UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Evaluación del efecto de liofilizado de cubios (*Tropaeolum tuberosum*) en las poblaciones microbianas de suelo como estrategia de manejo de rhizoctoniasis en cultivo de papa

Maria Irene Chabur Ortegón

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá, Colombia
2012

Evaluación del efecto de liofilizado de cubios (*Tropaeolum tuberosum*) en las poblaciones microbianas de suelo como estrategia de manejo de rhizoctoniasis en cultivo de papa

Maria Irene Chabur Ortegón

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias - Bioquímica

Director:
Pedro Filipe De Brito Brandão, Ph.D.

Codirectora:
Celsa García Domínguez, Ph.D.

Línea de Investigación:
Sanidad vegetal de la papa y Microbiología Ambiental

Grupos de Investigación:
Grupo de Investigación en Papa
y
Grupo de Estudios para la Remediación y Mitigación de Impactos Negativos al Ambiente
(G.E.R.M.I.N.A.)

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá, Colombia
2012

A Dios por permitirme vivir este proceso de aprendizaje. A mis padres, a mi hermana, a mis sobrinos y a Emiliano les agradezco su comprensión, su apoyo y su esfuerzo durante esta etapa tan importante en mi vida.

Agradecimientos

A mi director Pedro Filipe De Brito Brandão por su apoyo incondicional y disposición para compartir sus conocimientos y experiencia.

A mi codirectora Celsa García Domínguez por darme la oportunidad y la confianza de realizar este trabajo en su grupo de investigación.

A los miembros del grupo de Investigación de Papa, especialmente a Carol Puentes, Johan Cifuentes, Rosita Ferrucho y Nathalie Martínez, por compartir sus conocimientos, su experiencia y por su aporte a este trabajo.

A todas las personas que hacen parte de laboratorio Antonio Angarita Zerda de la Facultad de Agronomía por su colaboración y apoyo incondicional.

A la profesora Blanca Ligia Higuera y a los integrantes del laboratorio Hospedero-Patógeno especialmente a Harold Ardila y Carolina Cuellar por su apoyo y por permitirme realizar parte de esta investigación en sus instalaciones.

Al profesor Oscar Oliveros por su asesoría y disposición.

A mis amigos especialmente a Lorena Parra, Dayhana Benavidez, Camilo Beltrán y Deysy Juyo por su soporte emocional y amistad.

Agradecimiento especial a las instituciones: Universidad Nacional de Colombia (Vicedecanatura de Investigación de la Facultad de Ciencias y Facultad de Agronomía), Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia, Asohofrucol y Colciencias (Convocatoria Jóvenes Investigadores 2009). Por sus recursos aportados a este trabajo de Investigación.

A mis padres, Jose y Amparo; a mi hermana Karol; a mis sobrinos, Mateo y Martina y a Emiliano por su amor, confianza y apoyo incondicional durante el transcurso de este proceso. Les agradezco su compañía, por hacer parte de mi vida y por guiarme por un buen camino.

Resumen

Rhizoctonia solani GA-3 es un hongo patógeno de suelo importante en cultivos de papa. Causa reducciones y pérdidas en el tamaño y el número de tubérculos disminuyendo su calidad. Esta investigación se realizó con el fin de evaluar una posible estrategia de manejo del patógeno utilizando el proceso de biofumigación con glucosinolatos y los productos de hidrólisis de los cubios. Se evaluó en laboratorio el efecto de 65 accesiones de cubios (*Tropaeolum tuberosum*) sobre el patógeno utilizando suelo con antecedentes de presencia de la enfermedad, colectado en el municipio de Zipaquirá, Cundinamarca. Se mezcló 0.1 g de cubio liofilizado con 100 g de suelo y se cuantificó la densidad de hifas de *R. solani* ocho días después de la incorporación de los cubios mediante el uso de palillos de madera estériles como soporte para aislar el hongo. A partir de los resultados anteriores se realizó un ensayo en invernadero con ocho accesiones de cubios (Ttun 5, 19, 30, 54, 56, 61, 62 y 69), las cuales fueron seleccionadas con el fin de evaluar el efecto sobre la severidad e incidencia de la enfermedad causada por *R. solani*. Para esto se cuantificó el patógeno, además de otras poblaciones microbianas (pseudomonads fluorescentes, *Trichoderma* sp., bacterias totales y hongos totales) y se evaluó la lesión en tallo y estolón. Se seleccionó la accesión Ttun 5 de cubios por su mayor efecto sobre las hifas del patógeno y sobre la incidencia y severidad de la enfermedad, demostrando su potencial como biofumigante. A partir de los ensayos de invernadero se tomaron muestras de suelo y se estimó la densidad de la población de R. *solani* GA-3 y *Pseudomonas* sp. por PCR cuantitativa en tiempo real obteniendo bajas concentraciones en el suelo.

