

**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

LISNEY ALESSANDRA BASTIDAS PARRADO

Código 86312

Director

DANIEL URIBE VÉLEZ

Ph.D. Applied Microbiology

Asesora

CELSA GARCÍA DOMÍNGUEZ

Ph.D. Phytopathology

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FACULTAD DE CIENCIAS

POSTGRADO DE MICROBIOLOGÍA

BOGOTÁ D.C.

2010

**DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD BIOCONTROLADORA DE
Pseudomonas spp. CONTRA *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* EN EL
CULTIVO DE PAPA**

LISNEY ALESSANDRA BASTIDAS PARRADO

Código 86312

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FACULTAD DE CIENCIAS

POSTGRADO DE MICROBIOLOGÍA

BOGOTÁ D.C.

2010

NOTA ACEPTACIÓN

La presente tesis fue sustentada y aprobada para el grado de Maestría en Microbiología, el 11 de Agosto de 2010.

En constancia firman:



Jurado: Liliana María Hoyos Carvajal

Facultad de Agronomía

Universidad Nacional de Colombia



Jurado: Enrique Torres Torres

Facultad de Agronomía

Universidad Nacional de Colombia



Director: Daniel Uribe Vélez

Universidad Nacional de Colombia

AGRADECIMIENTOS

A mi mamá y hermanas, por sus palabras, solidaridad y apoyo.

Al Doctor Daniel Uribe por permitirme trabajar en el grupo que lidera, sus consejos y dirección.

A la Doctora Celsa García por su acompañamiento y consejos.

Al Grupo de Microbiología Agrícola Adriana, Anyela, Giovanna, Javier, Mery, Nathalia, Sandra, Paola, por sus voces de ánimo, sonrisas, enseñanzas, apoyo y paciencia.

A Johan, Milton y Miguel, quienes trabajaron conmigo durante el proceso.

Al Doctor Carlos Núñez por su acompañamiento y disposición.

A los docentes que fueron parte del proceso de formación durante el postgrado.

A los administrativos del Instituto de Biotecnología, especialmente a Rocío Oliveros.

A Luz Nelly Galindo por escucharme y aconsejarme por más de siete años.

A las entidades financiadoras, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Asociación Hortofrutícola de Colombia (ASOHOFrucol), Universidad Nacional de Colombia, Federación Colombiana de Productores de papa (FEDEPAPA) y a COLCIENCIAS por su apoyo bajo el programa de Jóvenes Investigadores.

DEDICATORIA

A dos personas que marcaron este proceso. Primero a una mujer que aprendió a escucharme, con la que compartí mi historia de vida y con la cual toda dificultad se convirtió en un momento de broma y superación, Yuli González. Y a una maravillosa persona quien promovió mi crecimiento académico, profesional y por sobretodo mi crecimiento personal en esta etapa, un ser que representa la calidez y sencillez de un ser humano, el mismo ser quien fue mi tutor, Daniel Uribe. Gracias Mil.

CONTENIDO

RESUMEN

INTRODUCCIÓN	13
1. MARCO TEÓRICO	16
1.1 IMPORTANCIA CULTIVO DE LA PAPA	16
1.2 SARNA O ROÑA POLVOSA DE LA PAPA	17
1.2.1 Biología y ciclo de vida del patógeno	17
1.2.2 Síntomas	18
1.2.3 Factores que determinan el desarrollo de la enfermedad	19
1.2.4 Sarna Polvosa en Colombia	21
1.2.5 Distribución Mundial	21
1.2.6 Control de la enfermedad	22
1.3 CONTROL BIOLÓGICO	24
1.3.1 Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal	25
1.3.1.1 <i>Pseudomonas</i> spp. como rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal.	25
1.3.1.2 <i>Pseudomonas</i> fluorescentes y su papel como agentes biocontroladores de patógenos de suelo	28
2. OBJETIVOS	31
2.1 OBJETIVO GENERAL	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
3. MATERIALES Y MÉTODOS	32

3.1 SELECCIÓN DE LOS AISLAMIENTOS BACTERIANOS	32
3.2 ORIGEN DEL MATERIAL VEGETAL	32
3.3 OBTENCIÓN Y MANEJO DEL INÓCULO DE <i>Spongospora subterranea</i>	33
3.4 SELECCIÓN DE AISLAMIENTOS RESISTENTES A RIFAMPICINA	33
3.5 CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LOS AISLAMIENTOS SELECCIONADOS	34
3.5.1 Producción de compuestos volátiles	34
3.5.2 Determinación de la capacidad antagónica <i>in vitro</i> contra <i>Rhizoctonia solani</i> .	34
3.6 DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL BIOCONTROLADOR DE LOS AISLAMIENTOS SELECCIONADOS DE <i>Pseudomonas</i> spp. CONTRA LA INFECCIÓN DE <i>Spongospora subterranea</i> f. sp. <i>subterranea</i> EN PLANTAS DE PAPA BAJO CONDICIONES CONTROLADAS	35
3.6.1 Adecuación de plántulas (<i>in vitro</i>) de papa	35
3.6.2 Preparación del inóculo de <i>Spongospora subterranea</i> , suspensiones celulares, inoculación con bacterias y evaluación de la enfermedad	36
3.6.3 Evaluación de la cepa IBUN Pfl 104 a diferentes dosis de inóculo de <i>Spongospora subterranea</i>	37
3.7 DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL BIOCONTROLADOR DE LOS AISLAMIENTOS SELECCIONADOS DE <i>Pseudomonas</i> spp. CONTRA <i>Spongospora subterranea</i> f.sp. <i>subterranea</i> BAJO CONDICIONES DE INVERNADERO EN PLANTAS DE PAPA.	38
3.8 ANÁLISIS DE DATOS	39
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
4.1 CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA	40

4.1.1 Evaluación de la capacidad antagónica contra <i>in vitro</i> contra <i>Rhizoctonia solani</i> a partir de la producción de compuestos volátiles	40
4.1.2 Evaluación de la capacidad antagónica <i>in vitro</i> de compuestos difusibles en agua contra <i>Rhizoctonia solani</i>	41
4.2 EVALUACIÓN DEL POTENCIAL BIOCONTROLADOR DE LOS AISLAMIENTOS CONTRA <i>Spongospora subterranea</i> f. sp. subterranea	42
4.2.1 Determinación del potencial biocontrolador de <i>Pseudomonas</i> spp. contra la infección de <i>Spongospora subterranea</i> f. sp. <i>subterranea</i> en plantas de papa bajo condiciones controladas	43
4.2.1.1 Adecuación del sistema hidropónico	43
4.2.1.2 Evaluación de la capacidad de colonización radical	44
4.2.1.3 Evaluación de la capacidad biocontroladora de los aislamientos de <i>Pseudomonas</i> spp.	46
4.2.1.4 Evaluación de la cepa IBUN Pfl 104 bajo diferentes dosis de inóculo de <i>Spongospora subterranea</i>	51
4.2.2 Determinación del potencial biocontrolador de <i>Pseudomonas</i> spp. contra la infección de <i>Spongospora subterranea</i> f. sp. <i>subterranea</i> en plantas de papa bajo condiciones de invernadero	53
4.2.2.1 Evaluación de la capacidad biocontroladora de <i>Pseudomonas</i> spp. contra <i>Spongospora subterranea</i> en <i>Solanum phureja</i>	53
4.2.2.2 Evaluación de la capacidad biocontroladora de diez aislamientos de <i>Pseudomonas</i> spp. contra <i>Spongospora subterranea</i> en <i>Solanum tuberosum</i>	60
5. DISCUSIÓN GENERAL	70
6. CONCLUSIONES	76
RECOMENDACIONES	
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de *Spongospora subterranea*.

Figura 2. Efecto de la producción compuestos volátiles por *Pseudomonas* spp. sobre el crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* a nivel *in vitro*.

Figura 3 Efecto de la producción de compuestos difusibles en agua por *Pseudomonas* spp. sobre el crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* a nivel *in vitro*.

Figura 4. Promedio de agallas por planta por tratamiento en plantas *in vitro* Parda Pastusa. Bioensayo Sistema Hidropónico bajo condiciones controladas.

Figura 5. Promedio de agallas por planta de acuerdo a diferentes concentraciones de inóculo de *Spongospora subterranea* en presencia o ausencia del aislamiento IBUN Pfl 104.

Figura 6. Promedio de agallas por planta por tratamiento en *Solanum phureja* cultivar Criolla Colombia. Repetición 1.

Figura 7. Promedio de agallas por planta por tratamiento en *Solanum phureja* cultivar Criolla Colombia. Repetición 2.

Figura 8. Promedio de agallas por planta por tratamiento en plantas de Diacol Capiro.

Figura 9. Promedio de agallas por planta por tratamiento en plantas Parda Pastusa.

Figura 10. Promedio de agallas por planta por tratamiento en plantas Pastusa Suprema.

LISTADO DE ANEXOS

ANEXO 1. Aislamientos seleccionados y procedencia.

ANEXO 2. Composición medios de cultivo y soluciones.

ANEXO 3. Sintomatología a nivel de raíz en plántulas *in vitro* Parda Pastusa. Bioensayo bajo condiciones controladas en un sistema hidropónico.

ANEXO 4. Análisis estadístico.

RESUMEN

Las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal son consideradas como microorganismos potenciales para el control biológico de patógenos de suelo. En el presente estudio se evaluó el potencial de control de diez aislamientos de *Pseudomonas* spp. pertenecientes al cepario del Grupo de Microbiología Agrícola del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia contra el parásito obligado *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* en plantas de papa *Solanum tuberosum* y *Solanum phureja*. La enfermedad causada por este patógeno de suelo afecta tubérculos, raíces y estolones, incidiendo sobre la calidad y producción del cultivo de papa, para la cual actualmente no existe una estrategia de control químico contundente impulsando a la búsqueda de alternativas que apoyen el manejo integrado de la enfermedad. Luego de la inoculación con los aislamientos de *Pseudomonas*, se obtuvieron niveles de control entre 20 y 76% en términos de reducción de agallas en raíz, según la especie hospedera y el aislamiento bacteriano empleado, bajo condiciones de invernadero. La capacidad de control con el aislamiento IBUN Pfl 108 en *S. tuberosum* fue consistente en las pruebas realizadas para los cultivares Diacol Capiro, Parda Pastusa y Pastusa Suprema, siendo el único de los aislamientos que redujo la formación de agallas en los tres cultivares, mientras el control más efectivo en *S. phureja* cultivar Colombia se obtuvo con los aislamientos IBUN Pfl 002 y 092. Finalmente, se estandarizó un protocolo para la evaluación de la enfermedad en un sistema hidropónico bajo condiciones controladas en un cultivar de papa Colombiano, herramienta que posee un gran potencial para realizar estudios puntuales de biología, comportamiento y control de *S. subterranea*, así como para estudios de fitomejoramiento para la selección de cultivares resistentes.

PALABRAS CLAVE: agallas, sistema hidropónico, *Solanum tuberosum*, *Solanum phureja*.

ABSTRACT

Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) are regarded as potential agents of biological control against soil-borne pathogens. The present research evaluated ten isolates of *Pseudomonas* spp. from the microbial collection of the Microbiología Agrícola group of the Biotechnology Institute of Universidad Nacional de Colombia against the obligate parasite *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* in two species of potato, *Solanum tuberosum* and *Solanum phureja*. The disease caused by this soil-borne pathogen affects tubers, roots and stolons, affecting crop quality and yield. The current lack of a definitive chemical control strategy encourages the search for alternatives that support integrated disease management. After inoculation with *Pseudomonas* isolates under greenhouse conditions, root galling was reduced between 20 and 76% depending upon host species and bacterial isolates. Isolate IBUN Pfl 108 has a consistent performance in the assays with *S. tuberosum* cultivars Diacol Capiro, Parda Pastusa and Pastusa Suprema, and it was the only isolate that reduced gall formation in these three cultivars. The most effective control in *S. phureja* cultivar Colombia was obtained with isolates IBUN Pfl 002 and 092. A protocol was standardized for disease assessment of the disease in a hydroponic growth system under controlled conditions in a potato Colombian cultivar. This tool that has a great potential for specific studies of biology, behavior and control of *S. subterranea*, as well as in plant breeding programs aimed at the selection of resistant cultivars.

KEY WORDS: galls, hydroponic growth system, *Solanum tuberosum*, *Solanum phureja*.

INTRODUCCIÓN

La papa como producto agrícola, ocupó en la década de los noventa el cuarto lugar como alimento básico de importancia a nivel mundial luego del trigo, arroz y maíz y el tercer lugar a nivel de producción agropecuaria nacional, para el 2003. El cultivo es fuente de empleo para más de noventa mil familias en Colombia, siendo eje de la actividad agropecuaria y económica en los departamentos de Cundinamarca, Boyacá y Nariño (Ministerio Agricultura y Desarrollo Rural, 2005).

El interés de trabajar y abordar problemas de importancia agronómica sobre productos básicos de consumo es de gran relevancia porque pueden generar a futuro un impacto tecnológico en pro de mejoras en la calidad y producción de los cultivos agrícolas. Es así como problemas fitosanitarios que afectan el cultivo de papa, son un blanco de investigación.

Patógenos de suelo como *Rhizoctonia solani* y *Spongospora subterranea* son los principales agentes causales de enfermedad que afectan la calidad comercial de los tubérculos (Rodríguez *et al.*, 2006). *S. subterranea* f. sp. *subterranea* (Sss) es un protozoo del grupo de los Plasmodioforomycetes, agente causal de la enfermedad Sarna polvosa de la papa (Qu y Christ, 2006). El patógeno afecta la calidad de los tubérculos por la aparición de pústulas polvosas en la peridermis. Además puede conducir a la disminución de los niveles de producción por la presencia de nodulaciones en la raíz que afectan la translocación de nutrientes (Hoyos *et al.*, 2008). Incidiendo de esta manera sobre la calidad cosmética del cultivo y los rendimientos hasta en un 80% (Peña, 2000).

La sarna polvosa es una enfermedad difícil de controlar debido a la formación de estructuras de resistencia (quistosoros) durante su ciclo de vida que puede persistir en el

suelo por largos períodos de tiempo (Merz, 1989; de Boer 2000a). Esto sumado a factores como intensificación en la producción de papa que lleva a la acumulación de inóculo en el suelo, así como un incremento en uso de variedades susceptibles (Merz *et al.*, 2004) y factores ambientales que favorecen la incidencia de la enfermedad (Braithwaite *et al.*, 1994) hacen de este patógeno un problema mayor para la producción de papa en el país.

Actualmente no se cuenta con adecuadas medidas para el manejo de la enfermedad (van de Graaf, 2000), no se dispone de moléculas químicas efectivas para su control y tampoco, de cultivares resistentes con una calidad comercial aceptable (Merz *et al.*, 2004; Qu y Christ, 2006; Baldwin *et al.*, 2008) ni se han identificado prácticas de manejo contundentes para el manejo integrado de la enfermedad.

Estrategias como el control biológico han sido ampliamente estudiadas para el manejo de enfermedades en plantas. Para las cuales microorganismos como las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV) han cobrado importancia por su capacidad para el manejo de diversos patógenos de suelo en cultivos de interés agronómico (Kloepper *et al.*, 1999).

El género *Pseudomonas* como parte del grupo de RPCV cuentan con una serie de mecanismos a los cuales se ha atribuido su capacidad para suprimir patógenos. Es así como la producción de sideróforos, considerados como moléculas específicas que secuestran eficientemente hierro, privan al patógeno de este elemento esencial para su desarrollo (Haas y Keel, 2003). De otra parte se ha demostrado la producción de metabolitos secundarios como antibióticos (O'Sullivan y O'Gara, 1992), enzimas (Chen *et al.*, 2000) y compuestos volátiles (Kai *et al.*, 2009) que juegan un papel importante en el control de diferentes patógenos.

Algunos estudios con cepas nativas Colombianas de *Pseudomonas* fluorescentes como las reportados por Bautista *et al.* (2007) se han caracterizaron por su potencial biológico para el control de *R. solani* en plantas *Solanum phureja* bajo condiciones de invernadero. Estos microorganismos hacen parte de una colección de aislamientos nativos rizosféricos de papa

(Uribe *et al.*, 1999) pertenecientes al Grupo de Microbiología Agrícola del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, que fueron caracterizados de acuerdo a su capacidad antagonista *in vitro* contra *R. solani*, así como por su capacidad de producir sideróforos, compuestos volátiles, ácido cianhídrico y la determinación de la presencia de rutas de síntesis de antibióticos (Informe técnico, 2009), convirtiéndose en fuente biológica para evaluaciones en control de enfermedades en plantas.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 IMPORTANCIA CULTIVO DE LA PAPA

En los 90's, la papa como producto alimenticio se situó como el cuarto alimento básico a nivel mundial después del trigo, el arroz y el maíz. Figura entre los diez alimentos más importantes producidos en los países en desarrollo. Su importancia surge de la capacidad de adaptación a los distintos climas y sistemas de cultivo que presenta este tubérculo, lo cual ha permitido el aumento en su producción y consumo (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2005).

Según reporta la FAO (2008) los países en desarrollo hoy son los principales productores e importadores de papas y la demanda está pasando del tubérculo fresco a los productos elaborados. La producción de estos países ha aumentado a una tasa promedio del 5% anual, teniendo para 2005 una participación sobre la producción mundial de papas del 52 por ciento.

En Colombia la papa se ubica como cuarto producto de producción agrícola a nivel nacional, genera más de cien mil empleos directos involucrando alrededor de noventa mil familias. En tres de los principales departamentos productores, Cundinamarca, Boyacá y Nariño, es la actividad agropecuaria que más empleo e ingresos genera, constituyéndose en eje fundamental de la economía regional en estos departamentos (Ministerio Agricultura y Desarrollo Rural, 2005). Para 2008 el área sembrada en papa fue de 122.640 hectáreas y la producción fue de 2.372.862 toneladas (Ministerio Agricultura y Desarrollo Rural, 2009).

La producción de papa se ve afectada por problemas fitosanitarios que residen en una amplia gama de patógenos que conducen al desarrollo de enfermedades tanto foliares como

edáficas, siendo económicamente importantes como habitantes, naturales de suelo la Rizoctoniasis o Costra negra de la papa causada por el hongo fitopatígeno *R. solani* y la Sarna o Roña polvosa de la papa causada por el biótrofo obligado *Sss* (Guerrero, 2004), que como menciona Peña (2000) puede afectar tanto la calidad cosmética del cultivo como los rendimientos hasta en un 80%.

1.2 SARNA O ROÑA POLVOSA DE LA PAPA

1.2.1 Biología y ciclo de vida del patógeno

S. subterranea (Wallroth) Lagerheim f. sp. *subterranea* Tomlinson, es un parásito obligado de suelo que pertenece a la familia *Plasmodiophoridae* (Qu y Christ, 2004) agente causal de la Sarna o Roña polvosa de la papa. Este grupo se caracteriza por la formación de zoosporas, estructuras que diseminan la infección en el campo, portadoras de virus y principal blanco de medidas de control (Merz, 1997). Así como por la formación de un protoplasto multinucleado conocido como plasmodio y de esporas de descanso resistentes al ambiente (Braselton, 1995).

Una vez una planta susceptible crece en campos donde está presente el inóculo de *Sss* las estructuras de descanso germinan liberando zoosporas primarias (Figura 1), en respuesta a exudados emitidos por las raíces de las plantas (Merz, 1997) y a condiciones ambientales favorables (Hoyos *et al.*, 2009). Cuando una zoospora entra en contacto con un pelo radical, los flagelos se separan, la zoospora se enquistada, formando en su interior una estructura a manera de estilete que fuerza la pared celular del pelo radical permitiendo la inyección y penetración del patógeno hacia el interior del hospedero (Braselton, 1995)

Una vez en el interior se forma un plasmodio primario (plasmodio esporangial) que luego de divisiones sucesivas conlleva a la formación de un zoosporangio que contiene las zoosporas secundarias que una vez liberadas pueden tomar dos vías (Braselton, 1995). La

primera, volver a infectar raíces de manera que progresivamente se liberan mas zoosporas incrementando el nivel de inóculo del suelo (Kole y Gielink, 1963 citado en Harrison *et al.* 1997) y la segunda, las zoosporas secundarias pueden formar un segundo plasmodio (plasmodio esporogénico) cuyo desarrollo puede darse en células corticales de la raíz de papa o células epidermales y subepidermales de los tubérculos (Braselton, 1995).

Luego de divisiones mitóticas y cruciformes del plasmodio esporogénico se sucede la formación de las esporas de descanso o soros en estructuras conocidas como quistosoros, estructuras de resistencia consideradas como las estructuras de supervivencia del protozoo (Hoyos *et al.*, 2009) que confieren su persistencia por períodos prolongados de tiempo.

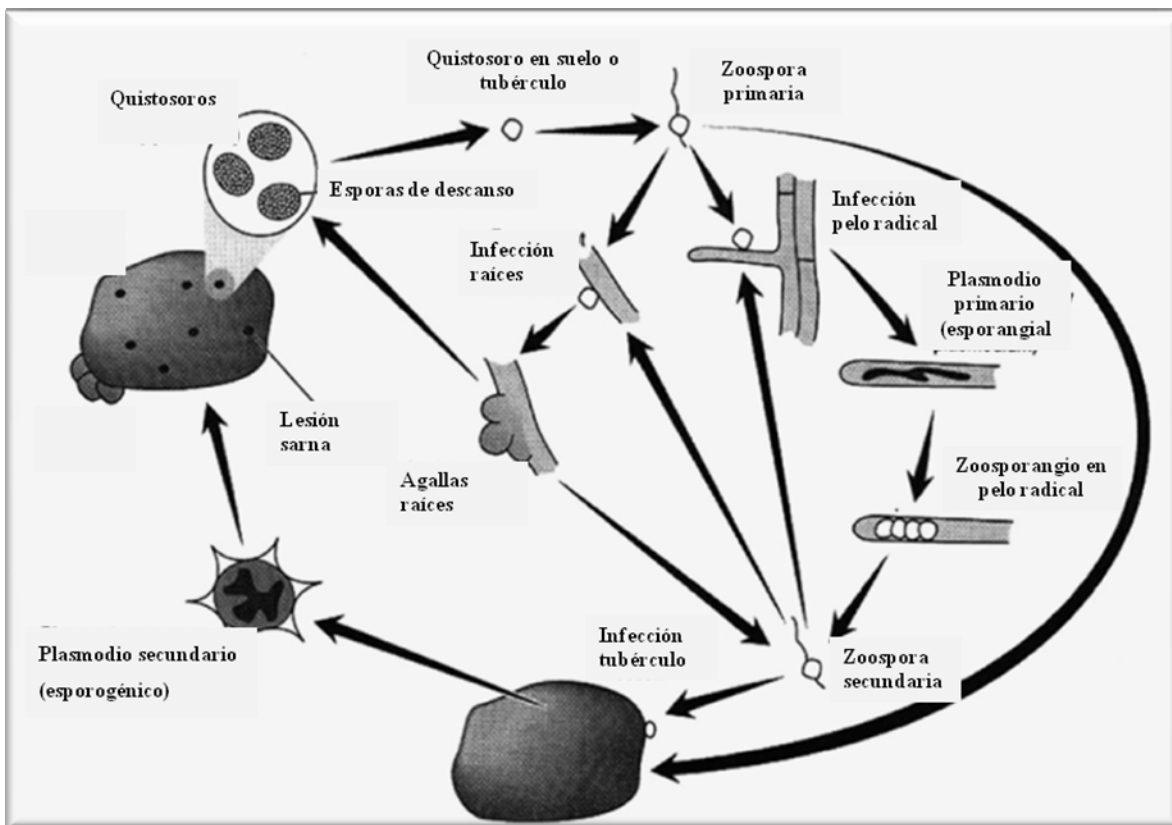


Figura 1. Ciclo de vida de *Spongospora subterranea* (Harrison *et al.*, 1997).

