladores sobre las enfermedades ocasionadas por *S. subterranea* (Nielsen y Larsen, 2004; Hoyos *et al.* 2008; Restrepo *et al.*, 2009; Bastidas, 2010). Sin embargo, la mayoría de los estudios evalúan el uso solamente de *Trichoderma* spp., existiendo una gran diversidad de microorganismos para ser evaluados en el biocontrol de *S. subterranea*. Así mismo, existen sustancias de origen natural que actúan en forma preventiva, por inducción de resistencia en el huésped, o por estimulación de la flora benéfica del suelo (Sánchez *et al.*, 2007; Nunes da Silva *et al.*, 2014). De esta manera, la presente investigación pretende determinar el efecto de diversos microorganismos y de algunos aditivos orgánicos, tanto individualmente como en mezcla, sobre la reducción del camanduleo de la papa.

2. Hipótesis

Diferentes cepas de microorganismos previamente seleccionadas por su potencial de biocontrol en diferentes pato-sistemas como *Trichoderma* spp., Actinomicetos y Rizobacterias actuarán en la disminución de agallas ocasionadas por *S. subterranea*. Así mismo, algunos aditivos orgánicos, como el biocarbón, quitina y quitosán reducirán de forma significativa el número de las agallas. Por lo tanto, la mezcla de biocontroladores y un aditivo orgánico ejercerá mayor control del camanduleo de la papa.

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Generar una alternativa de manejo del camanduleo de la papa ocasionada por el protozoo *S. subterranea*, con el uso de microorganismos biocontroladores y aditivos orgánicos.

3.2 Objetivos Específicos

- Seleccionar biocontroladores y aditivos orgánicos que aplicados de forma individual exhiban el mayor potencial en la reducción de la enfermedad camanduleo de la papa en condiciones semicontroladas.
- Determinar el efecto de mezclas de biocontroladores y aditivos orgánicos en la disminución del camanduleo de la papa en condiciones semicontroladas.

4. Marco teórico

4.1 Sarna polvosa y camanduleo de la papa

La papa (*Solanum tuberosum* L.) se encuentra entre los diez alimentos más importantes producidos en los países en desarrollo. A nivel mundial cerca de 40 enfermedades del suelo afectan las plantas papa y causan severos daños especialmente sobre los tubérculos, órgano económicamente más importante de la planta. La ocurrencia y desarrollo de las enfermedades del suelo dependen de varios factores que afectan ya sea el patógeno o la planta, y en la mayoría de los casos las condiciones favorables para el desarrollo de las enfermedades son las mismas que necesita el cultivo de papa (Fiers *et al.*, 2011).

4.1.1 Origen y distribución de *S. subterranea* en el mundo

El centro de origen del patógeno es Sur América, hogar ancestral de sus hospederos las solanáceas (Lyman y Rogers, 1915). *S. subterranea* se encuentra en la mayoría de los países cultivadores de papa (Figura 1) y hasta la fecha se continúan con nuevos reportes a nivel mundial (Vakalounakis *et al.*, 2014; Kanetis *et al.*, 2015; Mallik y Gudmestad, 2015). La sarna polvosa de la papa fue observada por primera vez en Alemania (Wallroth, 1842), mientras que 71 años después en 1912 Pethybridge señaló la formación de agallas en las raíces por la infección de *S. subterranea* (Ledingham, 1935). Actualmente, Falloon *et al.*, (2016) describen una tercera enfermedad que consiste en la disfunción de la membrana de la raíz, diferente al desarrollo de agallas.

4.1.2 Biología y ciclo de vida de *S. subterranea*

S. subterranea (Wallr.) Lagerheim f. sp. *subterranea* TomLinson es un protista de la familia *Plasmodiophoridae* (Cavalier, 1993). Este grupo se caracteriza por la formación de zoosporas biflageladas de desigual tamaño con mastigonemas y posición opuesta, que se liberan de las estructuras de resistencia llamados esporosoros (Braselton, 1995;

Merz, 1997), los cuales diseminan la infección en el campo, son portadoras de virus y es el principal blanco de medidas de control (Falloon, 2008).

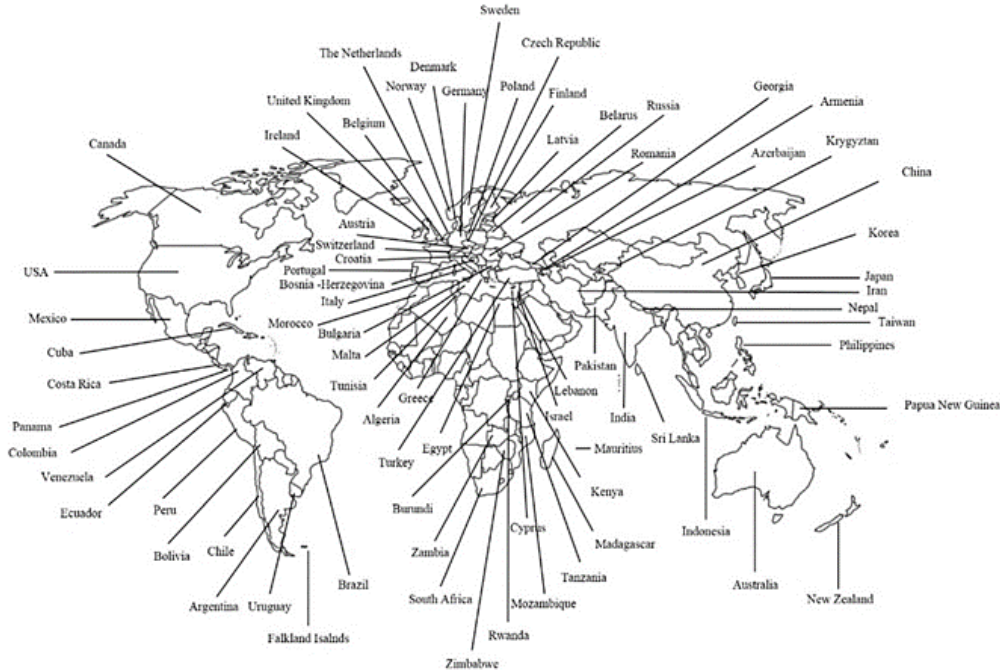


Figura 1: Distribución global de *S. subterranea*. Patógeno detectado en plantas de papa o tomate. Fuente Balendres *et al.*, 2016.

Según Merz, (2008) hay dos fases importantes del ciclo de vida de este patógeno, cada una inicia con la infección de las células del hospedero a partir de un plasmodio singular (Figura 2). En la fase esporangial, numerosas zoosporas secundarias son formadas dentro de zoosporangios de pared delgada, que se desarrollan a partir de plasmodios sporangionosos multinucleados en las células epidérmicas de las raíces o pelos radicales. Las zoosporas biflageladas salen del huésped y comienzan nuevos ciclos de infección (Figura 2 círculo interior). Con la fase esporogénica, después de divisiones nucleares y de la escisión dentro del plasmodio esporogénico, se producen esporas de resistencia (esporosoros) que tienen una pared gruesa lo que las hace altamente resistentes en el suelo y de cada espora se presenta la liberación de una zoospora primaria biflagelada, la cual entra en el sistema radical del huésped (Figura 2 círculo exterior). Cambios en la planta y condiciones ambientales pueden afectar la liberación de compuestos específicos que estimulan la liberación de las esporas (Balendres *et al.*, 2016).

Los estados circulares del ciclo de vida y los estados haploide/diploide aún no son muy claros. Sin embargo, dentro del grupo de los plasmodiophoridos la historia de vida mejor conocida es de *Plasmodiophora brassicae* Woron., a la que se le conoce una fase sexual y una asexual. Durante la fase sexual dos zoosporas se fusionan y un plasmodio binucleado infecta las células del hospedero. El plasmodio esporogénico empieza divisiones nucleares mitóticas y se desarrolla un largo plasmodio multinucleado. A continuación, sucede cariogamia y la meiosis se produce antes de la formación de esporas en reposo (Fähling *et al.*, 2004). Sí una fase sexual también existe en el ciclo de vida de *S. subterranea*, se debe esperar dentro de las poblaciones un alto grado de diversidad. Hasta ahora, las secuencias de ITS de colecciones de campo procedentes de diferentes continentes se han comparado, y sólo han podido ser identificados dos grupos genéticamente distintos (Qu y Christ, 2004).

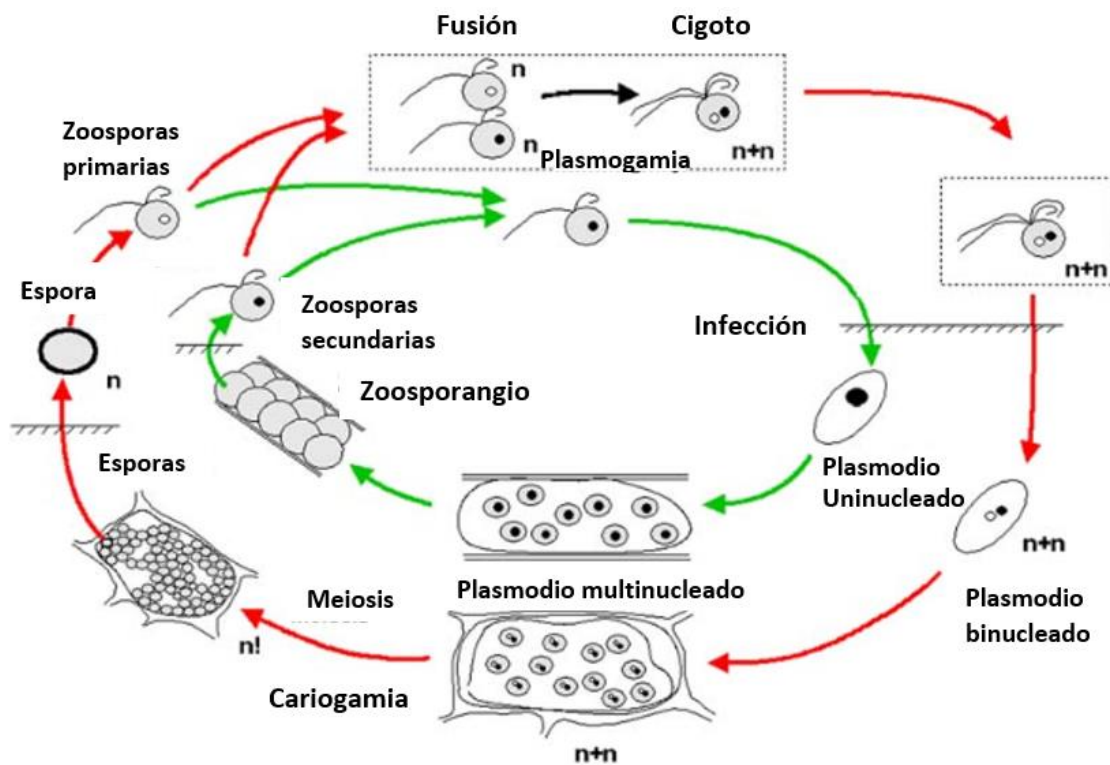


Figura 2: Ciclo de vida tentativo de *Spongospora*, fase asexual (círculo interior) y fase sexual (círculo exterior). Fuente: Merz, 2008

4.1.3 Síntomas en raíces y tubérculos

Se identifican tres distintas enfermedades en las plantas de papa ocasionadas por *S. subterranea*: sarna polvosa en los tubérculos, disfunción de la membrana de la raíz e hiperplasia de la raíz conocida comúnmente como camanduleo de la papa (Falloon *et al.*, 2016). La sintomatología ocasionada en los tubérculos consiste en lesiones pulverulentas sobre el peridermo y deformación de los mismos en infecciones severas, reduciendo significativamente la calidad, los rendimientos y su valor comercial. La infección se presenta a manera de pústulas de color castaño claro, de 0.5 a 2.0 mm de diámetro, que se extienden lateralmente debajo de la peridermis formando lesiones levantadas, el aumento de tamaño y división de las células parasitadas empuja y rompe el peridermo, formando proyecciones con apariencia de verrugas (Figura 3). Bajo la lesión se forma peridermo de cicatrización, que se va oscureciendo gradualmente y se deteriora, dejando una depresión superficial llena de una masa pulverulenta de esporas aglutinadas o esporosoros de color castaño oscuro (Osborn, 1911; Lawrence y McKenzie, 1980).

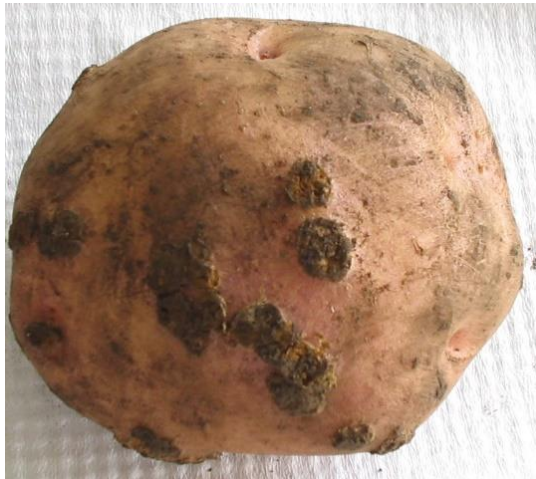


Figura 3: Síntomas de la sarna polvosa de la papa ocasionada por *Spongospora subterranea*. Fuente: Celsa García

La disfunción de la membrana de la raíz sucede cuando la zoospora se enquista y perfora las células de los pelos radicales del hospedero (Figura 4), probablemente alterando la función de la raíz debido al deterioro de las membranas de la epidermis de la raíz y de las paredes celulares (Fallon *et al.*, 2005; Falloon *et al.*, 2016).

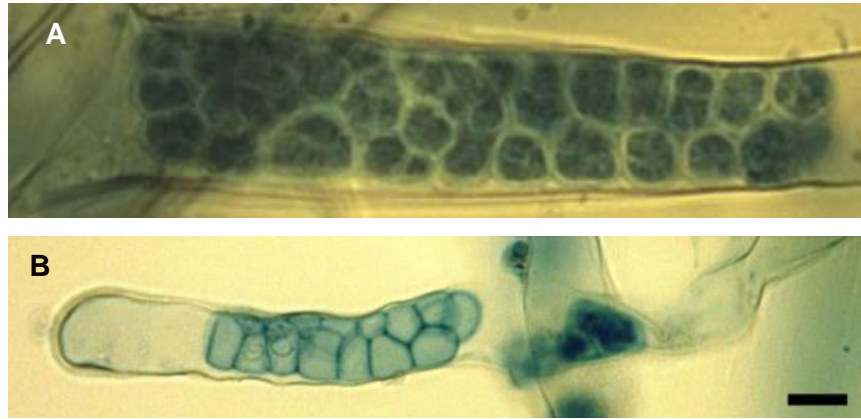


Figura 4: Pelos radicales de *S. tuberosum* con *Spongospora subterranea*. A: pelos radicales con zoosporangios cada uno con cuatro zoosporas internas. B: pelos radicales con zoosporangios cuyas zoosporas ya han sido liberadas. Teñido con azul de tripano; barra=10 μ m. Fuente: Falloon *et al.*, 2016.

Por último, el camanduleo ocasionado en las raíces por hipertrofia e hiperplasia de las células radicales, se manifiesta en la formación de agallas alrededor de la raíz (Figura 5) (Van De Graaf *et al.*, 2007). Las agallas contienen los esporosoros (Merz *et al.*, 2004) a manera de masas pulverulentas y dentro de ellos se encuentran las estructuras de descanso. Las nodulaciones generadas inicialmente son de color blanco lechoso y a medida que maduran se tornan de un color castaño (Balendres *et al.*, 2016). Se ha observado que algunos hospederos no forman estolones o tubérculos, sino abundantes agallas, afectando seriamente el rendimiento del cultivo (Nitzan *et al.*, 2008).



Figura 5: Camanduleo de la papa ocasionada por *Spongospora subterranea*. a) agalla joven sobre una raíz; barra = 2mm. Fuente: Falloon *et al.*, 2016. b) agallas desarrolladas en las raíces de papa, flecha amarilla: inicio de agalla color blanco lechoso, flecha roja: agalla madura de color castaño. Fuente: Celsa García.

En Colombia se han reportado pérdidas hasta del 50 % de las cosechas y 30 % en la reducción del peso de los tubérculos (Gilchrist *et al.*, 2011). Además, este patógeno puede servir como vector del virus PMTV (Jones y Harrison, 1969; Gallo *et al.*, 2013), y se estima que este virus puede causar pérdidas hasta del 25 % de este cultivo, lo cual adicionado al daño ocasionado por *S. subterranea*, se pueden estar presentando disminuciones del 50 – 80 % en la producción (Jones y Harrison, 1972; Guerrero, 2000).

4.1.4 Factores para el desarrollo de la enfermedad

La temperatura óptima para la expresión de síntomas de la sarna polvosa en los tubérculos es de 12 °C, mientras que los resultados obtenidos luego de cuantificar la cantidad de ADN en la piel de los tubérculos determinaron que las cantidades más altas se registraron en las plantas que crecieron a 9 °C, lo cual indica que la enfermedad es un problema para regiones con promedios bajos de temperatura (Van De Graaf *et al.*, 2005). Estos resultados coinciden con las investigaciones de Boer, (2000a) en un experimento con papa (cv. Kennebec) en las que encontraron niveles de enfermedad mayores a temperaturas de 12.5 °C y bajo en temperaturas entre 17.5 y 20 °C. Posteriores ensayos en donde se evaluó la formación de agallas en raíces permitieron dilucidar que esta sintomatología es más común a 17 °C (Van De Graaf *et al.*, 2007), en contraste con la temperatura óptima de 12 °C determinada para lesiones en el tubérculo (Van De Graaf *et al.*, 2005). Además no se observó formación de nodulaciones a 9 °C, a pesar que fue detectable la infección en raíces de acuerdo a la cuantificación de ADN (Van De Graaf *et al.*, 2007).

La humedad es otro factor que determina el comportamiento de *S. subterranea*. Una aproximación hecha por de Boer (2000a) mostró el más alto índice de enfermedad, determinado por la cantidad de zoosporangios presentes en pelos radicales de plantas de papa cv. Sebago, en suelos cercanos a saturación, mientras el índice decreció de manera proporcional a medida que la humedad del suelo se redujo.

Por otra parte, pruebas realizadas en plantas crecidas en suelos con humedad constante mostraron los más altos niveles de infección y enfermedad comparado con plantas que crecieron bajo un régimen de humedad fluctuante (Van De Graaf *et al.*, 2005, 2007). Esto fue reportado también por Wale (2000a).

El pH ácido puede resultar en la reducción de niveles de severidad e incidencia de la enfermedad (De Boer, 2000b), fenómeno que se puede explicar por la liberación de zinc y manganeso que pueden causar efectos tóxicos sobre las zoosporas de *S. subterranea* (Burnett, 1991; Falloon *et al.*, 2010).

4.2 Manejo de la enfermedad

Las estrategias desarrolladas para el control de *S. subterranea* están focalizadas en los esporosoros y en la prevención de la infección causada por las zoosporas en la raíz del huésped. Estos métodos buscan romper el ciclo del patógeno en uno o en los dos estados. Los métodos pueden ser aplicados cronológicamente, desde antes de la siembra, durante el establecimiento y crecimiento del cultivo. Es necesario integrar varios métodos para el control de este patógeno, debido a que no existe un único método disponible. Las prácticas que se pueden incluir en el manejo integrado son: rotación de cultivos, periodos prolongados de descanso del cultivo, selección de campos de siembra libre del patógeno, selección de cultivares resistentes, siembra de semilla libre del patógeno, control químico, control biológico e higiene en las prácticas culturales (Falloon, 2008).

Sin embargo, el control de la sarna polvosa y camanduleo de la papa es difícil de lograr debido a que los esporosoros presentes en el suelo pueden sobrevivir hasta por más de 50 años (Falloon, 2008), y no existen agroquímicos registrados para su manejo. Además, el manejo cultural implica rotaciones de muchos años con cultivos específicos y no se encuentran variedades comerciales resistentes (Qu y Christ, 2006). De esta manera, en la primera reunión europea de trabajo de sarna polvosa, se propuso adelantar investigación en el área de control biológico mediante la búsqueda e identificación de antagonistas contra *S. subterranea* (De Boer, 2000b).

4.2.1 Mejoramiento genético por resistencia al protozoario

Los primeros reportes en la región Andina fueron presentados por Torres *et al.*, (1995) quienes evaluaron 467 accesiones, encontrando la existencia de 17 genotipos resistentes y 33 moderadamente resistentes. Por otra parte, Lees, (2000) en Escocia, evaluó los niveles de resistencia a *S. subterranea* de una serie de clones de *Solanum phureja*, encontrando que algunos de éstos presentaron un adecuado nivel de resistencia, por lo

que esta especie fue propuesta como fuente de genes de resistencia. Merz, (2000) al evaluar la reacción de 11 cultivares determinó que existe correlación entre las pruebas de invernadero utilizando plántulas provenientes de cultivo de tejidos y la resistencia presentada en campo. Falloon *et al.*, (2003), realizaron un estudio en Australia con 99 cv.es de papa y 13 líneas de mejoramiento durante 11 años. Sus resultados indicaron que 21 % de los materiales evaluados eran resistentes, mientras que el 28 % presentó una resistencia moderada. Estos autores también reportaron que la expresión de la resistencia varía entre años y que los bioensayos realizados en invernadero, no siempre se correlacionaban con la respuesta presentada en campo, sugiriendo una fuerte interacción genotipo ambiente para esta característica.

Nitzan *et al.*, (2010), evaluaron la estabilidad de la resistencia genética de 24 genotipos de papa a *S. subterranea* en los estados de Washington e Idaho en Estados Unidos. Se identificó que la resistencia era estable al camanduleo y se determinó dejar una gran proporción de la variación genética. En otro estudio se evaluaron 10 cultivares con diferentes rangos de susceptibilidad a *S. subterranea* y a PMTV en diferentes países de Europa, para evitar discrepancias en los criterios de evaluación, se utilizó una escala estándar para los niveles de la sarna polvosa, determinándose que los cultivares se comportaron como estaba establecido en su caracterización inicial (a excepción de uno de ellos). Los resultados del ensayo de campo indicaron que los diferentes métodos de valoración son el principal factor de discrepancia en las calificaciones de la resistencia y que las condiciones ambientales y/o el nivel de inóculo del suelo juegan un papel menor (Merz *et al.*, 2012). En otra investigación desarrollaron un modelo de varianza genética para la evaluación de la resistencia a la sarna polvosa, y evidenciaron que no hubo mejora genética en la resistencia a *S. subterranea* en la población estudiada, lo que sugiere que la presión de selección para la resistencia ha sido débil y se debe prestar mayor atención a la selección de los parentales sobre los valores genéticos empíricos para mejorar las poblaciones genéticas y por ende la resistencia a la sarna polvosa de la papa (Paget *et al.*, 2014). Bittara *et al.*, (2016) en condiciones de campo evaluaron durante dos años 30 cultivares y 83 clones avanzados, encontrando los genotipos cuya epidermis era de color rojizo fueron más resistentes a la sarna polvosa, pero produjeron niveles similares del camanduleo que los genotipos de color rojo.

4.2.2 Control químico de *S. subterranea*

En un estudio desarrollado en tres regiones productoras de papa en Colombia se evaluó el efecto de Tiabendazol, Tolclofos metil, Benomyl, Carbendazin, Clorotalonil y Mancozeb aplicados al suelo para el manejo de *S. subterranea*. Sin embargo, se determinó que ninguno de los fungicidas contribuyó con el control del patógeno en raíces y tubérculos bajo las dosis y condiciones presentes de tres localidades productoras de papa (García y Navia, 2002). Falloon *et al.*, (2010) indican que niveles elevados de Zinc y Manganeso disminuyen moderadamente el desarrollo de agallas ocasionadas por *S. subterranea*. En otro estudio se evaluó el fungicida Mancozeb en condiciones de invernadero y los fungicidas Fluoanim y Mancozeb en condiciones de cultivo comercial aplicados al suelo y a la semilla, se evidenció que todos los tratamientos químicos suprimieron la multiplicación del patógeno y la enfermedad en raíces y tubérculos, excepto cuando se aplicó Mancozeb al suelo (Thangavel *et al.*, 2015).

4.2.3 Rotación de cultivos con plantas trampa

Es una estrategia con alto potencial para el manejo de la enfermedad, ya que reduce el nivel de estructuras de resistencia de plasmodiophoridos. Por ejemplo, es ampliamente conocido que la siembra de *Raphanus sativus* reduce la cantidad de quistes de *P. brassicae* Wor. en el suelo (Murakami *et al.*, 2000), mientras que la planta *Datura stramonium* L. redujo el nivel de *S. subterranea* en un 79 % en cultivos de papa de Australia. En Colombia, la búsqueda de herramientas para el manejo de la sarna polvosa bajo las condiciones de las zonas productoras de papa, se enfocó en la evaluación de sistemas de rotación de variedades comerciales que tradicionalmente se han considerado altamente susceptibles a la enfermedad (cv. Diacol Capiro) con variedades más tolerantes al ataque del patógeno (cv. ICA Puracé), encontrándose que efectivamente esta última variedad presenta una menor susceptibilidad a la sarna polvosa (Jaramillo y Botero, 2007).

4.2.4 Control biológico de *S. subterranea* con el uso de microorganismos

Ante la falta de opciones de manejo de esta enfermedad, algunos investigadores han dirigido sus esfuerzos hacia el control biológico, ya que esta alternativa es amigable con el medio ambiente y no tiene un efecto negativo sobre la salud animal y humana. Es así

como Nielsen y Larsen, (2004) demostraron el potencial de *T. harzianum* para reducir las infecciones de la raíz de tomate causadas por *S. subterranea* en condiciones de materas bajo invernadero, aplicando al suelo las formulaciones del biocontrolador mezcladas con esporosoros del patógeno.