Palabras clave: *Solanum tuberosum* L., rhizoctoniasis, enmienda biológica, isotiocianatos, PCR tiempo real, sonda TaqMan.

Abstract

Rhizoctonia solani AG-3 is an important soil-borne pathogen in potato crops. The fungi causes reductions and losses in the size and numbers of tubers diminishing crop yield quality. This research was conducted to evaluate a possible management strategy of the pathogen using a biofumigation process with glucosinolates and hydrolysis products of cubios. In the laboratory, the experiment evaluated the effect of 65 accesions of cubio (*Tropaeolum tuberosum*) on the pathogen using soil from the town of Zipaquira, Cundinamarca with a history of occurrence of the disease. We mixed 0,1 g lyophilized cubio with 100 g of soil and we quantified the density of hyphae of *R. solani* eight days after the incorporation of cubios using sterile wooden toothpicks as support to isolate the fungus. Based on the previous results, we performed an assay in a greenhouse with eight accessions of cubios (Ttun5, 19, 30, 54, 56, 61, 62 and 69), which were selected to assess the impact on the severity and incidences of disease caused by *R.solani*, we quantified the pathogen, in addition to other microbial populations (fluorescent pseudomonads, *Trichoderma* sp., total bacteria and total fingi) and evaluated the damage to stem and stolon. We selected the accession Ttun 5 of cubios its greater effect on hyphae of the pathogen, and effect on incidence and severity of the disease, this showed the potential of the method as bio-fumigant. Based on the greenhouse trials, we took soil samples and estimated the population density of *R.solani* GA-3 and *Pseudomonas* sp. by real-time PCR and we obtained low concentrations in soil.

Keywords: *Solanum tuberosum* L., rhizoctoniasis, amendment biological, isothiocyanate real-time PCR, TaqMan probe.

Contenido

	Pág
RESUMEN	**VI**
CONTENIDO	**VIII**
LISTA DE FIGURAS	**XII**
LISTA DE TABLAS	**XV**
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	**XVIII**
INTRODUCCIÓN	**1**
1. ESTADO DEL ARTE	**4**
1.1 Glucosinolatos	**4**
1.1.1 Sistema glucosinolato-mirosinasa	7
1.1.2 Adsorción, hidrólisis y degradación de glucosinolatos	8
1.2 Isotiocianatos	**9**
1.2.1 Adsorción, volatilización y degradación de isotiocianatos	9
1.3 Otros productos de hidrólisis	**10**
1.4 El concepto de Biofumigación	**10**
1.5 El cubio (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón)	**11**
1.6 La papa (*Solanum tuberosum* L.)	**12**
1.6.1 *Rhizoctonia solani* Kühn	13
1.6.1.1. Grupo de anastomosis de *R. solani*	14
1.6.2 Costra negra o rhizoctoniasis y agente causal	15

1.6.2.1 Ciclo de la enfermedad 16
1.6.2.2 Síntomas 16
1.6.2.3 Estrategias de manejo de la enfermedad 17

1.7 Métodos para conteo de microorganismos de suelo 18
1.7.1 Métodos microbiológicos 18
1.7.2 Métodos moleculares 18
1.7.2.1. PCR en tiempo real (qPCR) 19
1.7.3 Métodos para cuantificación de *R. solani* 23

2. METODOLOGIA 24

2.1 Material vegetal 24
2.1.1 Clasificación física de los cubios 25

2.2 Muestreo de suelo 25

2.3 Bionsayos de laboratorio: Evaluación del efecto de accesiones de cubios sobre *Rhizoctonia solani.* 26
2.3.1 Preparación de cubio-suelo 26
2.3.2 Evaluación del efecto de las 65 accesiones de cubios sobre *R. solani* 27
2.3.3 Análisis de datos 27

2.4 Bioensayos en invernadero 27
2.4.1 Obtención de aislamientos de *R. solani* GA-3 y preparación de inóculo para ensayos de invernadero 27
2.4.2 Evaluación del efecto ocho accesiones de cubio sobre *R. solani* GA-3 y microbiota total 28
2.4.2.1. Cuantificación de *R. solani* y la microbiota del suelo 29
2.4.2.2. Evaluación de la incidencia y severidad de la enfermedad 30
2.4.3 Evaluación de una accesión de cubios sobre tres aislamientos de *R. solani* GA-3 30
2.4.4 Evaluación del efecto de una accesión de cubio en la incidencia y severidad de la enfermedad en tres cultivares de papa 31
2.4.5 Análisis de datos 32