1.2.2 Síntomas

Raíces y tubérculos de papa pueden ser infectados por *Sss* (Qu y Christ, 2006). La sintomatología en raíz luego del proceso de infección y el posterior desarrollo de la enfermedad, consiste en fenómenos de hipertrofia e hiperplasia de las células radicales, manifestándose en la formación de agallas alrededor de la raíz (van de Graaf, 2007). Las agallas contienen los quistosoros (Merz *et al.*, 2004) a manera de masas polvorientas y dentro de ellos las estructuras de descanso. Las nodulaciones generadas inicialmente son de color blanco lechoso y a medida que maduran se tornan de un color castaño (Hooker, 1980; Torres, 2002).

El nombre de la enfermedad es atribuido a los síntomas que causa *Sss* en los tubérculos. La infección se presenta a manera de pústulas de color castaño purpúreo, de 0.5 a 2.0 mm de diámetro, que se extienden lateralmente debajo de la peridermis formando lesiones levantadas en forma de granitos, el aumento de tamaño y división de las células parasitadas empuja y rompe el peridermo, formando proyecciones con apariencia de verrugas. Bajo la lesión se forma peridermo de cicatrización, que se va oscureciendo gradualmente y se deteriora, dejando una depresión superficial llena de una masa polvorienta de esporas aglutinadas o quistosoros, de color castaño oscuro. La lesión esta generalmente circundada por los bordes levantados del peridermo desgarrado. Cuando hay demasiada humedad en el suelo no se forma peridermo de cicatrización, entonces la lesión se expande tanto en profundidad como en extensión, formando áreas con cavidades o verrugas grandes (Hooker, 1980).

1.2.3 Factores que determinan el desarrollo de la enfermedad

De acuerdo a los estudios de van de Graaf *et al.* (2005) donde se determinó el efecto de 3 condiciones diferentes de temperatura (9°, 12° y 17°C), pudieron establecer un óptimo de

12°C para la cual la expresión de síntomas de sarna polvosa en tubérculo fue más sever, 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. Estos resultados coinciden con las investigaciones de Boer (2000b) en un experimento con papa (cv. Kennebec) donde los niveles de enfermedad son mayores a temperaturas de 12.5°C y bajo en temperaturas entre 17.5°C y 20°C.

Posteriores ensayos 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 *Sss* visto sobre los efectos que produce sobre el hospedero. 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; van de Graaf *et al.*, 2007). En la práctica es conocido que la Sarna polvosa es a menudo prevalente en áreas o años húmedos (Wale, 2000a), cuando se presentan fuertes fluctuaciones en los niveles de humedad la enfermedad es menos común y en períodos secos no ocurre.

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 puede causar efectos tóxicos sobre las zoosporas de *Sss* (Burnett, 1991, citado por van de Graaf *et al.*, 2005).

1.2.4 Sarna Polvosa en Colombia

El primer reporte de Sarna polvosa en Colombia se registró en 1965 (Gómez *et al.*, 2008). Desde entonces su amplia diseminación en las diferentes zonas productoras de papa ha llevado a ser reconocida e identificada como un factor limitante para la comercialización del producto fresco y su procesamiento industrial, ya que afecta directamente la calidad del tubérculo (Guerrero, 2004).

De acuerdo a Rodríguez *et al.* (2006) en un estudio de incidencia de los principales patógenos de semilla, provenientes de diferentes locaciones en Colombia, determinaron que tanto *R. solani* como *Sss* son los organismos más importantes que afectan y deterioran la calidad de los tubérculos, lo que se refleja en la disminución de material comercializable, convirtiéndose en un problema para el mercado de exportación de la papa (Schott *et al.*, 2001) conociendo que Colombia es base de abastecimiento de este producto para la industria en la región Andina (FAO, 2008).

De otra parte, respecto a la expresión de la enfermedad, Jaramillo y Botero (2007) hacen referencia a una distribución de síntomas en los órganos de las plantas de papa de acuerdo a la zona de producción. Mientras en Cundinamarca, Boyacá y Norte de Antioquia es más frecuente observar pústulas sobre los tubérculos de los cultivares Parida Pastusa y Diacol Capiro, en el departamento de Nariño y Oriente de Antioquia es común observar agallas en raíces. Hasta ahora no se sabe si estas diferencias se deben a variaciones en las condiciones ambientales de una región a otra, o quizás se deban a la distribución regional de diferentes razas del patógeno y/o a su interacción: hospedero-patógeno-ambiente.

1.2.5 Distribución Mundial

Diversidad de países han reportado la ocurrencia de *Sss* como agente fitopatógeno que afecta el cultivo de la papa. En Europa se ha manifestado la enfermedad en países como Dinamarca, Alemania, Holanda, Irlanda, Suiza y Reino Unido. Igualmente se ha reportado

en medio oriente, Turquía e Israel, a pesar de las extremas regulaciones durante la importación de semilla. Así como en América del Norte y del Sur, donde específicamente se ha confirmado en países como Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador. Mientras, en Nueva Zelanda y Australia la sarna polvosa es considerada como una de las principales enfermedades que afectan el cultivo de papa. India, Pakistan y Japón consideran al patógeno como uno de los principales problemas que afectan la calidad de semilla y causa de pérdidas económicas (Wale, 2000a). Con este panorama de distribución del patógeno a nivel mundial se ha propuesto que la alta incidencia puede ser atribuida a la alta distribución comercial de los cultivares de papa que son particularmente sensibles a la enfermedad (Harrison *et al.*, 1997).

1.2.6 Control de la enfermedad

Sss ha sido reconocido como un agente fitopatógeno de suelo que genera estructuras de resistencia que le permite sobrevivir por períodos largos en el suelo razón que dificulta su control (Merz, 1989; de Boer, 2000a), períodos que de acuerdo con Acevedo (2009)¹ pueden ser superiores a 10 años en campo y de acuerdo a Qu (2010)² hasta 25 años en suelo seco.

Hoyos *et al.* (2009) mencionan tres estados de menor susceptibilidad del patógeno en términos biológicos, determinados por el enquistamiento de las estructuras. Una, ya mencionadas son las esporas de descanso, otras son las zoosporas y en tercer lugar están los plasmodios primarios. Convirtiéndose el enquistamiento en un mecanismo de defensa y perdurabilidad en suelos para *Sss*, cuya implicación se traduce en la dificultad para generar estrategias de manejo para este patógeno.

Sumado a esto, el hecho de que *Sss* es un biótrofo obligado, es decir que no pueda cultivarse *in vitro* sin la presencia de un hospedero, hace dispendioso los estudios

¹ Ingeniero Agrónomo. FEDEPAPA. Comunicación personal.

² Investigador Universidad de Pensilvania. Estados Unidos de América. Comunicación personal.

fitopatológicos necesarios para un mejor entendimiento de la enfermedad. De manera que los estudios deben hacerse principalmente bajo condiciones de invernadero o en campo, lo que implica como menciona Merz *et al.* (2004) largos períodos de trabajo y altos costos, haciendo insostenible su manejo, considerando además que el éxito o fracaso está condicionado fuertemente por factores ambientales.

En la actualidad la propuesta para el manejo de *Sss*, atendiendo a los factores mencionados y a la dificultad de control del patógeno, se refleja en la implementación de un programa de manejo integrado (de Boer, 2000b), ya que las prácticas por sí solas no son lo suficientemente contundentes para controlar la enfermedad. Así las estrategias propuestas se enfocan principalmente en prácticas culturales como el uso de semilla certificada, manejo adecuado del agua, rotación de cultivos y períodos de descanso del cultivo prolongados (Jan *et al.*, 2002); la selección de los campos de siembra, control químico y resistencia de cultivares (Merz y Falloon, 2009)

Falloon *et al.* (1996) adelantaron estudios de uso de productos químicos contra *Sss*, en Nueva Zelanda, tratando directamente tubérculos semilla de papa cultivar Agria, así como aplicaciones en surco. Sus resultados mostraron que el uso de productos como fluazinam (91% tubérculos sanos), mancozeb (90% tubérculos sanos), la mezcla de estos (90% tubérculos sanos), permitieron aumentar la proporción de tubérculos sanos comparados con el control sin tratar (75.4% tubérculos sanos). Comportamientos similares se obtuvieron para el tratamiento en surco con 97% y 86% de tubérculos sanos con el uso de fluazinam y mancozeb, respectivamente; mientras el control (agua) presentó 64% de tubérculos sanos.

El panorama en Colombia difiere para el uso de productos químicos. En un estudio realizado por García *et al.* (2006), se evaluaron seis productos comerciales de diferentes ingredientes activos (tiabendazol, tolclofos-metil, benomyl, carbendazim, clorotalonil, mancozeb) sobre material *S. tuberosum* cultivares Diacol Capiro y Parada Pastusa en tres localidades de los departamentos de Cundinamarca, Antioquia y Nariño, cuyos resultados no mostraron diferencias entre el uso o no de los fungicidas evaluados. Contrastando con lo reportado por Falloon *et al.* (1996) específicamente para el uso de mancozeb, que como ya

se nombró incidió en el aumento de tubérculos sanos. Concluyendo para el caso de Colombia, con que no se cuentan con productos específicos para el control de *Sss*.

Como estrategia alterna propuesta en la primera reunión europea de trabajo de Sarna polvosa, se estimó la investigación en el área de control biológico proponiendo la búsqueda e identificación de antagonistas contra *Sss* (de Boer, 2000b).

Son pocas las evaluaciones realizadas con microorganismos biocontroladores para el control de roña polvosa. Específicamente en Colombia, se han realizado algunos ensayos con *Trichoderma harzianum* bajo condiciones de invernadero. En un estudio realizado por Hoyos *et al.* (2008) con dos aislamientos nativos de *T. asperellum* (T-84 y T-109) procedentes de suelos colombianos, se pudo determinar como resultados preliminares una disminución en el número de nódulos generados en raíces de plantas Diacol Capiro, donde los tratamientos con *T. asperellum* registraron un número de nodulaciones por planta inferiores a 40, diferente a lo obtenido con el tratamiento químico donde el número de agallas máximo registrado fue de alrededor de 140 nódulos por planta.

1.3 CONTROL BIOLÓGICO

Como estrategia dentro del manejo integrado de plagas y enfermedades se encuentra el control biológico, cuya definición de acuerdo a lo mencionado por Eilenberg *et al.* (2001) se entiende como el uso de organismos vivos para suprimir la densidad de población o impacto de un organismo plaga, haciendo que este sea menos abundante o menos dañino de lo que pudiera ser. Así, esta estrategia puede incluir el uso de microorganismos como agentes de control biológico (Kloepper, 1996).

Diversos microorganismos asociados con plantas han sido objeto de estudio por su papel supresor, natural o inducido, sobre patógenos de suelo. Dentro del grupo de estos microorganismo se encuentra un grupo importante de bacterias asociadas estrechamente a las raíces conocidas como rizobacterias, que pueden ser reintroducidas a semillas o partes

vegetativas de plantas (semilla-tubérculo de papa) para colonizar el sistema radical en presencia de la microflora edáfica (Kloepper *et al*, 1999)

1.3.1 Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal

Las rizobacterias que proporcionan efectos benéficos sobre las plantas son conocidas como rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV), cuyos beneficios pueden ser entendidos en términos de crecimiento o de control biológico de enfermedades, donde una misma bacteria puede mediar estos dos procesos (Kloepper *et al*, 1999)

Es conocido y ampliamente estudiado el uso RPCV como inoculantes de semillas, suelo y plantas, capaces de suprimir patógenos de suelo promoviendo sanidad y productividad de los cultivos. Microorganismos del género *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. hacen parte del grupo de RPCV mas estudiado (Kloepper, 1980; Thomashow, 1996; Mercado-Blanco y Bakker, 2007) y promisorio para el manejo de enfermedades.

La capacidad de estos agentes biocontroladores en la supresión de enfermedades está dada por la manifestación de diversas interacciones entre el organismo hospedero (planta), el causante de enfermedad (patógeno), el organismo biocontrolador, la comunidad microbiana circundante y el ambiente. Los mecanismos o estrategias principales empleadas para el manejo de enfermedades en plantas son antibiosis, competencia por hierro (dada por la producción de sideróforos) e inducción de resistencia (O'Sullivan y O'Gara, 1992; Handelsman y Stabb, 1996; Bakker *et al.*, 2003).

1.3.1.1 *Pseudomonas* spp. como rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal.

Microorganismos rizosféricos del género *Pseudomonas* poseen características interesantes que determinan su potencial como RPCV. Por ejemplo, bajo condiciones *in vitro* crecen rápidamente y se pueden producir masivamente; pueden emplear como fuente energética

para su mantenimiento los exudados de raíces y semillas, lo que les permite actuar en nichos como la rizósfera, espermósfera y al interior de las plantas, dado por su alta capacidad de colonización y multiplicación en estos ambientes (Geels *et al.*, 1986; Quagliotto *et al.*, 2009). También es conocido que estos microorganismos son capaces de producir diversidad de metabolitos bioactivos (Bakker *et al.*, 2003) y de adaptarse a condiciones de estrés (Weller, 2007). Es así como agentes microbianos del género *Pseudomonas* cuentan con una serie de mecanismos supresores para el control de enfermedades en plantas

Como parte de dichos mecanismos se encuentra la producción de sideróforos, estrategia de biocontrol que contempla el hecho de privar a los patógenos de nutrientes esenciales para su crecimiento (Handelsman y Stabb, 1996). Así dentro de los mecanismos mejor estudiados se encuentran los de competencia por hierro, elemento esencial para procesos de biosíntesis y de baja disponibilidad para su asimilación (O'Sullivan y O'Gara, 1992), para acceder a este elemento bacterias como las *Pseudomonas* spp. liberan quelatos de hierro conocidos como sideróforos, que actúan como ligandos atrapando el hierro y haciéndolo disponible para sí mismos (Lugtenberg, 2009). *Pseudomonas* de suelo generalmente producen sideróforos fluorescentes, amarillo-verdosos, que han sido clasificados como pioverdinas o pioquelinas (O'Sullivan y O'Gara, 1992; Haas y Dèfago, 2005).

Igualmente, es conocido que diversas cepas de *Pseudomonas* spp. tienen la capacidad de producir antibióticos difusibles o volátiles que inhiben el crecimiento de patógenos en condiciones *in vitro* (Haas y Keel, 2003). Existen diversos antibióticos producidos por estos microorganismos dentro de los cuales se conocen compuestos como fenacinas, pioluteorinas, pirrolnitrinas, piocianinas y 2,4-diacetilfloroglucinol (O'Sullivan y O'Gara, 1992). Estos agentes biocontroladores exhiben amplia diversidad en cuanto al tipo y número de antibióticos producidos, lo que puede explicar y determinar su potencial para controlar múltiples enfermedades en plantas (Raaijmakers *et al.*, 2002).

Corbell y Loper (1995) propusieron un estudio que permitió discernir sobre el potencial supresor de *P. fluorescens* Pf-5 mediado por la producción de antibióticos como

pirrolnitrinas y pioluteorinas, además de otros metabolitos secundarios, mutando el gen *apdA*. Los resultados mostraron que se suspendió la producción de antibióticos por parte del agente biocontrolador, así como que la falta de la producción de metabolitos secundarios se correlacionó con la carencia de inhibición de crecimiento de *R. solani*.

Así mismo, en estudios realizados por Howell y Stipanovic (1979) en plántulas de algodón donde se evaluó la eficacia de un aislamiento de *P. fluorescens* o su antibiótico como tratamiento semilla para prevenir damping-off causado por *R. solani* se obtuvieron incrementos en la supervivencia de la plántulas del 30 al 79% y del 13 al 70% respectivamente, permitiéndoles concluir que la producción y uso de antibióticos como pirrolnitrina, se puede emplear como un inhibidor contra *R. solani* en plántulas de algodón.

Como tercer mecanismo supresor de enfermedad en plantas, se ha estudiado la producción de compuestos volátiles que como mencionan Kai *et al.* (2009) es común para diferentes microorganismos y su importancia radica en las funciones biológicas propias de estos compuestos que probablemente intervienen en procesos de comunicación célula a célula y de promoción de crecimiento e inhibición de patógenos; así como por su amplio rango de acción determinado por su habilidad para difundirse a través de soluciones acuosas hasta llegar a la atmósfera.

Pruebas *in vitro* contra *R. solani* confirman la importancia de la producción de compuestos volátiles orgánicos (CVOs) como inhibidores de este patógeno de suelo. Kai *et al.* (2006) determinaron la capacidad productora de CVOs en un sistema dual, donde se inhibió el crecimiento micelial del fitopatógeno hasta en un 80% empleando cepas de *P. fluorescens*, *P. trivialis* y *B. subtilis* entre otros.

En el caso de *Pseudomonas* fluorescentes se ha estudiado ampliamente la producción de ácido cianhídrico. Por ejemplo, Voisard *et al.* (1989) emplearon el mutante negativo CHA5 para HCN y CHA0 como la cepa nativa, en un sistema genobiótico contra el patógeno *Thielaviopsis basicola* D127, donde el porcentaje de superficie de raíces infectadas por CHA0 fue de alrededor de un 30% y difirió significativamente del control sin

Pseudomonas, mientras CHA5 no fue diferente del control, con alrededor de 65% de infección en la superficie de raíces, evidencia que muestra la importancia de la emisión o producción de compuestos volátiles en el control de enfermedades patógenas de plantas.

Finalmente se han identificado mecanismos de inducción de resistencia. Las plantas poseen varios mecanismos de defensa para protegerse a sí mismas contra el ataque de fitopatógenos (Corné *et al.*, 2001), esos mecanismos permanecen latentes hasta que la planta es apropiadamente estimulada (van Loon *et al.*, 1998), momento en el cual aumenta su capacidad de defensa en un proceso conocido como inducción de resistencia (Ramamoorthy *et al.*; 2001). Cuando los mecanismos de defensa son estimulados por agentes como RPCV el fenómeno es conocido como inducción de resistencia sistémica (Bakker *et al.*, 2007).

El proceso de inducción de resistencia sistémica (IRS) fue descubierto como uno de los modos de acción supresores de enfermedad en plantas por *Pseudomonas* spp. como RPCV (Mercado-Blanco *et al.*, 2007). Ensayos como los de Leeman *et al.* (1995) permiten dilucidar la capacidad de *P. fluorescens* para el control de agentes fitopatógenos por medio de IRS. Las evaluaciones consistieron en inocular, en locaciones separadas espacialmente, sobre las raíces de plantas de rábano tanto el patógeno (*Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*) como las RPCV (*P. fluorescens* WCS 358, WCS 374 y WCS 417). De acuerdo a los resultados, el porcentaje de plantas enfermas en el control fue de alrededor de 80%, mientras para las cepas WCS 374 y 417, fue de 45% aproximadamente siendo estadísticamente diferentes.

1.3.1.2 *Pseudomonas* fluorescentes y su papel como agentes biocontroladores de patógenos de suelo

Los organismos patógenos de suelo son difíciles de controlar. Estrategias como rotación de cultivos, procesos de fitomejoramiento para la obtención de variedades resistentes y la

aplicación de pesticidas son prácticas insuficientes para el control de enfermedades en raíces para diferentes cultivos de importancia (Haas y Défago, 2005).

La complejidad del manejo de los patógenos de suelo está dada por que las enfermedades ocurren en un ambiente dinámico en la interface de la raíz y el suelo conocida como la rizósfera, que por su naturaleza dinámica donde fluctúan condiciones de pH, concentración de sales, potenciales hídricos, disponibilidad de nutrientes, entre otros, se convierte en un interesante conjunto de interacciones que puede conllevar al establecimiento de patógenos y/o agentes de biocontrol (Handelsman y Stabb, 1996).

Es así como diferentes microorganismos del género *Pseudomonas*, en especial *P. fluorescens*, han sido reconocidos como potenciales controladores biológicos en plantas, principalmente contra patógenos de suelo, que atacan cultivos de importancia económica, como *R. solani* (Reddy *et al*, 2008) y *Sarocladium oryzae* (Saravanakumar *et al*, 2009) en arroz; *Gaeumannomyces graminis* (Capper y Higgins, 1993; Mazzola *et al*, 1995) y *Pythium* spp.(Milus y Rothrock, 1997) en trigo; así como *R. solani* en algodón (Howell y Stipanovic, 1979; Kloepper, 1991) y papa (Talbot y Larkin, 2005)

En Colombia son interesantes los avances obtenidos por el Grupo de Microbiología Agrícola del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, quien cuenta con una colección de aislamientos nativos rizosféricos de papa (Uribe *et al.*, 1999) que fueron caracterizados de acuerdo a su capacidad antagónica *in vitro* contra *R. solani*, así como por su capacidad de producir sideróforos, compuestos volátiles, ácido cianhídrico y la determinación de la presencia de rutas de síntesis de antibióticos (Artículo en publicación).

Bautista *et al.* (2007) emplearon 6 aislamientos de tal colección y evaluaron bajo condiciones de invernadero el potencial de estos aislamientos como agentes biocontroladores contra *R. solani* en plantas de papa de *S. phureja*. Así, la capacidad de biocontrol de las *Pseudomonas* spp. evaluadas se evidenció en la disminución de los

niveles de enfermedad ocasionados por el patógeno una vez fueron comparados contra el control, resultados que permiten notar una vez más la importancia de agentes microbianos del género *Pseudomonas* como controladores de patógenos de suelo.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la capacidad biocontroladora de cepas nativas de *Pseudomonas* spp. contra *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* en plantas de *Solanum tuberosum* y *Solanum phureja*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Establecer la capacidad antagónica funcional bajo condiciones *in vitro* de 10 cepas nativas de *Pseudomonas* spp. provenientes de la colección del banco de cepas del Grupo de Microbiología Agrícola Instituto de Biotecnología-Universidad Nacional de Colombia.

2.2.2 Determinar el potencial biocontrolador de *Pseudomonas* spp. contra la infección de *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* en plantas de papa bajo condiciones controladas.

2.2.3 Determinar el potencial biocontrolador de *Pseudomonas* spp. contra *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* a nivel de invernadero en plantas de papa.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 SELECCIÓN DE LOS AISLAMIENTOS BACTERIANOS

Para adelantar el presente estudio, se seleccionaron 10 aislamientos de *Pseudomonas* spp. pertenecientes al cepario de bacterias rizosféricas del Grupo de Microbiología Agrícola del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN) los cuales se habían obtenido de cultivos de papa de la región Cundiboyacense (Uribe *et. al.*, 1999) (Anexo 1). Los criterios de selección fueron la producción de sideróforos, de ácido cianhídrico (HCN), o de otros compuestos volátiles y la observación de antagonismos *in vitro* contra *R. solani*. Los aislamientos seleccionados fueron los siguientes: IBUN Pfl 002, 051, 063, 090, 092, 093, 097, 098, 104 y 108.