En Colombia, Hoyos *et al.*, (2008) demostraron que *T. asperellum* bajo condiciones controladas, promovió el crecimiento de plantas de papa y redujo el número de agallas de *S. subterranea* en las raíces. De otra parte, Gilchrist *et al.*, (2009) en condiciones de campo se investigó la influencia de cuatro aislamientos de *T. asperellum* sobre la sarna polvosa en tres tipos de suelo: Andisol, Entisol e Inceptisol. Aunque no se encontraron diferencias significativas en el crecimiento de las plantas y en su producción, sí se encontró que dichas variables estuvieron inversamente asociadas con el contenido de Al en los suelos, sugiriendo que los efectos de la sarna polvosa están fuertemente relacionados con las condiciones del suelo (Gilchrist *et al.*, 2009). En un estudio similar (Gilchrist *et al.*, 2010), evaluó la misma cepa de *T. asperellum* utilizada por Hoyos *et al.*, (2008) en condiciones de campo utilizando tres dosis de aplicación del biocontrolador, se encontró que la aplicación de *T. asperellum* T109 redujo en un 64 y 54 % los efectos de la sarna polvosa sobre la longitud de las plantas y su producción, respectivamente.

Restrepo *et al.*, (2009) evaluaron en un cultivo comercial los efectos de dos biocontroladores potenciales (*T. harzianum* y *Pseudomonas fluorescens*), un consorcio de micorrizas y viruta de pino sobre el control de *S. subterranea* en papa Diacol Capiro que es muy susceptible a la sarna polvosa. Estos tratamientos redujeron la incidencia en un 27 % en raíces y 2.1 % en tubérculos, sin embargo, no encontraron diferencias significativas en la severidad observada en los tratamientos, tanto en raíces como tubérculos. Bastidas, (2010) luego de inocular tubérculos semilla con 10 aislamientos de *Pseudomonas* spp. obtuvo niveles de control entre el 20 y 76 % en términos de reducción de agallas en raíz, según la especie hospedera (*S. tuberosum* o *S. phureja*) y el aislamiento bacteriano empleado bajo condiciones de invernadero.

A pesar de ser limitados los trabajos relaciones en control biológico con *S. subterranea*, hay varios reportes de control biológico de enfermedades producidas por patógenos del suelo, que podrían tener un efecto en la reducción del camanduleo de la papa. A

continuación se citarán los microorganismos que han demostrado el mayor potencial en diferentes patosistemas.

Manejo de fitopatógenos del suelo con el uso de *Trichoderma* spp.

Este género se encuentra ampliamente distribuido a nivel mundial, siendo el primer agente de control biológico identificado (Howell, 2003). Por tal razón, la mayoría de los estudios mencionados anteriormente en el control de *S. subterranea* han sido con este género. Son varios los mecanismos antagónicos identificados sobre fitopatógenos, tales como competencia por nutrientes, mico parasitismo, antibiosis y efectos sobre las plantas, implicando la modificación de la rizósfera, colonización radical, solubilización de nutrientes, promoción del crecimiento, tolerancia a estrés de tipo biótico y abiótico, e inducción de resistencia (Howell, 2003; Benítez *et al.*, 2004; Ozbay y Newman, 2004; Anand y Reddy, 2009).

En cuanto a patógenos del suelo, como lo menciona *Srivastava et al.*, (2015) *Trichoderma* spp. “es una arma mágica”. Evidenciándose biocontrol de este tipo de fitopatógenos desde condiciones *in vitro* con la inhibición del crecimiento de *Acremonium* sp., *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Pythium* sp., *Rhizoctonia* sp. y *Verticillium* sp. (AL Saeedi y AL Ani, 2014) y de patógenos que ocasionan pudrición en la raíz, tales como, *Phoma herbarum*, *Fusarium flocciferum*, *Scytalidium lignicola* y *Epicoccum nigrum* (Chen *et al.*, 2016). En condiciones *in vivo* se ha evidenciado control de *Macrophomina phaseolina* (Larralde *et al.*, 2008), *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Oloo, 2013) y *R. solani* en el cultivo de frijol (Asad *et al.*, 2014), en plantas de chile de *Phytophthora capsici* (Ramírez, 2015), en especies de pasturas de *Pythium ultimum*, *Sclerotinia trifoliorum* y *R. solani* (Kandula *et al.*, 2015), en solanáceas como la berenjena de *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum* (Jadon, 2009; Balaji y Ahir, 2011), en tomate de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Pythium aphanidermatum*, *R. solani* y *Sclerotium rolfsii* (Dutta y Das, 2002; Jayaraj *et al.*, 2006). En el cultivo de papa, especie de interés en la presente investigación, se ha identificado que varias cepas de *Trichoderma* spp. ejercen actividad de biocontrol sobre los fitopatógenos *M. phaseolina* (Kumar y Khare, 1990), *R. solani* (Grosch *et al.*, 2006; Wilson *et al.*, 2008; Beltrán y Garcés, 2011) y *Sclerotinia rolfsii* (Kumar y Khare, 1990).

Actinomicetos en control de enfermedades de plantas

Entre los microorganismos del suelo con un amplio rango de funciones, como la estimulación de los ciclos biogeoquímicos de los nutrientes, mejoramiento de la salud de la planta y la calidad estructural del suelo, factores claves de la fertilidad del mismo, se encuentran algunos hongos y bacterias filamentosas denominadas actinomicetos; microorganismos que se desarrollan en asociación con las raíces, en la rizósfera y que además están involucrados en la promoción de crecimiento vegetal y juegan un papel fundamental en el control de plagas en gran número de cultivos (Prashith *et al.*, 2010; Franco, 2011; Poomthongdee *et al.*, 2015). Actualmente, diversas investigaciones se han centrado en la búsqueda de nuevos compuestos antimicrobianos, principalmente provenientes de actinomicetos, por su prolífica producción de antibióticos naturales, de otros metabolitos secundarios (Oskay *et al.*, 2005; Prashith *et al.*, 2010). De acuerdo con Yuan y Crawford, (1995) los actinomicetos además de producir un amplio espectro de antibióticos producen una variedad de enzimas degradadoras de la pared celular de los hongos, tales como: celulasas, hemicelulasas, quitinasas, amilasas y glucanasas, entre otras. Dentro de los géneros más estudiados y más representativos de este tipo de microorganismos se destacan: *Microbispora* spp., *Micromonospora* spp., *Nocardia* spp. y *Streptomyces* spp. (Fialho de Oliveira *et al.*, 2010). Son varios estudios que han evidenciado control de patógenos del suelo, como lo es *S. subterranea*, por ejemplo en trigo de *Gaeumannomyces graminis* var *tritici* (Coombs *et al.*, 2004), biocontrol de *P. aphanidermatum* en pepino (El-Tarabily, 2006) y en plantas de maíz (Costa *et al.*, 2013), en el cultivo de lirio se evidenció control de *Fusarium proliferatum* y *F. oxysporum* f. sp. *lilii* y Poomthongdee *et al.*, (2015) observaron actividad antagónica contra tres hongos patógenos del arroz: *Fusarium moniliforme*, *Helminthosporium oryzae* y *R. solani*. En cuanto al biocontrol de patógenos en el cultivo de papa se ha observado efecto sobre el hongo *R. solani* (Mahmoud *et al.*, 2008; Wilson *et al.*, 2008) y el nematodo *Meloidogyne* spp. (Krechel *et al.*, 2002; Hafez y Sundararaj, 2006) observándose una amplia posibilidad de obtener control de *S. subterranea*.

Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal

Las bacterias rizosféricas promotoras de crecimiento vegetal (PGPRs) además de utilizarse como agentes protectores frente a diversos patógenos (Lemanceau y Alabouvette, 1993; Kloepper *et al.*, 2004), pueden actuar como fertilizadoras gracias a su capacidad para movilizar nutrientes a la planta (Zboińska *et al.*, 1992), y de producir

fitohormonas, las cuales permiten optimizar los procesos de floración, germinación y establecimiento de la plántula (Gutierrez *et al.*, 1996; Probanza *et al.*, 1996). Muchas bacterias, y en particular las pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*, son capaces de controlar patógenos, sobre todo hongos, sintetizando moléculas antifúngicas como pirrolnitrina, pioluteorina, tropolona, iturin A y surfactin, entre otras. Asimismo, existen cepas bacterianas capaces de sintetizar antibióticos activos contra otras bacterias (Szczech y Shoda, 2004). Este es probablemente el mecanismo alelopático por excelencia para reducir las poblaciones de otros microorganismos. Se ha reconocido que efecto de las rizobacterias en el control de varios hongos patógenos del suelo como *F. oxysporum* f. sp. *raphani*, *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* (Steijl *et al.*, 1999), *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Dekkers *et al.*, 2000), *G. graminis* var *tritici*, *M. phaseolina* (Nandakumar *et al.*, 2001), *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, *F. solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *R. solani* (Yuan *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2015). También se ha observado actividad supresiva de los nematodos *Meloidogyne javanica* en tomate (Siddiqui *et al.*, 2006) y *M. incognita* (Burkett *et al.*, 2008) y de las bacterias *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* (Siddiqui *et al.*, 2006) y *Ralstonia solanacearum* en tomate (Singh *et al.*, 2016). Por otro lado, se ha identificado actividad de biocontrol de hongos fitopatógenos que afectan el cultivo de papa como *Helminthosporium solani* (Elson *et al.*, 1997), *M. phaseolina* (Gupta *et al.*, 1999), *Phytophthora erythroseptica* (Schisler *et al.*, 2009), *Pythium ultimum* var. *ultimum* (Bardin *et al.*, 2004) y *R. solani* (Krechel *et al.*, 2002; Grosch *et al.*, 2005; Mahmoud *et al.*, 2008; Wilson *et al.*, 2008).

4.2.5 Otras alternativas en el control de *S. subterranea*

Varios compuestos de origen natural se han evaluado en el control de *S. subterranea*. En un ensayo desarrollado en campo se realizaron biofumigaciones con mostaza de la India, colza y canola y se observó una reducción de la enfermedad entre el 15-40 %, siendo la mostaza de la India el tratamiento más eficaz (Larkin y Griffin, 2007). Arias, (2011) realizó un análisis y comparación de glucosinolatos presentes en diferentes accesiones de cubio (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav.) para evaluar su uso potencial en el control de *S. subterranea*, se estandarizaron los procedimientos de extracción del compuesto y las diferentes formulaciones fueron probadas como biofumigante en el suelo, donde posteriormente se sembraron tubérculos de papa criolla. Sin embargo, los resultados obtenidos no permitieron establecer un posible potencial biofumigante de estos

compuestos. En otro estudio realizado con *Solanum andigena* y *S. phureja*, se evaluaron tres extractos vegetales en la liberación de zoosporas y evidenciaron que de la parte aérea de las plantas *D. stramonium* L. y *Lippia alba* L. en concentraciones de 1 y 1.5 % mostraron diferencias significativas en la liberación de zoosporas comparados con los demás extractos y el testigo susceptible (Fajardo *et al.*, 2015).

Otras alternativas de control de *S. subterranea* son las sustancias de origen natural que actúan en forma preventiva, por inducción de resistencia en el huésped, o por estimulación de la flora benéfica del suelo, es el caso del biocarbón (Elad *et al.*, 2010), la quitina (Cohen, 2001) y el quitosán (Sánchez *et al.*, 2007; Nunes da Silva *et al.*, 2014). Además, el uso de estas sustancias naturales puede llegar a potenciar la acción de los microorganismos antagonistas (Tian *et al.*, 2000; Matsubara *et al.*, 2002).

El biocarbón, carbón vegetal producido por pirólisis

El biocarbón, carbón vegetal producido por combustión de materia orgánica bajo condiciones de baja oxigenación, llamada pirólisis (Sohi *et al.*, 2009), es objeto de mucha atención desde los últimos años. Elad *et al.*, (2010) estudiaron el efecto de la aplicación de biocarbón sobre la inducción de resistencia sistémica de plantas de tomate y chile dulce contra dos patógenos fúngicos *Botrytis cinerea* y *Leveillula taurica* y contra el ácaro *Polyphagotarsonemus latus* Bank, encontrando disminución importante en la severidad de estas enfermedades y de los síntomas provocados por *P. latus*. Matsubara *et al.*, (2002) observaron que la aplicación de biocarbón combinado a la inoculación de micorrizas arbusculares (*Glomus* sp.) indujeron una tolerancia creciente a *F. oxysporum* en función de la cantidad de enmiendas utilizadas. Otros trabajos enfocados en los subproductos de la pirólisis (chikusaku-eki, mokusaku-eki o vinagre de madera) demostraron las propiedades de estos como fungicida, bactericida o repelente contra las enfermedades ocasionadas por *Penicillium griseofulvum*, *R. solani*, *Sclerotium oryzae*, *Helminthosporium maydis*, *Pythium* sp. y *Colletotrichum gloeosporioides* (Baimark y Niamsa, 2009).

Quitina y quitosán

El uso de la quitina y el quitosán ha demostrado varios efectos en el control de enfermedades, uno de ellos es la estimulación de las defensas de las plantas. Estas respuestas incluyen lignificación (Barber *et al.*, 1989), variaciones en el flujo de iones,

acidificación citoplasmática, despolarización de la membrana y fosforilación de proteínas (Barber *et al.*, 1989; Felix *et al.*, 1998, 1993; Kikuyama *et al.*, 1997), activación de glucanásas y quitinásas (Roby *et al.*, 1987; Kaku *et al.*, 1997), biosíntesis de fitoalexinas (Ren y West, 1992; Yamada *et al.*, 1993), generación de especies reactivas de oxígeno (Kuchitsu *et al.*, 1995) biosíntesis de ácido jasmónico (Nojiri *et al.*, 1996), y la expresión temprana de respuesta de genes relacionados con la defensa (Minami *et al.*, 1996; Nishizawa *et al.*, 1999; Takai *et al.*, 2001). Se reporta que el quitosán induce la formación calosa (Köhle *et al.*, 1985; Conrath *et al.*, 1989), biosíntesis de fitoalexinas e inhibe la producción de proteinasas (Walker y Ryan, 1984). Además, el uso de estas sustancias naturales pueden tener efectos fungicidas o antimicrobiales (Rabea *et al.*, 2003; Goy *et al.*, 2009; EL Hadrami *et al.*, 2010; Badawy y Rabea, 2011) y pueden llegar a estimular el desarrollo de microflora benéfica (Tian *et al.*, 2000; Matsubara *et al.*, 2002; Gryndler *et al.*, 2003).

La quitina es un polímero N-acetil D-glucosamina unidos por enlace $\beta(1,4)$ que tiene propiedades físico-químicas y biológicas de gran interés en el área agrícola (Tharanathan y Kittur, 2003), este compuesto es un biopolímero aminado y componente estructural que contribuye a la resistencia mecánica de los organismos que la contienen, después de la celulosa es el polisacárido más abundante en la naturaleza y el principal componente del exoesqueleto de insectos y crustáceos, además forma parte de las paredes celulares de los hongos, algas, y de la estructura básica de los huevos de los nematodos (Cohen, 2001; Merzendorfer y Zimoch, 2003; Jin *et al.*, 2005; Gortari y Hours, 2008). El quitosán es un polímero de β -1,4-glucosamina, que se encuentra formando parte de la pared de hongos, en especial de los zigomicetos y se puede producir por desacetilación de la quitina presente en el exoesqueleto de artrópodos (Winterowd y Sandford, 1995). El quitosán es el amino-polisacarido más abundante de origen natural, no es tóxico, es bioactivo, y ha sido objeto de estudio debido a sus características fisicoquímicas y actividad biológica (Goy *et al.*, 2009; Rabea *et al.*, 2003).

Debido a estos dos aditivos orgánicos no se encuentran presente en plantas y vertebrados, se puede utilizar de manera segura en el control de plagas y enfermedades (Cohen, 2001). Desde el punto biológico el quitosán ha derivado una gran atención en el área de la agricultura, ya que ha demostrado efectos fungicidas e inductores de mecanismos de defensa en tejidos vegetales (Terry, 2004; EL Hadrami *et al.*, 2010).

Badawy y Rabea, (2011) comentan que el efecto del quitosán en la reducción de patógenos del suelo viene del hecho que mejora las respuestas de defensas de las plantas y estimulan la actividad de microorganismos benéficos del suelo. Así mismo, la adición de quitina al suelo estimula el crecimiento de bacterias, actinomicetos y un gran número de especies de hongos con actividad quitinolítica (Tian *et al.*, 2000) que pueden actuar como biocontroladores.

En el cultivo de papa se evidenció significativamente menor número de plantas infectadas con el virus X de la papa después de aplicar en spray las plantas con quitosán (Chirkov *et al.*, 2001). En tomate y papa se observó disminución de desarrollo de las enfermedades ocasionadas por *P. infestans* y *Meloidogyne incognita* con el uso de quitosán aislado de cangrejo (Vasyukova *et al.*, 2001). En otros estudios, el hongo *Alternaria alternata* aislado de jitomate se inhibió con una concentración de quitosán al 2.5 % (Sánchez *et al.*, 2007). Zeng y Shi, (2009) desarrollaron un nuevo tipo de agente de recubrimiento de semillas de arroz bajo una producción orgánica, en donde el quitosán es la materia prima principal y encontraron que inhibían a *R. solani* y *F. moliniforme*. En un estudio realizado por Nunes da Silva *et al.*, (2014) encontraron que aplicaciones de quitosán al suelo redujeron significativamente la población del nematodo *Bursaphelenchus xylophilus* en plantas de *Pinus pinaster* y *Pinus pinea*.

Aparte de estos beneficios, cabe destacar los efectos favorables sobre el medio ambiente, derivados del reciclaje de subproductos de industrias agrícolas y pesquera, que pueden ser muy contaminantes (Borrego, 2014). Estas enmiendas de suelo podrían reducir considerablemente la dependencia de plaguicidas químicos y fertilizantes inorgánicos de síntesis para lograr sistemas agrícolas sostenibles. Concomitantemente, podría obtenerse una mejora en los rendimientos de estos cultivos.

5. Materiales y Métodos

A continuación se presenta de manera general el flujograma de trabajo, el cual comprende los diferentes bioensayos para la selección de los microorganismos y aditivos que fueron evaluados de forma individual y combinada para el control de esta enfermedad (Figura 6).

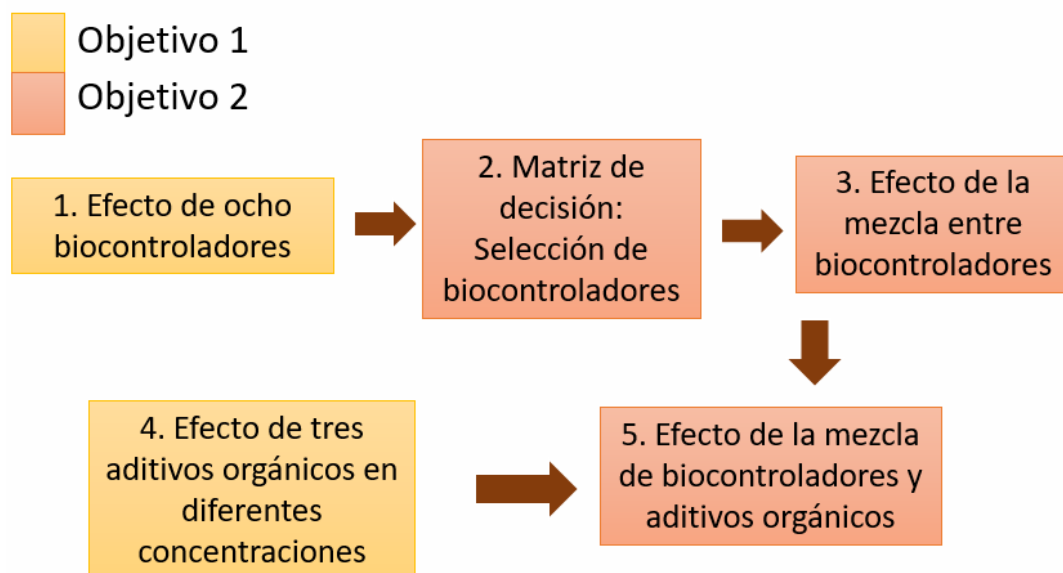


Figura 6: Flujograma general de trabajo para evaluar el efecto individual y en mezcla de microorganismos y aditivos en el camanduleo de la papa

5.1 Características generales de los ensayos

En el presente estudio se utilizó suelo proveniente del Municipio de Subachoque, Finca California ($4^{\circ}57'0.05''N$; $74^{\circ}9'18.72''O$), el cual tiene un largo historial de la presencia del camanduleo de la papa. Con el fin de realizar una estimación de la concentración de esporos en este suelo, las muestras se pasaron por tamices de $425\ \mu\text{m}$ y $250\ \mu\text{m}$, se pesó $0.1\ \text{g}$ del tamizado y se adicionó a un tubo Falcon con $10\ \text{mL}$ de agua destilada estéril (ADE). Enseguida el tubo se agitó en un vortex a $300\ \text{rpm}$ durante $3\ \text{min}$ y dos veces manualmente, posteriormente se tomó $10\ \mu\text{L}$ de la muestra y se trasladó a una

cámara de Neubauer, según los resultados el suelo contenía en promedio de 1×10^3 esporosoros.g⁻¹ de suelo.

Los ensayos se desarrollaron en el Municipio de Subachoque, Finca Tibagota (4°54'19.09"N; 74°12'8.40"O) con el suelo descrito anteriormente. En general se estableció un Diseño Completamente al azar (DCA) con 10 repeticiones, siendo la unidad experimental una planta de papa en materas con 600 g de suelo.

5.2 Bioensayos con los microorganismos

Se evaluó la actividad biocontroladora de diferentes cepas provenientes del Banco de microorganismos con interés en control biológico del Centro de Investigación Tibatátá-Corpoica, los microorganismos fueron seleccionados por su demostrada actividad biocontroladora en otros patosistemas (Anexo A). Las cepas evaluadas fueron tres cepas del género *Trichoderma*, *Trichoderma koningiopsis* Th003 (Jaimes *et al.*, 2009; Moreno *et al.*, 2009), *Trichoderma asperellum* Th034 (Beltrán y Garcés, 2011) y *Trichoderma brevicompactum* Th0201 (Smith *et al.*, 2012), dos cepas de Rizobacterias *Pseudomonas fluorescens* Ps006 (Ruíz *et al.*, 2013) y *Bacillus amyloliquefaciens* Bs006 (Caviedes, 2010) y tres cepas de los actinomicetos, *Streptomyces misionensis* Ac001, *Streptomyces* sp. Ac002 y *Streptomyces misionensis* Ac006 (Sastoque *et al.*, 2010). El diseño fue un arreglo factorial completo en DCA con 8 biocontroladores y un testigo. Se establecieron cuatro réplicas en el tiempo con el cv. Diacol Capiro.

El inóculo de las cepas de *Trichoderma* spp. se preparó en Papa Dextrosa Agar (PDA) con crecimiento durante siete días a 25 °C y se ajustó la concentración a 1×10^6 conidios.mL⁻¹. El inóculo de las cepas rizobacterias se preparó en caldo Luria Bertani (LB) durante 48 horas a 28 °C en agitación continua a 125 rpm y se utilizó 1×10^8 UFC.mL⁻¹. Dado que la concentración de inóculo de los actinomicetos no fue constante en varios ensayos previos para estas bacterias se utilizó una dilución 1:100 en agua crecidos en caldo Papa Dextrosa (PD) durante siete días a 28 °C en agitación continua a 125 rpm. La inoculación con todos los microorganismos se realizó por inmersión de los tubérculos durante 10 min y se realizó una aplicación de 50 mL al suelo alrededor de la planta 30 dds.

5.3 Matriz de decisión para seleccionar biocontroladores

Con el fin de evaluar el efecto de biocontrol de las mezclas de microorganismos, se seleccionaron los más promisorios mediante una matriz de decisión. Se consideraron criterios de eficacia en la disminución de agallas en la evaluación individual y de desarrollo tecnológico, para lo cual se tuvieron en cuenta trabajos previos de evaluación en control biológico en diferentes patosistemas y avances en el desarrollo de la formulación. Se asignó una clasificación de 1 a 100 según el avance logrado con cada cepa. Para escoger los microorganismos que tuvieran la mayor opción de uso en la reducción del camanduleo de la papa, se dieron diferentes pesos relativos, asignando un 80 % del valor a la eficacia obtenida en los ensayos establecidos para el control de *S. subterranea* en el cv. Diacol Capiro y 20 % al desarrollo tecnológico de cada cepa.

5.4 Bioensayos de mezcla entre los microorganismos

Los biocontroladores seleccionados en la matriz de decisión se evaluaron de forma combinada. Esto con el propósito de determinar si había un aumento en el control de *S. subterranea*. El diseño fue un arreglo factorial completo en DCA con cuatro tipos de mezcla con los microorganismos seleccionados *S. misionensis* Ac006, *T. koningiopsis* Th003 y *B. amyloliquefaciens* Bs006, y un testigo. Tres de las cuatro mezclas consistieron en grupos de dos microorganismos y la cuarta mezcla se realizó con los tres biocontroladores. Se establecieron tres réplicas en el tiempo con el cv. Diacol Capiro.

La producción de los biocontroladores y la concentración de estos fueron iguales a lo descrito anteriormente (5.2). Las mezclas de dos cepas se realizaron en relación 1:1, utilizando la mitad del volumen de cada una y la mezcla de los tres biocontroladores se logró usando un tercio del volumen de cada microorganismo. La inoculación de la semilla y aplicación al suelo se hicieron de la misma manera descrita anteriormente (5.2).

5.5 Ensayos con los aditivos orgánicos

Se seleccionaron los aditivos que estuvieran disponibles. El biocarbón donado por Cenipalma, proveniente del mesocarpo de semillas de palma, el quitosán (C3646 Sigma) con 85 % mínimo de acetilación y la quitina (C9213 Sigma) ambos provenientes de concha de cangrejo. Se utilizó un arreglo factorial incompleto en DCA con cinco

tratamientos (aditivos orgánicos con sus respectivas concentraciones), un testigo y diez repeticiones. Se establecieron tres réplicas en el tiempo con el cv. Diacol Capiro.

Los tres aditivos se maceraron en un molino eléctrico, con el fin de disminuir el tamaño de partícula y aumentar dispersión. La quitina se pasó por un tamiz de 150 µm, el quitosán por un tamiz de 300 µm y el biocarbón por un tamiz de 500 µm. Se utilizó la quitina y el quitosán al 0.1 y 0.5 % diluido en agua y la aplicación se realizó por inmersión de las semillas de papa durante 10 min. El biocarbón se aplicó en mezcla con suelo 1:100 p:p en el momento de la siembra.