2.5 Cuantificación absoluta de *R. solani* GA-3 y *Pseudomonas* sp. por PCR en tiempo real (qPCR) 32
2.5.1 Cuantificación de *R. solani* GA-3 por qPCR 32
2.5.2 Cuantificación de *Pseudomonas* sp. por qPCR 33
2.5.2.1. Extracción de ADN 33
2.5.2.2. PCR convencional 33
2.5.2.3. Clonación, extracción de ADN plasmídico y purificación 33
2.5.2.4. Obtención de la curva estándar 34
2.5.3 Ensayos de PCR en tiempo real con muestras de suelo 35
2.5.3.1. Extracción de ADN de muestras de suelo 35
2.5.3.2. Cuantificación de *R. solani* GA-3 y *Pseudomonas* sp. en suelo por qPCR 35

2.6 Comparación de metodologías de cuantificación microbiológica y molecular 35

3. RESULTADOS 37

3.1 Clasificación física de los cubios 37

3.2 Bioensayos de laboratorio: Evaluación del efecto de accesiones de cubios sobre *Rhizoctonia solani* 38

3.3 Bioensayos en invernadero 41
3.3.1 Obtención de aislamientos de *R. solani* GA-3 y obtención de inóculo 41
3.3.2 Evaluación del efecto de accesiones de cubios seleccionadas sobre *R. solani* y la microbiota del suelo 41
3.3.3 Evaluación de accesión Ttun 5 sobre tres aislamientos de *R. solani* GA-3 48
3.3.4 Evaluación del efecto de una accesión de cubio en la incidencia y severidad de la enfermedad en tres cultivares de papa 53

3.4 Cuantificación absoluta de *R. solani* GA-3 y *Pseudomonas* sp. por PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) 56
3.4.1 Cuantificación de *Rhizoctonia solani* GA-3 por qPCR 56
3.4.2 Cuantificación de *Pseudomonas* sp. por qPCR 56
3.4.2.1. PCR convencional 56
3.4.2.2. Clonación y obtención de ADN plasmídico 57
3.4.2.3. Obtención de la curva estándar 57
3.4.3 Ensayos de PCR en tiempo real con muestras de suelo 59

3.5 Comparación de metodologías de cuantificación microbiológica y molecular 63

4. DISCUSIÓN 65

4.1 Bioensayos de laboratorio: Evaluación del efecto de accesiones de cubios sobre *Rhizoctonia solani* 65

4.2 Bioensayos en invernadero: Evaluación del efecto de ocho accesiones de cubios sobre *R. solani* y microbiota total 69

4.3 Bioensayos en invernadero: Evaluación del efecto de la accesión Ttun de cubio sobre la incidencia y severidad en tres cultivares de papa y sobre la patogenecidad de tres aislamientos de *R. solani* GA-3 71

4.4 Cuantificación absoluta de *R. solani* GA-3 y *Pseudomonas* sp. por qPCR 73

4.5 Comparación de metodologías de cuantificación microbiológica y molecular 76

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 77

5.1 Conclusiones 77

5.2 Recomendaciones 78

A. ANEXO: PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN DE MICELIO DE *R. SOLANI* SEGÚN PROTOCOLO DEL DNEASY PLANT KIT (QIAGEN) 79

B. ANEXO: PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN MS (MURASHIGE AND SKOOG, 1962) AL 10 % 80

C. ANEXO: CURVA ESTÁNDAR OBTENIDA EN QPCR PARA CUANTIFICACIÓN ABSOLUTA DE RHIZOCTONIA SOLANI GA-3. GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN PAPA (DATOS NO PUBLICADOS) 81

D. ANEXO: PROTOCOLOS DE ENSAYOS PARA REALIZAR CURVA DE CALIBRACIÓN POR PCR EN TIEMPO REAL PARA *PSEUDOMONAS FLUORESCENS.* 83

E. ANEXO: PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN DE SUELO EMPLEANDO KIT COMERCIAL POWER SOIL® DNA ISOLATION KIT (LABORATORIOS MO BIO) 86

F. ANEXO: CURVA DE AMPLIFICACIÓN EN PCR EN TIEMPO REAL DE *PSEUDOMONAS* SP. UTILIZANDO SYBR® GREEN. 87

G. ANEXO. CURVAS DE AMPLIFICACIÓN EN PCR EN TIEMPO REAL DE *R. SOLANI* GA-3 Y *PSEUDOMONAS* SP EN MUESTRAS DE SUELO. UNIDAD DE FLUORESCENCIA RELATIVA (RFU) VS. EL NÚMERO DE CICLOS 89

BIBLIOGRAFÍA 93

Lista de figuras

Pág.