3.2 ORIGEN DEL MATERIAL VEGETAL

El material vegetal para las pruebas bajo condiciones controladas, consistió en plántulas de papa cultivares Diacol Capiro (DC) y Parda Pastusa (PP), producidas *in vitro* por el laboratorio de Biotecnología Antonio Angarita de la Facultad de Agronomía y el laboratorio de Cultivos Vegetales del IBUN, respectivamente.

Para las pruebas de invernadero se empleó semilla certificada de *S. phureja* cultivar Colombia (COL) y de *S. tuberosum*, los cultivares DC y Pastusa Suprema (PS), así como plántulas *in vitro* PP suministradas por el laboratorio de Cultivos Vegetales del IBUN.

3.3 OBTENCIÓN Y MANEJO DEL INÓCULO DE *Spongospora subterranea*

En cultivos comerciales de papa (*S. tuberosum*) ubicados en Páramo de Guerrero, Zipaquirá-Cundinamarca, se identificaron plantas con presencia de agallas en las raíces, síntoma característico de la enfermedad causada por *Sss*. Las agallas fueron cosechadas manualmente y posteriormente almacenadas a 4°C hasta su maduración. Luego, las agallas se lavaron con agua de grifo y se seleccionaron una a una eliminando excesos de material vegetal y suelo, finalmente se secaron a temperatura ambiente y se tamizaron por dos mallas (250µm y 425µm) para obtener quistosoros individuales. El inóculo se almacenó a 4°C en un recipiente plástico cerrado y cubierto con aluminio.

3.4 SELECCIÓN DE AISLAMIENTOS RESISTENTES A RIFAMPICINA

Para el seguimiento y recuperación de los aislamientos bacterianos empleados en las diferentes etapas del proyecto, se seleccionaron mutantes espontáneos con resistencia a Rifampicina (Rif^r). Para su obtención se siguió el protocolo estandarizado por el Grupo de Microbiología Agrícola del IBUN, el cual brevemente consistió en la inoculación de caldo LB, suplementado con rifampicina comercial a 50µg mL⁻¹, a partir de una colonia pura del aislamiento nativo previamente crecido en medio sólido LB (Anexo 2) por 48h a 25°C. Posteriormente los aislamientos se llevaron a incubar a 25°C con agitación constante por 48h. Luego, se sembraron 100µL del cultivo en agar LB con rifampicina a una concentración de 100µg mL⁻¹ que de igual manera se incubó por 48H a 25°C. Por último las cepas nativas y las Rif^r se sembraron e incubaron, bajo las mismas condiciones de tiempo y temperatura, en el medio suplementado con rifampicina (100µg mL⁻¹), confirmando la selección de los aislamientos. Finalmente los aislamientos Rif^r fueron criopreservados en medios Gherna (Anexo 2) y almacenados a -20°C y -80°C.

3.5 CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LOS AISLAMIENTOS SELECCIONADOS

Una vez marcados los aislamientos nativos de *Pseudomonas* spp. resistentes a rifampicina ($100\mu\text{g mL}^{-1}$) se estableció su acción como agentes supresores de enfermedad evaluando dos de los posibles mecanismos de acción, producción de compuestos volátiles y antagonismo contra *R. solani*.

3.5.1 Producción de compuestos volátiles

Para confirmar la acción biocontroladora de los aislamientos nativos de *Pseudomonas* spp. mediante la producción de compuestos volátiles inicialmente se realizó la siembra de cada uno de los aislamientos seleccionados en medio agar inductor de HCN (Frey-Klett *et al.*, 2005) (Anexo 2), los que se llevaron a incubar a 25°C por 24h. Previamente, se sembró en medio PDA (Anexo 2) un aislamiento de *R. solani* (*Rs*) patogénico de papa que se incubó por 5 días a 25°C . La evaluación de la producción de compuestos volátiles consistió en el enfrentamiento de la caja sembrada con el aislamiento bacteriano previamente incubado y una caja sembrada con un “plug” de *Rs*, unidas y selladas con parafilm. Este sistema se incubó por 5 días a 25°C . Los controles negativos correspondieron al cultivo del hongo enfrentado con el medio inductor sin bacteria (Mikani *et al.*, 2008) y un segundo control, hongo contra hongo. La siembra se realizó por duplicado. La evaluación se hizo midiendo el diámetro de crecimiento del patógeno y se determinó la media a partir de los datos registrados para cada uno de los aislamientos bacterianos.

3.5.2 Determinación de la capacidad antagonica *in vitro* contra *Rhizoctonia solani*.

Se empleó la metodología descrita por Bautista *et al.* (2007) con algunas modificaciones. Con cada que aislamiento bacteriano (previamente crecidos en LB por 48h a 25°C) se trazaron dos estrías paralelas equidistantes del centro de una caja de Petri que contenía agar PDA, la cual se incubó por 48h a 25°C . Cumplido el tiempo de incubación se sembró en el

centro de cada caja Petri, un “plug” de 5mm de lado tomado de un cultivo de *Rs* de cinco días de edad. La siembra se realizó por duplicado. El control consistió en la siembra de *Rs* sin *Pseudomonas*. El material incubó por 5 días a 25°C. La variable evaluada fue el halo de inhibición en centímetros medido desde el borde externo de crecimiento del hongo hasta el borde externo de crecimiento de la bacteria tomando como referencia el centro de la caja de Petri.

3.6 DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL BIOCONTROLADOR DE LOS AISLAMIENTOS SELECCIONADOS DE *Pseudomonas* spp. CONTRA LA INFECCIÓN DE *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* EN PLANTAS DE PAPA BAJO CONDICIONES CONTROLADAS

3.6.1 Adecuación de plántulas (*in vitro*) de papa

Se siguió la metodología propuesta por Merz (1989) y Merz *et al.* (2004) con algunas modificaciones. Se emplearon plántulas *in vitro* de papa, de los cultivares DC y PP de 4 y 6 semanas de crecimiento, respectivamente. Cada plántula se retiró del medio de cultivo eliminando el exceso con agua destilada. Posteriormente se cortaron las raíces a 1cm de la base del tallo y se transfirieron a recipientes plásticos negros de 1L de capacidad. En cada recipiente se colocaron 15 plántulas. Cada plántula se dispuso en un “plug” de espuma y se insertó en los huecos de la cubierta plástica de los recipientes, que contenían 1L de solución Hoagland (Anexo 2) dilución 1:24. El sistema hidropónico se mantuvo en cámara de crecimiento (Fitotron Sanyo MRL-351H) por 14 días, con un fotoperíodo de 12h día (9435 luxes promedio) a 18°C y 12h noche a 16°C, con humedad relativa constante al 75%.

3.6.2 Preparación del inóculo de *Spongospora subterranea*, suspensiones celulares, inoculación con bacterias y evaluación de la enfermedad

Se produjeron suspensiones bacterianas bajo condiciones de asepsia para cada uno de los aislamientos a evaluar. El proceso consistió inicialmente de la siembra en masa de las cepas bacterianas, partiendo de colonias puras, en medios LB con rifampicina ($100\mu\text{g mL}^{-1}$). El material se incubó a 25°C por 48h. Posteriormente se recogió y suspendió la masa bacteriana en tubos Falcon® de 50mL que contenían 10mL de MgSO_4 0,1M, seguido de la agitación con vortex hasta homogenizar. De esta suspensión bacteriana se tomaron alícuotas que se adicionaron a una nueva solución de MgSO_4 0,1 M hasta obtener inóculos bacterianos de D.O. $0,200 \pm 0,005$ a 600nm, lectura hecha en el espectrofotómetro marca Espectronic®20 Genesys™.

Estas suspensiones se emplearon para inocular por inmersión las raíces de las plántulas *in vitro* previamente adecuadas, manteniéndolas en cámara de crecimiento bajo las condiciones señaladas previamente excepto por la luminosidad que correspondió a 4115 luxes, siguiendo la metodología propuesta por Merz (1989). Cumplidas 22h se retiraron las plántulas de las suspensiones bacterianas y se dispusieron en recipientes plásticos que contenían el inóculo del patógeno. Tres días antes, en cada uno de los recipientes se había adicionado 1L de solución Hoagland (1:5) y 0,2g de quistosoros de *Sss*. Una vez colocadas las plántulas, los recipientes se cerraron y se mantuvieron en la cámara de crecimiento bajo las condiciones ya establecidas. Se emplearon como control relativo, plantas con el patógeno sin bacterias (testigo de infección del patógeno) y como control absoluto, plantas sin el patógeno y sin las bacterias.

Posterior a la inoculación con bacterias y al finalizar la prueba se examinaron dos plántulas por cada tratamiento para confirmar la presencia de la bacteria y determinar colonización radical, mediante la recuperación de bacterias en medio LB con rifampicina ($100\mu\text{g mL}^{-1}$). El procedimiento se llevó a cabo de acuerdo a la metodología empleada por Beltrán (2001), cortando el sistema radical de cada plántula, luego se eliminó el exceso de bacterias no

adheridas a la raíz, por inmersión y agitación manual en una suspensión de 5mL de MgSO_4 0.1M por 10s. Posteriormente se retiró la raíz, se sumergió en una nueva suspensión de MgSO_4 0.1M y se agitó en vortex durante 30s. De esta suspensión se tomaron 100 μL y se hicieron diluciones seriadas 1 en 10. Finalmente se sembraron 100 μL de las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} para el proceso posterior a la inoculación con bacterias, mientras que para la recuperación final se sembraron las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} , en ambos casos la siembra se hizo por duplicado. El período de incubación fue de 48h a 25°C. Por último se hizo el recuento de unidades formadoras de colonias.

Cumplido un mes, se retiraron las plántulas del sistema. La variable utilizada para evaluar la eficacia de los aislamientos bacterianos fue el número de agallas por sistema radical.

3.6.3 Evaluación de la cepa IBUN Pfl 104 bajo diferentes dosis de inóculo de *Spongospora subterranea*

Con el aislamiento IBUN Pfl 104, se evaluaron tres dosis de inóculo de *Sss* (0.10g, 0.15g y 0.20g de quistosoros por litro de solución nutritiva) manteniendo las plántulas bajo las condiciones de la cámara de crecimiento ya descritas. El ensayo consistió en tres bandejas cada una con 12 plántulas inoculadas con bacterias donde cada bandeja correspondió a una concentración de inóculo de *Sss*, así como otras tres bandejas con plántulas no inoculadas con bacterias de igual manera para cada concentración de inóculo de *Sss*. Al término de un mes se procedió a contar el número de agallas por planta para cada uno de los tratamientos.

3.7 DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL BIOCONTROLADOR DE LOS AISLAMIENTOS SELECCIONADOS DE *Pseudomonas* spp. CONTRA *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea* BAJO CONDICIONES DE INVERNADERO EN PLANTAS DE PAPA.

A nivel de laboratorio se produjeron suspensiones bacterianas para cada uno de los aislamientos. Se siguió una metodología similar a la citada para el sistema bajo condiciones controladas. Luego se procedió a inocular con bacterias, mediante inmersión, el material de siembra, por un período de 15 minutos con agitaciones repetidas cada 3 minutos. Para *S. phureja* se empleó una dosis de 24mL de la suspensión por tubérculo-semilla. En el caso de *S. tuberosum*, se empleó una dosis de 8mL de inóculo por brote, mientras que para el material *in vitro* fue de 4mL por plántula.

Posteriormente en los invernaderos de la Facultad de Agronomía, se hizo la siembra de un tubérculo, brote ó plántula por sitio en materas plásticas que contenían alrededor de 200g de suelo naturalmente infestado procedente de la zona de Páramo de Guerrero, municipio de Zipaquirá. Posterior a la siembra se aumentó la presión de inóculo adicionando 2.5mg de quistosoros sitio⁻¹.

El diseño estadístico correspondió a un diseño completamente al azar. Por tratamiento se establecieron 8 unidades experimentales. Así para cada bioensayo se establecieron los testigos que correspondieron al control de enfermedad que consistió en material vegetal sin bacterizar sembrado en suelo con infestación natural (Control+) y en suelo tratado con Basamid® (0,16g Kg⁻¹ de suelo).

La evaluación de los bioensayos fue de tipo destructivo, ocho semanas después de la siembra y consistió en el conteo del número de agallas por planta.

3.8 ANÁLISIS DE DATOS

A partir de la información registrada, en el sistema hidropónico bajo condiciones controladas y las pruebas de invernadero, se determinó la relación porcentual entre el número de agallas registradas por planta respecto a la media del testigo, de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\text{Relación porcentual agallas por planta (Ag / Pl)} = \frac{\text{número de agallas por planta}}{\text{número promedio de agallas del control}} * 100$$

En la prueba de diferentes dosis de inóculo de *Sss*, se calculó la media del número de agallas por planta para cada uno de los tratamientos.

Para el análisis de datos se emplearon los programas SAS y Statistics implementando pruebas no paramétricas (Kruskall Wallis por pares) a un p-valor <0.05.

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 asterisco. Si los intervalos de confianza alrededor de dos medias no se sobrelapan, las dos medias son significativamente diferentes al 5%.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA

En esta parte del estudio se compararon cepas nativas con sus respectivos aislamientos Rif^r para determinar si la selección por resistencia a rifampicina había modificado las propiedades funcionales de antagonismo de las cepas nativas en cuanto a la producción de compuestos volátiles y producción de metabolitos fungistáticos contra *Rs*.

4.1.1 Evaluación de la capacidad antagónica *in vitro* contra *Rhizoctonia solani* a partir de la producción de compuestos volátiles

Tanto las cepas nativas como las Rif^r de los 10 aislamientos de *Pseudomonas* spp. evaluados produjeron compuestos volátiles que inhibieron el crecimiento de *Rs* (Figura 2).

El efecto inhibitorio del aislamiento IBUN Pfl 002 sobre el crecimiento de *Rs* es atribuible a su capacidad de producción de HCN, pruebas previas de caracterización del cepario al que pertenecen estos microorganismos indicaron que éste es el único de los aislamientos evaluados que produce este compuesto (Informe técnico, 2009)³.

Los tratamientos control, que consistieron en el enfrentamiento hongo contra hongo (H-H) y hongo contra medio inductor de HCN (H-TSA), no restringieron el crecimiento de *Rs*, lo cual indica que *Rs* no produce este tipo de compuestos inhibitorios y que la inhibición no se debe a la producción de desechos como CO₂.

³ Informe Técnico del proyecto “Evaluación de Estrategias de Control Biológico Para el Manejo de *Rhizoctonia solani* y *Spongospora subterraenea* en Cultivos de Papa” presentado por Universidad Nacional de Colombia y FEDEPAPA. 2009.

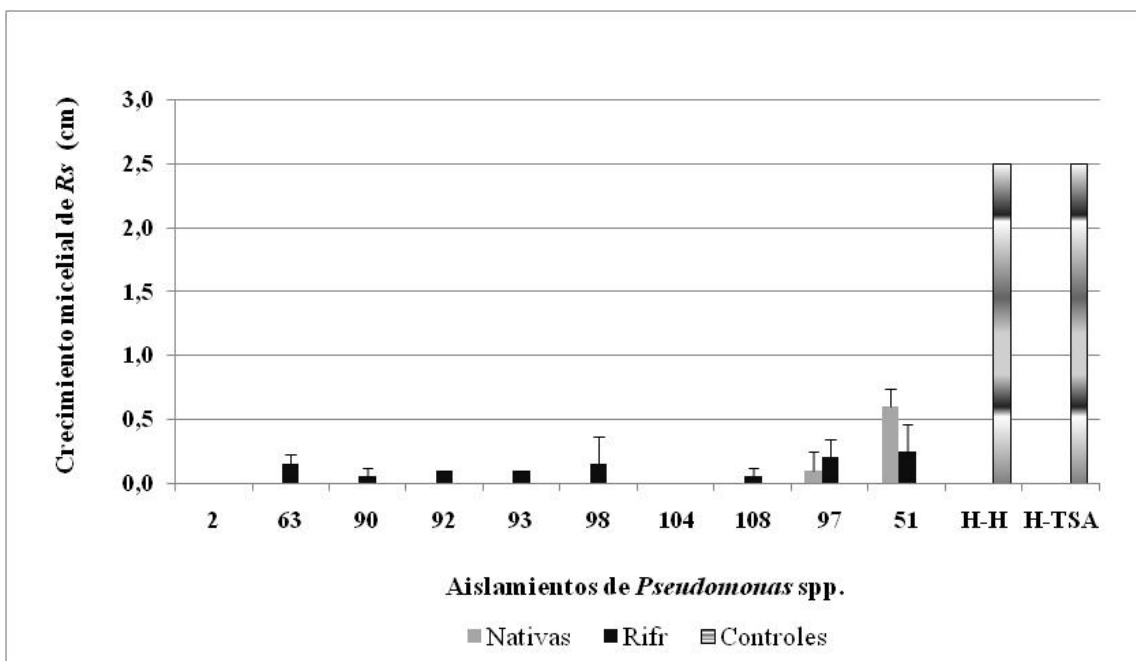


Figura 2. Efecto de la producción de compuestos volátiles por *Pseudomonas* spp. sobre el crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* *in vitro*. Para cada aislamiento nativo utilizado, Rif^r hace referencia al correspondiente aislamiento resistente a rifampicina. H-H se refiere a la evaluación de autoinhibición de crecimiento del aislamiento de *R. solani*. H-TSA se refiere a la evaluación del crecimiento de *R. solani* enfrentado con el medio TSA, inductor de producción de HCN. Se presenta la desviación estándar para cada uno de los tratamientos.

4.1.2 Evaluación de la capacidad antagonica *in vitro* de compuestos difusibles en agua contra *Rhizoctonia solani*

Cuando se evaluó el antagonismo de *Pseudomonas* mediante la producción de compuestos difusibles, ocho aislamientos tanto nativos como los correspondientes mutantes Rif^r, restringieron el crecimiento de *Rs*; este resultado coincide con lo reportado por Lara (2007) para las cepas nativas de los mismos aislamientos. Es de destacar que el aislamiento IBUN Pfl 002, que produce compuestos volátiles, no restringió el crecimiento de *Rs* mediante compuestos difusibles. Tampoco se observó restricción en el crecimiento de *Rs* con el aislamiento IBUN Pfl 063 ni con el tratamiento sin *Pseudomonas* (H) (Figura 3).

Los compuestos difusibles que intervienen en este antagonismo posiblemente se relacionan con la producción de antibióticos como fenazinas y floroglucinoles que han sido estudiados contra diferentes patógenos como *R. solani*, *G. graminis* var. *tritici*, y *F. oxysporum*.

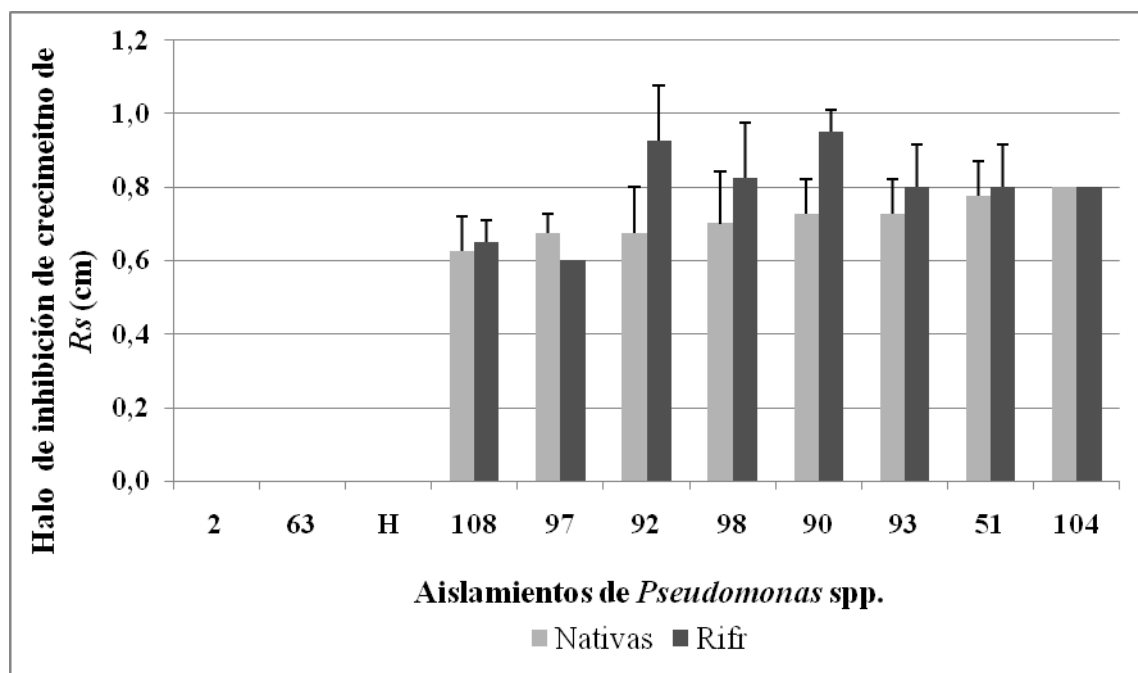


Figura 3. Efecto de la producción de compuestos difusibles en agua por *Pseudomonas* spp. sobre el crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* *in vitro*. Aislamientos de *Pseudomonas* nativas en gris y Rif^r en negro. H se refiere al crecimiento de *R. solani* sin la presencia de ningún aislamiento de *Pseudomonas*. Se presenta la desviación estándar para cada uno de los tratamientos.

4.2 EVALUACIÓN DEL POTENCIAL BIOCONTROLADOR DE LOS AISLAMIENTOS CONTRA *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea*

Se emplearon dos sistemas para la evaluación del potencial biocontrolador de los diez aislamientos de *Pseudomonas* spp. (IBUN Pfl 002, 051, 063, 090, 092, 093, 097, 098, 104 y 108) contra *Sss* en planta, el primero de ellos se hizo bajo condiciones controladas en un sistema hidropónico y el segundo bajo condiciones de invernadero empleando como sustrato suelo natural infestado.

4.2.1 Determinación del potencial biocontrolador de *Pseudomonas* spp. contra la infección de *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* en plantas de papa bajo condiciones controladas

4.2.1.1 Adecuación del sistema hidropónico

Para diseñar el procedimiento nos basamos en Merz (1989) y Merz *et al.* (2004) con las modificaciones resultantes de incluir aislamientos locales de *Pseudomonas* y variedades de papa colombianas. El inóculo de *Sss* se preincubó por tres días, y simultáneamente se promovió el crecimiento radical de las plántulas de papa mediante el corte de las mismas para su posterior exposición al inóculo del protozoo.

Inicialmente se empleó una concentración de quistosoros de $0,1\text{g.L}^{-1}$. El inóculo se preincubó por 3 días en solución nutritiva Hoagland (1:5). Las raíces de las plántulas de 7 días de crecimiento se bacterizaron por inmersión durante 15 minutos, y posteriormente se llevaron al sistema hidropónico con el inóculo de *Sss*. Tres días después se retiraron las plántulas de los recipientes que contenían el inóculo del protozoo y se colocaron en unos nuevos recipientes con solución nutritiva por otros 10 días. Al término de estos 10 días, se evaluó la enfermedad a nivel microscópico, mediante la tinción de raíces con azul de tripano en busca de signos típicos del patógeno, tales como plasmodios y/o zoosporangios al interior de las células radicales. Como no se observaron estructuras típicas del patógeno, optamos por duplicar la concentración de inóculo de *Sss* y extender el período de crecimiento radical una semana, el período de infección frente al patógeno a 5 días; el período de inoculación con bacterias a 22h y realizar las evaluaciones microscópicas a los 10, 14 y 18 días. A pesar de estas modificaciones, tampoco se observaron las estructuras del patógeno. Gómez *et al.* (2008) reportaron dificultades similares en estudios de infección de *Sss* en suelo empleando plantas DC, ya que no pudieron identificar claramente síntomas y signos del patógeno al interior de la raíz.