5.6 Ensayos con los microorganismos y aditivos orgánicos en mezcla

Los biocontroladores seleccionados en la matriz de decisión se combinaron con quitina y quitosán al 0.5 %. Para tal fin, se estableció un diseño factorial completo en DCA con 11 tratamientos, *S. misionensis* Ac006, *T. koningiopsis* Th003, *B. amyloliquefaciens* Bs006, quitina y quitosán de forma individual, y la mezcla de un biocontrolador con un aditivo orgánico. Se contó con un testigo patógeno y un testigo químico (Mancozeb) que demostró control del camanduleo en el trabajo reportado por Thangavel *et al.*, (2015). Se establecieron tres réplicas en el tiempo con el cv. Diacol Capiro

Para las mezclas de cada uno de los biocontroladores con un aditivo orgánico, al igual que en el caso anterior, se utilizaron las mismas concentraciones evaluadas individualmente, pero en la mitad del volumen. La inoculación de la semilla se hizo con esta mezcla y la aplicación al suelo 30 dds con cada uno de los microorganismos individuales, según correspondiera.

5.7 Matriz de decisión para seleccionar las mezclas

Con el fin de realizar una selección objetiva de las mezclas más promisorias en la disminución del camanduleo, se realizó una matriz de decisión que incluyó la reducción de agallas, resultados de la interacción de los microorganismos dentro de la mezcla y consistencia entre los diferentes ensayos. Para evaluar la consistencia se tuvo en cuenta la desviación estándar en cada ensayo, se sacó un promedio de las dos réplicas de cada tratamiento y a ese valor se le restó 100. Finalmente se asignó un valor del 35 % a la

eficacia en la reducción del camanduleo, del 35 % a la interacción y del 30 % a la consistencia de la actividad biocontroladora en los diferentes réplicas, para un total del 100 %.

5.8 Evaluación del camanduleo y variables de crecimiento vegetal

La evaluación de los ensayos se realizó ocho semanas después de la siembra, esta fue de tipo destructivo de todas las plantas. Las raíces se lavaron por inmersión en tazas con agua de grifo y se contó de número de agallas por plantas. Además, con el fin de identificar algún tipo de promoción de crecimiento vegetal o toxicidad por parte de los tratamientos, se midieron las variables de crecimiento vegetal como longitud foliar y de raíz, peso fresco foliar y de raíz.

5.9 Análisis de resultados

En los bioensayos de control, se determinó la relación porcentual entre el tratamiento y el testigo (ecuación 1).

$$Ag/Pl = \frac{\text{Número de agallas por planta en los tratamientos}}{\text{Número promedio de agallas en el testigo patógeno}} * 100 \quad (1)$$

Se presenta la eficacia en la reducción de agallas por cada tratamiento, teniendo en cuenta que la relación porcentual en el testigo es del 100 % se restó la relación porcentual obtenida en cada tratamiento.

Para evaluar la interacción y determinar sinergismo, antagonismo o adición entre las mezclas (de microorganismos y de microorganismos con aditivos) se utilizó la fórmula de Abbott's (Levy *et al.*, 1986) (ecuación 2).

$$E(\text{esp}) = (a + b) - (a * b)/100 \quad \text{y} \quad SF = E(\text{osb})/E(\text{esp}) \quad (2)$$

Donde a = control de eficacia por el biocontrolador 1; b = control de eficacia por el biocontrolador 2; E(esp) = control de eficacia esperada por la mezcla; E(obs) = control de eficacia observada en la mezcla. Cuando el Factor de Sinergia (SF) = 1, la interacción es aditiva; SF < 1, la interacción es antagónica y SF > 1, la interacción es sinérgica.

5.10 Análisis estadístico

Se realizaron diagramas de caja y bigotes para cada uno de los bioensayos establecidos donde cada caja representa dos cuartiles de datos. Así, la línea horizontal superior corresponde al percentil 75, mientras la línea horizontal inferior corresponde al percentil 25. La línea horizontal interior representa la mediana. Los bigotes que se extienden desde la caja hasta el último punto se da a una distancia de 1.5 veces la distancia intercuartílica desde los cuartiles. La distancia abarcada por los bigotes incluye el 95 % de los datos. Los datos externos que se presentan ocurren por encima de 3 distancias intercuartílicas a partir de los percentiles y son indicados por un círculo. Si los intervalos de confianza alrededor de dos medias no se sobrelapan, las dos medias son significativamente diferentes al 5 %.

A las variables de crecimiento vegetal se les realizó análisis normalidad y homogeneidad de varianzas multivariado y se sometieron los datos a MANOVA. A la eficacia en la reducción de agallas se realizó normalidad y homogeneidad de varianza univariado y los datos analizaron en ANOVA. Para los ensayos que contaron con réplicas en el tiempo se les realizó un análisis combinado, considerando un modelo mixto con dos factores (tratamiento y réplica en el tiempo). El grupo de datos que presentaron diferencias significativas se compararon los promedios de los tratamientos con la prueba de Tukey. Se trabajó con los paquetes estadísticos SAS V.9, R y Statistix implementando pruebas no paramétricas (Kruskal Wallis por pares) a un valor de $P < 0.05$.

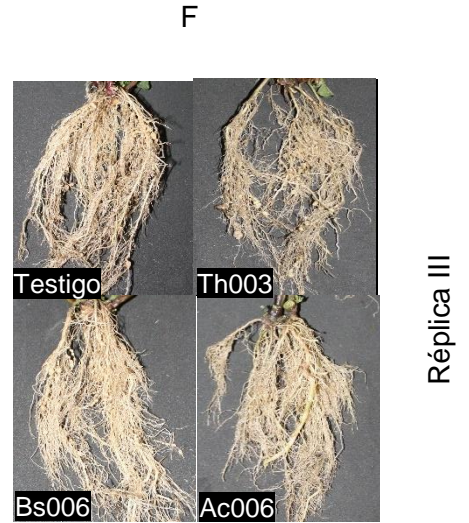
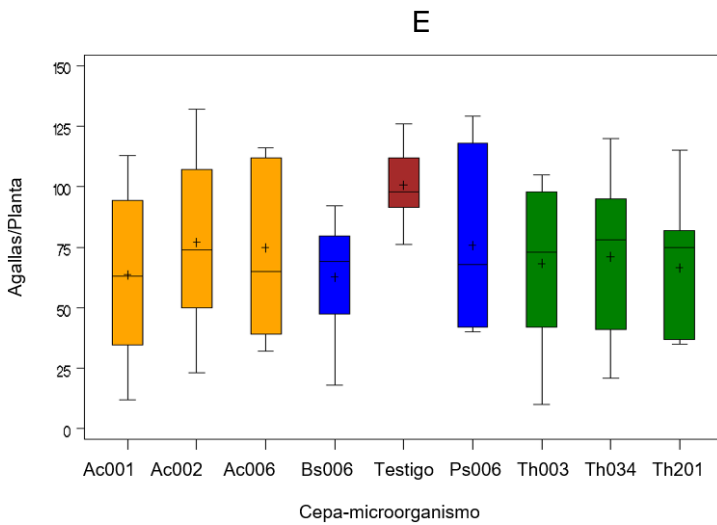
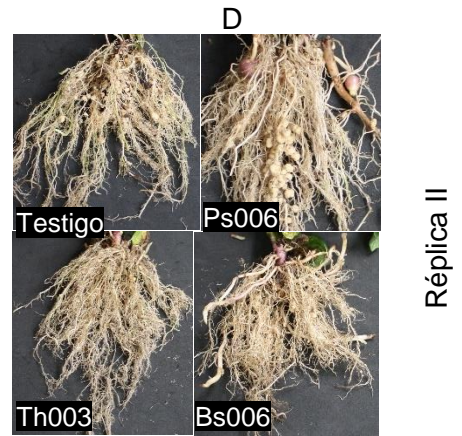
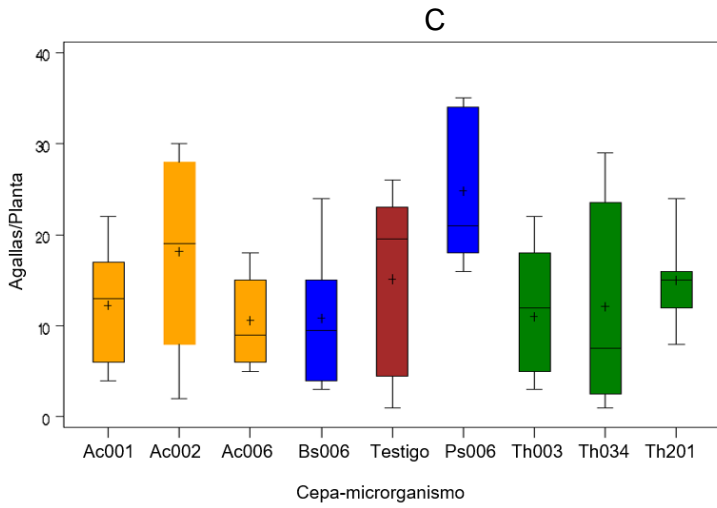
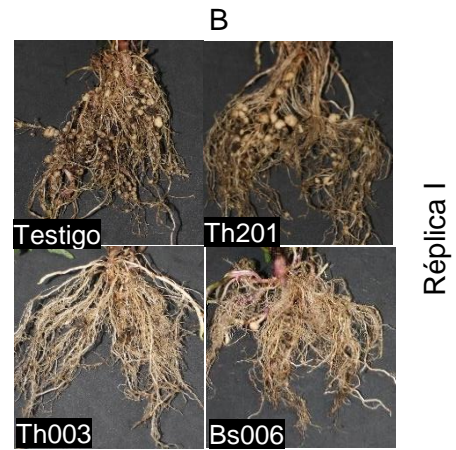
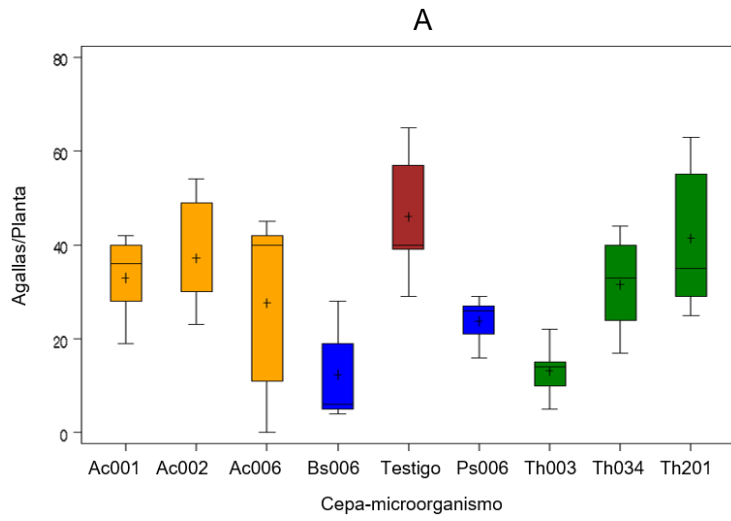
6. Resultados

En los diferentes ensayos establecidos con los biocontroladores y aditivos orgánicos en el análisis combinado de las réplicas, se detectaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las réplicas y no se evidenciaron diferencias significativas en la interacción tratamiento*réplica (Anexo B). Por esta razón, los resultados se presentan de forma independiente para cada réplica. Ninguno de los microorganismos biocontroladores (Anexo C) ni de los aditivos orgánicos (Anexo D) tuvieron efecto en el crecimiento vegetal ($P < 0.05$).

6.1 Actividad biocontroladora de ocho microorganismos

El número de agallas fue diferente en las cuatro réplicas (Figura 7), en la primera réplica se evidenció efecto de los biocontroladores ($P > 0.05$) en la reducción de agallas con relación al testigo (Tabla 1). Sin embargo, este efecto no se apreció en las otras tres réplicas. No obstante, la tendencia de la mayoría de los biocontroladores fue la reducción en alguna proporción las agallas, siendo las plantas inoculadas con *T. koningiopsis* Th003 y *B. amyloliquefaciens* Bs006 las que presentaron la mayor reducción de agallas con 43.83 y 43.61 % respectivamente, en promedio de las cuatro réplicas.

En la primera réplica el 75 % de las plantas en el testigo desarrollaron 57 agallas/planta, las plantas que menos agallas presentaron fueron las tratadas con *T. koningiosis* Th003, *B. amyloliquefaciens* Bs006 y *P. fluorescens* Ps006, ya que el 75 % de las raíces desarrollaron 15, 19 y 27 agallas/planta (Figura 7A), con una reducción significativa de agallas ($P > 0.05$) del 71.3, 73 y 48.26 % respectivamente (Tabla 1). El número de agallas fue abundante y se apreciaron agallas desde 1 a 10 mm de diámetro. Con *T. brevicompactum* Th201 se puede concluir que no hubo actividad pues la diferencia con el patógeno fue mínima (Figura 7B).



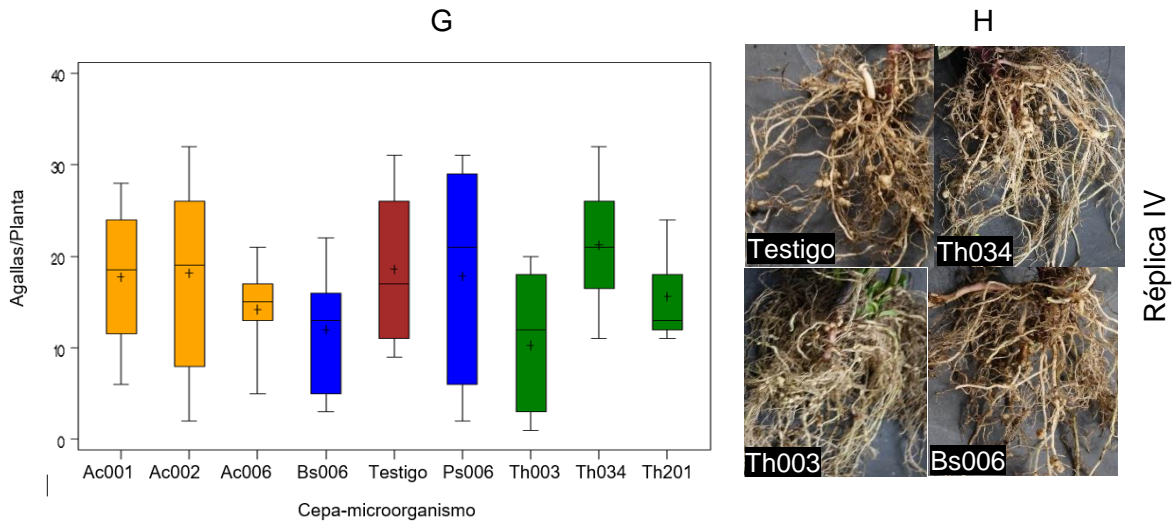


Figura 7: Efecto de biocontroladores en el número de agallas en plantas de *Solanum tuberosum* cv. Diacol Capiro a la intemperie en Subachoque. A, C, E y G: Diagrama de cajas; B, D, F y H: Fotografías de los tratamientos más representativos. Ac001: *S. misionensis*; Ac002: *Streptomyces* sp.; Ac006: *S. misionensis*; Bs006: *B. amyloliquefaciens*; Ps006: *P. fluorescens*; Th003: *T. koningiopsis*; Th034: *T. asperellum*; Th201: *T. brevicompactum*.

En la segunda réplica el 75 % de las plantas en el testigo desarrollaron 23 agallas/planta, y las plantas tratadas con *B. amyloliquefaciens* Bs006, *S. misionensis* Ac006 y *T. koningiopsis* Th003 desarrollaron 14, 15 y 15 agallas/planta con una reducción de agallas del 28.3, 29.9 y 27.3 % respectivamente (Figura 7C). En esta réplica se observaron desde 1 hasta 35 agallas, con un tamaño que osciló entre 1 a 10 mm de diámetro. Además, se pudo evidenciar que las plantas inoculadas con *P. fluorescens* Ps006 presentó mayor número de agallas que el testigo, debido a que el 75 % de las plantas desarrollaron 31 agallas (Figura 7D).

El 75 % de las plantas en el testigo en la tercera réplica presentó 100 agallas/planta, mientras que las plantas tratadas con *B. amyloliquefaciens* Bs006 y *S. misionensis* Ac001 expresaron el menor número de agallas con el 75 % de las raíces con 63 y 66 agallas/planta (Figura 7E), lo que representó una reducción del 37.64 y 36.77 % respectivamente. En esta réplica las plantas expresaron el mayor número de agallas en comparación con las otras tres réplicas, con un tamaño menor a 4 mm (Figura 7F).

En la cuarta réplica el 75 % de las plantas en el testigo desarrollaron 19 agallas/planta, y las plantas tratadas con *T. koningiopsis* Th003 y *B. amyloliquefaciens* Bs006 desarrollaron 16 agallas/planta con una reducción de agallas del 44.6 y 35.4 %

respectivamente (Figura 7C). Esta réplica presentó el menor número de agallas desarrolladas entre las cuatro réplicas, con un tamaño que osciló entre 1 a 10 mm de diámetro. Además se pudo evidenciar en las plantas inoculadas con *T. asperellum* una reducción de agallas negativa con -14.42 % (Figura 7H).

Tabla 1: Efecto de biocontroladores sobre la formación de agallas en raíz por *Spongospora subterranea* en plantas de *Solanum tuberosum* cv. Diacol Capiro en dos réplicas establecidas en materas a la intemperie en Subachoque.

Tratamiento	Reducción de agallas (%)				
	Réplica I	Réplica II	Réplica III	Réplica IV	Promedio
Testigo	0 a	0	0	0	0
Th003	71.30 b	27.27	32.14	44.62	43.83
Th034	31.30 ab	19.83	29.32	-14.42	16.51
Th201	10.00 ab	0.83	33.98	16.00	15.20
Ac001	28.26 ab	19.01	36.77	4.42	22.12
Ac002	19.13 ab	- 19.95	23.35	2.31	6.21
Ac006	40.00 ab	29.92	25.61	23.54	29.77
Bs006	73.04 b	28.37	37.64	35.38	43.61
Ps006	48.26 ab	- 63.97	24.61	4.15	3.27

Ac001: *S. misionensis*; Ac002: *Streptomyces* sp.; Ac006: *S. misionensis*; Bs006: *B. amyloliquefaciens*; Ps006: *P. fluorescens*; Th003: *T. koningiopsis*; Th034: *T. asperellum*; Th201: *T. brevicompactum*. Valores seguidos por la misma letra no son estadísticamente diferentes por Tukey por pares ($P < 0.05$) (Anexo E).

6.2 Selección de biocontroladores – matriz de decisión

Al considerar la eficacia en la reducción de agallas y el desarrollo tecnológico de los diferentes biocontroladores, se seleccionaron los aislamientos *T. koningiopsis* Th003, *B. amyloliquefaciens* Bs006 y *S. misionensis* Ac006 por presentar los indicadores más altos entre 25.3 y 55.1 (Tabla 2).

La eficacia de estas tres cepas estuvo en un rango de 23.8 y 35 %, sin embargo, el desarrollo tecnológico de estas tres cepas difiere notablemente. *T. koningiopsis* Th003 es la cepa que presenta la mayoría de artículos publicados y es la única que se encuentra formulada y registrada comercialmente como un polvo mojable (WP) bajo el nombre comercial de Tricotec. *B. amyloliquefaciens* Bs006 ha demostrado resultados promisorios en otros patosistemas por lo tanto presenta avances en el desarrollo de una formulación. Por último, los actinomicetos presentan los valores más bajos en cuanto al desarrollo tecnológico, ya que con estas cepas se han realizado muy pocos estudios y no se tienen

avances en su formulación (Tabla 2), sin embargo *S. misionensis* Ac006 estuvo dentro de las tres cepas seleccionadas por presentar una alta eficacia en la reducción de agallas.

Tabla 2: Matriz de decisión para seleccionar los biocontroladores que deben pasar a la siguiente etapa de investigación.

Cepa	Eficacia ¹ %	Aspectos Tecnológicos					Total
		Control biológico		Desarrollo de formulación		Puntaje ²	
Th003	35.07	Cotes <i>et al.</i> , 1994, 1996; Clavijo y Cotes, 1998; Rodríguez, 1998; Moreno, 2003; Beltrán, 2004; Cotes <i>et al.</i> , 2007; Jaimes <i>et al.</i> , 2009; Moreno <i>et al.</i> , 2009; Beltrán y Garcés, 2011; Smith <i>et al.</i> , 2012; Díaz <i>et al.</i> , 2013; Mesa <i>et al.</i> , 2014	100	Santos <i>et al.</i> , 2012 Registro ICA N°10150	100	20	55.1
Th034	13.21	Moreno, 2003; Beltrán, 2004; Beltrán y Garcés, 2011; Smith <i>et al.</i> , 2012	45	Santos <i>et al.</i> , 2012	60	10.5	13.2
Th201	12.16	Smith <i>et al.</i> , 2012; Botero <i>et al.</i> , 2015	30		0	3	12.2
Ac001	17.69	Sastoque <i>et al.</i> , 2010	10		0	1	17.7
Ac002	4.97	Sastoque <i>et al.</i> , 2010	10		0	1	5.0
Ac006	23.81	Sastoque <i>et al.</i> , 2010	10		0	1	23.8
Bs006	34.89	Caviedes, 2010; Díaz, <i>et al.</i> , 2013; Moreno <i>et al.</i> , 2016a; Moreno <i>et al.</i> , 2016b	45	Díaz <i>et al.</i> , 2015	60	10.5	34.9
Ps006	2.61	Cotes <i>et al.</i> , 2012	10	Ruíz <i>et al.</i> , 2013	60	7	2.6

¹ Es el 80 % de la eficacia promedio en la reducción de agallas en las réplicas en Diacol Capiro. ² Es el 20 % del promedio obtenido en los indicadores de los aspectos tecnológicos. Ac001: *S. misionensis*; Ac002: *Streptomyces* sp.; Ac006: *S. misionensis*; Bs006: *B. amyloliquefaciens*; Ps006: *P. fluorescens*; Th003: *T. koningiopsis*; Th034: *T. asperillum*; Th201: *T. brevicompactum*.

6.3 Actividad biocontroladora de la mezcla de microorganismos

En las dos réplicas del ensayo el número de agallas fue diferente, observándose mayor efecto de los biocontroladores en la segunda réplica (Figura 8). Aunque no se encontraron diferencias significativas, en el promedio de las dos réplicas las plantas tratadas con *T. koningiopsis* Th003 y con la mezcla dual de *T. koningiopsis* Th003 con *B. amyloliquefaciens* Bs006 presentó la mayor reducción de agallas con 30.8 y 30.5 % respectivamente (Tabla 3).

En la primera réplica el 75 % de las plantas del testigo desarrolló 23 agallas/planta, mientras que las plantas inoculadas con la mezcla dual de *T. koningiopsis* Th003 y *B. amyloliquefaciens* Bs006 expresaron el menor número de agallas ya que el 75 % de las raíces presentaron 14 agallas/planta (Figura 8 A) con una reducción del 24 %. Sin embargo, con la inoculación de *T. koningiopsis* Th003 se observó la mayor reducción de agallas (32 %) (Tabla 3). En dicha réplica se desarrollaron entre 1 y 32 agallas con un tamaño entre 1 y 8 mm, en la mezcla dual que contenían *S. misionensis* Ac006 con *T. koningiopsis* las raíces desarrollaron mayor número de agallas que el testigo, ya que el 75 % de las plantas tuvo 29 agallas/planta (Figura 8 B).

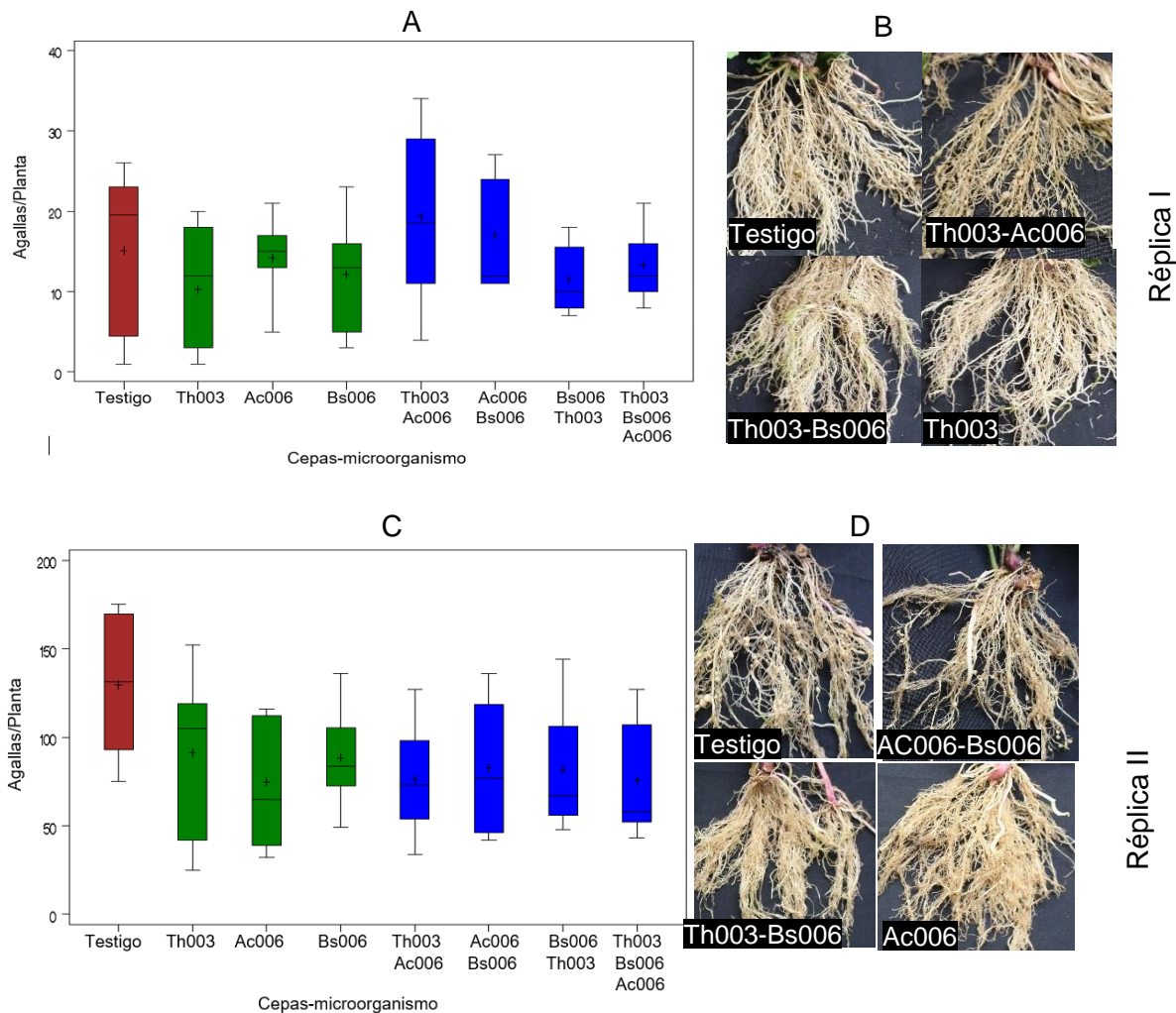


Figura 8: Efecto de la mezcla de biocontroladores sobre el número de agallas en plantas de *Solanum tuberosum* cv. Diacol Capiro a la intemperie en Subachoque. A y C: Diagrama de cajas; B y D: Fotografías de los tratamientos más representativos. Ac001: *S. misionensis*; Ac002: *Streptomyces* sp.; Ac006: *S. misionensis*; Bs006: *B. amyloliquefaciens*; Ps006: *P. fluorescens*; Th003: *T. koningiopsis*; Th034. *T. asperellum*; Th201: *T. brevicompactum*.