Figura 1. Estructura química general de los glucosinolatos (Fahey et al., 2001). **4**

Figura 2. Hidrólisis de los glucosinolatos. Productos de hidrólisis que pueden ser formados dependiendo del glucosinolato específico, presencia de enzimas (mirosinasa y otras) y factores ambientales. Los isotiocianatos, nitrilos y tiocianatos son los que más se encuentran en el suelo. Adaptado de Gimsing & Kirkegaard (2009). **7**

Figura 3. Destino de los glucosinolatos e isotiocianatos en el suelo. Adaptado de Gimsing & Kirkegaard (2009). **8**

Figura 4. Accesiones de cubios de la Colección Central de la Universidad Nacional de Colombia. A, Accesión Ttun 14; B, Accesión Ttun 45; C, Accesión Ttun 31; D, Accesión Ttun 25; E, Accesión Ttun 28; F, Accesión Ttun 1; G,. Accesión Ttun 7; H, Accesión Ttun 29. **12**

Figura 5. Micelio café, ramificación de micelio en ángulo recto, constricción de la hifa (Flechas blancas) y formación del septo cerca a la ramificación (Flechas negras) (400X, azul de lactofenol) (Ferrucho & García, 2012). **14**

Figura 6. Lesiones causadas por *R. solani* en papa. Derecha, Lesiones en tallo color marrón (Ferrucho & García, 2012). Izquierda Tubérculos de papa con esclerocios (Fox, 2006). **17**

Figura 7. La curva de amplificación ideal de PCR en tiempo real. Representa la intensidad de fluorescencia frente al número de ciclos, es una curva sigmoidal. La amplificación temprana no se puede observar porque las emisiones son enmascaradas por el ruido. Cuando el amplicon esta presente, el progreso exponencial puede ser monitoreado y la velocidad de la amplificación entra a una fase linear. Como los cebadores y la enzima comienzan a limitarse, y los productos inhibidores de la PCR, hace que la reacción disminuya su velocidad, y entre a una fase de transición y eventualmente llega a la fase plateau donde hay poco o no aumentó de la fluorescencia. El punto en el cual la fluorescencia supera el ruido, se conoce como umbral (línea horizontal) y es llamado el ciclo umbral o punto de cruce (Ct o CP), y este valor es usado en el cálculo de la cantidad de molde durante la cuantificación en PCR en tiempo real. Adaptado de Mackay (2004). **20**

Figura 8. Ilustración grafica que muestra la señal de fluorescencia generada por sondas TaqMan ®. Adaptado de Tevfik (2006). **22**

Figura 9. Ilustración grafica que muestra la señal de fluorescencia generada por SYBR Green ®. Adaptado de Tevfik (2006). **22**

Figura 10. Municipio de Zipaquirá, Cundinamarca. Los dos puntos (G2 y G11) georeferenciados subrayados corresponden a las fincas productoras de papa donde se obtuvieron las muestras de suelo utilizadas en el presente estudio. **26**

Figura 11. Clasificación fenotípica de algunos ejemplares de los cubios utilizados en este estudio de acuerdo a su color predominante y secundario de piel: A, accesión Ttun 31 (morado); B, accesión Ttun 19 (amarillo); C, accesión Ttun 4 (blanco-morado); y D, accesión Ttun 62 (blanco-rojo). **37**

Figura 12. Observación bajo microscopio de luz de ejemplar *Rhizocotonia solani* aislado a partir de suelo de Zipaquirá punto G2. Ramificación de micelio en ángulo recto y constricción de la hifa (flechas blancas) y formación del septo cerca a la ramificación (flechas negras). Aumentó de 40X, tinción con azul de lactofenol. **39**

Figura 13. Productos de PCR amplificados a partir de la región ITS (500 pb) utilizando los primers Rs1F2/Rs2R1 para identificación de aislamientos de *R. solani* GA-3. Fila 1: aislamiento Zipaquirá 1; Fila 2: aislamiento Zipaquirá 2; Fila 3: aislamiento Subachoque 1; Fila 4: aislamiento Subachoque 2; Fila 5: aislamiento Villa Pinzón 1; Fila 6: aislamiento Villa Pinzón 2; Fila 7: control negativo; M: Marcador de 100pb (Invitrogen). **41**

Figura 14. Ejemplares observados bajo microscopio de luz de bacterias aisladas a partir de suelo de Zipaquirá punto G2, teñidos con tinción de Gram. A, Bacilos Gram negativos; B, Bacilos Gram positivos. Aumentó de 100X utilizando aceite de inmersión. **42**