La falta de observaciones a nivel microscópico condujo a sustituir al cultivar DC por PP, reportado por Guerrero (2004) como un cultivar susceptible a *Sss* en raíz. Se mantuvieron las demás condiciones del ensayo anterior, excepto por el período de exposición al inóculo de *Sss*, el cual se decidió extender a un mes. Las evaluaciones por microscopía a diferentes intervalos no dieron ninguna evidencia de infección. Finalmente, luego de la exposición prolongada de las plántulas al inóculo de *Sss*, se evidenciaron síntomas de la enfermedad consistentes en agallas en la raíz. En consecuencia optamos por mantener cada una de las condiciones planteadas y continuar con la evaluación en el sistema hidropónico a nivel macroscópico. Estos resultados son relevantes y pertinentes, ya que por primera vez, hasta donde lo permite afirmar nuestra revisión de literatura, logramos reproducir la enfermedad causada por *Sss* en un cultivar de papa Colombiano bajo el sistema planteado. Este logro es importante, ya que abre posibilidades para realizar estudios puntuales de biología, comportamiento y manejo de este agente fitopatógeno en el contexto Colombiano.

4.2.1.2 Evaluación de la capacidad de colonización radical

Para cuantificar la capacidad de colonización de los aislamientos de *Pseudomonas* spp. Rif^r en las raíces de las plántulas de Parda Pastusa, se usó como variable la cantidad de células bacterianas recuperadas en forma de unidades formadoras de colonia (UFC) en medio agar LB suplementado con rifampicina a una concentración de 100 µg mL⁻¹.

En la tabla 1 se muestra el número de células recuperadas a partir de las suspensiones bacterianas (inóculo), así como la cantidad de bacterias adheridas al sistema radical post-inoculación con bacterias y aquellas que permanecieron hasta el momento de la evaluación final, para cada uno de los bioensayos realizados en el sistema hidropónico. La densidad de inóculo inicial estuvo entre 10¹⁰ y 10¹² UFC mL⁻¹, de las cuales quedaron adheridas a la raíz entre 10⁸ y 10¹⁰ UFC g⁻¹ de raíz seca una vez inoculadas con bacterias; para la evaluación final del ensayo, la colonización del sistema radical fluctuó entre 10⁶ y 10⁷ UFC g⁻¹ de raíz seca por planta. La cantidad de bacterias recuperadas por planta registrada en este estudio, es similar a las cifras reportadas entre 10⁵ y 10⁶ UFC por planta por Schmidt *et al.* (2004)

quienes emplearon como bacterias antagonistas a *P. fluorescens* y *P. corrugata*, para el control de *Pythium* spp. en plántulas de remolacha azucarera de 12 días de crecimiento.

Aparte de la diferencia entre aislamientos, estos resultados evidencian la gran capacidad de colonización radical por parte de los aislamientos de *Pseudomonas*, tanto por su capacidad de adhesión a las raíces de *S. tuberosum* como por su persistencia en el tiempo. Esta característica es fundamental para el potencial de cualquier agente antagonista de fitopatógenos, el cual debe tener alta capacidad de colonización y competencia, para obtener un efecto benéfico sobre las plantas (Haas y Defago, 2005).

Tabla 1. Recuento de unidades formadoras de colonia de los aislamientos nativos de *Pseudomonas* spp. para cada uno de los bioensayos en el sistema hidropónico.

Bioensayo	Material Vegetal	Aislamiento	UFC mL ⁻¹	UFC g ⁻¹ raíz de seca	
			Inóculo	Postinoculación con bacterias	Final ^d
1	Diacol	IBUN Pfl 104	7,47 x 10 ¹⁰	°ND	4,72 x 10 ⁶
	Capiro	IBUN Pfl 108	1,19 x 10 ¹⁰	ND	2,76 x 10 ⁷
2	Diacol	IBUN Pfl 097	3,88 x 10 ¹⁰	7,41 x 10 ⁸	6,48 x 10 ⁶
	Capiro	IBUN Pfl 098	ND	3,03 x 10 ⁹	4,26 x 10 ⁷
3	Diacol	IBUN Pfl 092	ND	1,15 x 10 ⁹	3,87 x 10 ⁷
	Capiro	IBUN Pfl 093	4,05 x 10 ¹¹	3,45 x 10 ⁹	ND
4	Diacol Capiro	IBUN Pfl 002	4,67 x 10 ¹¹	2,65 x 10 ⁹	4,58 x 10 ⁶
		IBUN Pfl 051	3,41 x 10 ¹¹	1,14 x 10 ¹⁰	1,50 x 10 ⁷
		IBUN Pfl 090	2,50 x 10 ¹⁰	1,62 x 10 ¹⁰	2,12 x 10 ⁷
		IBUN Pfl 092	1,96 x 10 ¹⁰	2,28 x 10 ¹⁰	2,96 x 10 ⁷
5	Parda Pastusa	IBUN Pfl 051	1,28 x 10 ¹²	2,00 x 10 ¹⁰	2,00 x 10 ⁵
		IBUN Pfl 063	4,61 x 10 ¹²	2,13 x 10 ¹⁰	1,79 x 10 ⁶
		IBUN Pfl 090	4,20 x 10 ¹²	1,18 x 10 ¹⁰	2,69 x 10 ⁶
		IBUN Pfl 093	1,04 x 10 ¹²	4,82 x 10 ¹⁰	1,56 x 10 ⁶

6	Parda Pastusa	IBUN Pfl 002	$2,00 \times 10^{10}$	$3,95 \times 10^9$	$2,26 \times 10^6$
		IBUN Pfl 092	$8,80 \times 10^{11}$	$2,87 \times 10^{10}$	$1,91 \times 10^6$
		IBUN Pfl 097	$2,67 \times 10^{12}$	$6,78 \times 10^9$	$1,19 \times 10^6$
		IBUN Pfl 098	$1,30 \times 10^{12}$	$1,16 \times 10^{10}$	$1,47 \times 10^6$
7	Parda	IBUN Pfl 104	$7,30 \times 10^{12}$	ND	$2,88 \times 10^7$
	Pastusa	IBUN Pfl 108	$2,70 \times 10^{12}$	ND	$2,11 \times 10^6$
1,2,3,5, 6 y		^a Control+	0,00	0,00	0,00
7		^b Control -	0,00	0,00	0,00

^aControl +: plántulas en presencia de *Sss* sin *Pseudomonas* spp.

^bControl -: plántulas en ausencia de *Sss* y de *Pseudomonas* spp.

^cND: no determinado.

^dFinal: se refiere a la cantidad de células recuperadas al momento de la evaluación del bioensayo.

4.2.1.3 Evaluación de la capacidad biocontroladora de los aislamientos de *Pseudomonas* spp.

Los síntomas observados en las plántulas PP infectadas con *Sss* bajo el modelo de hidroponía coincidieron con la descripción hecha por Hooker (1980) como nodulaciones a manera de agallas de color blanco lechoso en la raíz en plantas infectadas (Anexo 3). Al contar las agallas se observó que éstas se concentraron cerca de la base del tallo.

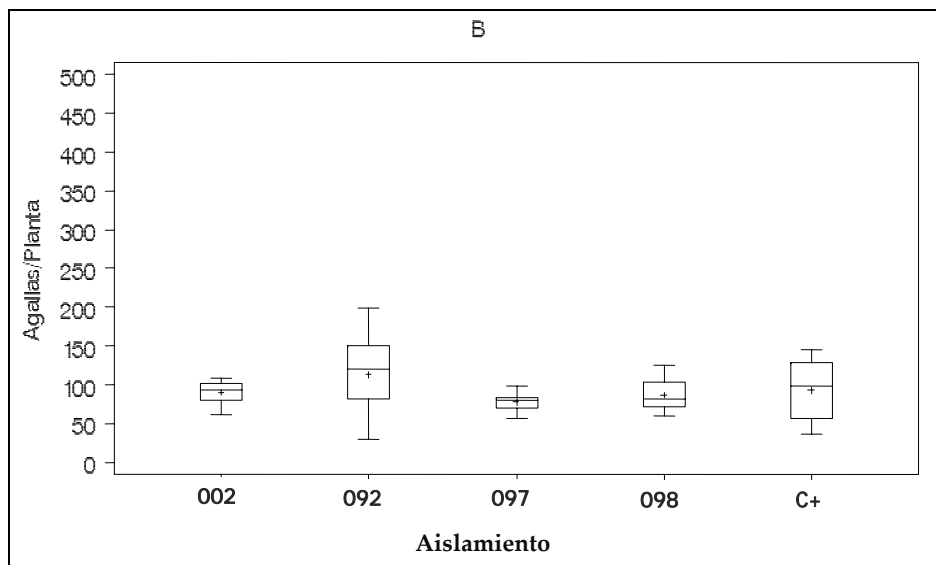
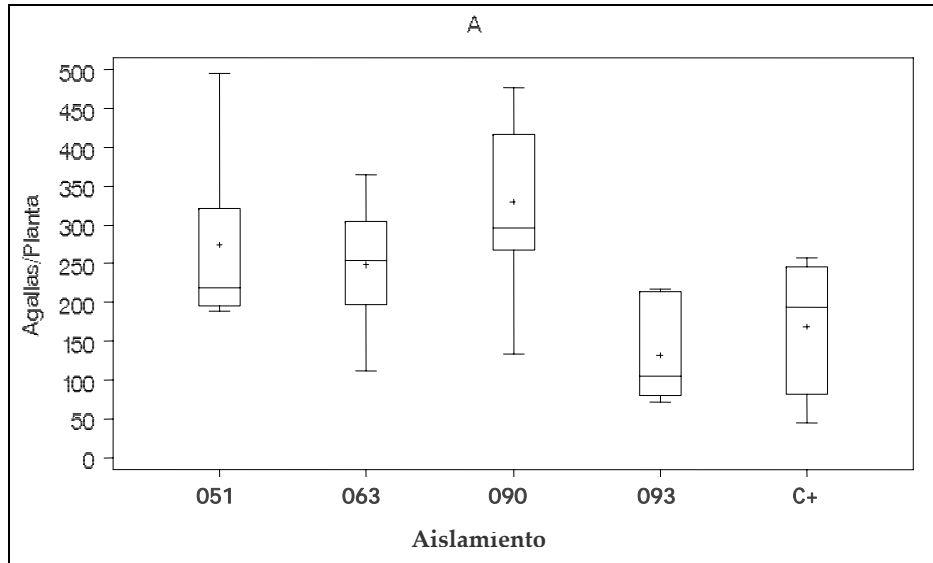
En la figura 4 (A, B y C) se representa mediante el diagrama de caja y bigotes el número de agallas en tres ensayos independientes, con cada uno de los aislamientos bacterianos evaluados en PP y su respectivo control sin *Pseudomonas* (C+).

Los aislamientos IBUN Pfl 051, 063 y 090 (Figura 4A), presentaron mayor número promedio de agallas por planta (A/Pl) que C+, es decir que no tienen la capacidad de restringir la formación de agallas bajo el sistema evaluado; el aislamiento IBUN Pfl 092 (Figura 4B) también presentó un número mayor de agallas que el testigo.

El aislamiento 093 (Figura 4A) redujo el número de agallas por planta respecto al testigo. Según el diagrama de caja y bigotes, el 75% de las plantas inoculadas con este aislamiento presentó menos de 197 A/Pl, mientras que para el control solo el 50% de las plantas presentó menos de 193 A/Pl. Un comportamiento similar se observó con los aislamientos IBUN Pfl 002, 097 y 098 (Figura 4B); la variación y distribución de los datos para estos aislamientos fueron menores respecto al C+; en efecto, el 75% de los individuos evaluados para los tres aislamientos presentó menos de 102, 84 y 105 A/Pl, respectivamente; estos valores son inferiores a los obtenidos para el 50% de las plantas del tratamiento C+.

Los aislamientos IBUN Pfl 104 y 108 (Figura 4C) también redujeron el número de agallas frente al control. Con estos dos aislamientos, el 75% de la población presentó menos de 30 y 3 A/Pl respectivamente, con una variación de datos menor para ambos aislamientos, respecto al tratamiento C+, reflejando su potencial como agentes biocontroladores. En cuanto al tratamiento C+, el 25% de los individuos presentó más de 28 A/Pl.

El número de agallas promedio del tratamiento C+ fue cada vez menor entre bioensayos, el primero presentó 170 A/Pl (Figura 4A); el segundo 92 A/Pl y el tercero 53 A/Pl (Figura 4C). Vale la pena mencionar que los ensayos se establecieron en un período de ocho meses empleando la misma fuente de inóculo de *Sss*, lo que posiblemente indica que su viabilidad pudo ser afectada por el tiempo. Este factor pudo determinar el potencial controlador de los aislamientos bacterianos una vez que a menor viabilidad del patógeno mayor oportunidad de los aislamientos para ejercer un efecto de control.



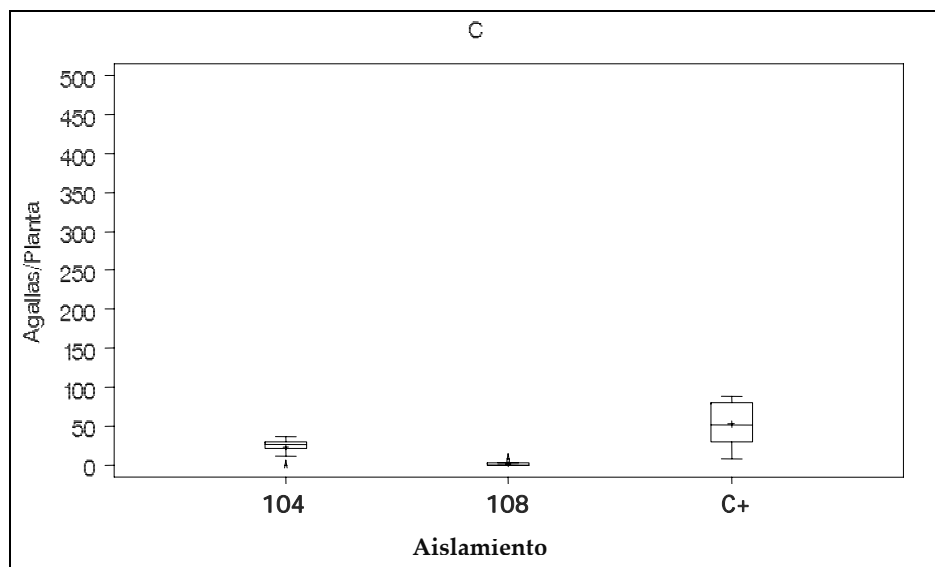


Figura 4. Efecto de aislamientos de *Pseudomonas* spp., inoculadas en raíces de plántulas de papa *in vitro* cultivar Parda Pastusa en un sistema hidropónico bajo condiciones controladas, sobre la formación de agallas por parte de *Spongospora subterranea*. Las figuras A, B y C representan tres ensayos independientes realizados sucesivamente. C+ corresponde al control positivo (Sin *Pseudomonas*+inóculo de Sss). Los datos son presentados como diagrama de caja y bigote. La línea superior horizontal de cada caja, corresponde al percentil 75 y la inferior al percentil 25. La línea vertical representa el 95% de los datos. El signo positivo corresponde a la media del tratamiento.

La relación porcentual de cada uno de los aislamientos respecto al tratamiento C+ (Tabla 2) permitió determinar que los aislamientos IBUN Pfl 104 e IBUN Pfl 108 redujeron la formación de agallas en 53,11 y 96,62% respectivamente comparado con el control positivo, mientras para los aislamientos IBUN Pfl 093 e IBUN Pfl 097 la reducción de agallas fue de 22,13% y 15,58%, respectivamente, y para los aislamientos IBUN Pfl 002 e IBUN 098 tan solo de 2,04% y 6,06 % respectivamente. En cambio, los cuatro aislamientos restantes (IBUN Pfl 092, 063, 051, 090) aumentaron la formación de agallas comparados con el C+, hasta en un 94% para el aislamiento IBUN Pfl 090. En el control negativo, sin presencia del patógeno, no hubo formación de agallas en la raíz

Tabla 2. Efecto de diez aislamientos de *Pseudomonas* spp. sobre la formación de agallas en la raíz por *Spongospora subterranea* en plantas de *Solanum tuberosum*, cultivar Parda Pastusa, bajo condiciones controladas.

Tratamiento	Ag/PI*
IBUN Pfl 108	3.38a
IBUN Pfl 104	46.89ab
IBUN Pfl 093	77.87abc
IBUN Pfl 097	84.42abcd
IBUN Pfl 098	93.94bcd
IBUN Pfl 002	97.94bcd
IBUN Pfl 092	122.62cd
IBUN Pfl 063	146.68cd
IBUN Pfl 051	161.90cd
IBUN Pfl 090	194.69d

*Los valores presentados corresponden a la relación porcentual entre el número de agallas registradas por planta y la media del control positivo, entendida como el 100% de enfermedad. Valores seguidos por la misma letra no son estadísticamente diferentes por Kruskall Wallis por pares (p-valor<0.05) (Anexo 4).

La capacidad de *Sss* de producir agallas en raíces de papa bajo condiciones de hidroponía presentó un amplio rango de respuesta frente a los diez aislamientos de *Pseudomonas* evaluados. En comparación con la condición de ausencia de la bacteria, esta capacidad se estimuló con los aislamientos IBUN Pfl 092, 063, 051 y 090, se redujo hasta en un 16% con los aislamientos IBUN Pfl 002, 097 y 098, y cayó a niveles que pueden considerarse de biocontrol con los aislamientos IBUN Pfl 093, 104, 108. Esta amplitud de respuesta invita a considerar las condiciones experimentales.

El sistema hidropónico pudo favorecer la proliferación de agallas, pues, como lo mencionan D'aes *et al.* (2009), facilita la actividad de las zoosporas (Braselton, 1996), que por su capacidad natatoria constituyen devastadores mecanismos de infección. Otro aspecto del sistema hidropónico que favorece la infección es la fácil difusión de los quimioatrayentes o

exudados radicales liberados por las plantas, que orientan el movimiento de las zoosporas hacia las raíces (de Souza *et al.*, 2003).

De acuerdo a Shippers *et al.* (1988) (citado por van Peer *et al.*, 1990) la producción de metabolitos fitotóxicos por bacterias en la endorizosfera de plantas crecidas en sistemas hidropónicos, particularmente componentes de tipo gaseoso, pueden permanecer atrapados en los tejidos de las raíces afectando su fisiología, aspecto que posiblemente pueda determinar la sensibilidad de las raíces frente a la infección de *Sss* y por tanto estimular la proliferación de la enfermedad, cabe recordar que los aislamientos bacterianos incluidos en este estudio producen compuestos volátiles de acuerdo a los resultados obtenidos para esta prueba.

4.2.1.4 Evaluación del aislamiento IBUN Pfl 104 bajo diferentes dosis de inóculo de *Spongospora subterranea*

La respuesta diferencial de *Sss* a los aislamientos de *Pseudomonas* spp. en términos de producción de agallas observada en el sistema hidropónico, condujo a explorar el efecto de la dosis de inóculo del patógeno. Se decidió emplear el aislamiento IBUN Pfl 104, que mostró un moderado potencial de control frente a *Sss* en el sistema hidropónico.

Los resultados mostraron que la capacidad de control del aislamiento IBUN Pfl 104 fue dependiente de la dosis de quistosoros. En la figura 5 se observa el potencial controlador de IBUN Pfl 104 de acuerdo a las diferentes dosis de inóculo de *Sss*, para cada una de las cuales se presentó reducción sobre la expresión de síntomas en raíz respecto al tratamiento sin *Pseudomonas*, siendo una respuesta significativa la obtenida bajo 0,10 g de *Sss*. No se observó un aumento significativo de agallas a una mayor dosis de inóculo de *Sss* cuando las plantas no fueron inoculadas con bacterias. Mientras las plantas tratadas con el aislamiento bacteriano presentaron mayor cantidad de agallas por planta a dosis mayores del patógeno.

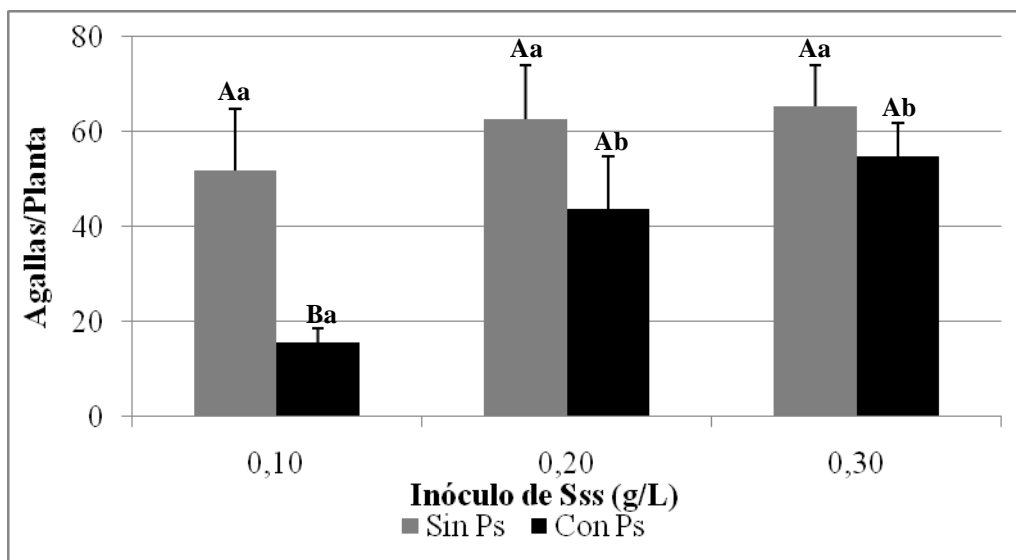


Figura 5. Efecto de las dosis de inóculo de *Spongospora subterranea* sobre la formación de agallas en raíces de plántulas *in vitro* cultivar Parda Pastusa sin bacterizar o inoculadas con bacterias con el aislamiento de *Pseudomonas* IBUN Pfl 104 en un sistema hidropónico bajo condiciones controladas. Valores seguidos por la misma letra no son estadísticamente diferentes por Kruskal Wallis por pares (p -valor<0.05). Letras en mayúscula corresponden a la asignación estadística dentro de la dosis y letras en minúscula corresponden a la asignación estadística entre dosis de Sss, con o sin *Pseudomonas*.

Los resultados confirman, al menos para este aislamiento, que la dosis de inóculo de Sss afecta cuantitativamente la interacción entre el patógeno y la bacteria, y sugieren que la respuesta diferencial observada previamente se pudo deber a la cantidad y/o viabilidad de inóculo empleado en cada una de las. Esta evidencia corrobora la importancia de conocer no solo los mecanismos de acción de los agentes biocontroladores contra patógenos de plantas, sino de los factores que afectan y determinan la eficacia e interacciones que se dan bajo un proceso de biocontrol. (Johnson, 1994; Raaijmakers *et al.*, 1995).