En la segunda réplica las plantas del testigo tuvieron el mayor número de agallas con el 75 % de las plantas con 168 agallas/planta. Al igual que en la primera réplica, las plantas inoculadas con la mezcla dual de *T. koningiopsis* Th003 y *B. amyloliquefaciens* Bs006 expresaron reducido número de agallas, ya que el 75 % de las raíces presentaron 97 agallas/planta (Figura 8 C) con una reducción del 37 %. *S. misionensis* Ac006, fue el biocontrolador individual que en esta réplica disminuyó en mayor proporción las agallas con 42 % (Tabla 3). Las agallas desarrolladas en los diferentes tratamientos de esta réplica fueron abundantes, con un rango de 25 a 175 agallas/planta; y un tamaño entre 1 y 10 mm de diámetro (Figura 8 D).

Tabla 3: Efecto de la mezcla de biocontroladores sobre la formación de agallas en la raíz por *Spongospora subterranea* en plantas de *Solanum tuberosum* cv. Diacol Capiro en dos réplicas establecidas en materas a la intemperie en Subachoque.

Tratamiento	Reducción de agallas (%)		
	Réplica I	Réplica II	Promedio
Testigo	0	0	0
Th003	32.00	29.64	30.82
Ac006	6.12	42.31	24.21
Bs006	19.56	31.79	25.68
Th003-Ac006	- 28.10	41.00	6.45
Ac006-Bs006	- 12.40	36.32	11.96
Th003-Bs006	23.97	37.02	30.49
Th003-Ac006-Bs006	12.16	41.43	26.79

Ac006: *S. misionensis*; Bs006: *B. amyloliquefaciens*; Th003: *T. koningiopsis*. (Anexo F).

Las mezclas realizadas usando la mitad o un tercio de la concentración de cada uno de los microorganismos, cuando se trataba de mezclas de dos o tres biocontroladores respectivamente, tuvieron una interacción antagónica (Tabla 4). Sin embargo, la mezcla dual que contenía *T. koningiopsis* Th003 y *B. amyloliquefaciens* Bs006 presentaron el mayor valor de interacción en promedio de las dos réplicas (0.62), seguido de la mezcla realizada con los tres microorganismos (0.24). Por el contrario, se observó una interacción negativa (-0.04) en la mezcla realizada con *S. misionensis* Ac006 y *T. koningiopsis* Th003, debido al mayor número de agallas desarrolladas con esta mezcla que el testigo en la primera réplica.

Tabla 4: Interacciones microbianas en la formación de agallas en la raíz por *Spongospora subterranea* en plantas de *Solanum tuberosum* cv. Diacol Capiro en dos réplicas establecidas en materas a la intemperie en Subachoque.

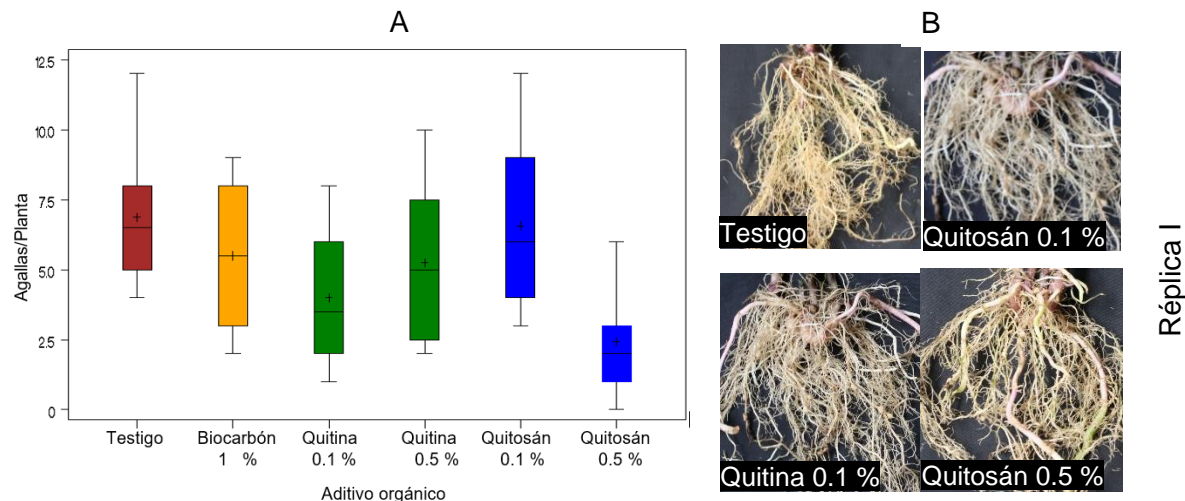
Tratamiento	Interacción microbiana*		
	Réplica I	Réplica II	promedio
Th003-Ac006	-0.8	0.7	- 0.04
Ac006-Bs006	- 0.5	0.6	0.05
Th003-Bs006	0.5	0.7	0.62
Th003-Ac006-Bs006	0.6	0.1	0.24

*Cuando el resultado es igual a uno la interacción es aditiva, mayor a uno es sinérgica y menor a uno es antagonica.

6.4 Efecto de tres aditivos orgánicos a diferentes concentraciones

Los aditivos orgánicos redujeron ($P<0.05$) las agallas con respecto al testigo en las dos réplicas, sin embargo, hubo diferencias en el comportamiento del patógeno (Figura 9) y en el porcentaje de control obtenido por un mismo tratamiento entre réplicas (Tabla 5). Las semillas de papa tratadas con quitosán al 0.5 % expresaron la mayor reducción de agallas con un promedio del 64.8 % en las dos réplicas.

En la primera réplica el 75 % de las plantas en el testigo desarrollaron 8 agallas/planta, mientras que las plantas tratadas con quitosán al 0.5 % presentaron la menor cantidad de agallas con 3 agallas/planta (Figura 9 A), con una reducción de agallas del 64.7 % seguido de quitina al 0.1 % con 41.8 %. Entre los aditivos evaluados el quitosán 0.1 % presentó la menor reducción de agallas (Tabla 5). Esta réplica presentó la menor cantidad de agallas entre los ensayos evaluados con un rango de 1 a 12 agallas/planta, con un tamaño de agallas menor a 5 mm de diámetro (Figura 9 B).



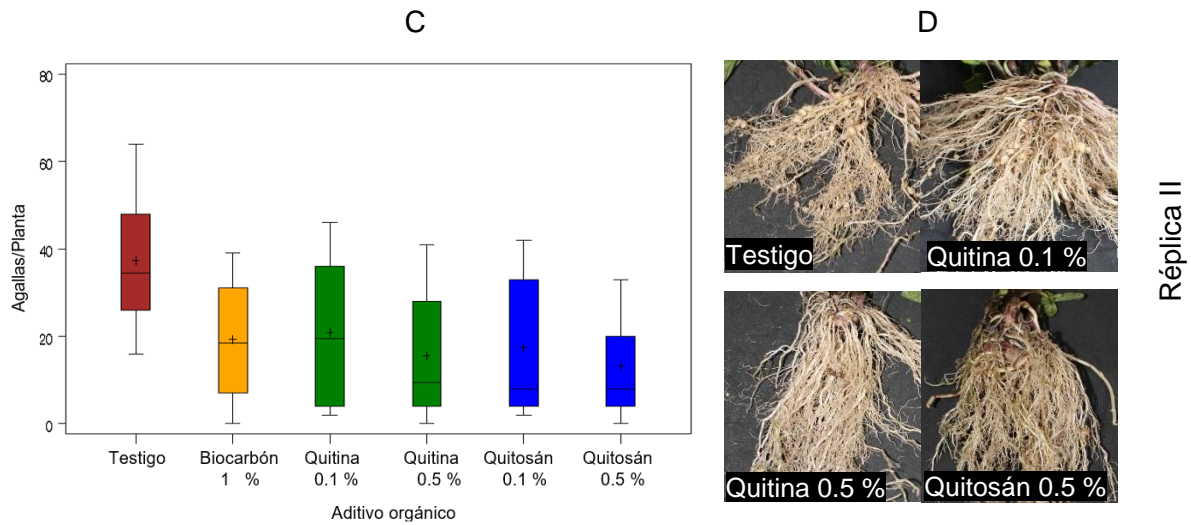


Figura 9: Efecto de tres aditivos orgánicos en diferentes concentraciones sobre el número de agallas en materas a la intemperie-Subachoque en plantas de *Solanum tuberosum* cv. Diacol Capiro. A y C: Diagrama de cajas; B y D: Fotografías de los tratamientos más representativos.

En la segunda réplica el 75 % de las raíces del testigo presentó 48 agallas/planta, mientras que las plantas tratadas con quitosán y quitina al 0.5 % desarrollaron 20 y 26 agallas/planta (Figura 9 C), con una reducción del camanduleo del 64 y 58 % respectivamente. La quitina al 0.1 % presentó la menor reducción de agallas, lo cual difiere con la primera réplica en donde fue el segundo aditivo en reducir el camanduleo. Las agallas desarrolladas en esta réplica estuvieron entre 1 y 64 agallas/planta con un tamaño que osciló entre 2 y 10 mm de diámetro (Figura 9 D).

Tabla 5: Efecto de aditivos orgánicos sobre la formación de agallas en la raíz por *Spongospora subterranea* en plantas de *Solanum tuberosum* cv. Diacol Capiro en las dos réplicas establecidas en materas a la intemperie en Subachoque

Tratamiento	Reducción de agallas		
	Réplica I	Réplica II	Promedio
Testigo	0 a	0 a	-
Biocarbón	20.00 ab	48.26 ab	34.13
Quitina 0.1%	41.82 ab	44.03 ab	42.93
Quitina 0.5%	23.64 ab	58.18 b	40.91
Quitosán 0.1%	4.42 a	53.23 ab	28.82
Quitosán 0.5%	64.68 b	64.85 b	64.76

Valores seguidos por la misma letra no son estadísticamente diferentes por Tukey por pares ($P < 0.05$) (Anexo G).

6.5 Actividad biocontroladora de la mezcla de microorganismos y aditivos orgánicos

El desarrollo de agallas difirió entre las dos réplicas y se evidenció efecto ($P < 0.05$) de los biocontroladores, aditivos y mezclas sólo en la réplica II (Figura 10). Las plantas tratadas con la mezcla dual de quitosán con Th003 y sólo quitosán presentaron la mayor reducción de agallas con un promedio de las dos réplicas de 63.8 y 62.6 % respectivamente (Tabla 6).

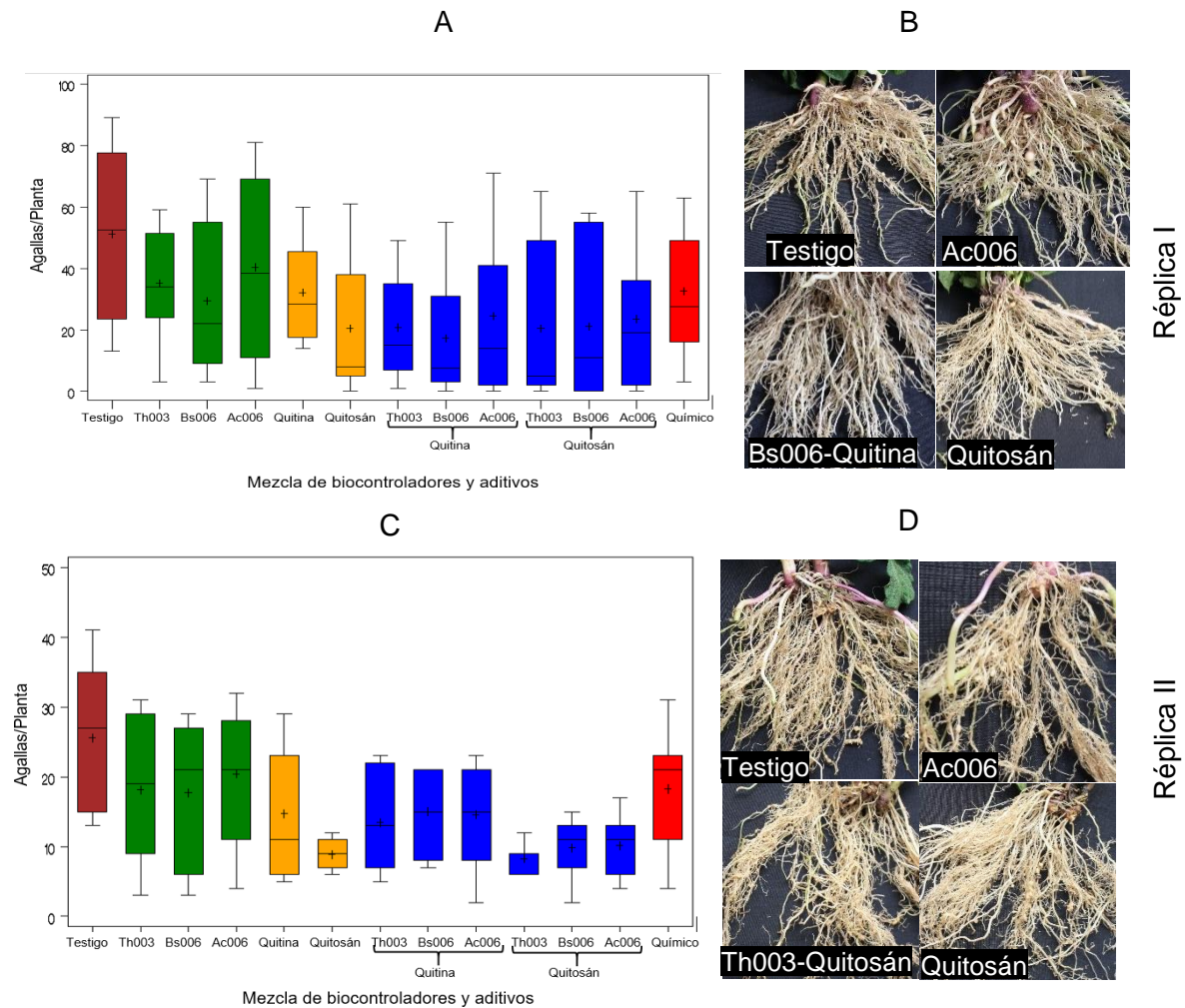


Figura 10: Efecto de la mezcla de biocontroladores y aditivos orgánicos sobre el número de agallas en plantas de *Solanum tuberosum* cv. Diacol Capiro a la intemperie en Subachoque. A y C: Diagrama de cajas; B y D: Fotografías de los tratamientos más representativos. Th003: *T. koningiopsis*; Bs006: *B. amyloliquefaciens*; Ac006: *S. misionensis*.

En la primera réplica el 75 % de las plantas en el testigo desarrolló 77 agallas/planta. Las plantas que presentaron menor desarrollo de agallas provenían de tubérculos tratados con la mezcla de quitina y Bs006 con el 75 % de las raíces con 27 agallas/planta (Figura 10 A) lo que representó una reducción del camanduleo del 66 %, seguido de las plantas tratadas con quitosán y Th003 con 59.9 % de reducción (Tabla 6). El desarrollo de agallas fue abundante con un rango de 1 a 89 agallas/planta y su tamaño osciló entre 2 y 10 mm de diámetro. Las plantas inoculadas con *S. misionensis* Ac006 presentó el mayor número de agallas entre los tratamientos con 66 agallas/planta (Figura 10 B).

En la segunda réplica el 75 % de las plantas en el testigo fue de 32 agallas/planta. La comparación de medias detectó diferencias entre el testigo y las plantas inoculadas con quitosán y las mezclas con los biocontroladores, con el 75 % de las plantas en un rango de 9 a 13 agallas/planta (Figura 10 B), representando una reducción de agallas entre 60.3 a 67.6 % (Tabla 6). El número de agallas desarrolladas estuvo entre 2 y 41 agallas/planta con un tamaño que no superó 5 mm. Al igual que en la primera réplica, las plantas inoculadas con *S. misionensis* Ac006 presentaron el mayor número de agallas entre los tratamientos evaluados (Figura 10 D).

Tabla 6: Efecto de la mezcla de biocontroladores y aditivos orgánicos sobre la formación de agallas en la raíz por *Spongospora subterranea* en plantas de *Solanum tuberosum* cv. Diacol Capiro en dos réplicas establecidas en materas a la intemperie en Subachoque.

Tratamiento	Reducción de agallas (%)		
	Réplica I	Réplica II	Promedio
Testigo	0	0 a	0
Th003	31.30	29.05 ab	30.17
Bs006	42.30	30.73 ab	36.51
Ac006	20.98	20.11 ab	20.54
Quitina	37.16	42.46 ab	39.81
Quitosán	59.79	65.36 b	62.58
Quitina-Th003	59.32	47.49 ab	53.40
Quitina-Bs006	66.16	41.34 ab	53.75
Quitina-Ac006	52.08	43.02 ab	47.55
Quitosán-Th003	59.90	67.60 b	63.75
Quitosán-Bs006	58.53	61.45 b	59.99
Quitosán-Ac006	53.93	60.34 b	57.13
Químico	36.04	28.49 ab	32.27

Ac006: *S. misionensis*; Bs006: *B. amyloliquefaciens*; Th003: *T. koningiopsis*. Valores seguidos por la misma letra no son estadísticamente diferentes por Tukey por pares ($P < 0.05$) (Anexo H).

Las mezclas realizadas con la mitad de la concentración de los biocontroladores, la quitina o el quitosán tuvieron en promedio de las dos réplicas un efecto antagónico en la reducción del camanduleo de la papa (Tabla 7). No obstante, se presentaron mayores valores que los obtenidos en las mezclas de los biocontroladores (Tabla 4). Se identifica que la mezcla de Th003 con el quitosán o la quitina presentaron en promedio de las dos réplicas los mayores valores de interacción (0.82).

Tabla 7: Interacciones sobre la formación de agallas en la raíz por *Spogospora subterranea* en plantas de *Solanum tuberosum* cv. Diacol Capiro en dos réplicas establecidas en materas a la intemperie en Subachoque.

Tratamiento	Interacción*		
	Réplica I	Réplica II	Promedio
Quitina-Th003	0.93	0.80	0.82
Quitina-Bs006	0.92	0.69	0.76
Quitina-Ac006	0.91	0.80	0.81
Quitosán-Th003	0.83	0.90	0.82
Quitosán-Bs006	0.76	0.81	0.74
Quitosán-Ac006	0.79	0.83	0.77

*Cuando el resultado es igual a uno la interacción es aditiva, mayor a uno es sinérgica y menor a uno es antagónica.

6.6 Matriz de decisión para seleccionar las mezclas

Al considerar la eficacia en la reducción de agallas, interacción de las mezclas y consistencia de la actividad biocontroladora entre réplicas de un ensayo, se pudo identificar que las mezclas realizadas con los biocontroladores, *T. koningiopsis* Th003 y *B. amyloliquefaciens* Bs006 presentó el mayor puntaje (32.54). Así mismo, en las mezclas que incluyeron aditivos más biocontroladores, fué la que contenía quitosán y Th003 la de mayor puntaje (43.43). Cabe destacar que las mezclas realizadas con el quitosán presentaron los mayores valores entre las mezclas realizadas, seguido por aquellas que contenían quitina (Tabla 8).

Tabla 8: Matriz de decisión para seleccionar las mezclas de biocontroladores y de los aditivos orgánicos con los biocontroladores.

	Eficacia¹	Interacción²	Consistencia³	Total
Tratamiento	%			
Th003-Ac006	2.26	- 0.03	15.65	17.88
Ac006-Bs006	4.19	0.00	17.72	21.91
Th003-Bs006	10.67	0.20	21.67	32.54
Th003-Ac006-Bs006	9.38	0.07	21.76	31.21
Quitina-Th003	18.69	0.29	20.73	39.71
Quitina-Bs006	18.81	0.27	20.62	39.70
Quitina-Ac006	16.64	0.28	17.59	34.51
Quitosán-Th003	22.31	0.29	20.83	43.43
Quitosán-Bs006	21.00	0.26	19.91	41.16
Quitosán-Ac006	20.00	0.27	20.11	40.37

¹ Representa el 35 % del promedio de la eficacia en las dos réplicas; ² Representa el 35 % del promedio de la interacción en las dos réplicas; ³ Representa el 30 % de 100 menos el promedio de la desviación estándar del promedio de las dos réplicas.

7. Discusión

Los resultados confirmaron la actividad biocontroladora de algunos de los microorganismos evaluados en el presente trabajo. No obstante, la reducción de agallas por los microorganismos solo fue significativa ($P < 0.05$) en una de cuatro réplicas, además se identificó una alta variabilidad de biocontrol en los diferentes ensayos. Es importante resaltar que el ensayo se desarrolló en suelo naturalmente infestado y en varios estudios se ha indicado que la actividad biocontroladora de los microorganismos puede ser desestabilizada por las relaciones entre las diferentes especies habitantes del suelo; se pueden presentar tipos de competencias entre especies de microorganismos relacionados taxonómicamente, como de especies lejanas (Campbell, 1983; Walker *et al.*, 2003; Bacilio *et al.*, 2003; Bais *et al.*, 2006; Neuhauser y Fargione, 2004; Zhang *et al.*, 2014). Además, existen otros factores que afectan la eficacia de control, como la colonización en las raíces, la formación de biofilms y la competencia por espacio y nutrientes (Bais *et al.*, 2004; Reva *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2012). Bae y Knudsen, (2005) mencionan que el crecimiento de hifas y la eficacia de biocontrol de *T. harzianum* puede depender de su interacción con los componentes bióticos del medio ambiente y del suelo. Sin embargo, en las cuatro réplicas establecidas con el cv. Diacol Capiro, se observó consistencia en la disminución del camanduleo con la cepas *T. koningiopsis* Th003 y *B. amyloliquefaciens* Bs006, reportando la mayor reducción de agallas con un promedio de 43.8 y 43.6 % respectivamente.

En *P. brassicae* se ha identificado que la pared celular de las esporas contiene principalmente proteína y quitina (Buczacki y Moxham, 1983). Es muy probable que la pared de tres capas de las esporas de *S. subterranea* esté compuesta por los mismos componentes y que la actividad endoquitinasa encontrada en *T. koningiopsis* Th003 (Cotes *et al.*, 1996) pudo inducir a la descomposición microbiana de las esporas. La cepa Bs006 es productora de lipopéptidos cíclicos tales como iturinas y fengicinas (Moreno *et al.*, 2016b) que pudo ejercer actividad sobre los esporosoros, así mismo, otras cepas de

B. amyloliquefaciens se ha encontrado producción de subtilisin (Guleria *et al.*, 2016) una proteasa que podría haber ejercido degradación de la capa protectora de proteína de las esporas. Sin embargo, no hay que descartar la inducción de resistencia en las plantas de papa, mecanismo identificado en la interacción *F. oxysporum* – tomate - *T. koningiopsis* y relacionado con la expresión de genes que hacen parte de la ruta del ácido jasmónico (Jaimes *et al.*, 2009; Moreno *et al.*, 2009). Así mismo, en el caso de *B. amyloliquefaciens* Bs006 este fenómeno se podría relacionar con la producción de surfactina y de fengicinas, lipopéptidos relacionados con la inducción de resistencia en plantas contra fitopatógenos (Moreno *et al.*, 2016b). Los organismos mejor caracterizados inductores de resistencia sistémica inducida (ISR) son las PGPRs, en este caso *B. amyloliquefaciens* Bs006 (Henry *et al.*, 2012). También se ha identificado en *Trichoderma* sp. un tipo de respuesta ISR dependiente del genotipo de la planta (Tucci *et al.*, 2011; Banani *et al.*, 2014), resulta interesante evaluar estas cepas en otros cultivares e identificar si hay un tipo de inducción de resistencia de acuerdo al cultivar de papa.

Los porcentajes de biocontrol obtenidos con Th003 en el presente estudio (43.8 % en promedio) se encuentran en el rango de eficacia de biocontrol registrados en varios patosistemas. No obstante, en el control de otras enfermedades se ha evidenciado porcentajes de eficacia más altos. En relación a patógenos del suelo en el cultivo de papa se evidenció efecto de biocontrol sobre *R. solani* disminuyendo la incidencia de la enfermedad en un 70 % (Beltrán *et al.*, 2007) y en semilla de papa almacenada y tratada con esta cepa redujo la incidencia en un 80 % (Beltrán *et al.*, 2011); así mismo, en el cultivo de tomate se registró una eficacia de control del 71 % de *R. solani* (Cotes *et al.*, 2001). En *Pythium* sp., Th003 presentó un 66 % de eficacia de biocontrol en plantas de frijol (Cotes *et al.*, 1992, 1994); de *F. oxysporum* en el cultivo de tomate registró una eficacia de control del 67 % (Cotes *et al.*, 2001); la incidencia de la enfermedad ocasionada por *S. sclerotiorum* en lechuga fue reducida en un 80 % (Cotes *et al.*, 2007), en este mismo hospedero disminuyó en un 90 % la incidencia de *Olpidium virulentus* (Smith *et al.*, 2013). En protozoarios como *S. subterranea* se ha identificado que esta cepa disminuye en un 58 % la severidad de la hernia de las crucíferas ocasionado por *P. brassicae* Woronin (Botero *et al.*, 2015). En el control de patógenos foliares, Th003 disminuyó la incidencia del moho gris causado por *B. cinerea* en un 49 y 60 % en el cultivo de tomate y mora respectivamente (Moreno *et al.*, 2007; Zapata y Cotes, 2013); y

de *Oidium lycopersicum* en plantas de tomate se evidenció una reducción de la incidencia (28 %) y de la severidad (66 %) (Moreno y Cotes, 2007).