Larkin y Fravel (1999) evaluaron tres aislamientos no patogénicos de *Fusarium* spp. como controladores biológicos contra *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* bajo diferentes dosis tanto de los agentes antagonistas como de los patogénicos. De acuerdo a los resultados tanto el tipo de aislamiento biocontrolador, como la concentración del patógeno y del mismo antagonista afectaron significativamente el desarrollo de *Fusarium* en tomate, coincidiendo con los resultados obtenidos en el presente estudio.

4.2.2 Determinación del potencial biocontrolador de *Pseudomonas* spp. contra la infección de *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* en plantas de papa bajo condiciones de invernadero

Esta fase del estudio de la capacidad biocontroladora de los diez aislamientos de *Pseudomonas* sobre *Sss* se realizó con suelo naturalmente infestado, en reconocimiento que el suelo es el medio natural donde se dan las interacciones entre hospedantes, patógenos y la comunidad biótica. El suelo se colectó en la zona del páramo de Guerrero, Zipaquirá. Se usaron dos especies de papa, *S. phureja* (cv. Criolla Colombia) y *S. tuberosum* (cv. Diacol Capiro, Parda Pastusa y Pastusa Suprema). El ensayo se llevó a cabo en los invernaderos de la Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía.

La concentración de la suspensión de bacterias usada para inocular los tubérculos fluctuó entre 10^9 y 10^{12} UFC mL⁻¹. La cantidad de células recuperadas de tubérculos semilla, previo a la siembra, de *S. phureja* fluctuó entre 10^5 y 10^6 UFC g⁻¹ de peso fresco de tubérculos, y de *S. tuberosum* entre 10^6 y 10^7 UFC g⁻¹ de peso fresco (resultados no mostrados). Se destaca una vez más la importancia de estos resultados de colonización relacionados con procesos de establecimiento y competencia en un ambiente rizosférico que pueden además determinar la capacidad antagonista de estos microorganismos frente a un agente fitopatógeno (Schmidt *et al.*, 2004; Haas y Défago, 2005).

4.2.2.1 Evaluación de la capacidad biocontroladora de *Pseudomonas* spp. contra *Spongospora subterranea* en *Solanum phureja*

Para esta etapa del estudio se montaron 10 bioensayos, en seis de los cuales se logró infección de las plantas en el tratamiento sin aplicación de la bacteria (control positivo). Se consideró como primera evaluación el conjunto de tres bioensayos exitosos donde se evaluaron nueve de los aislamientos bacterianos y como segunda evaluación, el conjunto de los otros tres bioensayos exitosos. La evaluación del efecto de los aislamientos bacterianos contra *Sss* se llevó a cabo contando el número de agallas producidas por planta, de forma

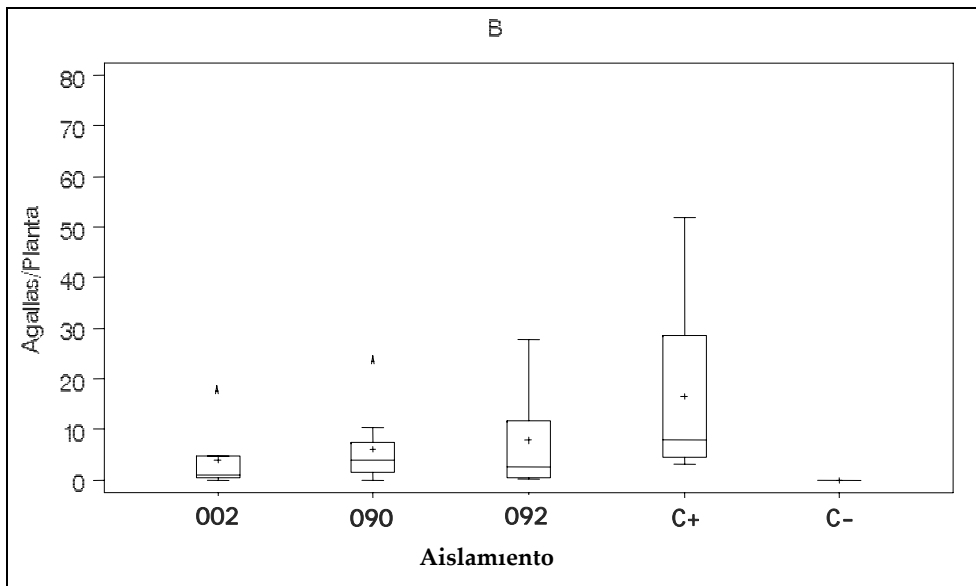
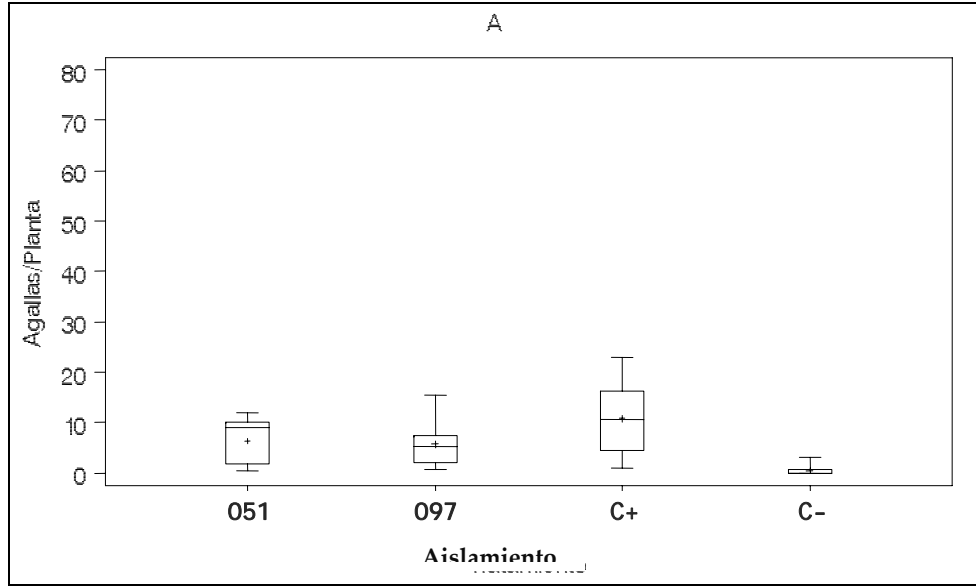
similar a los ensayos en el sistema hidropónico bajo condiciones controladas. El número de agallas por planta (promedio de tres ensayos) para el control positivo fue de 18.32 para la primera evaluación y de 14.23, para la segunda.

En las figuras 6 y 7 se presenta la distribución de los datos con los diagramas de caja y bigotes para cada uno de los aislamientos bacterianos evaluados en *S. phureja* y sus respectivos controles. La figura 6 (A, B, C) corresponde a la primera evaluación y la figura 7 (A,B,C) a la segunda.

Los aislamientos IBUN Pfl 097 y 051 redujeron el número de agallas con respecto al testigo sin inoculación con bacterias (Figura 6A). El 75% de las plantas evaluadas presentó menos de 8 y 10 agallas promedio por planta (A/Pl) respectivamente, mientras que en el tratamiento C+ solo el 50% de las plantas tuvo menos de 10 A/Pl.

Los aislamientos IBUN Pfl 002, 090 y 092 también redujeron el número de agallas promedio por planta respecto al C+, el cual presentó una amplia variación de datos, comparado con los aislamientos bacterianos (Figura 6B). El 50% de las plantas inoculadas con bacterias con estos aislamientos formó menos de 1, 4 y 3 A/Pl, respectivamente, mientras que para el tratamiento C+ el 75% de la población evaluada presentó más de 4 A/Pl. En el control negativo (C-) no se produjeron agallas en la raíz.

Los aislamientos IBUN Pfl 098 y 108 también redujeron la formación de agallas (Figura 6C). El 50% de las plantas presentó menos de 17 y 27A/Pl respectivamente, mientras que el tratamiento C+ el 50% de las plantas presentó más de 27 A/Pl con una amplia variación de los datos. En el tratamiento C-, el máximo de agallas obtenido fue de 8 A/Pl.



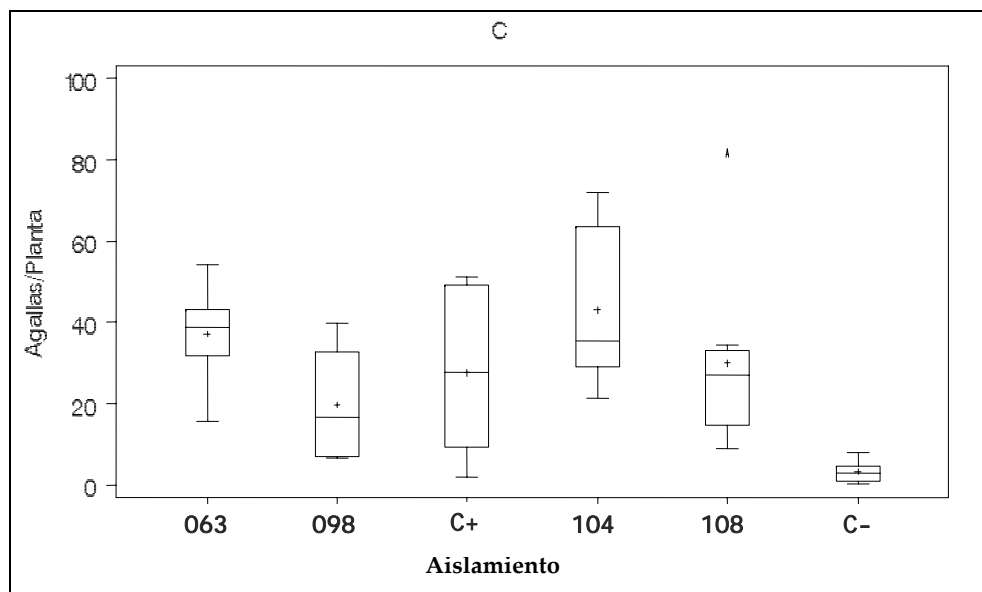
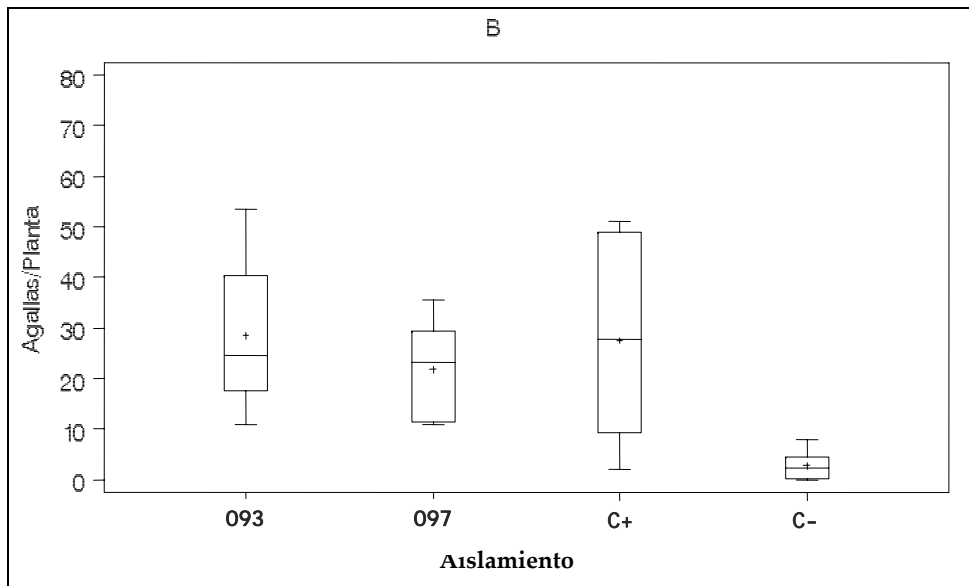
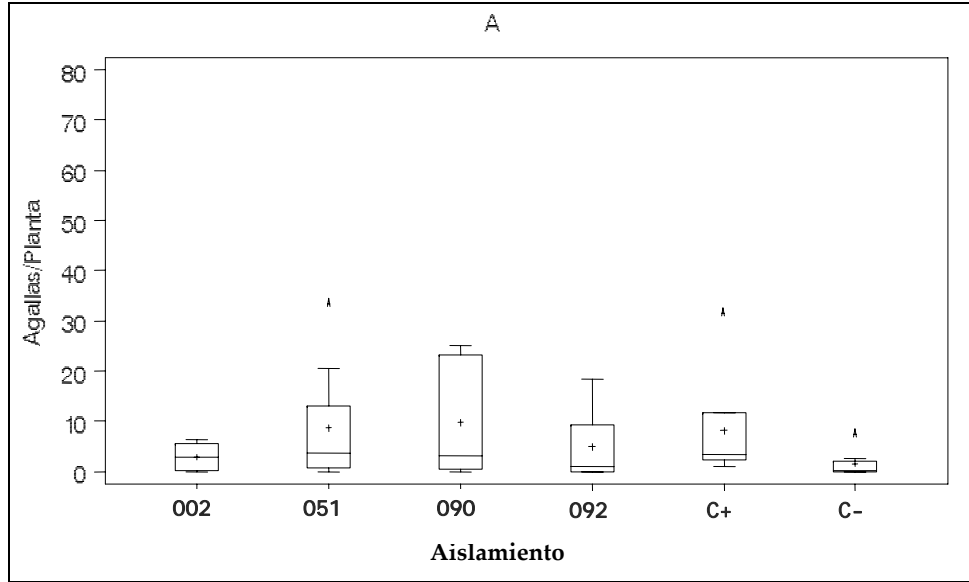


Figura 6. Efecto de aislamientos de *Pseudomonas* spp. sobre la formación de agallas por parte de *Spongospora subterranea* en *S. phureja* cultivar Criolla Colombia. Evaluación 1. Las figuras A, B y C representan tres ensayos independientes realizados sucesivamente. C+ corresponde al control positivo (sin *Pseudomonas*+ suelo infestado), C- corresponde al control negativo (sin *Pseudomonas*+ suelo desinfestado con Basamid®). Los datos son presentados como diagrama de caja y bigotes. La línea superior horizontal corresponde al percentil 75, la inferior al percentil 25. La línea vertical representa el 95% de los datos. Los asteriscos se definen como datos atípicos de más de 3 veces la distancia intercuartílica. El signo positivo corresponde a la media del tratamiento.

Los aislamientos IBUN Pfl 002 (Figura 7A), 098 y 108(Figura 7C) redujeron el número de agallas por planta respecto al C+ y presentaron una menor variación de los datos. Según el diagrama de caja y bigotes, el 50% de las plantas inoculadas con estos tres aislamientos presentaron menos de 4 A/Pl, mientras que para el tratamiento C+ el 50% de la población evaluada presentó más de 3 A/Pl. Los aislamientos IBUN Pfl 051, 090 y 092 (Figura 7A) presentaron mayor variación de los datos respecto al C+ y los aislamientos IBUN Pfl 093, 097 se comportaron de manera similar a C+, con medianas de 24, 23 y 27 A/Pl respectivamente (Figura 7B). El control negativo presentó el menor número de agallas y variabilidad en los tres ensayos establecidos.



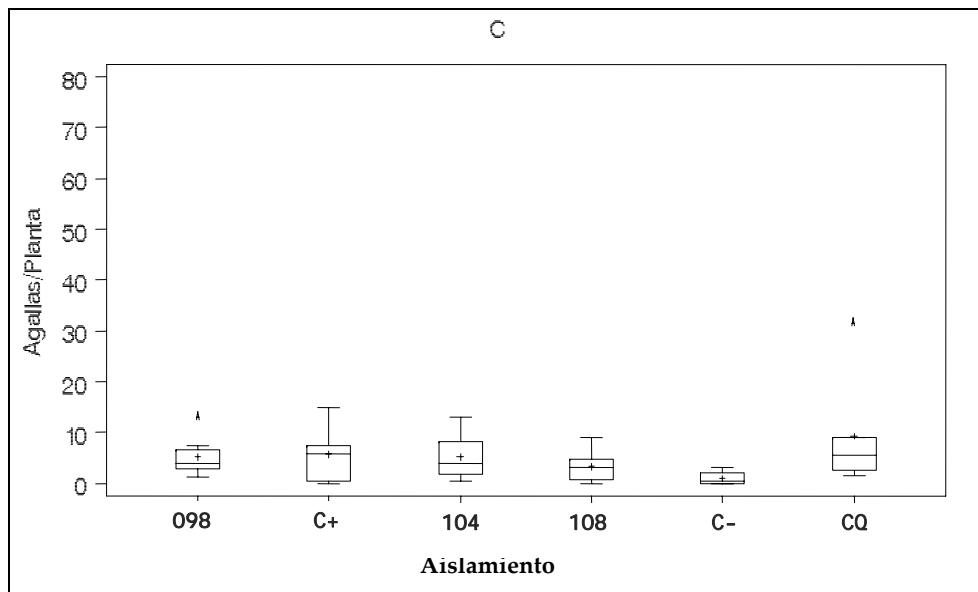


Figura 7. Efecto de aislamientos de *Pseudomonas* spp. sobre la formación de agallas por parte de *Spongospora subterranea* en *S. phureja* cultivar Criolla Colombia. Ensayo 2. Las figuras A, B y C representan tres ensayos independientes realizados sucesivamente. C+ corresponde al control positivo (sin *Pseudomonas*+suelo infestado natural), C- corresponde al control negativo (sin *Pseudomonas*+suelo desinfestado con Basamid®) y el control químico (Pulsor®+suelo infestado) a CQ. Los datos son presentados como diagrama de caja y bigotes (Ver figura 6 para explicación del diagrama).

En la tabla 3 se presenta el efecto cuantitativo de diez aislamientos de *Pseudomonas* spp. sobre la formación de agallas en raíces de *S. phureja* cultivar Colombia por *Sss* bajo condiciones de invernadero, como la relación porcentual entre el número de agallas producidas bajo cada aislamiento y el testigo sin inoculación con bacterias para las dos evaluaciones.

El aislamiento IBUN Pfl 002 redujo la formación de agallas entre 76% y 64% en las dos evaluaciones. Los aislamientos IBUN Pfl 092, 097 y 098 también redujeron la formación de agallas, aunque en menor medida que el aislamiento IBUN Pfl 002. Así IBUN Pfl 092 redujo la enfermedad entre 53 y 40%, IBUN Pfl 097 entre 47 y 21% e IBUN Pfl 098 entre 47 y 24%. Estos resultados confirman la capacidad de estos aislamientos bacterianos de controlar la producción de agallas por *Sss* en el suelo. Aunque el grado de antagonismo contra *Sss* de los aislamientos IBUN Pfl 051, 090, 104 y 108 varió entre réplicas, al menos

en una de ellas se redujo el número de agallas. El tratamiento al suelo con Basamid[®] sin inoculación con bacterias de la semilla redujo la producción de agallas por encima del 85%, mientras que Pulsor[®], como control químico (CQ), no tuvo efecto en esa variable.

En síntesis, los aislamientos IBUN Pfl 002 y 092 de *Pseudomonas* spp. mostraron la mayor capacidad de control contra *Sss* en *S. phureja* cultivar Colombia expresada como una menor cantidad de agallas por planta comparada con el control positivo con niveles de reducción de enfermedad superiores a 40% para las evaluaciones 1 y 2; luego vienen los aislamientos IBUN Pfl 097 y 098. Estos resultados son promisorios ya que hoy no se cuenta con prácticas de control efectivas para el manejo de la enfermedad. El uso de estos aislamientos puede contribuir a reducir el inóculo presente en los suelos e incidir positivamente en los niveles de producción y calidad del producto comercializable. En ese sentido, no se debe desestimar la modesta actividad antagónica de los aislamientos IBUN 051, 090 y 097.

Los datos de la evaluación 1 para los aislamientos IBUN Pfl 002, 090, 092, 063 y 104 no son diferentes significativamente. No obstante, la estadística descriptiva apoyada en las gráficas de caja, permite detectar diferencias entre ellos. Así, los datos para los aislamientos IBUN Pfl 002, 090 y 092 (Figura 6B) fueron más consistentes respecto a la distribución del control positivo, lo que sugiere un mejor efecto de restricción en la producción de agallas. En cambio, los datos obtenidos para los IBUN 063 y 104 fueron más variables y reflejaron una mayor cantidad de agallas respecto al control. Estos resultados sugieren diferencias de comportamiento dependientes del aislamiento evaluado frente a *Sss* para el cultivar criolla Colombia.

El efecto de algunos de los aislamientos de *Pseudomonas* spp. sobre la formación de agallas varió entre evaluaciones, lo que pudo deberse a cambios en las condiciones ambientales, ya que corresponden a ensayos hechos en tiempos diferentes. Alzate *et al.* (2008) citan que la liberación de zoosporas, estructuras infectivas del fitopatógeno, está influenciada por la temperatura; sus resultados sugieren que a temperaturas mayores de 25°C hay menor cantidad de liberación de zoosporas y a temperaturas de 5°C no hay liberación; de esta

manera, la producción de agallas como parámetro de la capacidad de control por parte de los aislamientos pudo haber sido afectada por esta condición

Tabla 3. Efecto de diez aislamientos de *Pseudomonas* spp. sobre la formación de agallas en raíces de plantas de *Solanum phureja* cultivar Colombia por *Spongospora subterranea* bajo condiciones de invernadero.

Tratamiento	Ag/Pl ^w	
	^x E1	^y E2
Control -	4,46a	16,54a
IBUN Pfl 002	24,01ab	35,25ab
IBUN Pfl 090	37,02abc	119,41c
IBUN Pfl 092	47,09abc	59,80ab
IBUN Pfl 097	52,76abc	79,19ab
IBUN Pfl 051	59,10abc	105,38ab
IBUN Pfl 098	71,73abc	75,65ab
IBUN Pfl 108	108,63bc	48,51ab
IBUN Pfl 063	134,39b	^z ND
IBUN Pfl 104	155,58b	75,80ab
IBUN Pfl 093	ND	103,25c
Pulsor	ND	112,36c

^wValores presentados corresponden a la relación porcentual entre el número de agallas registradas por planta y la media del control positivo, entendida como el 100% de enfermedad. Valores seguidos por la misma letra no son estadísticamente diferentes por Kruskal Wallis por pares (p-valor<0.05) (Anexo 4).

^xEvaluación 1

^yEvaluación 2

^zValor no determinado.

4.2.2.2 Evaluación de la capacidad biocontroladora de diez aislamientos de *Pseudomonas* spp. contra *Spongospora subterranea* en *Solanum tuberosum*

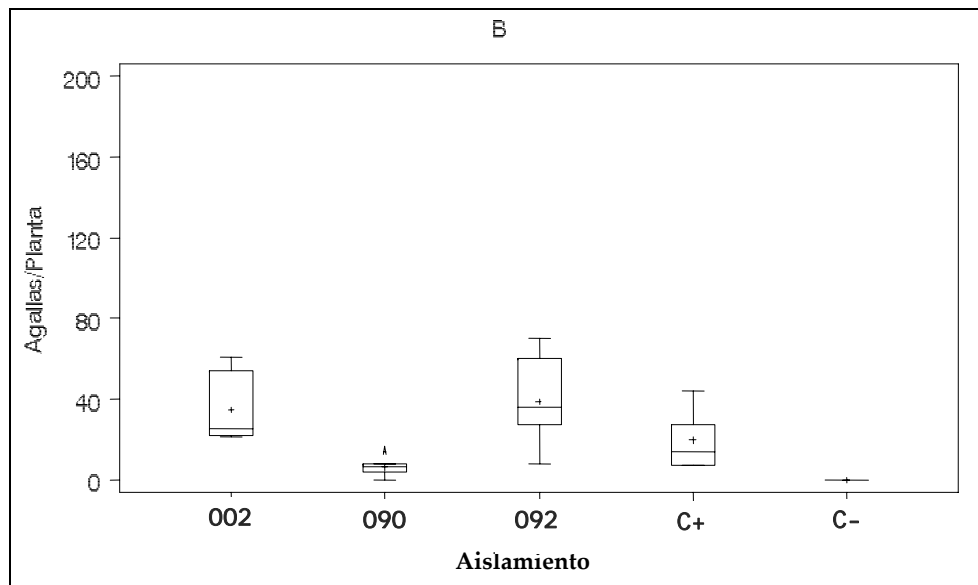
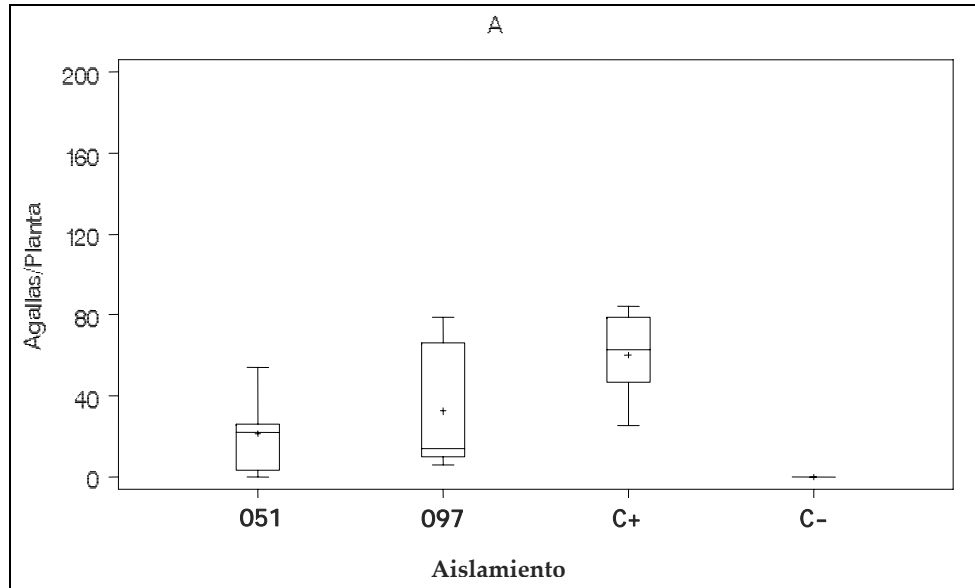
Para evaluar la capacidad controladora de los aislamientos de *Pseudomonas* spp. en tres cultivares de *S. tuberosum* (DC, PP, PS), se establecieron once bioensayos de los cuales

cuatro no se consideraron exitosos porque el testigo no presentó síntomas en raíz . Para DC se evaluaron nueve aislamientos en tres ensayos, así: [051 y 097], [2, 90 y 92] y [63, 93, 104 y 108] (Figura 8); para PP se evaluaron ocho aislamientos en dos ensayos, así: [2, 92, 97 y 98] y [63, 93, 104 y 108] (Figura 9); para PS se evaluaron los 10 aislamientos en dos ensayos, así: [69, 90, 93, 104 y 108] y [2, 51, 92, 97 y 98] (Figura 10).

Diacol Capiro. Cuando se evaluaron los aislamientos IBUN Pfl 051 e IBUN Pfl 097 (Figura 8A), ambos redujeron el número de agallas con respecto al testigo positivo. El aislamiento 051 tuvo un efecto reductor con mediana en 22 A/Pl y el 75 % de las plantas con menos de 26 A/Pl, contra el testigo positivo (C+) con mediana en 63 A/Pl y el 25% de la población con hasta 47 A/Pl. El aislamiento 097 presentó adicionalmente una distribución asimétrica positiva consistente en que el 50% de las plantas tuvo entre 6 y 16 A/Pl, con mediana en 14. Lo que refuerza su papel como agente de biocontrol. En el tratamiento C- no hubo formación de agallas.

Cuando se evaluaron los aislamientos IBUN Pfl 002, 090 y 092 (Figura 8B), el aislamiento IBUN Pfl 090 presentó la menor variación, con un efecto reductor sobre la formación de agallas; el máximo número de A/Pl fue de 15 y el 75% de los individuos presentó menos de 8 A/Pl. En el tratamiento C+, el 75% de las plantas presentó más de 7 A/Pl. Para los aislamientos IBUN Pfl 002 y 092 se observó que el 75% de las plantas evaluadas presentó más de 25 y 36 A/Pl. En el tratamiento C- no hubo formación de agallas.

Cuando se evaluaron los aislamientos 063, 093, 104 y 108, el diagrama muestra el potencial de los aislamientos IBUN Pfl 104 y 108 como agentes biocontroladores para reducir la formación de agallas, ya que el 100% de los individuos evaluados presentó menos de 104 y 105 A/Pl, respectivamente, mientras que para el tratamiento C+ el 100% de los individuos presentaron más de 111 A/Pl. Respecto a IBUN Pfl 63 y 93 el 50% de los individuos presentaron menos de 111 A/Pl. En el tratamiento C+ se contaron más de 111 A/Pl para el 100% de los individuos.



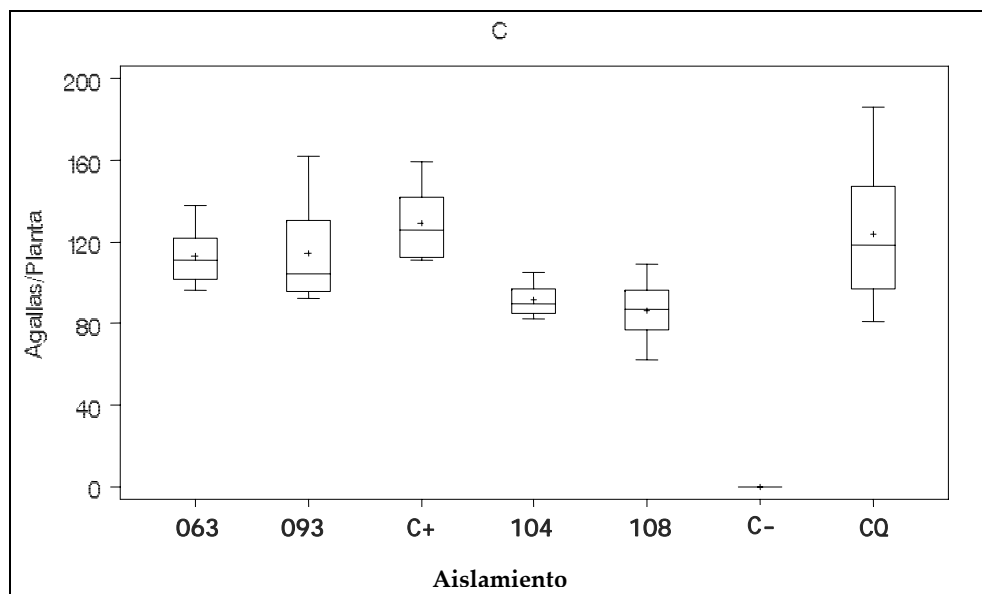


Figura 8. Efecto de aislamientos de *Pseudomonas* spp. sobre la formación de agallas por parte de *Spongospora subterranea* en *S. tuberosum*. Las figuras A, B y C representan tres ensayos independientes realizados sucesivamente en plantas Diacol Capiro. C+ corresponde al control positivo (sin *Pseudomonas*+suelo infestado), C- corresponde al control negativo (sin *Pseudomonas*+suelo desinfestado con Basamid®) y el control químico (Pulsor®+suelo infestado) a CQ. Los datos son presentados como diagrama de caja y bigote (Ver figura 6 para explicación del diagrama).

Parda Pastusa. Cuando se evaluaron los aislamientos IBUN Pfl 002, 092, 097 y 098 (Figura 9A), ninguno de los aislamientos redujo el número de agallas con respecto al testigo. La mediana del control positivo fue de 38 A/Pl contra 73 A/Pl para el aislamiento 002, 58 A/Pl para el aislamiento 092, 53 A/Pl para el aislamiento 097 y 55 A/Pl para el aislamiento 098.

El otro ensayo, donde se evaluaron los aislamientos IBUN Pfl 063, 093, 104 y 108 (Figura 9B) se encontró que solamente IBUN Pfl 108 redujo la formación de agallas, con menos de 16 A/Pl para el 50% de las plantas evaluadas en comparación con 17 A/Pl para el C+. No hubo efecto de control por parte del tratamiento CQ, y en el C- no se expresó la enfermedad.

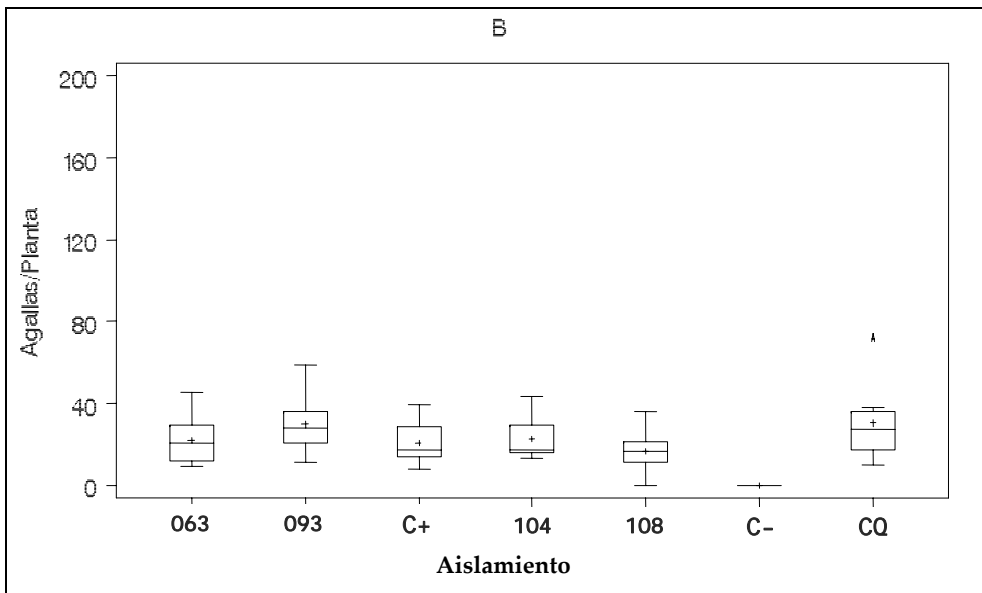
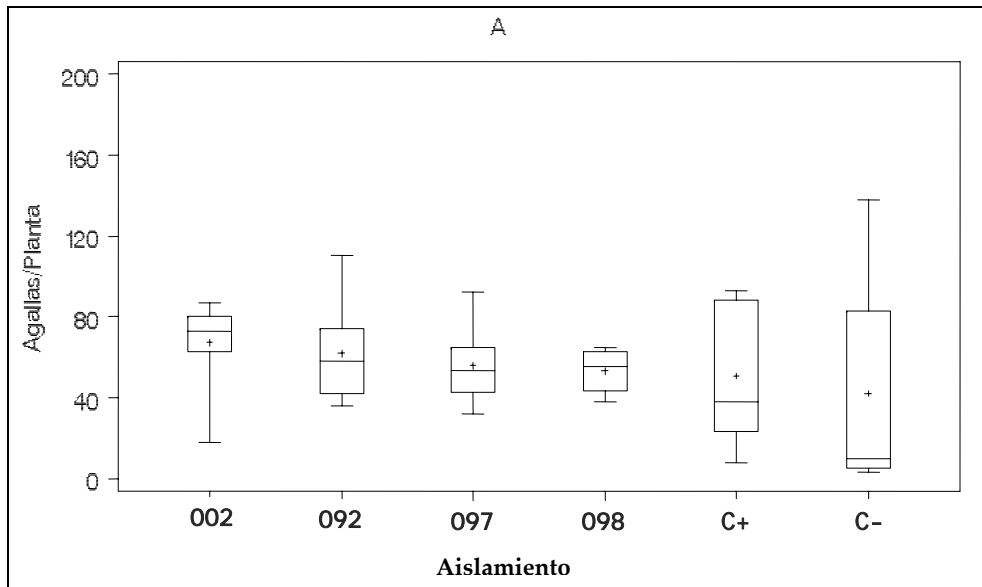
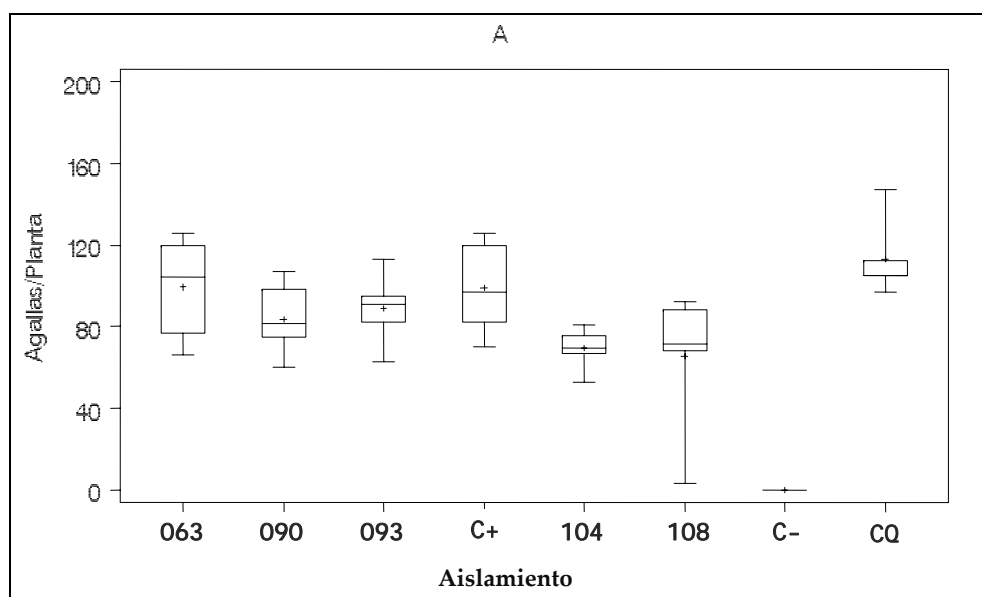


Figura 9. Efecto de aislamientos de *Pseudomonas* spp. sobre la formación de agallas por parte de *Spongospora subterranea* en *S. tuberosum*. Las figuras A y B representan dos ensayos independientes realizados sucesivamente en plantas Parda Pastusa. C+ representa el control positivo (sin *Pseudomonas*+suelo infestado), C- corresponde al control negativo (sin *Pseudomonas*+suelo desinfestado con Basamid®) y el control químico (Pulsor®+suelo infestado) a CQ. Los datos son presentados como diagrama de caja y bigote (Ver figura 6 para explicación del diagrama).

Pastusa Suprema. Los aislamientos IBUN Pfl 063, 090, 093, 104 y 108 se evaluaron en un mismo ensayo (Figura 10A). Los aislamientos IBUN Pfl 104, 108, 093 y 090 mostraron un efecto restrictivo sobre la producción de agallas en raíces. El máximo número de agallas para IBUN Pfl 104 fue de 81 A/Pl, mientras para el C+ el 75% de las plantas presentaron más de 82 A/Pl. Respecto a IBUN Pfl 108 y 093 el 75% de los individuos evaluados presentaron menos de 95 A/Pl, valores inferiores a la mediana del C+ (97 A/Pl). No hubo expresión de síntomas relacionados con *Sss* en el C-. Respecto al tratamiento CQ no hay evidencia de control de la enfermedad, el 75% de las plantas presentaron más de 92 A/Pl.

En el segundo ensayo se evaluaron los aislamientos 002, 051, 092, 097 y 098 (Figura 10B). Los aislamientos 002 y 051 presentaron el mayor efecto en la reducción del número de agallas por planta. Se pudo determinar que para IBUN Pfl 002 el 75% de las plantas presentaron menos de 109 A/Pl, mientras 50% de las plantas para IBUN Pfl 051 presentaron menos de 75 A/Pl. Los tratamientos bacterianos restantes, incluido el C+ y CQ presentaron más de 106 A/Pl para el 50% de las plantas evaluadas en cada uno de ellos. Respecto al C- el 100% de las plantas evaluadas presentaron menos de 34 A/Pl.



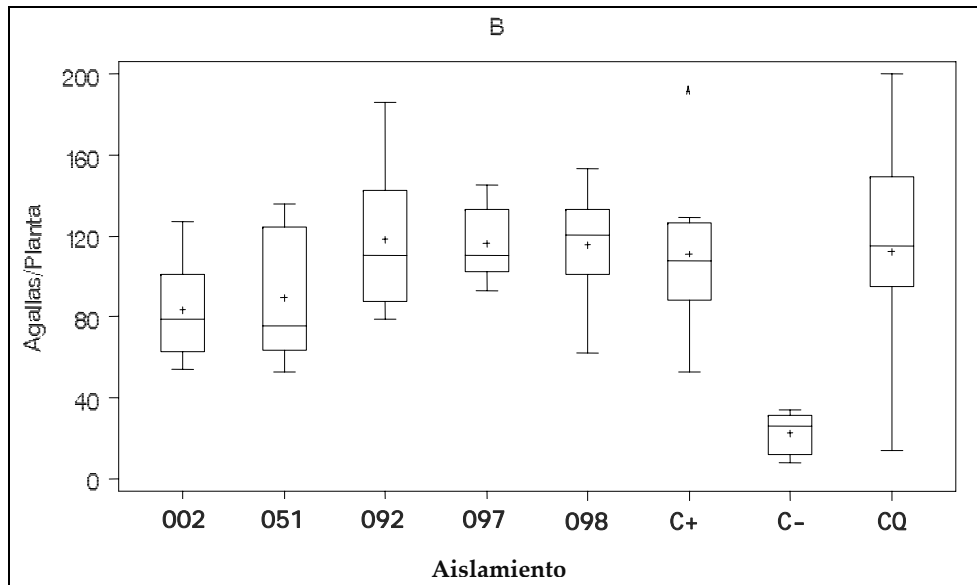


Figura 10. Efecto de aislamientos de *Pseudomonas* spp. sobre la formación de agallas por parte de *Spongospora subterranea* en *S. tuberosum*. Las figuras A y B representan dos ensayos independientes realizados sucesivamente en plantas Pastusa Suprema. C+ representa el control positivo (sin *Pseudomonas*+suelo infestado), C- corresponde al control negativo (sin *Pseudomonas*+suelo desinfestado con Basamid®) y el control químico (Pulsor®+suelo infestado) a CQ. Los datos son presentados como diagrama de caja y bigote (Ver figura 6 para explicación del diagrama).

Los datos de la tabla 4 representan la relación porcentual del número de agallas en cada uno de los tres cultivares de *S. tuberosum* con respecto a la media del C+; el número promedio de A/Pl fue de 68 en DC, 36 en PP y 105 en PS.

Los aislamientos IBUN Pfl 051, 090, 097, 104 y 108 redujeron el número de agallas en el cultivar DC, en 64, 68, 46, 26 y 30% respectivamente comparado frente al control positivo, mientras que para IBUN Pfl 063 y 093 la reducción en la producción de agallas no superó el 8%.

En cuanto al cultivar PP IBUN Pfl 108 logró una reducción de alrededor de 20% en el número de agallas, el resto de aislamientos no redujo el número de agallas. La reducción de la enfermedad en el control negativo fue cercana al 60%, lo que indica que a pesar del tratamiento del suelo hubo un alto índice de formación de agallas.

En el cultivar PS los aislamientos IBUN Pfl 104 y 108 presentaron un nivel de control de 30 y 34% respectivamente. Por otra parte los aislamientos IBUN Pfl 002, 051 y 090 mostraron niveles de control de 25, 20 y 16% respectivamente, los cuales aunque no alcanzaron a ser estadísticamente significativos, sugieren alguna capacidad de control de estos aislamientos (particularmente IBUN Pfl 51 y 90), contra *S. subterranea* en *S. tuberosum*.

Para el caso de DC es preciso notar el potencial de control de cinco de los aislamientos bacterianos evaluados siendo ellos IBUN Pfl 051, 090, 097, 104 y 108. Respuesta que se puede observar con claridad en los diagramas de caja y bigotes, siendo en general los aislamientos que se caracterizan por tener las variaciones más bajas para los tratamientos evaluados (Figura 8) así como los que controlaron la enfermedad en niveles superiores a 30%. En cuanto al comportamiento de los aislamientos bacterianos en el cultivar PP, es de notar que tan solo IBUN Pfl 108 ejerció un efecto de control contra *Sss*. Mientras en el cultivar PS, IBUN Pfl 108, 104 y 002 se destacaron por ser los aislamientos con mayor potencial para controlar *Sss*, seguidos de IBUN Pfl 051, 090 y 093. Los aislamientos de *Pseudomonas* restantes presentan niveles de enfermedad similares al control positivo como se puede observar en los diagramas de caja (Figura 10).

Tabla 4. Efecto de diez aislamientos de *Pseudomonas* spp. sobre la formación de agallas en raíces de plantas de *Solanum tuberosum* por *Spongospora subterranea*, bajo condiciones de invernadero

Tratamiento	Ag/PI ^x		
	Diacol Capiro	Parda Pastusa	Pastusa Suprema
Control -	0,00a	39,45a	10,05 ^a
Pulsor [®]	100,1d	146,41b	103,65bc
IBUN Pfl 002	175,92e	132,23b	74,94b
IBUN Pfl 051	35,62b	ND	80,45bc
IBUN Pfl 063	91,12d	106,02b	100,13c
IBUN Pfl 090	32,19b	ND ^y	84,47bc
IBUN Pfl 092	195,52e	121,41b	106,18c
IBUN Pfl 093	92,33d	143,98b	89,80bc
IBUN Pfl 097	53,68bc	109,62b	104,38c
IBUN Pfl 098	ND	103,23b	103,82c
IBUN Pfl 104	73,66c	109,64b	70,15b
IBUN Pfl 108	69,73c	80,72b	66,16b

^x Valores presentados corresponden a la relación porcentual entre el número de agallas registradas por planta y la media del control positivo, entendida como el 100% de enfermedad. Valores seguidos por la misma letra no son estadísticamente diferentes por Kruskal Wallis por pares (p-valor<0.05) (Anexo 4).

^y Valor no determinado.

Al comparar la actividad de los aislamientos de *Pseudomonas* spp. en los tres cultivares de *S. tuberosum*, se observó que IBUN Pfl 104 y 108 mantuvieron los niveles de control tanto en DC como en PS, mientras que aislamientos como IBUN Pfl 063, 092, 098 no difieren del control positivo, es decir no inhiben la expresión de *Sss* a nivel de raíz, en ninguno de los cultivares; esto parece indicar que estos aislamientos no cuentan con mecanismos de acción que restrinjan la expresión de la enfermedad. Es así como a pesar de ser los tres cultivares pertenecientes a la especie *S. tuberosum*, la respuesta obtenida por aislamiento, para el control de la enfermedad, difiere entre cultivares; hecho que debe estar relacionado

con las diferencias genotípicas propias de cada cultivar y la relación específica que pueden llegar a tener con los aislamientos bacterianos.