Otras cepas de *T. koningiopsis* han evidenciado biocontrol de diferentes fitopatógenos como, hiperparasitismo de *M. phaseolina* aislado de frijol común (Larralde *et al.*, 2008), inhibió en un 27.42% a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* en frijol (Oloo, 2013), redujo en un 95 % la producción de esporangios de *P. capsici* en chile (Ramírez, 2015), y mostró inhibir el crecimiento de cuatro patógenos que ocasionan pudrición en la raíz *P. herbarum*, *F. flocciferum*, *S. lignicola* y *E. nigrum* (Chen *et al.*, 2016). En otros estudios se ha identificado el uso potencial de otras especies de *Trichoderma* spp. con rangos en la reducción de agallas similares al obtenido con Th003. En condiciones de invernadero *T. harzianum* disminuyó en un 51.5 % la infección en las raíces (Nielsen y Larsen, 2004), *T. asperellum* redujo el número de agallas en un rango del 55 al 66.7 % (Hoyos *et al.*, 2008) y en condiciones de campo *T. harzianum* disminuyó la incidencia de esta enfermedad en un 27 % en raíces (Restrepo *et al.*, 2009).

B. amyloliquefaciens Bs006 ha demostrado inhibición de *F. oxysporum* en condiciones *in vitro* (Caviedes, 2010) y reducción de la incidencia y severidad de *F. oxysporum* en un 57 y 73 % respectivamente en plantas de uchuva (Moreno *et al.*, 2016a). En el presente trabajo Bs006 fue la segunda cepa en disminuir en mayor proporción las agallas en las raíces del cv. Diacol Capiro. En otros patosistemas, otras cepas de *B. amyloliquefaciens* han demostrado actividad de control sobre patógenos del suelo, en condiciones *in vitro* se demostró una inhibición de *R. solani* (Yu *et al.*, 2002), de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (Yuan *et al.*, 2012) y de *S. sclerotiorum* (Ji *et al.*, 2013), también presentó actividad supresiva del nematodo *M. incognita* (Burkett *et al.*, 2008), supresión de la pudrición de la raíz en ginseng ocasionado por *Cylindrocarpon destructans* (Kim *et al.*, 2016) y demostró una eficacia de biocontrol del 68.1 % de la bacteria *R. solanacearum* en tomate (Singh *et al.*, 2016).

El actinomiceto *S. misionensis* Ac006 estuvo dentro de los tres microorganismos que redujo en mayor proporción las agallas, con un promedio de las cuatro réplicas de 29.7 %. De acuerdo con Yuan y Crawford, (1995) los actinomicetos producen una variedad de enzimas degradadoras de la pared celular de los hongos, como las quitinasas que probablemente tuvieron un efecto sobre las esporas de resistencia de *S. subterranea*.

Otras cepas de *S. misionensis* han demostrado actividad biocontroladora del tizón de las plántulas ocasionado por *F. proliferatum* y de la pudrición basal causada por *F. oxysporum* f. sp. *lilii* (Chung *et al.*, 2011) y actividad antagónica contra tres hongos patógenos del arroz: *F. moniliforme*, *H. oryzae* y *R. solani* (Poomthongdee *et al.*, 2015).

Mediante una matriz de decisión en la que se incluyó la eficacia en la reducción de agallas, actividad de los biocontroladores contra diferentes fitopatógenos y sus características relacionadas con el avance tecnológico (producción masiva, formulación y registro productor). Se seleccionaron a *T. koningiopsis* Th003, *B. amyloliquefaciens* Bs006 y *S. misionensis* Ac006 con el objeto de establecer el tipo de interacción en la reducción del camanduleo. En diferentes patosistemas se ha reportado que las mezclas realizadas entre diferentes microorganismos o la mezcla de biocontroladores y aditivos orgánicos puede tener relaciones sinérgicas, aditivas o antagónicas (Whipps, 2001; Nawar, 2005; Prevost *et al.*, 2006; Lowe *et al.*, 2012; Sarma *et al.*, 2015; Waewthongrak *et al.*, 2015; Bakeer *et al.*, 2016; Nitu *et al.*, 2016).

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo se observó que las diferentes mezclas realizadas usando la mitad o un tercio de la concentración de cada microorganismo cuando se utilizaban mezclas de dos o de tres respectivamente, registraban interacciones antagónicas en cuanto a la eficacia en la reducción de agallas en las plantas. No obstante, es importante resaltar que la mezcla de *T. koningiopsis* Th003 y *B. amyloliquefaciens* Bs006 presentó el mayor valor de interacción, además de tener un efecto de biocontrol consistente en los diferentes ensayos. De esta manera, se identifica un uso promisorio de estos dos microorganismos, si se tiene en cuenta que sólo se usó la mitad de la concentración de cada uno de ellos. Lo cual permitiría reducir la variabilidad de biocontrol en condiciones de campo como lo demostró Guetsky *et al.*, (2002). Teniendo en cuenta los diferentes mecanismos de acción reportados para cada uno de los microorganismos en dicha mezcla, se podría esperar una complementariedad de estos en el efecto biocontrolador, fenómeno identificado en los consorcios microbianos en que las PGPR con diferentes mecanismos de acción pueden reducir la probabilidad de desarrollo de resistencia por los fitopatógenos y puede ser eficaz en una amplia gama de condiciones ambientales (Jetiyanon y Kloepper, 2002; Sarma *et al.*, 2015). En particular, las mezclas de hongos y bacterias pueden proporcionar protección en diferentes momentos debido a sus requisitos diferenciales y mecanismos de acción, lo

que puede ayudar a superar las inconsistencias en el comportamiento de las cepas individuales (Klein *et al.*, 2013).

Sin embargo, una gran parte de las mezclas evaluadas en diferentes trabajos han demostrado ser antagónicas, como lo evidencia el hecho de que sólo el 2 % de 465 tratamientos publicados han evidenciado sinergismo en las mezclas de microorganismos (Xu *et al.*, 2011b), lo cual es coherente con una investigación, en donde por medio de un modelo genérico concluyeron que el uso de un solo microorganismo con dos mecanismos de acción presenta mayor biocontrol de la enfermedad que el uso de dos microorganismos en mezcla cada uno con un mecanismo de acción diferente (Xu *et al.*, 2011a). Así mismo, se ha observado que este efecto antagónico con la mezcla de microorganismos debe a la incompatibilidad entre estos, pues al evaluarse individualmente disminuyeron la enfermedad o población del fitopatógeno (Oyekanmi *et al.*, 2007).

En relación a patógenos del suelo, *Aphanomyces euteiches* f. sp. *pisi* en guisante, la inoculación individual de *T. harzianum* ThzID1 y *P. fluorescens* 2-79 R N₁₀, a la semilla, demostró reducir significativamente la enfermedad, lo que no sucedió con la evaluación de la mezcla (Dandurand y Knudsen, 1993). En plantas de papa se evaluó el efecto de 10 cepas de bacterias en el control de *Fusarium sambucinum* Fuckel, solo 16 de 90 mezclas, evaluadas a la mitad de la concentración, tuvieron mejor respuesta de biocontrol que las cepas evaluadas individualmente, los autores concluyen que factores como la dosis y compatibilidad entre las bacterias pueden influir en la respuesta de control a la enfermedad (Schisler *et al.*, 1997). En tomate se evaluaron mezclas de cepas no patogénicas de *Fusarium* spp. y los biocontroladores *Trichoderma* spp., *Gliocladium virens*, *P. fluorescens* y *Burkholderia cepacia* en el control de fusariosis, pero no proporcionó significativamente una mejor respuesta a la enfermedad que cuando se inocula la cepa no patogénica de *Fusarium* spp. (Larkin y Fravel, 1998). De Boer *et al.*, (1999) y Georgakopoulos *et al.*, (2002) evaluaron la mezcla en dúo de varias cepas de *Pseudomonas* spp. y de bacterias, en el control de *F. oxysporum* y *Pythium* spp., en ambos estudios encontraron que las mezclas no aumentaban la eficacia de control que cuando se evaluaban individualmente.

Estudios relacionados en el biocontrol de *M. incognita* causante del nudo de la raíz, similar al daño ocasionado por *S. subterranea*, han demostrado que las mezclas de microorganismo no aumentan la eficacia de control de este nematodo. Por ejemplo, en pimiento con dos cepas de *Burkholderia cepacia* y una cepa de *T. virens* (Rafferty-McArdle *et al.*, 2001) y en genotipos de soya con los biocontroladores *Glomus mosseae*, *Bradyrhizobium japonicum* y *Trichoderma pseudokoningii* (Oyekanmi *et al.*, 2007) las poblaciones del nematodo disminuyeron en igual proporción, cuando se inocularon los microorganismos individual o en mezcla.

A nivel molecular la producción de 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) por cepas de *P. fluorescens*, y la producción de quitinasas como la endoquitinasa ECH42 y la NAG1 *N*-acetyl- β -d-glucosaminidase por *T. atroviride*, evidenció que la DAPG mejoran la expresión de nag1 pero no de ech42, y una sustancia desconocida desde *P. fluorescens* CHA0 reprimió la expresión de ambas quitinasas de *T. atroviride* (Lutz *et al.*, 2004). En plantas de maíz se evidenció que la inoculación de las mezclas de *Glomus*, *Azospirillum* y *Pseudomonas* no incrementó la producción de metabolitos secundarios en las raíces de las plantas, siendo comparable con la inoculación de solo *Glomus* (Walker *et al.*, 2011).

En relación con los aditivos orgánicos, se evidenció disminución significativa ($P < 0.05$) de agallas con el quitosán al 0.5 % en las dos réplicas. El efecto de este aditivo sobre el patosistema *S. subterraena*-papa, pudo ser debido a uno o varios de los mecanismos de acción reportados para este aditivo, entre los que se encuentran: efectos directos contra patógenos (Rabea *et al.*, 2003; Hassni *et al.*, 2004; Kulikov *et al.*, 2006); desarrollo de barreras físicas alrededor de los sitios de penetración del patógeno (Hirano *et al.*, 1999; El-Hadrami *et al.*, 2009), tales como la inducción de depósitos de calosa (Conrath *et al.*, 1989; Köhle *et al.*, 1985; Iriti *et al.*, 2006); quelación de nutrientes y minerales (Bornet y Teissedre, 2008); efecto sobre la H⁺-ATPasa y despolarización de la membrana (Benhamou *et al.*, 1998; Amborabé *et al.*, 2008); modulación de las respuestas de defensa de las plantas (Köhle *et al.*, 1985; Conrath *et al.*, 1989; Benhamou *et al.*, 1998; Hirano *et al.*, 1999; El-Ghaouth *et al.*, 2000; Rabea *et al.*, 2003; Terry, 2004; Hassni *et al.*, 2004; EL Hadrami *et al.*, 2010); efectos en la distorsión nuclear y muerte celular programada (Iriti *et al.*, 2006; Vasil'ev *et al.*, 2009); activación de especies reactivas de oxígeno y actividad antioxidante (Sun *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2014) . Badawy y Rabea, (2011) sugieren que el efecto del quitosán en la reducción de patógenos del suelo viene

del hecho que mejora las respuestas de defensas de las plantas y estimulan la actividad de microorganismos benéficos del suelo.

Este aditivo ha demostrado tener efecto en otros patógenos del suelo; en condiciones controladas se evidenció disminución *in vitro* en un 75 % del micelio de *F. oxysporum* f. sp. *albedinis* (Hassni *et al.*, 2004). Zeng y Shi, (2009) evidenciaron en semillas recubiertas con este aditivo, inhibición del crecimiento y colonización de *R. solani* y *F. moliniforme* en un 85.7 y 93 % respectivamente. En un estudio realizado por Nunes da Silva *et al.*, (2014) encontraron que aplicaciones de quitosán al suelo redujo en un 82.7 % la población del nematodo *Bursaphelenchus xylophilus* en plantas de *P. pinaster* y *P. pinea*. En el cultivo de papa se ha evidenciado efecto del quitosán en la reducción de varios fitopatógenos, Chirkov *et al.* (2001) encontró significativamente menor número de plantas infectadas con el virus X de la papa, teniendo a los ocho días de la inoculación un 62 % de tolerancia al virus. También se observó disminución de los síntomas de las enfermedades ocasionadas por *P. infestans* (10 %) y *M. incognita* (69 %) (Vasyukova *et al.*, 2001).

Es importante resaltar que la actividad del quitosán depende del grado de deacetilación, peso molecular, hospedero, composición química y/o nutrientes del sustrato (Goy *et al.*, 2009; EL Hadrami *et al.*, 2010). En el presente estudio se trabajó con un quitosán oligomérico, lo cual presentó una ventaja ya que en una investigación realizada por Rabea y colaboradores (2003) encontraron mayor actividad antifúngica de un quitosán oligomérico que de aquel con largas unidades de cadena. De otra parte, se ha demostrado que un grado de deacetilación bajo es más efectivo que un grado mayor (Andres *et al.*, 2010), a pesar de que el quitosán utilizado en el presente trabajo tenía un 85 % de desacetilación (alto grado), fue efectivo en la disminución del camanduleo.

En esta investigación se evidenció disminución de agallas cuando el quitosán se aplicó a la mayor concentración (0.5 %), lo cual está en concordancia con lo reportado por Sánchez *et al.*, (2007) quienes evaluaron el quitosán en un rango de 0.5 al 2.5 % y observaron que las concentraciones más altas de quitosán inhibieron el crecimiento del micelio y afectó la esporulación de *A. alternata*. Por el contrario, Chookhongkha *et al.*, (2013) no encontraron diferencias significativas en la evaluación del quitosán en un rango

de 20 a 100 ppm en el control de *Rhizopus* sp. *Colletotrichum capsici*, *C. gloeosporioides*, y *Aspergillus niger* en semillas de chile.

Las mezclas realizadas con la mitad de la concentración de los biocontroladores seleccionados y el quitosán o la quitina, resultó tener una relación antagónica, similar a lo obtenido con las mezclas de los biocontroladores. Radwan *et al.*, (2011) evaluó los bioproductos *Bacillus megaterium* (Bioarc®), *Trichoderma album* (Biozeid®), *Ascophyllum nodosum* (Algaefol®), semillas de *Matricaria chamomilla* y quitosán, y el nematicida oxamyl, solos y en mezcla, en el control de *M. incognita*, de las nueve mezclas realizadas tres resultaron tener una interacción antagónica. En otro estudio se evaluó la mezcla de tres especies de *Glomus* spp., *G. mossae*, *G. galedonium* y *G. fasciculatum*, *Bacillus subtilis* y el quitosán en el control de mildew polvosa en fresa y todas las mezclas realizadas con *B. subtilis* presentó mayor severidad que cuando se evaluó individualmente (Lowe *et al.*, 2012). A pesar de estos resultados la mezcla de Th003 y quitosán presentó los mayores valores de interacción, demostrando su potencial para ser evaluado en condiciones de campo. Además, una ventaja comparativa del presente estudio, es el hecho de que en las mezclas se trabajó con la mitad de la concentración (0.25 %) del quitosán, resultando en valores de control similar a la concentración del 0.5 %, lo cual puede conducir a un beneficio costo en la aplicación de este aditivo orgánico.

Investigaciones realizadas por Beauséjour *et al.*, (2003); Rivero, (2008); Melia y Aryantha, (2010) evidenciaron mayor efecto de control del quitosán que el producido por los microorganismos, sobre la sarna común en papa, hongos que causan el manchado de grano en arroz y de *F. oxysporum* en tomate. Al igual que en el presente trabajo, de cuatro ensayos, tanto en la evaluación individual como en las mezclas, el quitosán al 0.5 % disminuyó significativamente las agallas en tres ensayos. Efecto que no se apreció en los ensayos realizados con los biocontroladores.

Comprender los factores, tales como, la alta variabilidad de los datos en los diferentes ensayos y la inconsistencia de biocontrol por algunas cepas en las réplicas es muy difícil de comprender. Por un lado se debe a la gran complejidad del patosistema *S. subterranea* papa en donde hay una fuerte interacción genotipo ambiente (Torres *et al.*, 1995; Lees, 2000; Merz, 2000; Falloon *et al.*, 2003). Por otro lado, los mecanismos de

biocontrol empleados por varios microorganismos son diversos y complejos, y dependen de la cepa del biocontrolador, de la especie de planta y del patógeno involucrados en la interacción (Howell, 2003). Como lo mencionan Brimner y Boland, (2003), entender y comprender el completo funcionamiento de un sistema biológico es muy difícil, ya que la complejidad de las interacciones planta-suelo-microorganismos-ambiente son variadas y una comprensión completa de todas las relaciones en cuestión es poco probable.

A pesar que las mezclas de microorganismos y aditivos evaluadas en este trabajo no mostró sinergismo, es importante continuar con la evaluación de nuevas mezclas que puedan conducir a una mayor reducción del camanduleo, a una actividad estable en diferentes ambientes y cultivares de papa, y mejorar la sanidad contra otros problemas fitosanitarios de las plantas.

8. Conclusiones y recomendaciones

8.1 Conclusiones

1. Los resultados obtenidos permitieron demostrar una reducción del camanduleo ocasionado por *S. subterranea* con el uso de biocontroladores y de aditivos orgánicos utilizados de forma individual, lo cual confirma parte de la hipótesis planteada. Sin embargo, se rechaza la parte de la hipótesis en la que se esperaba encontrar un aumento de biocontrol con las mezclas de estos.
2. *T. koningiopsis* fue el microorganismos que al aplicarlo de forma individual disminuyó en mayor proporción la cantidad de agallas con un promedio de las cuatro réplicas del 43.83 %, seguido de *B. amyloliquefaciens* con 43.61 %.
3. En la matriz de decisión propuesta permitió seleccionar a los biocontroladores *S. misionensis* Ac006, *T. koningiopsis* Th003 y *B. amyloliquefaciens* Bs006, para establecer ensayos de mezclas entre estos microorganismos, el quitosán y la quitina. Se identificó que la cepa Th003 presenta el mayor desarrollo tecnológico entre las cepas evaluadas.
4. La mezcla de los biocontroladores *T. koningiopsis* Th003 y *B. amyloliquefaciens* Bs006 presentó la mayor reducción de agallas entre las mezclas con un promedio de dos réplicas de 30.5 %. Pero este efecto no fue mayor al producido por solo *T. koningiopsis* Th003 en donde se presentó una disminución del camanduleo del 30.8 % en promedio de las dos réplicas. No obstante, las mezclas de los microorganismos contenían la mitad de la concentración que cuando se evaluaron individualmente.

5. Entre los aditivos evaluados el quitosán al 0.5 % presentó significativamente mayor reducción del camanduleo con un 64.7 % en promedio de dos réplicas.
6. La mezcla de *T. koningiopsis* Th003 y el quitosán 0.5 % fue el tratamiento que redujo en mayor proporción el número de agallas con promedio de dos réplicas del 63.8 %.
7. Mediante la matriz de decisión para seleccionar las mezclas se aprecia mayor actividad de control cuando los tubérculos son tratados con los aditivos orgánicos, en particular el quitosán, en comparación con los biocontroladores.
8. En todas las mezclas evaluadas usando la mitad o un tercio de la concentración usada en la evaluación individual, se presentó una interacción antagónica.
9. La información generada en este trabajo contribuyó a la selección de componentes tecnológicos como alternativas de manejo de *S. subterranea*.

8.2 Recomendaciones

1. Evaluar otros géneros microbianos, aditivos orgánicos y enmiendas en este patosistema.
2. Evaluar en condiciones de campo los tratamientos seleccionados, en diferentes zonas productoras, tipos de suelos, otros cultivares y hasta cosecha para determinar la eficacia de estos.
3. Determinar formas y frecuencias de aplicación de los microorganismos y aditivos orgánicos seleccionados.
4. Evaluar otras fuentes de quitosán con diferentes características fisicoquímicas disponibles en el mercado. Así mismo, evaluar otras concentraciones.
5. Buscar fuentes alternativas de quitosán de bajo costo y alta eficacia.

6. Desarrollar prototipos de bioplaguicidas que incluyan quitosán en su composición y escalar su producción.
7. Establecer un plan de manejo integrado de enfermedades que incluya los componentes tecnológicos seleccionados y evaluar su eficacia contra otros problemas fitosanitarios limitantes en el cultivo de papa.
8. Estudiar los modos de acción involucrados en la actividad de control del camanduleo.

8.3 Perspectivas

- Corto plazo: Evaluar otras fuentes de quitosán de bajo costo y alta eficacia, **ya** que el evaluado en el presente trabajo es inviable económicamente. ¿Será que otra fuente de quitosán presentará una reducción de agallas similar al encontrado con el quitosán (C3646 Sigma)? En Colombia las fuentes de quitosán para uso agrícola son escasas, el único disponible en el mercado local es uno con un 6 % de quitosán. Una vez se tenga una fuente de quitosán viable económicamente se evaluaría el efecto sobre el camanduleo y la sarna polvosa. Así mismo, evaluar otros aditivos o enmiendas que se encuentren disponibles en el mercado.

-Mediano plazo: 1) Comprar quitina, que tiene mayores opciones en el mercado que el quitosán, y desarrollar técnicas de deacetilación en el laboratorio. ¿El quitosán producto de la deacetilación en el laboratorio tendrá un rango de eficacia similar al evaluado en la presente investigación?, se evaluaría la viabilidad técnica y económica de este proceso en el laboratorio. 2) Identificar los posibles mecanismos de acción en la interacción papa-*S.subterranea*-tratamiento (Quitosán y Th003) ¿El efecto del quitosán en la reducción de las agallas será por efectos directos sobre *S. subterranea* o por inducción de defensas en las plantas?, desarrollar los protocolos y ensayos para identificar el o los mecanismo(s) de acción, una opción para identificar efecto directo, sería el desarrollo de un protocolo para la liberación de zoosporas en condiciones de laboratorio.

Bibliografía

- AL Saeedi, S., AL Ani, B., 2014. Study of antagonistic capability of *Trichoderma harzianum* isolates against some pathogenic soil borne fungi. *Agric. Biol. J. N. Am.* 5, 15–23. doi:10.5251/abjna.2014.5.1.15.23
- Amborabé, B.-E., Bonmort, J., Fleurat-Lessard, P., Roblin, G., 2008. Early events induced by chitosan on plant cells. *J. Exp. Bot.* 59, 2317–2324. doi:10.1093/jxb/ern096
- Anand, S., Reddy, J., 2009. Biocontrol potential of *Trichoderma* sp. against plant pathogen. *Int. J. Agric. Sci.* 1, 30–39. doi:10.9735/0975-3710.1.2.30-39
- Andres, Y., Giraud, L., Gerente, C., Cloirec, P.L., 2010. Antibacterial Effects of Chitosan Powder: Mechanisms of Action. *Environ. Technol.* doi:10.1080/09593332808618893
- Arias, M., 2011. Análisis y comparación de los glucosinolatos presentes en diferentes accesiones de cubio (*Tropaeolum tuberosum*) para evaluar su uso potencial en el control del patógeno de la papa *Spongospora subterranea*. Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de: Magister en Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
- Asad, S., Ali, N., Hameed, A., Khan, S., Ahmad, R., Bilal, M., Shahzad, M., Tabassum, A., 2014. Biocontrol efficacy of different isolates of *Trichoderma* against soil borne pathogen *Rhizoctonia solani*. *Pol. J. Microbiol.* 63, 95–103.
- Badawy, M., Rabea, E., 2011. A biopolymer chitosan and its derivatives as promising antimicrobial agents against plant pathogens and their applications in crop protection. *Int. J. Carbohydr. Chem.* 20, 29. doi:10.1155/2011/460381
- Bae, Y., Knudsen, G., 2005. Soil microbial biomass influence on growth and biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum*. *Biol. Control* 32, 236–242. doi:10.1016/j.biocontrol.2004.10.001
- Baimark, Y., Niamsa, N., 2009. Study on wood vinegars for use as coagulating and antifungal agents on the production of natural rubber sheets. *Biomass Bioenergy* 33, 994–998. doi:10.1016/j.biombioe.2009.04.001
- Bais, H., Park, S., Weir, T., Callaway, R., Vivanco, J., 2004. How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends Plant Sci.* 9, 26–32. doi:10.1016/j.tplants.2003.11.008
- Bakeer, A., El-Mohamedy, R., Saied, N., Abd-El-Kareem, F., 2016. Field suppression of Fusarium soil borne diseases of tomato plants by the combined application of bio agents and chitosan. *Br. Biotechnol. J.* 13, 1–10.
- Balaji, L., Ahir, R., 2011. Evaluation of plant extracts and biocontrol agents against leaf spot disease of brinjal. *Indian Phytopathol.* 64, 378–380.
- Balendres, M., Tegg, R., Wilson, C., 2016. Key events in pathogenesis of *Spongospora* diseases in potato: a review. *Australas. Plant Pathol.* 45, 229–240. doi:10.1007/s13313-016-0398-3
- Banani, H., Roatti, B., Ezzahi, B., Giovannini, O., Gessler, G., Pertot, I., Perazzolli, M., 2014. Characterization of resistance mechanisms activated by *Trichoderma*