Igualmente es importante hacer referencia al número de agallas promedio para el control positivo en cada cultivar, para los cuales, como se citó anteriormente, el mayor número de agallas por planta se presentó en el cultivar PS, seguido por DC y finalmente por PP. Lo que indicó que bajo las condiciones de evaluación PS fue el cultivar más susceptible a nivel de expresión de síntomas en raíz comparado con los otros dos cultivares. Respuesta que de acuerdo a la susceptibilidad en raíz para sarna polvosa difiere de lo reportado para PS para el cual no se registra susceptibilidad en raíces, mientras para los cultivares DC y PP si se reporta tal susceptibilidad. (<http://papaunc.com/catalogoExtendido.shtml?>, consulta 2010). Los resultados de Jaramillo *et al* (2008) confirman la alta susceptibilidad para el cultivar DC en la raíz, al igual que en el presente estudio, en el cual también se manifestó la formación de agallas en el cultivar PP, confirmando su susceptibilidad en raíz.

5. DISCUSIÓN GENERAL

Para el desarrollo de este estudio, se seleccionaron 10 aislamientos de *Pseudomonas* spp. que de acuerdo a los estudios adelantados por Uribe *et al* (1999) y Lara (2007), cuentan con al menos un mecanismo supresor de patógenos de suelo. Tales estudios se realizaron con *R. solani*, y se basaron en la caracterización funcional antagonica de compuestos difusibles en agua. Adicionalmente se tuvo en cuenta las evaluaciones adelantadas por el Grupo de Microbiología Agrícola del IBUN, (Informe técnico, 2009)⁴ como fueron la producción de compuestos volátiles y de sideróforos, en conjunto estos antecedentes se tomaron como criterio para seleccionar los aislamientos a evaluar contra *Sss*.

Los resultados confirmaron la actividad biocontroladora de los aislamientos seleccionados contra *Rs in vitro*, tanto nativos como mutantes Rif^r, confirmando los resultados de Uribe *et al* (1999) y Lara (2007). Los mecanismos de antagonismo de estos aislamientos, ya han sido reportados como inhibidores de crecimiento de *Rs* (Nagarajkumar *et al.*, 2004, Kai *et al.*, 2007) y de otros patógenos como *F. oxysporum*, *Alternaria alternata* (Trivedi *et al.*, 2008) y *Botrytis mali* (Mikani *et al.*, 2008). Esto demuestra el potencial de los aislamientos que poseen dichos mecanismos como agentes biocontroladores contra diversos fitopatógenos.

Una vez confirmada la capacidad antagonista de los aislamientos de *Pseudomonas in vitro*, se realizaron las pruebas contra *Sss* en plantas bajo el sistema hidropónico y en invernadero. En las pruebas de invernadero se lograron reducciones en el número de agallas por planta entre 20 y 76% dependiendo del aislamiento bacteriano y de la especie o cultivar de papa evaluado.

⁴ Informe técnico del proyecto “Evaluación de Estrategias de Control Biológico para el manejo de *Rhizoctonia solani* y *Spongospora subterranea* en cultivos de papa”. Presentado por Universidad Nacional de Colombia y FEDEPAPA.

Así, en *S. phureja* cultivar Colombia, dos aislamientos de *Pseudomonas*, IBUN Pfl 002 y 092, se destacaron por su capacidad de disminuir en más del 40% la formación de agallas en raíz causadas por *Sss*. Este efecto fue reproducible en pruebas hechas en tiempos diferentes, sustentando su importancia como aislamientos promisorios para el control de *Sss* en este cultivar.

La capacidad de control lograda con IBUN Pfl 002 es interesante una vez que es el único de los 10 aislamientos de *Pseudomonas* evaluados que tiene la capacidad de producir HCN, razón que podría explicar la actividad controladora contra *Sss*. Este compuesto ha sido considerado como uno de los mecanismos supresores de enfermedades en plantas, es así como se comprobó su capacidad de control contra *T. basicola* en tabaco (Voisard *et al.*, 1989) realizando pruebas con las cepas *P. fluorescens* CHA0 productor de HCN y CHA5, una cepa mutante negativa para HCN, la cual no inhibió la enfermedad tan efectivamente como la cepa nativa CHA0.

En los estudios de caracterización adelantados por el Grupo de Microbiología Agrícola, también fue posible determinar la presencia de un gen relacionado con la producción de fenacina para el aislamiento IBUN Pfl 002, un antibiótico identificado como metabolito que interviene en la supresión de enfermedades como pudrición de raíz en trigo (Thomashow y Weller, 1988) y pudrición de raíz en tomate (Bolwerk *et al.*, 2003) característica relevante que sumada a la producción de HCN pueden definir su potencial como agente biocontrolador.

En *S. tuberosum* 6 de los 10 aislamientos redujeron el número de agallas por planta en los 3 cultivares evaluados, excepto los aislamientos IBUN Pfl 063, 092, 093 y 098, quienes no ejercieron un efecto restrictivo en la expresión de síntomas a en las raíces de las plantas evaluadas. Además fue evidente la respuesta dependiente entre los aislamientos de *Pseudomonas* y el cultivar en términos de su capacidad de control.

Es así como en DC cabe resaltar el potencial de los aislamientos IBUN Pfl 051, 090, 097, 104 y 108, ya que redujeron el número de agallas entre 26% y 65%, teniendo en cuenta

además que de los tres cultivares evaluados fue el segundo que presentó mayor cantidad de agallas a nivel de raíz para el control positivo y que el cultivar es susceptible a nivel de raíz para *Sss* (Catálogo de variedades, Grupo de investigación en papa), de manera que a pesar de la alta susceptibilidad a la enfermedad estos aislamientos redujeron la expresión de síntomas, convirtiéndose en agentes potenciales para el control de *Sss* para este cultivar.

Para el cultivar PS los aislamientos IBUN Pfl 002, 051, 090, 104 y 108, redujeron el número de agallas entre 20 y 33%, siendo niveles de control inferiores a los obtenidos para DC pero no menos importantes, respuesta que puede obedecer a la susceptibilidad del cultivar frente al protozoo bajo las condiciones de estudio, recordando que el control positivo presentó el mayor número de agallas respecto a los controles de PP y DC, lo que pudo determinar el potencial antagonista de los aislamientos bacterianos.

IBUN Pfl 108, fue el único de los aislamientos con actividad biocontroladora contra *Sss* para los tres cultivares *S. tuberosum*, resultado que cobra importancia porque permite considerar a este aislamiento como un posible agente potencial para el manejo de la enfermedad independiente del hospedero, característica esencial para escoger un microorganismo de amplio espectro para el control del protozoo.

La información obtenida también muestra diferencias de la actividad supresora de los aislamientos de *Pseudomonas* frente al parásito entre *S. phureja* y *S. tuberosum*. Es así como el aislamiento IBUN Pfl 002 reduce la expresión de agallas en raíz en más de un 70% para en *S. phureja*, mientras que no tiene ningún potencial de manejo en DC ni PP y alrededor de un 25% en PS, comportamiento similar se presentó con el aislamiento IBUN Pfl 092, considerado con potencial para el control de *Sss* en *S. phureja* bajo las condiciones de este estudio pero sin actividad biocontroladora para ninguno de los cultivares evaluados de *S. tuberosum*, hecho que posiblemente esté relacionado con el genotipo característico de cada especie. Este tipo de respuestas dependientes del hospedero se refleja en diferentes tipos de ensayos, por ejemplo en una evaluación donde emplearon la cepa *P. fluorescens* E6 para la inoculación de semillas de tres diferentes especies de plantas ornamentales de la

familia Asteraceae hubo efecto de promoción de crecimiento sobre dos de ellas, mientras para una de ellas se presentó reducción de la tasa de crecimiento (Yuen y Schroth, 1986).

Estos resultados también pueden estar asociados con el origen de los aislamientos bacterianos, estudios como los de Berg *et al.* (2002) sugieren que la actividad antagonista y diversidad de las poblaciones rizosféricas es dependiente de la especie de planta de donde fueron aisladas, existiendo una estrecha relación con el tipo de exudados liberados por la especie hospedera, compuestos que determinan en gran medida la interacción con los agentes microbianos (Rudrappa *et al.*, 2008).

La relación del número de agallas por planta para el material *S. phureja* respecto a PP, DC y PS fue 1.0 : 2.2 : 4.2 : 6.5 respectivamente, de manera que la cantidad de nodulaciones en el cv. criolla Colombia fue menor comparada con las plantas de los cultivares de *S. tuberosum*, sugiriendo que bajo las condiciones de los ensayos establecidos el cv. criolla Colombia es menos susceptible a *Sss* comparado con los cultivares PP, DC y PS, en términos de la expresión de síntomas en raíz. Este evento se puede observar con claridad en los diagramas de caja y bigote, tanto para el comportamiento entre especies como entre los cultivares de la misma especie en el caso de *S. tuberosum*.

Respecto a los ensayos hechos en el sistema hidropónico, también se observaron diferentes comportamientos frente a *Sss* dependientes del aislamiento bacteriano. De manera que hubo aislamientos con capacidad antagonista contra *Sss*, así como *Pseudomonas* que no tuvieron ningún tipo de efecto y otros que al parecer estimularon la formación de agallas, esta respuesta puede estar relacionada con la acumulación de compuestos como el 2,4-diacetilfloroglucinol que en altas concentraciones puede generar efectos fitotóxicos (Haas y Défago, 2005) afectando fisiológicamente las plantas y por ende su susceptibilidad ante la presencia de un parásito como *Sss*. Los resultados obtenidos en el bioensayo de dosis de respuesta sugieren además que la capacidad biocontroladora de los aislamientos bacterianos responde a la cantidad de inóculo del patógeno bajo la cual esté expuesto el hospedero.

De otra parte, se pudo determinar, bajo las dos condiciones evaluadas, que el aislamiento IBUN Pfl 063 no tuvo actividad biocontroladora control contra *Sss*. Hecho que puede estar relacionado con la carente actividad antagonica a nivel *in vitro* contra *Rs* en la prueba de compuestos difusibles en agua, lo que puede sugerir que este aislamiento no tiene la capacidad de producir algún tipo de antibiótico (Haas y Keel, 2003) que contrarreste la actividad de *Sss* en las plantas de papa evaluadas. Inicialmente este aislamiento fue seleccionado porque además de tener la capacidad de restringir el crecimiento de *Rs* de acuerdo a las pruebas de producción de compuestos volátiles, en trabajos como el de Bautista (2007) y Lara (2007) se comprobó su efecto promotor sobre el crecimiento vegetal.

La capacidad de los aislamientos que presentaron actividad biocontroladora contra *Sss* pudo estar relacionada con la producción de otro tipo de metabolitos que no fueron evaluados en el presente estudio. Es así como la producción de antibióticos como el floroglucinol, compuesto comúnmente producido por microorganismo como las *Pseudomonas* spp. ha sido reportado como inhibidor de las zoosporas de *Pythium* spp. (Haas y Défago, 2005), fitopatógeno de suelo que afecta el cultivo de trigo. Raaijmakers *et al.* (1999) demostraron que la producción de 2,4-Diacetilfloroglucinol por *Pseudomonas* spp. fluorescentes, es un componente esencial para el control biológico que opera en suelos supresivos de pudrición de raíz en trigo.

Adicionalmente, esta actividad también podría estar regulada por la acción de biosurfactantes, principalmente compuestos como los ramnolípidos, que por su característica anfílica puede actuar y destruir la membrana de las zoosporas (D'aes *et al.*, 2009). Este tipo de compuestos químicos pueden ser producidos por diferentes géneros de bacterias como *Bacillus*, *Rhodococcus* y los relacionados con este estudio, *Pseudomonas*; microorganismos que se identificaron por su potencial para el control del grupo de agentes fitopatógenos productores de zoosporas, grupo dentro del cual se encuentran organismos de la clase *Oomycetes*, *Chytridiomycetes* y *Plasmodiophoromycetes* donde se ubica el género *Spongospora* (Stanghellini y Miller, 1997). Igualmente Nielsen *et al.* (2002) señala que la

producción de este tipo de metabolitos son un rasgo común relacionado con *Pseudomonas* fluorescentes asociadas a las raíces.

Así como los biosurfactantes se han considerado como compuestos benéficos para el control de enfermedades una vez que causan efectos deletéreos sobre estructuras infectivas como las zoosporas, se ha planteado el efecto que pueden tener en patogénesis de plantas relacionado con un aumento del acceso físico en términos de permeabilidad en la superficie de las plantas frente a la presencia de enzimas degradadoras de pared celular (D'aes *et al.*, 2009) factor que debe ser considerado, teniendo en cuenta que una vez se alteren las características estructurales de las células radicales la planta puede ser más vulnerable a la penetración y por tanto a la infección, en este caso de *Sss*.

De otra parte, haciendo referencia a los resultados obtenidos para el control químico empleado en los diferentes bioensayos que correspondió a Pulsor[®] cuyo ingrediente activo es Thifluzamide, empleado comúnmente al momento de siembra mediante la aplicación a semilla en cultivos de papa para el control de *R. solani*, no mostró ningún nivel de control contra *S. subterranea*, respuesta que se suma a los resultados obtenidos por García *et al.* (2006) en Colombia, con seis moléculas químicas diferentes y a los de Falloon *et al.* (1996) en Nueva Zelanda, confirmando la falta de alternativas de control químico para este fitopatógeno.

Considerando estos resultados de ineficiencia de moléculas químicas para el control de *Sss*, así como las prácticas de manejo actuales sugeridas para el manejo de la enfermedad como lo son el uso de semilla certificada, manejo del agua, períodos prolongados de descanso de los terrenos de siembra (Jan *et al.*, 2002) que no han sido lo suficientemente contundentes para el manejo de *Sss* y la dificultad de manejo dada por la biología del patógeno, permiten resaltar la gran importancia de los resultados obtenidos en el presente estudio haciendo uso de agentes biocontroladores del tipo *Pseudomonas* spp. quienes inciden sobre la cantidad de agallas formadas en la raíz restringiendo la cantidad de inóculo producido y por ende el liberado al suelo. Estrategia que pudiese ser considerada entonces como parte fundamental en el manejo integrado de *Sss* en los cultivos de papa.

6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos bajo el sistema de hidroponía notan de importancia, ya que hasta donde la revisión de literatura permite afirmar, se adaptó por primera vez en Colombia un protocolo que permite el desarrollo de la enfermedad *Sss* hasta la formación de agallas bajo condiciones de laboratorio, lo cual lo convierte en una herramienta útil para adelantar investigaciones ya sea de biología del patógeno, como para evaluar otras estrategias de manejo (biológicas, químicas) y/o avanzar en los programas de fitomejoramiento para la selección de variedades resistentes.

Los aislamientos IBUN Pfl 002 y 092 se destacaron por su capacidad biocontroladora contra *Sss* particularmente en el cultivar criolla Colombia, hecho que se observó en las pruebas de invernadero, con niveles de reducción de enfermedad de hasta un 76 y 53%, respectivamente, potencial que fue similar para las dos pruebas realizadas con cada uno de los aislamientos de *Pseudomonas*.

En el caso de *S. tuberosum* los aislamientos IBUN Pfl 051, 090, 097, 104 y 108 para el cultivar DC, alcanzaron niveles de control entre 26 y 68%, dependiente del aislamiento empleado. Mientras para PS los aislamientos IBUN Pfl 002, 051, 090, 104 y 108 incidieron sobre la formación de agallas con niveles de control entre 15 y 34%, igualmente dependiente del aislamiento bacteriano.

El aislamiento IBUN Pfl 108 se destacó por ser el único aislamiento con actividad biocontroladora en los tres cultivares evaluados de *S. tuberosum* y también por ser el aislamiento de mayor potencial en términos de restricción sobre la formación de agallas en raíz en las pruebas del sistema hidropónico.

Se identificó un comportamiento diferencial entre los aislamientos de *Pseudomonas* spp. frente al potencial antagonista para el control de *Sss* en plantas de papa, es decir, que los resultados obtenidos con cada uno de los aislamientos bacterianos fue dependiente de la especie en la que se evaluaron, sugiriendo un comportamiento genotipo-específico.

Es resaltar que si bien los niveles de reducción sobre la expresión de síntomas logrados en las pruebas bajo invernadero oscilan entre el 20 y el 76%, dependiendo de la especie hospedera y del aislamiento de *Pseudomonas* spp. evaluado, estos niveles de control obtenidos son valores muy importantes toda vez que no existe actualmente una alternativa contundente para el manejo de *Sss*.

Es así como el uso de controladores biológicos, particularmente los aislamientos de *Pseudomonas* IBUN Pfl 002 para *S. phureja* (cv. criolla Colombia), IBUN Pfl 051 para DC e IBUN Pfl 108 para los cultivares PP y PS, puede ser considerados como una propuesta para apoyar el manejo integrado de *Sss* en el cultivo de papa, cuya contribución bajo los resultados obtenidos en este estudio sería disminuir la cantidad de inóculo del protozoo proveniente de agallas una vez liberados los quistosoros en el suelo.

RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos bajo los dos sistemas de evaluados permitieron determinar el potencial biocontrolador de los aislamientos de *Pseudomonas* spp. seleccionados contra *Sss* en plantas de papa, por lo cual se recomienda continuar con este tipo de ensayos en planta bajo condiciones de invernadero y campo, empleando los aislamientos que mostraron los mejores resultados en esta investigación.

Se propone indagar sobre los mecanismos de acción de *Pseudomonas* spp. que determinan su capacidad de control contra *Sss*, identificando la producción de metabolitos secundarios potenciales como los biosurfactantes u otro tipo de metabolitos.

Sería interesante y oportuno evaluar las interacciones a nivel molecular que se generan en la triada planta, *Sss* y *Pseudomonas* spp. con el fin de conocer la expresión diferencial de genes de acuerdo a la capacidad controladora o no por parte de las *Pseudomonas* y el cultivar evaluado. Así como determinar si hay efectos de inducción de resistencia por parte de los microorganismos bacterianos sobre la planta de papa que active su capacidad de defensa.

Es oportuno realizar ensayos de dosis de respuesta empleando diferentes concentraciones tanto del inóculo de *Sss* como de los aislamientos de *Pseudomonas*, con el fin de obtener mayor precisión respecto al potencial de control de los agentes de biocontrol.

BIBLIOGRAFÍA

Bakker, A., van Peer, R. 1988. Brighton Crop Protection. Conference, p. 611-614. En: van de Graaf, P., Wale, S. J., Lees, A. K. 2007. Factors affecting the incidence and severity of *Spongospora subterranea* infection and galling in potato roots. *Plant Pathology* 56, 1005–1013.

Bakker, P., Pieterse, C., van Loon, L. C. 2003. Understanding the involvement of rhizobacteria mediated induction of systemic resistance in biocontrol of plant diseases. *Canadian Journal of Plant Pathology* 25, 5-9.

Bakker, P., Pieterse, C., van Loon, L. 2007. Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*. 97, 239-243.

Baldwin, S. J., Genet, R. A., Butler, R. C., Jacobs, J. M. E. 2008. A greenhouse assay for Powdery Scab (*Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea*) resistance in potato. *Potato Research* 51, 163–173.

Bautista, G., Mendoza, H., Uribe, D. 2007. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* in native potato (*Solanum phureja*) plants using native *Pseudomonas fluorescens*. *Acta Biológica Colombiana* 12(1), 19-32.

Beltrán, D., Lara, L. 2001. Estudio preliminar en términos de asociación entre aislamientos nativos de *Pseudomonas fluorescens* con la rizósfera de papa *Solanum phureja* y su actividad antagonista *in vitro* contra *Rhizoctonia solani*. Tesis de grado para optar al título de Licenciadas en Biología. Bogotá. 51p.

Berg, G., Roskot, N., Steidle, A., Eberl, L., Zock, A., Smalla, K. 2002. Plant-Dependent Genotypic and Phenotypic Diversity of Antagonistic Rhizobacteria Isolated from Different *Verticillium* Host Plants. *Applied and Environmental Microbiology*. 68 (7), 3328-3338.

Bolwerk, A., Lagopodi, A., Wijffjes, A., Lamers, G., Chin, T., Lugtenberg, B., Bloemberg, G. 2003. Interactions in the tomato rhizosphere of two *Pseudomonas* biocontrol strains with the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *MPMI* 16(11), 983-993.

Braithwaite, M., Falloon, R. E., Genet, R. A., Wallace, A. R., Fletcher, J. D., Braam, W. F. 1994. Control of Powdery Scab of potatoes with chemical seed tuber treatments. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 22, 121-128.

Braselton, J. 1995. Current status of the Plasmodiophorids. *Critical Reviews in Microbiology* 21(4), 263-275.

Capper, A., Higgins, K. 1993. Application of *Pseudomonas fluorescens* isolates to wheat as potential biological control agents against take-all. *Plant Pathology*. 42, 560-567.

Chen, C., Belanger, R., Benhamou, N., Paulitz, T. 2000. Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 56, 13-23

Corbell, N., Loper, J. 1995. A Global Regulator of Secondary Metabolite Production in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Journal of Bacteriology* 117(21), 6230–6236.

D'aes, J., de Maeyer, K., Pauwelyn, E., Höfte, M. 2009. Biosurfactants in plant–*Pseudomonas* interactions and their importance to biocontrol. *Society for Applied Microbiology and Blackwell Publishing Ltd, Environmental Microbiology Reports*, 1-14.

de Boer, R. 2000a. Research into the biology and control of powdery scab of potatoes in Australia. En: Merz U, Lees AK (eds) Proceedings of the first European powdery scab workshop, Aberdeen, Scotland, 79-83.

de Boer, R. 2000b. Summary of the session on recognising the components of an integrated control approach to powdery scab and the potato mop top virus. En: Merz U, Lees AK (eds) Proceedings of the first European powdery scab workshop, Aberdeen, Scotland, 101–104.

de Souza, J., de Boer, M., de Waard, P., van Beek, T., Raaijmakers, J.. 2003. Biochemical, Genetic, and Zoosporicidal Properties of Cyclic Lipopeptide Surfactants Produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Applied and Environmental Microbiology*. 69 (12), 7161-7172.

Eilenberg, J., Hajek, A., Lomer, C. 2001. Suggestions for unifying the terminology in biological control. *Biocontrol* 46, 387–400

Falloon, R. E., Wallace, A. R., Braithwaite, M., Genet, R. A., Nott, H. M., Fletcher, J. D., Braam, W. F. 1996. Assessment of seed tuber, in furrow and foliar chemical treatments for control of Powdery Scab (*Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea*) of potato. *New Zealand Journal of Crop Horticultural Science* 24, 341-353.

FAO 2008. El mundo de la papa. www.potato2008.org

Frey-Klett, P., Chavette, M., Clause, M-L., Courier, S., Le Roux, C., Raaijmakers, J., Martinotti, M.G., Pierrat, J-C and J. Garbaye. 2005. Ectomycorrhizal symbiosis affects functional diversity of rhizosphere fluorescent pseudomonads. *New Phytologist* 165, 317-328.

García, C., Perez, J. C., Jaramillo, S., Guerrero, O., Benavides, J., Núñez, C. 2006. Evaluar el efecto de fungicidas aplicados al suelo para el manejo de *S. subterranea*. Redepapa. [http://: www. Redepapa.org\celsa.pdf](http://www.Redepapa.org\celsa.pdf)

Geels, E., Lamers J., Hoekstra, O., Schippers B. 1986. Potato plant response to seed tuber bacterization in then field in various rotations. Netherland Journal of Plant Pathology 92, 257-272.

Gherna, J. 1986. Storage and survival of bacteria by Ultra-free. Lett Applied Microbiology 3, 127-129.

Gómez, S., Hoyos, L., González, E. 2008. Estudios de infección de *Spongospora subterranea* en papa (*solanum tuberosum*) variedad comercial diacol capiro. Politécnica. 7,9-18.

Grupo de investigación en papa. Consulta 05 de mayo de 2010. <http://papaunc.com/catalogoExtendido.shtml?>

Guerrero, O. 2004. Patógenos del suelo en el cultivo de la papa. I Taller Nacional sobre patógenos del suelo, virus e insectos plaga diferentes a *Tecia solanivora*. CEVIPAPA. Ministerio de Agricultura. Consejo Nacional de la Papa. Memorias.pag. 14-19.

Haas, D., Défago, G. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by Fluorescent Pseudomonads. Nature Reviews Microbiology. 4, 307-319.

Haas, D., Keel, C. 2003. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. Annual Review of Phytopathology. 41,117-53.

Handelsman, J., Stabb, E. V. 1996. Biocontrol of soilborne plant pathogens. The Plant Cell 8, 1855-1869.

Harrison, J.G., R.J. Searle and N.A. Williams, 1997. Powdery scab disease of potato—a review. Plant Pathology 46(1), 1-25.

Hooker, W. 1980. Enfermedades fungosas. Compendio de Enfermedades de la Papa. CIP, Lima, Perú.

Howell C. R., Stipanovic R. D. 1979. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. *Phytopathology* 69, 480-482.

Hoyos, L. M., Jaramillo, S., Orduz, S. 2008. Evaluación de *Trichoderma asperellum* como biorregulador de *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea*. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* 61(2), 4496-4502.

Hoyos, L., Villegas, M., González, E. 2009. Observaciones histológicas de estructuras celulares asociadas a *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* en papa. *Revista Facultad Nacional Agronomía Medellín*. 62(2), 5039-5045.

Jan, H., Hidalgo, O. A., Muhammad, A., Khan, S. 2002. Effect of seed or soil treatment with fungicides on the control of Powdery Scab of potato. *Asian Journal of Plant Sciences* 1(4), 454-455.

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* spp. *andigena*). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*. 60(2), 3859-3876.

Jaramillo, S., Pérez, G., Hoyos, L. 2008. Variación morfológica de quistosoros de *Spongospora subterranea* (Wallr.) Lagerh f. sp. *subterranea*. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* 61 (2).

Johnson, K. 1994. Dose-response relationships and inundative biological control. *Phytopathology* 84, 780-784.

Kai, M., Haustein, M., Molina, F., Petri, A., Scholz, B., Piechulla, B. 2009. Bacterial volatiles and their action potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 81, 1001-1012.

Kloepper J., Schroth, M., Miller, T. 1980. Effects of rhizosphere colonization by plant growth promotion rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathology* 70, 1078-1082.

Kloepper, J., Leong, J., Teintze, M., Schroth, M.. 1980. *Pseudomonas* siderophores: a mechanism explaining disease suppressive soils. *Current Microbiology* 4, 317-320.

Kloepper, J. 1981. Development of *in vivo* assays for prescreening antagonists of *Rhizoctonia solani* on Cotton. *Phytopathology* 81, 1006-1013.

Kloepper, J. 1996. Host specificity in microbe-microbe interactions. *BioScience* 46(6), 406-409.

Kloepper, J., Rodríguez, R., Zehnder, G., Murphy, J., Sikora, E., Fernández, C. 1999. Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. *Australasian Plant Pathology* 28, 21-26.

Larkin, R., Fravel, D. 1999. Mechanisms of action and dose response relationships governing biological control of Fusarium wilt of tomato by nonpathogenic *Fusarium* spp. *Phytopathology* 89,1152-1161.

Leeman, M., van Pelt, J. A., den Ouden, F. M., Heinsbroek, M., Bakker, P. A. H. M., Schippers, B.1995. Induction of systemic resistance by *Pseudomonas fluorescens* in radish cultivars differing in susceptibility to fusarium wilt, using a novel bioassay. *European Journal of Plant Pathology* 101, 655-664.

Lugtenberg, B., Kamilova, F. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology* 63, 541-556.

Mazzola, M. Fujimoto, D., Thomashow, L., Cook, J. 1995. Variation in sensitivity of *Gaeumannomyces graminis* to antibiotics produced by Fluorescent *Pseudomonas* spp. and effect on biological control of Take-All of Wheat. *Applied and Environmental Microbiology* 61 (7), 2554-2559.

Mercado-Blanco, J., Bakker, P., 2007. Interactions between plants and beneficial *Pseudomonas* spp.: exploiting bacterial traits for crop protection. *Antonie van Leeuwenhoek*. 92, 367-389.

Merz, U. 1989. Infectivity, inoculum density and germination of *Spongospora subterranea* resting spores: a solution-culture test system. *Bulletin OEPP* 19, 585-592.

Merz, U. 1997. Microscopical observations of the primary zoospores of *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea*. *Plant Pathology* 46, 670–674.

Merz, U., Martinez, V., Schwarzel, R. 2004. The potential for the rapid screening of potato cultivars (*Solanum tuberosum*) for resistance to Powdery Scab (*Spongospora subterranea*) using a laboratory bioassay. *European Journal of Plant Pathology* 110, 71-77.

Merz, U. Falloon, R. 2009. Review: Powdery Scab of potato—increased knowledge of pathogen biology and disease epidemiology for effective disease management. *Potato Research* 52, 17-37.

Mikani, A., Etebarian, H.R., Sholberg, P.L., O’Gorman D.T., Stokes S., Alizadeh, A. 2008. Biological control of apple gray mold caused by *Botrytis mali* with *Pseudomonas fluorescens* strains. *Postharvest Biology and Technology* 48, 107–112.

Milus, E., Rothrock, C. 1997. Efficacy of bacterial seed treatments for controlling Pythium root rot of winter wheat. *Plant Diseases* 8, 180-184.

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. 2005. Observatorio Agrocadenas Colombia. Documento de Trabajo No. 54. La cadena de la papa en Colombia: una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005. <http://www.agrocadenas.gov.co>

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. 2009. Consulta en: <http://web.presidencia.gov.co/sp/2009/abril/30/13302009.html>

Nagarajkumar M, Bhaskaran R, Velazhahan R. Involvement of secondary metabolites and extracellular lytic enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* in inhibition of *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen. *Microbiological Research* 159, 73-78.

Nielsen, C., Ferrin, D., Stanghellini, M. 2006. Efficacy of biosurfactants in the management of *Phytophthora capsici* on pepper in recirculating hydroponic systems. *Canadian Journal Plant pathology*. 28, 450-460.

O'Sullivan, D. J., O'Gara, F. 1992. Traits of Fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiological Reviews*. 56(4), 662-676.

Peña, L. 2000. La roña de la papa (*Spongospora subterranea* Wallr). *Boletín de la Papa* 2(19): 1-2.

Reddy, B., Reddy, K., Rao, M., Rao, K. 2008. Efficacy of Antimicrobial Metabolites of *Pseudomonas fluorescens* Against Rice Fungal Pathogens. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy* 2(1), 178-182.

Raaijmakers, J., Leeman, M., van Oorschot, M., van der Sluis, I., Schippers, B., Bakker, P. 1995. Dose-response relationships in biological control of Fusarium wilt of radish by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* 85, 1075-1081.

Raaijmakers, J., Bonsall, R., Weller, D. 1999. Effect of population density of *Pseudomonas fluorescens* on production of 2,4-diacetylphloroglucinol in the rhizosphere of wheat. *Phytopathology*. 89, 470-475.

Raaijmakers, J., Vlami, M., Souza, J. 2002. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek* 81, 537-547.

Ramamoorthy, V., Viswanathan, R., Raguchander, T., Prakasam, V., Samiyappan, R. 2001. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Protection*. 20, 1-11.

Rodríguez, K., Rivero, R., García, C. 2006. Estudio de la incidencia de los principales patógenos en semilla de papa (*Rhizoctonia*, *Rosellinia*, *Spongospora*, *Erwinia*, *Streptomyces* y *Verticillium*). Redepapa. <http://www.redepapa.org/maldonado.pdf>

Rudrappa, T. Czymmek, K., Paré, P., Bais, H. 2008. Root-Secreted Malic Acid Recruits Beneficial Soil Bacteria. *Plant Physiology* 148, 1547–1556

Qu, X., Christ, B. 2004. Genetic Variation and Phylogeny of *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea* Based on Ribosomal DNA Sequence Analysis. *American Journal of Potato Research* 81, 385-394.

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.

Quagliotto, L., Azziz, G., Bajsa N., Vaz, P., Pérez, C., Ducamp, F., Cadenazzi, M., Altier, N., Arias, A. 2009. Three native *Pseudomonas fluorescens* strains tested under growth chamber and field conditions as biocontrol agents against damping-off in alfalfa. *Biological Control* 51, 42–50.

Saravanakumar, D., Lavanya, N., Muthumeena, K., Raguchander, T., Samiyappan, R. 2009. Fluorescent pseudomonas mixtures mediate disease resistance in rice plants against sheath rot (*Sarocladium oryzae*) disease. *BioControl* 54:273–286.

Schmidt, C., Agostini, F., Leifert, C., Killham, K., Mullins, C., 2004. Influence of inoculum density of the antagonistic bacteria *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas corrugata* on sugar beet seedling colonization and suppression of Pythium damping off. *Plant and soil* 265, 111-122.

Schott, G., Maldonado, L., Suárez, V., 2001. Nuevos senderos de la agroindustria de la papa. *Revista Latinoamericana de la papa. ALAP*. Lima, Perú.

Stanghellini, M., Miller, R. 1997. Biosurfactants: Their Identity and Potential Efficacy in the Biological Control of Zoosporic Plant Pathogens. *Plant Disease* 81(1), 4-12.

Talbot, B., Larkin, R. 2005. Efficacy of several potential biocontrol organisms against *Rhizoctonia solani* on potato. *Crop Protection* 24, 939-950.

Thomashow, L., Weller, D. 1988. Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Journal of Bacteriology* 170 (8), 3499-3508.

Thomashow, L. 1996. Biological control of plant root pathogens. *Current Opinion in Biotechnology* 7, 343-347.

Torres, H. 2002. Manual de enfermedades más importantes de la papa en el Perú. <http://www.cipotato.org/training/materials/htorres/HtorresRona.pdf>.

Trivedi, P., Pandey, A., Palni, L. 2008. In vitro evaluation of antagonistic properties of *Pseudomonas corrugate*. *Microbiological Research* 163, 329-336.

Uribe, D., Ortiz, E., Portillo, M., Bautista, G., Cerón, J. 1999. Diversidad de pseudomonas fluorescentes en cultivos de papa de la región cundiboyacense y su actividad antagonista *in vitro* sobre *Rhizoctonia solani*. Revista Colombiana de Biotecnología 2, 50-58.

van de Graaf, P., Lees, A., Duncan J. 2000. Epidemiology and control of *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea*, with special reference to zoospore release and bait plant infection. In: Merz U, Lees AK (eds) Proceedings of the first European powdery scab workshop, Aberdeen, Scotland, July 20–22, 2000, pp 57-60.

van de Graaf, P., Lees, A. K., Wale, S. J., Duncan J. M. 2005. Effect of soil inoculum level and environmental factors on potato powdery scab caused by *Spongospora subterranea* Plant Pathology 54, 22-28.

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 Pathology 56, 1005-1013.

van Loon, L., Bakker, P., Pieterse, C. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Annual Review of Phytopathology. 36,453–483.

van Peer, R., Punte, E., Weger, L. de, Schippers, B. 1990. Characterization of root surface and endorhizosphere Pseudomonads in relation to their colonization of roots. Applied and Environmental Microbiology 56(8): 2462-2470.

Voisard, C., Keel, C., Haas, D., Défago, G. 1989. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions The EMBO Journal 8(2), 351 -358.

Wale, S. 2000a. Summary of the session on national potato production and the powdery scab situation. En: Merz U, Lees AK (eds) Proceedings of the first European powdery scab workshop, Aberdeen, Scotland, 3-9.

Weller, D. M. 2007. *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: Looking back over 30 years. *Phytopathology* 97, 250-256.

Yuen, Y. Schroth, M. 1986. Interactions of *Pseudomonas fluorescens* strain E& with ornamental plants and its effect on the composition of root-colonizing microflora.

<http://www.fao.org/ag/magazine/pdf/0611-1.pdf>

ANEXOS

ANEXO 1. Aislamientos seleccionados y procedencia.

AISLAMIENTO	MATERIAL	ZONA
IBUN Pfl 002	Pastusa	Saboyá
IBUN Pfl 051	Pastusa	Tausa
IBUN Pfl 063	Pastusa	Cogua
IBUN Pfl 090	Pastusa	Motavita
IBUN Pfl 092	Pastusa	Motavita
IBUN Pfl 093	Pastusa	Motavita
IBUN Pfl 097	Parda Pastusa	Motavita
IBUN Pfl 098	Parda Pastusa	Motavita
IBUN Pfl 104	Pastusa	Motavita
IBUN Pfl 108	Parda Pastusa	Motavita

ANEXO 2. COMPOSICIÓN MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES.

Agar Luria-Betani (LB)

Reactivo	Cantidad (g L ⁻¹)
Triptona	10
Cloruro de sodio	10
Agar bacteriológico	10
Extracto de levadura	5

Medio Guerna

Reactivo	Cantidad por 100mL
Tripticasa de soya	3.13g
Glucosa	0.52g
Leche en polvo descremada	2.07g
Glicerol al 87%	4,15mL

Medio Inductor de HCN

Reactivo	Cantidad (g L ⁻¹)
Tripticasa de soya	30
Glicina	4.4
Agar bacteriológico	15

Agar Papa Dextrosa (PDA)

Reactivo	Cantidad (g L ⁻¹)
Agar PDA	39.1

Solucion Nutritiva Hoagland

Solución	Cantidad (mL L ⁻¹)
1M KH ₂ PO ₄	1
1M KNO ₃	5
1M Ca(NO ₃) ₂	5
1M MgSO ₄	2
Fe-EDTA	1
Solución stock microelementos	1

Solución stock microelementos	Cantidad (%)
H ₃ BO ₃	0.286
MnCl ₂ 4H ₂ O	0.181
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.022
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.008
H ₂ MoO ₄ H ₂ O	0.002

ANEXO 3. SINTOMATOLOGÍA A NIVEL DE RAÍZ EN PLÁNTULAS *in vitro* PARDA PASTUSA. BIOENSAYO BAJO CONDICIONES CONTROLADAS EN UN SISTEMA HIDROPÓNICO.



ANEXO 4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Bioensayos Sistema Hidropónico bajo condiciones controladas.

Bioensayo 1

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for AGALLAS by TRAT

TRAT	Mean Rank	Sample Size
51	25.6	8
63	23.8	9
90	31.7	10
93	9.1	8
C+	13.4	7
Total	21.5	42

Kruskal-Wallis Statistic 19.3029
P-Value, Using Chi-Squared Approximation 0.0007

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	4	2904.38	726.095	8.23	0.0001
Within	37	3264.62	88.233		
Total	41	6169.00			

Total number of values that were tied 6
Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 42 Missing Cases 8

Bioensayo 2

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for AGALLAS by TRAT

TRAT	Mean Rank	Sample Size
2	26.9	10
92	32.3	10
97	18.6	10
98	23.6	10
C+	26.2	10
Total	25.5	50

Kruskal-Wallis Statistic 4.7474
P-Value, Using Chi-Squared Approximation 0.3142

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	4	1007.9	251.987	1.21	0.3211
Within	45	9395.5	208.790		
Total	49	10403.5			

Total number of values that were tied 21
 Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 50 Missing Cases 0

Bioensayo 3

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for AGALLAS by TRAT

TRAT	Mean Rank	Sample Size
C+	23.8	10
104	16.9	10
108	5.8	10
Total	15.5	30

Kruskal-Wallis Statistic 21.3502
 P-Value, Using Chi-Squared Approximation 0.0000

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	2	1631.45	815.725	37.7	0.0000
Within	27	584.55	21.650		
Total	29	2216.00			

Total number of values that were tied 16
 Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 30 Missing Cases 0

Bioensayos bajo invernadero en *Solanum phureja* cultivar Colombia.

Repetición 1 Bioensayo 2

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for AGALLAS by TRATAMIEN

TRATAMIEN	Mean Rank	Sample Size
2	17.7	7
90	20.0	8
92	21.2	7
C+	28.4	7
C-	5.0	7
Total	18.5	36

Kruskal-Wallis Statistic 18.5829
P-Value, Using Chi-Squared Approximation 0.0009

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	4	2029.79	507.446	8.77	0.0001
Within	31	1793.21	57.846		
Total	35	3823.00			

Total number of values that were tied 17
Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 36 Missing Cases 4

Repetición 1 Bioensayo 3

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for AGALLAS by TRAT

TRAT	Mean Rank	Sample Size
63	32.1	8
98	18.0	4
C+	23.6	7
104	32.7	7
108	23.6	14
C-	4.5	6
Total	23.5	46

Kruskal-Wallis Statistic 19.3069
P-Value, Using Chi-Squared Approximation 0.0017

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	5	3476.75	695.350	6.01	0.0003
Within	40	4626.75	115.669		
Total	45	8103.50			

Total number of values that were tied 16
Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 46 Missing Cases 9

Repetición 2 Bioensayo 1

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for AGALLAS by TRAT

TRAT	Mean Rank	Sample Size
2	23.3	8
51	27.4	8
90	27.9	8
92	20.3	8
C+	30.4	7

C-	15.5	8
Total	24.0	47

Kruskal-Wallis Statistic 6.5009
P-Value, Using Chi-Squared Approximation 0.2605

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	5	1195.74	239.147	1.35	0.2632
Within	41	7265.26	177.202		
Total	46	8461.00			

Total number of values that were tied 23
Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 47 Missing Cases 1

Repetición 2 Bioensayo 2

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for AGALLAS by TRAT

TRAT	Mean Rank	Sample Size
93	19.6	7
97	17.3	8
C+	18.3	7
C-	4.5	7
Total	15.0	29

Kruskal-Wallis Statistic 14.3802
P-Value, Using Chi-Squared Approximation 0.0024

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	3	1038.71	346.238	8.80	0.0004
Within	25	983.79	39.351		
Total	28	2022.50			

Total number of values that were tied 14
Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 29 Missing Cases 2

Repetición 2 Bioensayo 3

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for AGALLAS by TRAT

TRAT	Mean Rank	Sample Size
98	27.7	8
C+	27.5	6
104	26.8	8

108	21.0	8
C-	10.4	8
CQ	28.6	8
Total	23.5	46

Kruskal-Wallis Statistic 10.8389
P-Value, Using Chi-Squared Approximation 0.0547

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	5	1945.94	389.188	2.54	0.0436
Within	40	6133.06	153.327		
Total	45	8079.00			

Total number of values that were tied 29
Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 46 Missing Cases 1

Bioensayos bajo invernadero en *Solanum tuberosum* cultivar Diacol Capiro

Bioensayo 1

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for AGALLAS by TRAT

TRAT	Mean Rank	Sample Size
51	11.2	7
97	13.5	7
C+	20.0	7
C-	3.0	4
Total	13.0	25

Kruskal-Wallis Statistic 14.2877
P-Value, Using Chi-Squared Approximation 0.0025

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	3	767.07	255.690	10.3	0.0002
Within	21	521.43	24.830		
Total	24	1288.50			

Total number of values that were tied 11
Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 25 Missing Cases 7

Bioensayo 2

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for AGALLAS by TRAT

TRAT	Mean Rank	Sample Size
2	21.7	6
90	9.3	8
92	23.6	7
C+	16.7	5
C-	3.0	4
Total	15.5	30

Kruskal-Wallis Statistic 21.0880
P-Value, Using Chi-Squared Approximation 0.0003

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	4	1622.68	405.671	16.7	0.0000
Within	25	608.82	24.353		
Total	29	2231.50			

Total number of values that were tied 13
Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 30 Missing Cases 9

Bioensayo 3

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for AGALLAS by TRAT

TRAT	Mean Rank	Sample Size
63	36.8	8
93	34.6	8
C+	44.3	6
104	20.3	8
108	18.8	8
C-	4.5	8
CQ	37.6	8
Total	27.5	54

Kruskal-Wallis Statistic 35.8242
P-Value, Using Chi-Squared Approximation 0.0000

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	6	8834.7	1472.45	16.3	0.0000
Within	47	4235.8	90.12		
Total	53	13070.5			

Total number of values that were tied 23

Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 54 Missing

Bioensayos bajo invernadero en *Solanum tuberosum* cultivar Parda Pastusa

Bioensayo 1

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for AGALLAS by TRAT

TRAT	Mean Rank	Sample Size
2	30.1	8
92	25.1	8
97	23.1	8
98	22.7	6
C+	21.7	7
C-	15.0	8
Total	23.0	45

Kruskal-Wallis Statistic 5.6072
P-Value, Using Chi-Squared Approximation 0.3463

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	5	966.61	193.323	1.14	0.3562
Within	39	6618.39	169.702		
Total	44	7585.00			

Total number of values that were tied 15
Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 45 Missing Cases 1

Bioensayo 2

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for AGALLAS by TRAT

TRAT	Mean Rank	Sample Size
63	31.1	8
93	38.6	8
C+	29.5	8
104	32.5	8
108	25.4	8
C-	5.0	8
CQ	37.5	8
Total	28.5	56

Kruskal-Wallis Statistic 23.2150
P-Value, Using Chi-Squared Approximation 0.0007

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	6	6142.7	1023.78	5.96	0.0001
Within	49	8410.3	171.64		
Total	55	14553.0			

Total number of values that were tied 36
Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 56 Missing Cases 0

Bioensayos bajo invernadero en *Solanum tuberosum* cultivar Pastusa Suprema

Bioensayo 1

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for AGALLAS by TRAT

TRAT	Mean Rank	Sample Size
63	40.3	8
90	31.4	6
93	34.5	8
C+	41.2	8
104	18.9	8
108	23.1	6
C-	4.5	8
CQ	44.8	6
Total	29.5	58

Kruskal-Wallis Statistic 34.4331
P-Value, Using Chi-Squared Approximation 0.0000

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	7	9789.6	1398.51	10.9	0.0000
Within	50	6415.9	128.32		
Total	57	16205.5			

Total number of values that were tied 31
Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 58 Missing Cases 6

Bioensayo 2

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for AGALLAS by TRAT

TRAT	Mean Rank	Sample Size
2	25.4	8
51	29.4	8
92	41.1	8
97	42.6	8
98	42.7	8
C+	37.6	8
C-	5.1	8
CQ	36.1	8
Total	32.5	64

Kruskal-Wallis Statistic 26.0337
P-Value, Using Chi-Squared Approximation 0.0005

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	7	9023.4	1289.05	5.63	0.0001
Within	56	12812.6	228.80		
Total	63	21836.0			

Total number of values that were tied 16
Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 64 Missing Cases 0