- harzianum* T39 and benzothiadiazole to downy mildew in different grapevine cultivars. *Plant Pathol.* 63, 334–343. doi:10.1111/ppa.12089
- Barber, M., Bertram, R., Ride, J., 1989. Chitin oligosaccharides elicit lignification in wounded wheat leaves. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 34, 3–12. doi:10.1016/0885-5765(89)90012-X
- Bardin, S., Huang, H., Moyer, J., 2004. Control of *Pythium* damping-off of sugar beet by seed treatment with crop straw powders and a biocontrol agent. *Biol. Control* 29, 453–460. doi:10.1016/j.biocontrol.2003.09.001
- Bastidas, L., 2010. Determinación de la capacidad biocontroladora de *Pseudomonas* spp. contra *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* en el cultivo de papa. Tesis para optar al título de Maestría en Ciencias en Microbiología. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
- Beauséjour, J., Clermont, N., Beaulieu, C., 2003. Effect of *Streptomyces melanosporofaciens* strain EF-76 and of chitosan on common scab of potato. *Plant Soil* 256, 463–468. doi:10.1023/A:1026177714855
- Beltrán, C., 2004. Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp. con potencial biocontrolador de *Rhizoctonia solani* Kühn. en papa, bajo condiciones de casa de malla. Tesis de grado presentado como requisito parcial para optar el título de Biólogo. Universidad Nacional de Colombia., Bogotá.
- Beltrán, C., Cotes, A., Paris, A., 2007. Selection of isolates of *Trichoderma* spp. with biocontrol activity over *Rhizoctonia solani* in potato. *IOBCWPRS Bull* 30, 55–8.
- Beltrán, C., Garcés, E., 2011. Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp. con potencial biocontrolador de *Rhizoctonia solani* Kühn en papa bajo condiciones de casa de malla. *Acta Biológica Colomb.* 10, 82–83.
- Beltrán, C., Moreno, C., Cotes, A., 2011. *Trichoderma koningiopsis* Th003 alternativa biológica para el control de *Rhizoctonia solani* en el cultivo de papa. CORPOICA. Bogotá, Colombia.
- Benhamou, N., Kloepper, J.W., Tuzun, S., 1998. Induction of resistance against Fusarium wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response. *Planta* 204, 153–168. doi:10.1007/s004250050242
- Benítez, T., Rincón, A., Limón, M., Codón, A., 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiol. Off. J. Span. Soc. Microbiol.* 7, 249–260.
- Bittara, F., Thompson, A., Gudmestad, N., Secor, G., 2016. Field evaluation of potato genotypes for resistance to powdery scab on tubers and root gall formation caused by *Spongospora subterranea*. *Am. J. Potato Res.* 1–12. doi:10.1007/s12230-016-9526-4
- Bornet, A., Teissedre, P., 2008. Chitosan, chitin-glucan and chitin effects on minerals (iron, lead, cadmium) and organic (ochratoxin A) contaminants in wines. *Eur. Food Res. Technol.* 226, 681–689. doi:10.1007/s00217-007-0577-0
- Borrego, A., 2014. Las enmiendas orgánicas del suelo en el control de las Fusariosis del espárrago y del tomate. Tesis Doctoral. Universidad de Cordoba. Colombia.
- Botero, A., Gómez, I., Benítez, E., García, C., 2015. Liming with dolomite reduces the efficacy of the biocontrol fungus *Trichoderma koningiopsis* against cabbage clubroot. *Agron. Colomb.* 33, 49–57. doi:10.15446/agron.colomb.v33n1.46759
- Braselton, J., 1995. Current status of the Plasmodiophorids. *Crit. Rev. Microbiol.* 21, 263–275. doi:10.3109/10408419509113543
- Brimner, T.A., Boland, G.J., 2003. A review of the non-target effects of fungi used to biologically control plant diseases. *Agric. Ecosyst. Environ.* 100, 3–16. doi:10.1016/S0167-8809(03)00200-7

- Buczacki, S., Moxham, S., 1983. Structure of the resting spore wall of *Plasmodiophora brassicae* revealed by electron microscopy and chemical digestion. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 81, 221–231. doi:10.1016/S0007-1536(83)80073-4
- Burkett, M., Kokalis, N., Lawrence, K., van Santen, E., Kloepper, J.W., 2008. Suppressiveness of root-knot nematodes mediated by rhizobacteria. *Biol. Control* 47, 55–59. doi:10.1016/j.biocontrol.2008.07.008
- Burnett, F., 1991. The Biology and Control of Powdery Scab (*Spongospora subterranea*) of Potatoes. Thesis Ph. D. University of Glasgow, Scotland.
- Cavalier, T., 1993. The Protozoan Phylum Opalozoa. *J. Eukaryot. Microbiol.* 40, 609–615. doi:10.1111/j.1550-7408.1993.tb06117.x
- Caviedes, D., 2010. Aislamiento y selección de *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp., promotoras del crecimiento vegetal en cultivo de uchuva (*Physalis peruviana* L.) con actividad antagónica frente a *Fusarium oxysporum*. Tesis de grado presentado como requisito parcial para optar el título de Microbiólogo industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- Chen, J., Liu, K., Miao, C., Sun, S., Chen, Y., Xu, L., Guan, H., Zhao, L., 2016. Salt tolerance of endophytic *Trichoderma koningiopsis* YIM PH30002 and its volatile organic compounds (VOCs) allelopathic activity against phytopathogens associated with *Panax notoginseng*. *Ann. Microbiol.* 66, 981–990. doi:10.1007/s13213-015-1171-5
- Chirkov, S., Il'ina, A., Surgucheva, N., Letunova, E., Varitsev, Y., Tatarinova, N., Varlamov, V., 2001. Effect of Chitosan on Systemic Viral Infection and Some Defense Responses in Potato Plants. *Russ. J. Plant Physiol.* 48, 774–779. doi:10.1023/A:1012508625017
- Chookhongkha, N., Sopondilok, T., Photchanachai, S., 2013. Effect of chitosan and chitosan nanoparticles on fungal growth and Chilli seed quality. *Acta Hort.* 973, 231–237. doi:10.17660/ActaHortic.2013.973.32
- Chowdhury, S., Hartmann, A., Gao, X., Borriss, R., 2015. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 – a review. *Front. Microbiol.* 6, 1–12. doi:10.3389/fmicb.2015.00780
- Chung, W., Wu, R., Hsu, C., Huang, H., Huang, J., 2011. Application of antagonistic rhizobacteria for control of *Fusarium* seedling blight and basal rot of lily. *Australas. Plant Pathol.* 40, 269–276. doi:10.1007/s13313-011-0040-3
- Clavijo, A., Cotes, A.M., 1998. Evaluación de la actividad quitinasa en procesos de control biológico de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* sp. *lycopersici* en tomate, mediante fitoinvigorización de semillas en presencia de *Trichoderma koningii*. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 1, 58–66.
- Cohen, E., 2001. Chitin synthesis and inhibition: a revisit. *Pest Manag. Sci.* 57, 946–950. doi:10.1002/ps.363
- Conrath, U., Domard, A., Kauss, H., 1989. Chitosan-elicited synthesis of callose and of coumarin derivatives in parsley cell suspension cultures. *Plant Cell Rep.* 8, 152–155. doi:10.1007/BF00716829
- Coombs, J.T., Michelsen, P.P., Franco, C.M.M., 2004. Evaluation of endophytic actinobacteria as antagonists of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in wheat. *Biol. Control* 29, 359–366. doi:10.1016/j.biocontrol.2003.08.001
- Costa, F., Zucchi, T., Melo, I., 2013. Biological control of phytopathogenic fungi by endophytic actinomycetes isolated from maize (*Zea mays* L.). *Braz. Arch. Biol. Technol.* 56, 948–955. doi:10.1590/S1516-89132013000600009
- Cotes, A., Cárdenas, A., Pinzon, H., 2001. Effect of seed priming in the presence of *Trichoderma koningii* on seed and seedling disease induced in tomato by

- Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. IOBCWPRS Bull 24, 259–263.
- Cotes, A., Lepoivre, P., Semal, J., 1996. Correlation between hydrolytic enzyme activities measured in bean seedlings after *Trichoderma koningii* treatment combined with pregermination and the protective effect against *Pythium splendens*. Eur. J. Plant Pathol. 102, 497–506. doi:10.1007/BF01877144
- Cotes, A., Lepoivre, P., Semal, J., 1992. Effect of precolonization of bean seeds with *Trichoderma*, on symptoms induced by *Pythium*. Meded. Van Fac. Landbouwwet. Rijksuniv. Te Gent 57.
- Cotes, A., Moreno, C., Molano, L., Villamizar, L., Piedrahita, W., 2007. Prospects for integrated management of *Sclerotinia sclerotiorum* in lettuce. Int. Organ. Biol. Integrated Control-WPRS Bull. 30, 391–394.
- Cotes, A., Sastoque, L., Rada, L., Beltrán, C., González, C., Osorio, D., Cepero, M., 2012. Evaluation of naturally occurring *Pseudomonas* spp. and a biopesticide based on *Trichoderma koningiopsis* as potential biological control agents of *Olpidium virulentus* in Fique. Int. Organ. Biol. Integrated Control-WPRS Bull. 78, 135–139.
- Cotes, A., Thonart, P., Lepoivre, P., 1994. Relationship between the protective activities of several strains of *Trichoderma* against damping-off agents and their ability to produce hydrolytic enzymes activities in soil or in synthetic media. Meded. Van Fac. Landbouwk. En Toegepaste Biol. Wet. Rijksuniv. Te Gent 59, 931–941.
- Dandurand, L., Knudsen, G., 1993. Influence of *Pseudomonas fluorescens* on Hyphal Growth and Biocontrol Activity of *Trichoderma harzianum* in the Spermosphere and Rhizosphere of Pea. Phytopathology 83, 265. doi:10.1094/Phyto-83-265
- DANE, 2016. Encuesta Nacional Agropecuaria ENA. [WWW Document]. URL http://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/enda/ena/2014/boletin_ena_2014.pdf (accessed 3.10.16).
- De Boer, M., van der Sluis, I., van Loon, L., Bakker, P., 1999. Combining fluorescent *Pseudomonas* spp. strains to enhance suppression of fusarium wilt of radish. Eur. J. Plant Pathol. 105, 201–210. doi:10.1023/A:1008761729073
- De Boer, R., 2000a. Research into the biology and control of powdery scab of potatoes in Australia., in: Merz U, Lees AK (Eds) Proceedings of the First European Powdery Scab Workshop, Past and Present Research. Aberdeen, Scotland, pp. 79–83.
- De Boer, R., 2000b. Summary of the session on recognizing the components of an integrated control approach to powdery scab and the potato mop top virus, in: Merz U, Lees AK (Eds) Proceedings of the First European Powdery Scab Workshop. Aberdeen, Scotland, pp. 101–104.
- Dekkers, L., Mulders, I., Phoelich, C., Chin-A-Woeng, T., Wijffjes, A., Lugtenberg, B., 2000. The sss colonization gene of the tomato-*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS365 can improve root colonization of other wild-type *Pseudomonas* spp. bacteria. Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI 13, 1177–1183. doi:10.1094/MPMI.2000.13.11.1177
- Díaz, A., García, J., Zapata, J., 2015. Improvement of Sporulation Conditions of a New Strain of *Bacillus amyloliquefaciens* in Liquid Fermentation. Adv. Biosci. Biotechnol. 06, 302. doi:10.4236/abb.2015.64029
- Díaz, A., Smith, P., Mesa, P., Zapata, J., Cavedes, D., Cotes, A., 2013. Control of *Fusarium* wilt in cape gooseberry by *Trichoderma koningiopsis* and PGPR. IOBC-WPRS Bull. 86, 89–94.
- Dutta, P., Das, B., 2002. Management of collar rot of tomato by *Trichoderma* spp. and chemicals. Indian Phytopathol. 55, 235–237.

- EL Hadrami, A., Adam, L., Hadrami, I., Daayf, F., 2010. Chitosan in plant protection. *Mar. Drugs* 8, 968. doi:10.3390/md8040968
- Elad, Y., David, D.R., Harel, Y.M., Borenshtein, M., Kalifa, H.B., Silber, A., Graber, E.R., 2010. Induction of Systemic Resistance in Plants by Biochar, a Soil-Applied Carbon Sequestering Agent. *Phytopathology* 100, 913–921. doi:10.1094/PHTO-100-9-0913
- El-Ghaouth, A., Smilanick, J.L., Wisniewski, M., Wilson, C.L., 2000. Improved Control of Apple and Citrus Fruit Decay with a Combination of *Candida saitoana* and 2-Deoxy-D-Glucose. *Plant Dis.* 84, 249–253. doi:10.1094/PDIS.2000.84.3.249
- El-Hadrami, A., El-Hadrami, I., Daayf, F., 2009. Suppression of induced plant defence responses by fungal and oomycete pathogens., in: Bouarab, K., Brisson, N., Daayf, F. (Eds.), *Molecular Plant-Microbe Interactions*. CABI, Wallingford, pp. 231–268. doi:10.1079/9781845935740.0231
- Elson, M., Schisler, D., Bothast, R., 1997. Selection of Microorganisms for Biological Control of Silver Scurf (*Helminthosporium solani*) of Potato Tubers. *Plant Dis.* 81, 647–652. doi:10.1094/PDIS.1997.81.6.647
- El-Tarabily, K., 2006. Rhizosphere-competent isolates of streptomycete and non-streptomycete actinomycetes capable of producing cell-wall-degrading enzymes to control *Pythium aphanidermatum* damping-off disease of cucumber. *Can. J. Bot.* 84, 211–222. doi:10.1139/b05-153
- Fähling, M., Graf, H., Siemens, J., 2004. Characterization of a single-spore isolate population of *Plasmodiophora brassicae* resulting from a single club. *J. Phytopathol.* 152, 438–444. doi:10.1111/j.1439-0434.2004.00868.x
- Fajardo, M., González, E., Castaño, H., 2015. Estudio de extractos vegetales en la inhibición de la liberación de zoosporas de *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea*. *Rev. Politec.* 9, 113–121.
- Fallon, R., Curtin, D., Lister, R., Butler, R., 2005. Root function and growth of potato plants reduced by *Spongospora subterranea* infection. *Am. J. Potato Res.* 82, 57–97. doi:10.1007/BF02894918
- Falloon, R., 2008. Control of powdery scab of potato: towards integrated disease management. *Am. J. Potato Res.* 85, 253–260. doi:10.1007/s12230-008-9022-6
- Falloon, R., Genet, R., Wallace, A., Butler, R., 2003. Susceptibility of potato (*Solanum tuberosum*) cultivars to powdery scab (caused by *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea*), and relationships between tuber and root infection. *Australas. Plant Pathol.* 32, 377–385. doi:10.1071/AP03040
- Falloon, R., Merz, U., Butler, R., Curtin, D., Lister, R., Thomas, S., 2016. Root infection of potato by *Spongospora subterranea*: knowledge review and evidence for decreased plant productivity. *Plant Pathol.* 65, 422–434. doi:10.1111/ppa.12419
- Falloon, R.E., Curtin, D., Lister, R., Butler, R., Scott, C., 2010. Elevated zinc and manganese levels give moderate reductions in *Spongospora subterranea* infection of potato roots, in: *Proceedings. 6th Australasian Soilborne Diseases Symposium*. Twin Waters, Queensland, Australia., p. 46.
- Felix, G., Baureithel, K., Boller, T., 1998. Desensitization of the perception system for chitin fragments in tomato cells. *Plant Physiol.* 117, 643–650. doi:10.1104/pp.117.2.643
- Felix, G., Regenass, M., Boller, T., 1993. Specific perception of subnanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells: induction of extracellular alkalinization, changes in protein phosphorylation, and establishment of a refractory state. *Plant J.* 4, 307–316. doi:10.1046/j.1365-313X.1993.04020307.x

- Fialho de Oliveira, M., Germano da Silva, M., Van Der Sand, S., 2010. Anti-phytopathogen potential of endophytic actinobacteria isolated from tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) in southern Brazil, and characterization of *Streptomyces* sp. R18(6), a potential biocontrol agent. Res. Microbiol. 161, 565–572. doi:10.1016/j.resmic.2010.05.008
- Fiers, M., Edel-Hermann, V., Chatot, C., Hingrat, Y.L., Alabouvette, C., Steinberg, C., 2011. Potato soil-borne diseases. A review. Agron. Sustain. Dev. 32, 93–132. doi:10.1007/s13593-011-0035-z
- Franco, C., 2011. Evaluación de caracteres PGPR en Actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. Barcelona, España.
- Franco, M., Rezende, R., Gravina-Oliveira, M., Pereira, P., do Nascimento, R., da Silva, E., Macrae, A., Coelho, R., 2013. *Streptomyces misionensis* PESB-25 produces a thermoacidophilic endoglucanase using sugarcane bagasse and corn steep liquor as the sole organic substrates. Biomed Res. Int. 2013, 584207–584207. doi:10.1155/2013/584207
- Gallo, Y., Gutiérrez, P., Marín, M., 2013. Detection of PMTV using polyclonal antibodies raised against a capsid-specific peptide antigen. Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín 66, 6999–7008.
- García, C., Navia, E., 2002. Evaluación de estrategias de manejo de la roña polvosa (*Spongospora subterranea*) en las tres regiones más productoras de papa en Colombia [WWW Document]. Redepapa. URL <https://redepapa.org/> (accessed 8.7.16).
- Georgakopoulos, D., Fiddaman, P., Leifert, C., Malathrakis, N.E., 2002. Biological control of cucumber and sugar beet damping-off caused by *Pythium ultimum* with bacterial and fungal antagonists. J. Appl. Microbiol. 92, 1078–1086.
- Gil, J., Gutiérrez, P., Cotes, J., González, E., Marín, M., 2011. Caracterización genotípica de aislamientos colombianos del potato Mop-Top Virus (PMTV, pomovirus). Actual. Biológicas 33, 69–84.
- Gilchrist, E., Jaramillo Villegas, S., Reynaldi, S., 2009. Efecto sobre la sarna polvosa de cuatro aislamientos del hongo *Trichoderma asperellum* en tres tipos de suelo. Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín 62, 4783–4792.
- Gilchrist, E., Perez, J., Vargas, H., Reynaldi, S., 2010. *Trichoderma asperellum* T109 effect over *Spongospora subterranea* in potato field. Phytopathology 100, S40–S40.
- Gilchrist, E., Soler, J., Merz, U., Reynaldi, S., 2011. Powdery scab effect on the potato *Solanum tuberosum* ssp. andigena growth and yield. Trop. Plant Pathol. 36, 350–355. doi:10.1590/S1982-56762011000600002
- Gortari, M., Hours, R., 2008. Fungal chitinases and their biological role in the antagonism onto nematode eggs. A review. Mycol. Prog. 7, 221–238. doi:10.1007/s11557-008-0571-3
- Goy, R., de Britto, D., Assis, O., 2009. A review of the antimicrobial activity of chitosan. Polímeros 19, 241–247. doi:10.1590/S0104-14282009000300013
- Grosch, R., Faltin, F., Lottmann, J., Kofoet, A., Berg, G., 2005. Effectiveness of 3 antagonistic bacterial isolates to control *Rhizoctonia solani* Kühn on lettuce and potato. Can. J. Microbiol. 51, 345–353. doi:10.1139/w05-002
- Grosch, R., Scherwinski, K., Lottmann, J., Berg, G., 2006. Fungal antagonists of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*: selection, control efficacy and influence on the indigenous microbial community. Mycol. Res. 110, 1464–1474. doi:10.1016/j.mycres.2006.09.014

- Gryndler, M., Jansa, J., Hršelová, H., Chvátalová, I., Vosátka, M., 2003. Chitin stimulates development and sporulation of arbuscular mycorrhizal fungi. *Appl. Soil Ecol.* 22, 283–287. doi:10.1016/S0929-1393(02)00154-3
- Guerrero, O., 2000. La roña o sarna polvosa en el Departamento de Nariño, in: Fedepapa (Eds). *Papas Colombianas Con El Mejor Entorno Ambiental*. Bogotá, Colombia, pp. 127–129.
- Guetsky, R., Shtienberg, D., Elad, Y., Fischer, E., Dinoor, A., 2002. Improving biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of disease suppression. *Phytopathology* 92, 976–985. doi:10.1094/PHYTO.2002.92.9.976
- Guleria, S., Walia, A., Chauhan, A., Shirkot, C.K., 2016. Molecular characterization of alkaline protease of *Bacillus amyloliquefaciens* SP1 involved in biocontrol of *Fusarium oxysporum*. *Int. J. Food Microbiol.* 232, 134–143. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.030
- Gupta, C., Sharma, A., Dubey, R., Maheshwari, D., 1999. *Pseudomonas aeruginosa* (GRC1) as a strong antagonist of *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium oxysporum*. *Cytobios* 99, 183–189.
- Gutierrez, F., Acero, N., Lucas, J., Probanza, A., 1996. The influence of native rhizobacteria on European alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) growth. *Plant Soil* 182, 67–74. doi:10.1007/BF00010996
- Hafez, S., Sundararaj, P., 2006. Efficacy of fosthiazate for the control of *Paratrichodorus* spp. and *Meloidogyne chitwoodi* on potato. *Int. J. Nematol.* 16, 157–160.
- Harrison, J., Searle, R., Williams, N., 1997. Powdery scab disease of potato - a review. *Plant Pathol.* 46, 1–25.
- Hassni, M., Hadrami, A., Daayf, F., Barka, E., Hadrami, I., 2004. Chitosan, antifungal product against *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* and elicitor of defence reactions in date palm roots. *Phytopathol. Mediterr.* 43, 195–204. doi:10.14601/Phytopathol_Mediterr-1743
- Henry, G., Thonart, P., Ongena, M., 2012. PAMPs, MAMPs, DAMPs and others: an update on the diversity of plant immunity elicitors. *Biotechnol. Agron. Société Environ.* 16, 257–268.
- Hirano, S., Nakahira, T., Nakagawa, M., Kim, S.K., 1999. The preparation and applications of functional fibres from crab shell chitin. *J. Biotechnol., Biotechnological Aspects of Marine Sponges* 70, 373–377. doi:10.1016/S0168-1656(99)00090-5
- Howell, C., 2003. Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. *Plant Dis.* 87, 4–10. doi:10.1094/PDIS.2003.87.1.4
- Hoyos, L., Jaramillo, S., Orduz, S., 2008. Evaluation of *Trichoderma asperellum* as bioregulator of *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea*. *Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín* 61, 4496–4502.
- ICA, 2011. Manejo Fitosanitario del cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* subsp. andigena y *S. phureja*) Medidas para la temporada invernal. Instituto Colombiano Agropecuario, Bogotá.
- Iriti, M., Sironi, M., Gomarasca, S., Casazza, A.P., Soave, C., Faoro, F., 2006. Cell death-mediated antiviral effect of chitosan in tobacco. *Plant Physiol. Biochem. PPB Société Fr. Physiol. Végétale* 44, 893–900. doi:10.1016/j.plaphy.2006.10.009
- Jadon, K.S., 2009. Eco-friendly management of brinjal collar rot caused by *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Indian Phytopathol.* 62, 345–347.

- Jaimes, Y., Moreno, C., Cotes, A., 2009. Inducción de resistencia sistémica contra *Fusarium oxysporum* en tomate por *Trichoderma koningiopsis* Th003. *Acta Biol. Colomb.* 14, 111.
- Jaramillo, S., Botero, J., 2007. Respuesta de diferentes poblaciones de *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* a la rotación entre dos variedades de papa (*Solanum tuberosum* ssp. *andigena*). *Rev. Fac. Nac. Agron.* 60, 3859–3876.
- Jayaraj, J., Radhakrishnan, N., Velazhahan, R., 2006. Development of formulations of *Trichoderma harzianum* strain M1 for control of damping-off of tomato caused by *Pythium aphanidermatum*. *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* 39, 1–8. doi:10.1080/03235400500094720
- Jetiyanon, K., Kloepper, J., 2002. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant diseases. *Biol. Control* 24, 285–291. doi:10.1016/S1049-9644(02)00022-1
- Ji, S.H., Paul, N.C., Deng, J.X., Kim, Y.S., Yun, B.-S., Yu, S.H., 2013. Biocontrol Activity of *Bacillus amyloliquefaciens* CNU114001 against Fungal Plant Diseases. *Mycobiology* 41, 234. doi:10.5941/MYCO.2013.41.4.234
- Jin, R., Suh, J., Park, R., Kim, Y., Krishnan, H., Kim, K., 2005. Effect of chitin compost and broth on biological control of *Meloidogyne incognita* on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Nematology* 7, 125–132. doi:10.1163/1568541054192171
- Jones, R. a. C., Harrison, B.D., 1972. Ecological studies on potato mop-top virus in Scotland. *Ann. Appl. Biol.* 71, 47–57. doi:10.1111/j.1744-7348.1972.tb04715.x
- Jones, R., Harrison, B., 1969. The behaviour of potato mop-top virus in soil, and evidence for its transmission by *Spongospora subterranea* (Wallr.) Lagerh. *Ann. Appl. Biol.* 63, 1–17. doi:10.1111/j.1744-7348.1969.tb05461.x
- Kaku, H., Shibuya, N., Xu, P., Aryan, A., Fincher, G., 1997. N-acetylchitooligosaccharides elicit expression of a single (1→3)- β -glucanase gene in suspension-cultured cells from barley (*Hordeum vulgare*). *Physiol. Plant.* 100, 111–118. doi:10.1111/j.1399-3054.1997.tb03460.x
- Kandula, D., Jones, E., Stewart, A., McLean, K., Hampton, J., 2015. *Trichoderma* species for biocontrol of soil-borne plant pathogens of pasture species. *Biocontrol Sci. Technol.* 25, 1052–1069. doi:10.1080/09583157.2015.1028892
- Kanetis, L., Papayiannis, L., Samouel, S., Iacovides, T., 2015. First Report of Potato Powdery Scab, Caused by *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea*, in Cyprus. *Plant Dis.* 100, 1010. doi:10.1094/PDIS-07-15-0778-PDN
- Kikuyama, M., Kuchitsu, K., Shibuya, N., 1997. Membrane Depolarization Induced by N-Acetylchitooligosaccharide Elicitor in Suspension-Cultured Rice Cells. *Plant Cell Physiol.* 38, 902–909.
- Kim, Y., Balaraju, K., Cheon, W., Jeon, Y., 2016. Biological characteristics of *Bacillus amyloliquefaciens* AK-0 and disease suppression of Korean ginseng root rot caused by *Cylindrocarpon destructans* (Zins.). *IOBC-WPRS Bull.* 117, 23.
- Klein, M., Silva, A., Lopes, M., Kupper, K., 2013. Application of microorganisms, alone or in combination, to control postbloom fruit drop in citrus. *Trop. Plant Pathol.* 38, 505–512. doi:10.1590/S1982-56762013000600006
- Kloepper, J., Ryu, C., Zhang, S., 2004. Induced Systemic Resistance and Promotion of Plant Growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94, 1259–1266. doi:10.1094/PHTO.2004.94.11.1259
- Köhle, H., Jeblick, W., Poten, F., Blaschek, W., Kauss, H., 1985. Chitosan-Elicited Callose Synthesis in Soybean Cells as a Ca²⁺-Dependent Process. *Plant Physiol.* 77, 544–551.

- Krechel, A., Faupel, A., Hallmann, J., Ulrich, A., Berg, G., 2002. Potato-associated bacteria and their antagonistic potential towards plant-pathogenic fungi and the plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood. *Can. J. Microbiol.* 48, 772–786.
- Kuchitsu, K., Kosaka, H., Shiga, T., Shibuya, N., 1995. EPR evidence for generation of hydroxyl radical triggered by N-acetylchitooligosaccharide elicitor and a protein phosphatase inhibitor in suspension-cultured rice cells. *Protoplasma* 188, 138–142. doi:10.1007/BF01276805
- Kulikov, S., Chirkov, S., Il'ina, A., Lopatin, S., Varlamov, V., 2006. Effect of the molecular weight of chitosan on its antiviral activity in plants. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 42, 224–228.
- Kumar, S., Khare, M., 1990. Studies on the Antagonistic Relationship of Soybean Spherosphere Microflora with *Rhizoctonia bataticola* and *Sclerotium rolfsii*. *J. Biol. Control* 4, 72–74. doi:10.18641/jbc/4/1/49606
- Larkin, R., Fravel, D., 1998. Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of Fusarium wilt of tomato. *Plant Dis.* 82, 1022–1028. doi:10.1094/PDIS.1998.82.9.1022
- Larkin, R., Griffin, T., 2007. Control of soil borne potato diseases using Brassica green manures. *Crop Prot.* 26, 1067–1077. doi:10.1016/j.cropro.2006.10.004
- Larralde, C., Santiago, M., Sifuentes, A., Rodríguez, I., Rodríguez, M., Shirai, K., Narváez, J., 2008. Biocontrol potential and polyphasic characterization of novel native *Trichoderma* strains against *Macrophomina phaseolina* isolated from sorghum and common bean. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80, 167–177. doi:10.1007/s00253-008-1532-0
- Lawrence, C., McKenzie, A., 1980. Powdery scab, in: Hooker (eds) *Compendio de enfermedades de la papa*. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, pp. 35–36.
- Ledingham, G., 1935. Occurrence of Zoosporangia in *Spongospora subterranea*, (Wallroth) Lagerheim. *Nature* 135, 394–394. doi:10.1038/135394a0
- Lees, A.K., 2000. Summary of the session on past and present research on powdery scab., in: Merz U, Lees AK (Eds) *Proceedings of the First European Powdery Scab Workshop*. Aberdeen, Scotland, pp. 61–65.
- Lemanceau, P., Alabouvette, C., 1993. Suppression of fusarium wilts by fluorescent pseudomonads: Mechanisms and applications. *Biocontrol Sci. Technol.* 3, 219–234. doi:10.1080/09583159309355278
- Le Mire, G., Nguyen, M., Fassotte, B., du Jardin, P., Verheggen, F., Delaplace, P., Jijakli, M., 2016. Review: implementing plant biostimulants and biocontrol strategies in the agroecological management of cultivated ecosystems. *Biotechnol. Agron. Société Environ.* 20, 299–313.
- Levy, Y., Benderly, M., Cohen, Y., Gisi, U., Bassand, D., 1986. The joint action of fungicides in mixtures: comparison of two methods for synergy calculation. *EPPO Bull.* 16, 651–657. doi:10.1111/j.1365-2338.1986.tb00338.x
- Li, Y., Gu, Y., Li, J., Xu, M., Wei, Q., Wang, Y., 2015. Biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* LJ02 induces systemic resistance against cucurbits powdery mildew. *Plant Biot. Interact.* 883. doi:10.3389/fmicb.2015.00883
- Lowe, A., Rafferty-McArdle, S., Cassells, A., 2012. Effects of AMF- and PGPR-root inoculation and a foliar chitosan spray in single and combined treatments on powdery mildew disease in strawberry. *Agric. Food Sci.* 21, 28–38.

- Lu, Y., Cheng, D., Lu, S., Huang, F., Li, G., 2014. Preparation of quaternary ammonium salt of chitosan nanoparticles and their textile properties on *Antheraea pernyi* silk modification. *Text. Res. J.* doi:10.1177/0040517514538691
- Lutz, M.P., Wenger, S., Maurhofer, M., Défago, G., Duffy, B., 2004. Signaling between bacterial and fungal biocontrol agents in a strain mixture. *FEMS Microbiol. Ecol.* 48, 447–455. doi:10.1016/j.femsec.2004.03.002
- Lyman, G.R., Rogers, J.T., 1915. The native habitat of *Spongospora subterranea*. *Science* 42, 940–941. doi:10.1126/science.42.1096.940
- Mahmoud, D., Mahmoud, A., Gomaa, A., 2008. Antagonistic activities of potato associated bacteria via their production of hydrolytic enzymes with special reference to pectinases. *Res. J. Agric. Biol. Sci.* 5, 575–584.
- Mallik, I., Gudmestad, N.C., 2015. First Report of *Potato mop top virus* Causing Potato Tuber Necrosis in Colorado and New Mexico. *Plant Dis.* 99, 164–164. doi:10.1094/PDIS-08-14-0819-PDN
- Matsubara, Y., Hasegawa, N., Fukui, H., 2002. Incidence of *Fusarium* root rot in asparagus seedlings infected with arbuscular mycorrhizal fungus as affected by several soil amendments. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* 71, 370–374. doi:10.2503/jjshs.71.370
- MAVDT, Fedepapa, 2004. Guía ambiental para el cultivo de la papa. Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, Colombia.
- Melia, S., Aryantha, I., 2010. The Effects of Chitosan on Antifungal Activity of *Trichoderma harzianum* Rifai against *Fusarium oxysporum*. 2nd Int. Biotechnol. Biodivers. Conf.
- Merz, U., 2008. Powdery scab of potato—occurrence, life cycle and epidemiology. *Am. J. Potato Res.* 85, 241–246. doi:10.1007/s12230-008-9019-1
- Merz, U., 2000. Powdery scab. Research in Switzerland., in: Merz U, Lees AK (Eds) Proceedings of the First European Powdery Scab Workshop. Aberdeen, Escocia, pp. 43–44.
- Merz, U., 1997. Microscopical observations of the primary zoospores of *Spongospora subterranea* f.sp.*subterranea*. *Plant Pathol.* 46, 670–674. doi:10.1046/j.1365-3059.1997.d01-67.x
- Merz, U., Lees, A.K., Sullivan, L., Schwärzel, R., Hebeisen, T., Kirk, H.G., Bouček-Mechiche, K., Hofferbert, H.R., 2012. Powdery scab resistance in *Solanum tuberosum*: an assessment of cultivar x environment effect. *Plant Pathol.* 61, 29–36. doi:10.1111/j.1365-3059.2011.02489.x
- Merz, U., Martinez, V., Schwärzel, R., 2004. The potential for the rapid screening of potato cultivars (*Solanum tuberosum*) for resistance to powdery scab (*Spongospora subterranea*) using a laboratory bioassay. *Eur. J. Plant Pathol.* 110, 71–77. doi:10.1023/B:EJPP.0000010123.21255.d1
- Merzendorfer, H., Zimoch, L., 2003. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *J. Exp. Biol.* 206, 4393–4412. doi:10.1242/jeb.00709
- Mesa, P., Moreno, C., Cotes, A., 2014. Efecto promotor de crecimiento vegetal y biocontrolador de *Trichoderma koningiopsis* sobre *Rhizoctonia solani* en el cultivo de arroz. *Actual. Biológicas* 36, 242.
- Minami, E., Kuchitsu, K., He, D., Kouchi, H., Midoh, N., Ohtsuki, Y., Shibuya, N., 1996. Two Novel Genes Rapidly and Transiently Activated in Suspension-Cultured Rice Cells by Treatment with N-Acetylchitoheptaose, a Biotic Elicitor for Phytoalexin Production. *Plant Cell Physiol.* 37, 563–567.

- Moreno, C., 2003. Control biológico de enfermedades foliares del cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) con énfasis en Mildeo polvoso (*Oidium* sp.). Tesis de Pregrado. Carrera de Ingeniería Agrónoma. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
- Moreno, C., Cotes, A., 2007. Survival in the phylloplane of *Trichoderma koningii* and biocontrol activity against tomato foliar pathogens. IOBC-WPRS Bull. 30, 557–561.
- Moreno, C., Cotes, A., Guevara, E., 2007. Biological control of foliar diseases in tomato greenhouse crop in Colombia: selection of antagonists and efficacy tests. IOBC-WPRS Bull. 30.
- Moreno, C., Kloepper, J., Marc, O., Cotes, A., 2016b. Influence of temperature and culture media on growth, lipopeptide production and antagonistic activity of *Bacillus amyloliquefaciens* Bs006. Int. Organ. Biol. Integrated Control-WPRS Bull. 117, 161–161.
- Moreno, C., Kloepper, J., Ongena, M., Cotes, A., 2016a. Biotic factors involved in biological control activity of *Bacillus amyloliquefaciens* (Bs006) against *Fusarium oxysporum* in Cape gooseberry (*Physalis peruviana*). IOBC-WPRS Bull. 115, 129–126.
- Moreno, C.A., Castillo, F., González, A., Bernal, D., Jaimes, Y., Chaparro, M., González, C., Rodríguez, F., Restrepo, S., Cotes, A.M., 2009. Biological and molecular characterization of the response of tomato plants treated with *Trichoderma koningiopsis*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 74, 111–120. doi:10.1016/j.pmpp.2009.10.001
- Murakami, H., Tsushima, S., Akimoto, T., Murakami, K., Goto, I., Shishido, Y., 2000. Effects of growing leafy daikon (*Raphanus sativus*) on populations of *Plasmiodiophora brassicae* (clubroot). Plant Pathol. 49, 584–589. doi:10.1046/j.1365-3059.2000.00495.x
- Nandakumar, R., Babu, S., Viswanathan, R., Raguchander, T., Samiyappan, R., 2001. Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. Soil Biol. Biochem. 33, 603–612. doi:10.1016/S0038-0717(00)00202-9
- Nawar, L., 2005. Chitosan and Three *Trichoderma* spp. to Control *Fusarium Crown* and Root Rot of Tomato in Jeddah, Kingdom Saudi Arabia. Egypt. J. Phytopathol. 33, 45–58.
- Nielsen, S., Larsen, J., 2004. Two *Trichoderma harzianum*-based bio-control agents reduce tomato root infection with *Spongospora subterranea* (Wallr.) Lagerh., f. sp. *subterranea*, the vector of Potato mop-top virus. J. Plant Dis. Prot. 111, 145–150. doi:10.1007/BF03356140
- Nishizawa, Y., Kawakami, A., Hibi, T., He, D.-Y., Shibuya, N., Minami, E., 1999. Regulation of the chitinase gene expression in suspension-cultured rice cells by N-acetylchitooligosaccharides: differences in the signal transduction pathways leading to the activation of elicitor-responsive genes. Plant Mol. Biol. 39, 907–914. doi:10.1023/A:1006161802334
- Nitu, N., Masum, M., Jannat, R., Sultana, S., Bhuiyan, K., 2016. Application of chitosan and *Trichoderma* against soil-borne pathogens and their effect on yield of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). Int. J. Biosci. 9, 10–24.
- Nitzan, N., Cummings, T., Johnson, D., Miller, J., Batchelor, D., Olsen, C., Quick, R.A., Brown, C., 2008. Resistance to root gallings caused by the powdery scab pathogen *Spongospora subterranea* in potato. Plant Dis. 92, 1643–1649. doi:10.1094/PDIS-92-12-1643

- Nitzan, N., Haynes, K., Miller, J., Johnson, D., Cummings, T., Batchelor, D., Olsen, C., Brown, C., 2010. Genetic stability in potato germplasm for resistance to root galling caused by the pathogen *Spongospora subterranea*. *Am. J. Potato Res.* 87, 497–501. doi:10.1007/s12230-010-9152-5
- Nojiri, H., Sugimori, M., Yamane, H., Nishimura, Y., Yamada, A., Shibuya, N., Kodama, O., Murofushi, N., Omori, T., 1996. Involvement of jasmonic acid in elicitor-induced phytoalexin production in suspension-cultured rice cells. *Plant Physiol.* 110, 387–392.
- Nunes da Silva, M., Cardoso, A., Ferreira, D., Brito, M., Pintado, M., Vasconcelos, M., 2014. Chitosan as a biocontrol agent against the pinewood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). *For. Pathol.* 44, 420–423. doi:10.1111/efp.12136
- Oloo, J., 2013. Evaluation of local *Trichoderma* isolates for their efficiency in biological control of *Fusarium Oxysporum* F. Sp *Phaseoli* in common bean. Thesis Master of Science in Biotechnology (Thesis). University of Nairobi.
- Osborn, T., 1911. *Spongospora subterranea*, (Wallroth) Johnson. *Ann. Bot.* 25, 327–341.
- Oskay, A., Üsame, T., Cem, A., 2005. Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *Afr. J. Biotechnol.* 3, 441–446.
- Oyekanmi, E., Coyne, D., Fagade, O., Osonubi, O., 2007. Improving root-knot nematode management on two soybean genotypes through the application of *Bradyrhizobium japonicum*, *Trichoderma pseudokoningii* and *Glomus mosseae* in full factorial combinations. *Crop Prot.* 26, 1006–1012. doi:10.1016/j.cropro.2006.09.009
- Ozbay, N., Newman, S., 2004. Biological Control with *Trichoderma* Spp. With Emphasis on *T. harzianum*. *Pak. J. Biol. Sci.* 7, 478–484. doi:10.3923/pjbs.2004.478.484
- Paget, M., Alspach, P., Genet, R., Apiolaza, L., 2014. Genetic variance models for the evaluation of resistance to powdery scab (*Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea*) from long-term potato breeding trials. *Euphytica* 197, 369–385. doi:10.1007/s10681-014-1073-9
- Poomthongdee, N., Duangmal, K., Pathom-aree, W., 2015. Acidophilic actinomycetes from rhizosphere soil: diversity and properties beneficial to plants. *J. Antibiot. (Tokyo)* 68, 106–114. doi:10.1038/ja.2014.117
- Prashith, K., Shobha, K., Onkarappa, R., 2010. Fascinating diversity and Potent biological activities of Actinomycete metabolites. *J. Pharm. Res.* 3, 250–256.
- Prevost, K., Couture, G., Shipley, B., Brzezinski, R., Beaulieu, C., 2006. Effect of chitosan and a biocontrol streptomycete on field and potato tuber bacterial communities. *BioControl* 51, 533–546.
- Probanza, A., Brierley, J.L., Acero, N., Mañero, F., 1996. The influence of native rhizobacteria on european alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) growth. *Plant Soil* 182, 59–66. doi:10.1007/BF00010995
- Qu, X., Christ, B., 2006. Single cystosorus isolate production and restriction fragment length polymorphism characterization of the obligate biotroph *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea*. *Phytopathology* 96, 1157–1163. doi:10.1094/PHTO-96-1157
- Qu, X., Christ, B., 2004. Genetic variation and phylogeny of *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea* based on ribosomal DNA sequence analysis. *Am. J. Potato Res.* 81, 385–394. doi:10.1007/BF02870199
- Rabea, E., Badawy, M., Stevens, C., Smagghe, G., Steurbaut, W., 2003. Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action. *Biomacromolecules* 4, 1457–1465. doi:10.1021/bm034130m

- Radwan, M.A., Abu-ELamayem, M.M., Farrag, S. a. A., Ahmed, N.S., 2011. Integrated management of *Meloidogyne incognita* infecting tomato using bio-agents mixed with either oxamyl or organic amendments. *Nematol. Mediterr.* 39.
- Rafferty-McArdle, S.M., Roberts, D., Chitwood, D., Carta, L., Lumsden, R., Mao, W., 2001. Application of *Burkholderia cepacia* and *Trichoderma virens*, alone and in combinations, against *Meloidogyne incognita* on bell pepper. *Nematropica* 31, 75–86.
- Ramírez, E., 2015. Evaluación del control biológico de *Phytophthora capsici* en Chile (*Capsicum annuum* L.) por *Trichoderma* spp. Trabajo de grado para obtener el grado de maestría en ciencias agronómicas. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Mexico.
- Ren, Y., West, C., 1992. Elicitation of diterpene biosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.) by chitin. *Plant Physiol.* 99, 1169–78. doi:10.1104/pp.99.3.1169
- Restrepo, F., Jaramillo, S., Cotes, M., 2009. Effect of two microorganisms, mycorrhize and pine wood shavings on the control of powdery scab (*Spongospora subterranea*) in potato. *Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín* 62, 5047–5054.
- Reva, O., Dixelius, C., Meijer, J., Priest, F., 2004. Taxonomic characterization and plant colonizing abilities of some bacteria related to *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 48, 249–259. doi:10.1016/j.femsec.2004.02.003
- Rivero, D., 2008. Identificación y control in vitro con quitosana y *Trichoderma* spp. de hongos que causan el manchado del grano en arroz (*Oryza sativa* L.). *Rev. Protección Veg.* 23, 67–67.
- Roby, D., Gadelle, A., Toppan, A., 1987. Chitin oligosaccharides as elicitors of chitinase activity in melon plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 143, 885–892. doi:10.1016/0006-291X(87)90332-9
- Rodríguez, F., 1998. Estudio de un modelo de control biológico de la pudrición radical causada por *Rhizoctonia solani* Kuhn en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Aislamiento y selección de *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp., promotoras del crecimiento vegetal en cultivo de uchuva (*Physalis peruviana* L.) con actividad antagónica frente a *Fusarium oxysporum*. Tesis de maestría en Microbiología. Nacional de Colombia, Bogotá.
- Ruíz, C., Izquierdo, L., Moreno, C., Gómez, M., Villamizar, L., 2013. Development, stability and biocontrol activity of a formulation based on *Pseudomonas fluorescens* Ps06. *Int. Organ. Biol. Integrated Control-WPRS Bull.* 86, 25–30.
- Sánchez, D., Baños, S., Ocampo, P., 2007. Efecto del quitosano en el desarrollo y morfología de "*Alternaria alternata*" (Fr.) Keissl. *An. Biol.* 29, 23–32.
- Santala, J., Samuilova, O., Hannukkala, A., Latvala, S., Kortemaa, H., Beuch, U., Kvarnheden, A., Persson, P., Topp, K., Ørstad, K., Spetz, C., Nielsen, S. I., Kirk, H. g., Budziszewska, M., Wieczorek, P., Obrępalska-Stęplowska, A., Pospieszny, H., Kryszczuk, A., Sztangret-Wiśniewska, J., Yin, Z., Chrzanowska, M., Zimnoch-Guzowska, E., Jackeviciene, E., Taluntyté, L., Pūpola, N., Mihailova, J., Lielmane, I., Järvekülg, L., Kotkas, K., Rogozina, E., Sozonov, A., Tikhonovich, I., Horn, P., Broer, I., Kuusiene, S., Staniulis, J., Uth, J. g., Adam, G., Valkonen, J. p. t., 2010. Detection, distribution and control of Potato mop-top virus, a soil-borne virus, in northern Europe. *Ann. Appl. Biol.* 157, 163–178. doi:10.1111/j.1744-7348.2010.00423.x
- Santos, A., García, M., Cotes, A., Villamizar, L., 2012. Efecto de la formulación sobre la vida útil de bioplaguicidas a base de dos aislamientos colombianos de

- Trichoderma koningiopsis* Th003 y *Trichoderma asperellum* Th034. Rev. Iberoam. Micol. 29, 150–156.
- Sarma, B., Yadav, S., Singh, S., Singh, H.B., 2015. Microbial consortium-mediated plant defense against phytopathogens: Readdressing for enhancing efficacy. Soil Biol. Biochem. 87, 25–33. doi:10.1016/j.soilbio.2015.04.001
- Sastoque, E., Cotes, A., Rodríguez, R., Pedroza, A., 2010. Effect of nutrients and fermentation conditions on the production of biosurfactants using rhizobacteria isolated from fique plants. Univ. Sci. 15, 251–264.
- Schisler, D., Slininger, P., Bothast, R., 1997. Effects of Antagonist Cell Concentration and Two-Strain Mixtures on Biological Control of Fusarium Dry Rot of Potatoes. Phytopathology 87, 177–183. doi:10.1094/PHYTO.1997.87.2.177
- Schisler, D., Slininger, P., Miller, J., Woodell, L., Clayson, S., Olsen, N., 2009. Bacterial Antagonists, Zoospore Inoculum Retention Time and Potato Cultivar Influence Pink Rot Disease Development. Am. J. Potato Res. 86, 102. doi:10.1007/s12230-008-9066-7
- Shah, F., Falloon, R., Butler, R., Lister, R., 2011. Low amounts of *Spongospora subterranea* sporosorus inoculum cause severe powdery scab, root galling and reduced water use in potato (*Solanum tuberosum*). Australas. Plant Pathol. 41, 219–228. doi:10.1007/s13313-011-0110-6
- Siddiqui, I., Shaukat, S., Sheikh, I., Khan, A., 2006. Role of cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in the suppression of root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* in tomato. World J. Microbiol. Biotechnol. 22, 641–650. doi:10.1007/s11274-005-9084-2
- Singh, D., Yadav, D.K., Chaudhary, G., Sharma, V.S.R. and R.K., 2016. Potential of *Bacillus amyloliquefaciens* for biocontrol of bacterial wilt of tomato incited by *Ralstonia solanacearum*. J. Plant Pathol. Microbiol. 2016. doi:10.4172/2157-7471.1000327
- Smith, A., Beltrán Acosta, C., Cotes, A., 2013. Avances en el estudio del virus de la macana en el cultivo de fique (*Furcraea* spp.). CORPOICA. Bogotá, Colombia.
- Smith, A., Beltrán, C., Kusunoki, M., Cotes, A., Motohashi, K., Kondo, T., Deguchi, M., 2012. Diversity of soil-dwelling *Trichoderma* in Colombia and their potential as biocontrol agents against the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. J. Gen. Plant Pathol. 79, 74–85. doi:10.1007/s10327-012-0419-1
- Sohi, S., Lopez, E., Krull, E., Bol, R., 2009. Biochar, climate change and soil: A review to guide future research [WWW Document]. URL <http://www.icyte.com/system/snapshots/fs1/5/8/b/a/58ba027005f1477c3ada8e31dc8a7327c986cadb/index.html> (accessed 4.30.16).
- Srivastava, M., Pandey, S., Shahid, M., Kumar, V., Singh, A., Trivedi, S., Srivastava, Y., 2015. Trichoderma: A magical weapon against soil borne pathogens. Afr. J. Agric. Res. 10, 4591–4598. doi:10.5897/AJAR2015.10192
- Steijl, H., Niemann, G., Boon, J., 1999. Changes in chemical composition related to fungal infection and induced resistance in carnation and radish investigated by pyrolysis mass spectrometry. Physiol. Mol. Plant Pathol. 55, 297–311. doi:10.1006/pmpp.1999.0232
- Sun, S., Wang, J., Zhu, L., Liao, D., Gu, M., Ren, L., Kapulnik, Y., Xu, G., 2012. An active factor from tomato root exudates plays an important role in efficient establishment of mycorrhizal symbiosis. PLoS ONE 7, e43385. doi:10.1371/journal.pone.0043385

- Sun, T., Yao, Q., Zhou, D., Mao, F., 2008. Antioxidant activity of N-carboxymethyl chitosan oligosaccharides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18, 5774–5776. doi:10.1016/j.bmcl.2008.09.072
- Szczzech, M., Shoda, M., 2004. Biocontrol of *Rhizoctonia* Damping-off of Tomato by *Bacillus subtilis* Combined with *Burkholderia cepacia*. *J. Phytopathol.* 152, 549–556. doi:10.1111/j.1439-0434.2004.00894.x
- Takai, R., Hasegawa, K., Kaku, H., Shibuya, N., Minami, E., 2001. Isolation and analysis of expression mechanisms of a rice gene, EL5, which shows structural similarity to ATL family from Arabidopsis, in response to N-acetylchitoooligosaccharide elicitor. *Plant Sci.* 160, 577–583. doi:10.1016/S0168-9452(00)00390-3
- Terry, L., 2004. Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review. *Postharvest Biol. Technol.* 32, 1–13. doi:10.1016/j.postharvbio.2003.09.016
- Thangavel, T., Tegg, R., Wilson, C., 2015. Monitoring *Spongospora subterranea* development in potato roots reveals distinct infection patterns and enables efficient assessment of disease control methods. *PLoS ONE* 10, 1–18. doi:10.1371/journal.pone.0137647
- Tharanathan, R., Kittur, F., 2003. Chitin--the undisputed biomolecule of great potential. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 43, 61–87. doi:10.1080/10408690390826455
- Tian, H., Riggs, R., Crippen, D., 2000. Control of Soybean Cyst Nematode by Chitinolytic Bacteria with Chitin Substrate. *J. Nematol.* 32, 370–376.
- Torres, H., Pacheco, M., French, E., 1995. Resistance of potato to powdery scab (*Spongospora subterranea*) under andean field conditions. *Am. Potato J.* 72, 355–363. doi:10.1007/BF02849332
- Tucci, M., Ruocco, M., De Masi, L., De Palma, M., Lorito, M., 2011. The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by the plant genotype. *Mol. Plant Pathol.* 12, 341–354. doi:10.1111/j.1364-3703.2010.00674.x
- Turka, I., Bimšteine, G., 2011. The screening of different potato varieties for tuber diseases and its importance in integrated pest management. *Latv. Lauksaimn. Univ. - Raksti* 54–59.
- Vakalounakis, D., Doulis, A., Lamprou, K., 2014. First Report of Powdery Scab, Caused by *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea*, on Potatoes in Crete, Greece. *Plant Dis.* 98, 425–425. doi:10.1094/PDIS-07-13-0776-PDN
- Van De Graaf, P., Lees, A., Wale, S., 2005. Effect of soil inoculum level and environmental factors on potato powdery scab caused by *Spongospora subterranea*. *Plant Pathol.* 54, 22–28. doi:10.1111/j.1365-3059.2005.01111.x
- Van De Graaf, P., Wale, S., Lees, A., 2007. Factors affecting the incidence and severity of *Spongospora subterranea* infection and galling in potato roots. *Plant Pathol.* 56, 1005–1013. doi:10.1111/j.1365-3059.2007.01686.x
- Van Loon, L., Bakker, P., Pieterse, C., 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36, 453–483. doi:0066-4286/98/0901-0453\$08.00
- Vasil'ev, L., Dzyubinskaya, E., Zinovkin, R., Kiselevsky, D., Lobysheva, N., Samuilov, V., 2009. Chitosan-induced programmed cell death in plants. *Biochem. Biokhimiia* 74, 1035–1043.
- Vasyukova, N., Zinov'eva, S., Il'inskaya, L., Perekhod, E., Chalenko, G., Gerasimova, N., Il'ina, A., Varlamov, V., Ozeretskovskaya, O., 2001. Modulation of plant resistance to diseases by water-soluble chitosan. *Appl. Biochem. Microbiol.* 37, 103–109. doi:10.1023/A:1002865029994

- Waewthongrak, W., Pisuchpen, S., Leelasuphakul, W., 2015. Effect of *Bacillus subtilis* and chitosan applications on green mold (*Penicillium digitatum* Sacc.) decay in citrus fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 99, 44–49. doi:10.1016/j.postharvbio.2014.07.016
- Wale, S., 2000a. Summary of the session on national potato production and the powdery scab situation, in: Merz U, Lees AK (Eds) *Proceedings of the First European Powdery Scab Workshop*. Aberdeen, Scotland, pp. 3–9.
- Walker, M., Ryan, C., 1984. Proteinase inhibitor synthesis in tomato leaves : induction by chitosan oligomers and chemically modified chitosan and chitin. *Plant Physiol.* 76, 787–790.
- Walker, V., Couillerot, O., Felten, A.V., Bellvert, F., Jansa, J., Maurhofer, M., Bally, R., Moëgne-Loccoz, Y., Comte, G., 2011. Variation of secondary metabolite levels in maize seedling roots induced by inoculation with *Azospirillum*, *Pseudomonas* and *Glomus* consortium under field conditions. *Plant Soil* 356, 151–163. doi:10.1007/s11104-011-0960-2
- Wallroth, R., 1842. Der Knollenbrand der Kartoffel. *Linnæa. Journal für die Botanik in ihrem ganzen Umfang*.
- Whipps, J.M., 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 52, 487–511. doi:10.1093/jexbot/52.suppl_1.487
- Wiesel, L., Newton, A., Elliott, I., Booty, D., Gilroy, E., Birch, P., Hein, I., 2014. Molecular effects of resistance elicitors from biological origin and their potential for crop protection. *Front. Plant Sci.* 5, 1–13. doi:10.3389/fpls.2014.00655
- Wilson, C., 2014. Plant pathogens—the great thieves of vegetable value, in: 29th International Horticultural Congress. Brisbane, Queensland.
- Wilson, P., Ahvenniemi, P., Lehtonen, M., Kukkonen, M., Rita, H., Valkonen, J., 2008. Biological and chemical control and their combined use to control different stages of the *Rhizoctonia* disease complex on potato through the growing season. *Ann. Appl. Biol.* 153, 307–320. doi:10.1111/j.1744-7348.2008.00292.x
- Winterowd, J., Sandford, P., 1995. Chitin and chitosan, in food polysaccharides and their applications. Editorial Marcel Dekker, U.S.A.
- Xu, M., Jeffries, P., Pautasso, M., Jeger, M., 2011a. A Numerical Study of Combined Use of Two Biocontrol Agents with Different Biocontrol Mechanisms in Controlling Foliar Pathogens. *Phytopathology* 101, 1032–1044. doi:10.1094/PHYTO-10-10-0267
- Xu, M., Jeffries, P., Pautasso, M., Jeger, M.J., 2011b. Combined Use of Biocontrol Agents to Manage Plant Diseases in Theory and Practice. *Phytopathology* 101, 1024–1031. doi:10.1094/PHYTO-08-10-0216
- Yamada, A., Shibuya, N., Kodama, O., Akatsuka, T., 1993. Induction of phytoalexin formation in suspension-cultured rice cells by N-Acetyl-chitooligosaccharides. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57, 405–409. doi:10.1271/bbb.57.405
- Yu, G.Y., Sinclair, J.B., Hartman, G.L., Bertagnolli, B.L., 2002. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biol. Biochem.* 34, 955–963. doi:10.1016/S0038-0717(02)00027-5
- Yuan, J., Raza, W., Shen, Q., Huang, Q., 2012. Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 5942–5944. doi:10.1128/AEM.01357-12
- Yuan, W., Crawford, D., 1995. Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3119.

- Zapata, J., Cotes, A., 2013. Desarrollo de prototipos de bioplaguicida a base de *Rhodotorula glutinis* LvCo7 para el control de *Botrytis cinerea* en cultivos de mora. CORPOICA. Bogotá, Colombia.
- Zboińska, E., Lejczak, B., Kafarski, P., 1992. Organophosphonate utilization by the wild-type strain of *Pseudomonas fluorescens*. Appl. Environ. Microbiol. 58, 2993–2999. doi:0099-2240/92/092993-07\$02.00/0
- Zeng, D., Shi, Y., 2009. Preparation and application of a novel environmentally friendly organic seed coating for rice. J. Sci. Food Agric. 89, 2181–2185. doi:10.1002/jsfa.3700

A. Anexo: Procedencia de los microorganismos seleccionados

Microorganismos	Material	Zona
<i>T. koningiopsis</i> Th003	Larvas muertas de <i>Anopheles</i>	Subachoque-Cundinamarca
<i>T. asperellum</i> Th034	Suelo	Cucaita-Boyacá
<i>T. brevicompactum</i> Th201	Suelo	Cereté-Córdoba
<i>S. misionensis</i> Ac001	Platas de fique	Totoró-Cauca
<i>Streptomyces</i> sp. Ac002	Platas de fique	Totoró-Cauca
<i>S. misionensis</i> AC006	Platas de fique	Totoró-Cauca
<i>B. amyloliquefaciens</i> Bs006	Rizósfera Uchuva	Granada-Cundinamarca
<i>P. fluorescens</i> Ps006	Platas de fique	Totoró-Cauca

B. Anexo: Análisis combinado para las réplicas establecidas en el tiempo.

- Evaluación individual de biocontroladores

Procedimiento GLM

Variable dependiente: agallas

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	35	176710.0552	5048.8587	11.34	<.0001
Error	194	86350.9405	445.1079		
Total correcto	229	263060.9957			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	agallas Media
0.671746	28.59732	21.09758	36.00435

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tiempo	3	160539.7188	53513.2396	120.23	<.0001
tto	8	6877.1034	859.6379	1.93	0.0574
tto*tiempo	24	9293.2329	387.2180	0.87	0.6427

- Evaluación en mezcla de biocontroladores

Procedimiento GLM

Variable dependiente: agallas

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	25	27.36930211	1.09477208	5.26	<.0001
Error	162	33.69806385	0.20801274		
Total correcto	187	61.06736596			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	AGPL Media
0.648182	32.10898	0.456084	1.420426

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Réplica	1	22.02804867	22.02804867	105.90	<.0001
Tratamiento	12	2.49950718	0.20829227	1.00	0.4501
Réplica*Tratamiento	12	2.84174625	0.23681219	1.14	0.3327

- Evaluación individual de aditivos orgánicos

Procedimiento GLM

Variable dependiente: agallas

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	11	11.02441485	1.00221953	5.08	<.0001
Error	88	17.34658115	0.19712024		
Total correcto	99	28.37099600			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	agallas Media
0.788580	28.77854	0.443982	0.910200

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Réplica	1	6.43173236	6.43173236	32.63	<.0001
Tratamiento	5	3.77969827	0.75593965	3.83	0.0034
Réplica*tratamiento	5	0.81298422	0.16259684	0.82	0.5353

- Evaluación en mezcla de biocontroladores y aditivos orgánicos

Procedimiento GLM

Variable dependiente: agallas

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	19	45928.4524	2417.2870	3.80	<.0001
Error	193	122766.5993	636.0964		
Total correcto	212	168695.0516			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	agallas Media
0.772257	15.3546	25.22095	21.86385

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Réplica	1	28584.62253	28584.62253	44.94	<.0001
Tratamiento	9	12327.20444	1369.68938	2.15	0.0270
Réplica*tratamiento	9	5016.62538	557.40282	0.88	0.5474

C. Anexo: Análisis estadístico variables de desarrollo vegetal ensayo de eficacia con los biocontroladores

- Cv. Diacol Capiro réplica I

```
> #prueba de igualdad de matrices de varianzas y covarianzas
> library(biotools)
> boxM(biodesb2[3:8],biodesb2[,1])
```

Box's M-test for Homogeneity of Covariance Matrices

```
data: biodesb2[3:6]
Chi-Sq (approx.) = 278.21, df = 168, p-value = 1.875e-07
```

```
> library(MVN)
> #Prueba de Normalidad multivariante
> testRoyS<-roystonTest(resp,ggplot=FALSE)
> testRoyS
Royston's Multivariate Normality Test
```

data: resp

H : 9.796357
p-value: 0.1219499

Result: Data are multivariate normal.

```
> #manova
> fit<-summary((manova(as.matrix(resp)~tto, data=biodesb2)), test="Wilks"
)
> fit
```

	Df	Wilks	approx F	num Df	den Df	Pr(>F)
tto	8	0.58132	0.70283	48	289.45	0.9303
Residuals	63					

- Cv. Diacol Capiro réplica II

```
> #prueba de igualdad de matrices de varianzas y covarianzas
> library(biotools)
> boxM(biodesb2[3:6],biodesb2[,1])

Box's M-test for Homogeneity of Covariance Matrices

data: biodesb2[3:6]
Chi-Sq (approx.) = 189.18, df = 168, p-value = 0.1258

> library(MVN)
> #Prueba de Normalidad multivariante
> testRois<-roystonTest(resp,qqplot=FALSE)
> testRois
Royston's Multivariate Normality Test
-----
data: resp

H      : 13.04089
p-value: 0.05219499

Result: Data are multivariate normal.
-----

> #manova
> fit<-summary((manova(as.matrix(resp)~tto, data=biodesb2)), test="wilks"
)
> fit
```

	Df	Wilks	approx F	num Df	den Df	Pr(>F)
tto	8	0.58132	0.68283	48	289.45	0.19864
Residuals	63					

- Cv. Diacol Capiro réplica III

```
> #prueba de igualdad de matrices de varianzas y covarianzas
> library(biotools)
> boxM(biodesb2[3:6],biodesb2[,1])

Box's M-test for Homogeneity of Covariance Matrices

data: biodesb2[3:6]
Chi-Sq (approx.) = 189.18, df = 168, p-value = 0.05898

> library(MVN)
> #Prueba de Normalidad multivariante
> testRois<-roystonTest(resp,qqplot=FALSE)
> testRois
Royston's Multivariate Normality Test
-----
data: resp

H      : 13.04089
p-value: 0.219499

Result: Data are multivariate normal.
-----
```

```
> #manova
> fit<-summary((manova(as.matrix(resp)~tto, data=biodesb2)), test="wilks"
)
> fit
          Df  Wilks approx F num Df den Df Pr(>F)
tto        8 0.58132  0.568283    48 289.45 0.08648
Residuals 63
```

- Cv. Diacol Capiro réplica IV

```
> #prueba de igualdad de matrices de varianzas y covarianzas
> library(biotools)
> boxM(biodesb2[3:6],biodesb2[,1])
```

Box's M-test for Homogeneity of Covariance Matrices

```
data: biodesb2[3:6]
Chi-Sq (approx.) = 239.18, df = 168, p-value = 0.2898
```

```
> library(MVN)
> #Prueba de Normalidad multivariante
> testRois<-roystonTest(resp,qqplot=FALSE)
> testRois
Royston's Multivariate Normality Test
```

data: resp

H : 13.04089
p-value: 0.34769

Result: Data are multivariate normal.

```
> #manova
> fit<-summary((manova(as.matrix(resp)~tto, data=biodesb2)), test="wilks"
)
> fit
          Df  Wilks approx F num Df den Df Pr(>F)
tto        8 0.48132  0.798283    48 289.45 0.45648
Residuals 63
```

D. Anexo: Análisis estadístico variables de desarrollo vegetal ensayo de eficacia con los aditivos orgánicos

- Cv. Diacol Capiro Réplica I

```
> #prueba de igualdad de matrices de varianzas y covarianzas
> library(biotools)
> boxM(aditdesb1[3:8],aditdesb1[,1])
```

Box's M-test for Homogeneity of Covariance Matrices

```
data: aditdesb1[3:8]
Chi-Sq (approx.) = 127.34, df = 105, p-value = 0.06823
```

```
> library(MVN)
> #Prueba de Normalidad multivariante
> testRois<-roystonTest(resp,qqplot=FALSE)
> testRois
```

Royston's Multivariate Normality Test

data : resp

H : 8.60872
p-value : 0.1582329

Result : Data are multivariate normal.
----- |

```
> #manova
> fit<-summary((manova(as.matrix(resp)~tto, data=aditdesb1)), test="Wilks")
> fit
```

	Df	Wilks	approx F	num Df	den Df	Pr(>F)
tto	5	0.5793	0.82867	30	170	0.7219
Residuals	47					

- Cv. Diacol Capiro Réplica II

```
> #prueba de igualdad de matrices de varianzas y covarianzas
> library(biotools)
> boxM(aditdesb1[3:6],aditdesb1[,1])

      Box's M-test for Homogeneity of Covariance Matrices

data:  aditdesb1[3:6]
Chi-Sq (approx.) = 127.34, df = 105, p-value = 0.12823

> library(MVN)
> #Prueba de Normalidad multivariante
> testRois<-roystonTest(resp,qqplot=FALSE)
> testRois
Royston's Multivariate Normality Test
-----
data : resp

H      : 8.60872
p-value : 0.23295

Result : Data are multivariate normal.
-----

> #manova
> fit<-summary((manova(as.matrix(resp)~tto, data=aditdesb1)), test="wilks")
> fit
```

	Df	Wilks	approx F	num Df	den Df	Pr(>F)
tto	5	0.5793	0.7867	30	170	0.09876
Residuals	47					

E. Anexo: Análisis estadístico desarrollo de agallas ensayo de eficacia con los biocontroladores

- Relación porcentual Réplica I

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV

Variable	Mean Rank	Sample Size
A	35.3	10
B	8.4	10
C	25.5	10
D	31.4	10
E	26.8	10
F	30.0	10
G	23.4	10
H	8.8	10
I	17.4	10
Total	23.0	90

Kruskal-Wallis Statistic 21.4126
P-Value, Using Chi-Squared Approximation 0.0061

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	8	3689.30	461.162	4.27	0.0011
Within	36	3891.70	108.103		
Total	44	7581.00			

- Relación porcentual Réplica II

Puntuaciones de Wilcoxon (Sumas de rango) for Variable AG_PLBIO2
Classified by Variable TT0B2

TT0B2	N	Sum of Scores	Expected Under H0	Std Dev Under H0	Mean Score
Patógeno	8	259.50	240.0	45.116176	32.437500
Th003	7	170.00	210.0	42.614058	24.285714
Th034	8	202.50	240.0	45.116176	25.312500
Th201	5	164.00	150.0	36.701522	32.800000
Ac001	8	216.50	240.0	45.116176	27.062500
Ac002	7	261.50	210.0	42.614058	37.357143
Ac006	5	119.50	150.0	36.701522	23.900000
Bs006	6	143.50	180.0	39.830500	23.916667
Ps006	5	233.00	150.0	36.701522	46.600000

Average scores were used for ties.

Test de Kruskal-Wallis

Chi-cuadrado 9.2575
DF 8
Pr > Chi-cuadrado 0.3210

- Relación porcentual Réplica III

Procedimeinto NPAR1WAY

Puntuaciones de Wilcoxon (Sumas de rango) for Variable AG_PLBI03
Classified by Variable TTOB3

TTOB3	N	Sum of Scores	Expected Under H0	Std Dev Under H0	Mean Score
Patógeno	8	416.50	276.00	52.523668	52.062500
Th003	7	224.50	241.50	49.539129	32.071429
Th034	8	270.50	276.00	52.523668	33.812500
Th201	7	212.50	241.50	49.539129	30.357143
Ac001	8	232.50	276.00	52.523668	29.062500
Ac002	8	285.00	276.00	52.523668	35.625000
Ac006	7	240.50	241.50	49.539129	34.357143
Bs006	8	219.00	276.00	52.523668	27.375000
Ps006	7	245.00	241.50	49.539129	35.000000

Average scores were used for ties.

Test de Kruskal-Wallis

Chi-cuadrado 8.4116
DF 8
Pr > Chi-cuadrado 0.3943

- Relación porcentual Réplica IV

Puntuaciones de Wilcoxon (Sumas de rango) for Variable AG_PLBI04
Classified by Variable TTOB4

TTOB4	N	Sum of Scores	Expected under H0	Std Dev under H0	Mean Score
Patógeno	7	230.50	206.50	41.849928	32.928571
Th003	7	125.50	206.50	41.849928	17.928571
Th034	8	313.00	236.00	44.298662	39.125000
Th201	5	137.00	147.50	36.056498	27.400000
Ac001	8	257.50	236.00	44.298662	32.187500
Ac002	7	235.00	206.50	41.849928	33.571429
Ac006	5	126.00	147.50	36.056498	25.200000
Bs006	6	124.00	177.00	39.123519	20.666667
Ps006	5	162.50	147.50	36.056498	32.500000

Average scores were used for ties.

Test de Kruskal-Wallis

Chi-cuadrado 9.0045
DF 8
Pr > Chi-cuadrado 0.3419

F. Anexo: Análisis estadístico de la relación porcentual en la mezcla de biocontroladores

Anexo F.2: Relación porcentual réplica I

Procedimiento NPAR1WAY

Puntuaciones de Wilcoxon (Sumas de rango) for Variable AG_PLR1
Classified by Variable tto1

tto1	N	Sum of Scores	Expected Under H0	Std Dev Under H0	Mean Score
1	8	241.50	220.00	41.021274	30.187500
2	7	145.00	192.50	38.786732	20.714286
3	5	146.00	137.50	33.470968	29.200000
4	6	144.00	165.00	36.289541	24.000000
5	8	285.00	220.00	41.021274	35.625000
6	5	163.50	137.50	33.470968	32.700000
7	8	176.50	220.00	41.021274	22.062500
8	7	183.50	192.50	38.786732	26.214286

Average scores were used for ties.

Test de Kruskal-Wallis

Chi-cuadrado	5.5866
DF	7
Pr > Chi-cuadrado	0.5888

Anexo F.3: Relación porcentual réplica II

Procedimiento NPAR1WAY

Puntuaciones de Wilcoxon (Sumas de rango) for Variable AG_PLR2
Classified by Variable tto2

tto2	N	Sum of Scores	Expected Under H0	Std Dev Under H0	Mean Score
1	8	398.00	256.0	48.435429	49.750000
2	7	236.50	224.0	45.717223	33.785714
3	7	176.50	224.0	45.717223	25.214286
4	8	270.50	256.0	48.435429	33.812500
5	9	243.50	288.0	50.904356	27.055556
6	8	238.50	256.0	48.435429	29.812500
7	7	209.00	224.0	45.717223	29.857143
8	9	243.50	288.0	50.904356	27.055556

Average scores were used for ties.

Test de Kruskal-Wallis

Chi-cuadrado	10.1276
DF	7
Pr > Chi-cuadrado	0.1815

G. Anexo: Análisis estadístico desarrollo de agallas ensayo de eficacia con los aditivos orgánicos

- Relación porcentual réplica I

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV

Variable	Mean Rank	Sample Size
a	28.8	8
b	23.7	8
c	16.1	6
d	21.9	8
e	27.1	7
f	10.8	6
Total	22.0	43

Kruskal-Wallis Statistic 9.9575
 P-Value, Using Chi-Squared Approximation 0.0364

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	5	1548.75	309.749	2.30	0.0446
Within	37	4983.75	134.696		
Total	42	6532.50			

- Relación porcentual réplica II

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV

Variable	Mean Rank	Sample Size
a	39.8	10
b	27.8	9
c	25.7	8
d	22.8	9
e	23.1	9
f	20.6	8
Total	27.0	53

Kruskal-Wallis Statistic 9.5460
 P-Value, Using Chi-Squared Approximation 0.0392

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	5	2266.5	453.306	2.11	0.0303
Within	47	10080.0	214.467		
Total	52	12346.5			

H. Anexo: Análisis estadístico de la relación porcentual en la mezcla de biocontroladores y aditivos orgánicos

- Relación porcentual réplica I

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV

Variable	Mean Rank	Sample Size
Testigo	89.3	10
Th003	84.3	10
B006	59.6	10
Ac006	72.5	10
Quitina	60.2	10
Quitosán	50.2	10
Th003Quitina	57.4	10
Bs006Quitina	52.6	10
Ac006Quitina	56.9	10
Th003Quitosán	49.5	10
Bs006Quitosán	48.1	10
Ac006Quitosán	54.8	10
Quimico	72.1	10
Total	61.5	130

Kruskal-Wallis Statistic 14.9718
P-Value, Using Chi-Squared Approximation 0.2430

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	12	18659	1554.90	1.28	0.2391
Within	117	132139	1212.29		
Total	129	150798			

- Relación porcentual réplica II

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV

Variable	Mean Rank	Sample Size
a	72.4	7
b	54.2	7
c	53.7	7
d	60.6	7
e	43.5	7
f	27.6	7
g	43.2	7
h	48.6	7
i	47.3	7
j	24.9	7
k	32.7	7
l	32.3	7
m	56.9	7
Total	46.0	91

Kruskal-Wallis Statistic 23.4416
P-Value, Using Chi-Squared Approximation 0.0242

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	12	16300.2	1358.35	2.29	0.0149
Within	78	46281.8	593.36		
Total	90	62582.0			

I. Anexo: Resumen presentación XVII Congreso de la Asociación Latinoamericana de la Papa.

XXVII Congreso de la Asociación Latinoamericana de la Papa – Panamá, 2016

“Sabor y nutrición en un solo lugar”

EFICACIA DE BIOCONTROLADORES Y ADITIVOS ORGÁNICOS EN EL CONTROL DEL CAMANDULEO DE LA PAPA OCASIONADA POR *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea*¹

Mesa-Quijano, P.², García-Domínguez, C.², Cotes-Prado, A.M.³

¹ Investigación financiada por Fundación Ceiba y Corredor Tecnológico-Cundinamarca

² Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agrarias. Ciudad Universitaria Carrera 45 Bogotá, Colombia. e-mail: pemesag@unal.edu.co cgarciad@unal.edu.co

³ Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Corpoica Tibaitatá Km 14 vía Mosquera Cundinamarca. e-mail: amcotes@corpoica.org.co

Palabras claves: Microorganismos, aditivos orgánicos, reducción de agallas.

El cultivo de la papa se ve afectado por diversos fitopatógenos e insectos plagas, destacándose en los últimos años la reemergencia de la enfermedad denominada sarna polvosa y camanduleo causada por el Protista – Plasmodiophorida obligado *Spongospora subterranea* (Wallr.) Lagerheim f. sp. *subterranea* Tomlinson. El camanduleo ocasiona en las raíces y en los estolones hipertrofia e hiperplasia de las células radicales, manifestándose en la formación de agallas alrededor de estos. La infección en raíces por *S. subterranea* disminuye el área de intercambio, lo que afecta el crecimiento de la planta y disminuye el área foliar efectiva, reduciendo la translocación de nutrientes hacia los tubérculos y disminuyendo por ende la producción.

Objetivos: Seleccionar biocontroladores y aditivos orgánicos que exhiban el mayor potencial en la reducción de la enfermedad camanduleo de la papa en condiciones de semicontroladas.

Materiales y Métodos: En una primera etapa se estableció un protocolo para el desarrollo del camanduleo con dos concentraciones de inóculo, 8.8×10^3 y 1×10^5 esporos g^{-1} de suelo en tres condiciones ambientales. Una vez definidas las condiciones para la reproducción de la enfermedad, se evaluó en los cultivares Parida Pastusa y Diacol Capiro ocho microorganismos potencialmente

biocontroladores: tres cepas de *Trichoderma* spp. a 1×10^6 conidios.mL⁻¹, dos rizobacterias a 1×10^8 UFC. mL⁻¹ y tres actinomicetos en dilución 1:100. La inoculación se realizó por inmersión del tubérculo durante 10 min y aplicación de 50 mL al suelo 30 días después de siembra. Adicionalmente se evaluaron tres aditivos orgánicos, quitina y quitosán al 0.1 % y 0.5 % aplicados por inmersión del tubérculo durante 10 min y biocarbón en mezcla con el suelo al 1 %. A las 8 semanas de establecido el ensayo se evaluó la incidencia y la severidad expresada como número de agallas y se determinó la relación porcentual entre el número de agallas por planta respecto a la media del testigo. Se realizaron diagramas de caja y bigotes para cada uno de los bioensayos establecidos, donde cada caja representa dos cuartiles de datos. A la relación porcentual se le analizó normalidad y homogeneidad de varianzas y los datos se sometieron a ANOVA y se establecieron diferencias significativas mediante la prueba de Bonferroni.

Resultados y Conclusiones: En la primera etapa, se logró reproducir la enfermedad encontrándose diferencias significativas ($P < 0.001$) entre los ambientes evaluados, pero no entre las concentraciones de inóculo del patógeno. El 75% de las plantas sembradas en el municipio de Subachoque en suelo naturalmente infestado con el patógeno presentaron la enfermedad, con 142 agallas promedio por planta, mientras que en el invernadero del Centro de Investigación ubicado en el municipio de Mosquera solo el 50% de las plantas sembradas en el suelo infestado, proveniente de Subachoque, tuvo menos de 16 agallas en promedio y en Mosquera a la intemperie, las plantas sembradas en dicho suelo no presentaron la enfermedad. Por lo que los ensayos subsiguientes se establecieron en Subachoque. Al aplicar los biocontroladores, se observó disminución del desarrollo del camanduleo en el cultivar Parda Pastusa con el uso de *Streptomyces misionensis* Ac006 con un 49.03 % de eficacia, seguido de *Pseudomonas fluorescens* Ps006 con 40.34 %. En Diacol Capiro la comparación de medias Bonferroni ($P < 0.005$) indicó que *Trichoderma koningiopsis* Th003 es significativamente diferente al testigo patógeno, con una reducción de agallas del 74.22%. A pesar de no ser diferente al patógeno,