Figura 15. Ejemplares observados bajo microscopia óptica de hongos aislados a partir de suelo de Zipaquirá punto G2. A. *Rhizopus* sp., flechas negras indican esporangióforo y esporangio esférico; B. *Trichoderma* sp., flechas negras indican fiálides y conidióforo; C. *Penicilium* sp., flechas negras indican coniosporas y ramificaciones filoides. Aumentó de 40X; tinción con azul de lactofenol. **43**

Figura 16. Efecto de las accesiones de cubios sobre lesiones en estolón causado por *Rhizoctonia solani* GA-3. Lesiones en estolón obtenidas en diferentes tratamientos (flechas blancas). Accesiones: A, Ttun 61; B, Ttun 5; C, Ttun 56; y D, Sin cubio. **48**

Figura 17. Efecto de la accesión Ttun 5 de cubio sobre tres aislamientos de *Rhizoctonia solani* GA-3. Lesión en estolón obtenida con diferentes aislamientos (flechas blancas). A, Zipaquirá; B, Subachoque 54; C, Villa Pinzón. Lesiones producidas por tres aislamientos de R. solani GA-3 en estolones de papa, cultivar Diacol Capiro. El suelo naturalmente infestado fue adicionado con (cantidad) polvo de cubio liofilizado. **52**

Figura 18. Efecto de la accesión Ttun 5 de cubio sobre tres aislamientos de *Rhizoctonia solani* GA-3. Severidad en tallo obtenida con diferentes aislamientos (flechas blancas) en la réplica dos. A, Subachoque; B, Zipaquirá; C, Testigo. Lesiones

producidas por tres aislamientos de R. solani GA-3 en base de tallo de plantas de papa, cultivar Diacol Capiro. El suelo fue adicionado con 0,5 g de cubio liofilizado. **53**

Figura 19. Efecto de la accesión Ttun 5 de cubio sobre *Rhizoctotnia solani* GA-3. Lesiones en estolón (flechas negras) en tres cultivares de papa: A, Cultivar Diacol Capiro; B, Cultivar Criolla; y C, Suprema. **55**

Figura 20. Productos de PCR obtenidos por amplificación parcial del gen 16S rRNA (65 pb) utilizando los primers Pf/Pr específicos para la identificación del género Pseudomonas. Carril 1-9: amplicones de 65 pb del gen 16S rRNA de *Pseudomonas fluorescens*; M: Marcador de 10 pb (izquierda) y 100 pb (Invitrogen). **56**

Figura 21. Diluciones de ADN plasmídico de *Pseudomonas* a distintas concentraciones. Fila 1: 500 ng/µl; fila 2: 250 ng/µl; fila 3: 100 ng/µl; fila 4: 50 ng/µl; fila 5: 25 ng/µl; fila 6: 10 ng/µl; fila 7: 5 ng/µl; fila 8: 500 pg/µl; fila 9: 50 pg/µl; fila 10: 5 pg/µl; fila 11: 500 fg/µl; fila 12: 50 fg/µl; fila 13: 5 fg/µl; fila M: Marcador de 100 pb (Invitrogen). **58**

Figura 22. Correlación entre los valores de Ct (línea azul) obtenidos en PCR en tiempo real y el log de la concentración de ADN (fg/µl) de *Pseudomonas* sp. Ecuación obtenida a partir de la regresión lineal. **59**

Figura 23. Correlación de la densidad de hifas de *R. solani* GA-3 (propágulos/g de suelo) y la concentración de ADN (fg/µl) detectada por PCR en tiempo real a partir de muestras de suelo obtenidas en bioensayos de invernadero. **63**

Figura 24. Correlación de la densidad de hifas de *R. solani* GA-3 (propágulos/g de suelo) y la concentración de ADN (fg/µl) detectada por qPCR. Arriba: Evaluación del efecto de ocho accesiones de cubios. Abajo Izquierda: Evaluación del efecto de la accesión Ttun 5 sobre tres aislamientos del patógeno; Abajo derecha: Evaluación del efecto de la accesión Ttun 5 sobre incidencia y severidad de la enfermedad en tres cultivares de papa. **64**

Figura 25. Correlación de las UFC/g de suelo de *Pseudomonas* sp. y la concentración de ADN (fg/µl) detectada por PCR en tiempo real a partir de muestras de suelo obtenidas en bioensayos de invernadero. **64**

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1. Clasificación de los glucosinolatos de acuerdo a su estructura química y su distribución en diferentes familias de angiospermas. Adaptado de Fahey et al. (2001). **5**

Tabla 2. Descriptores y opciones de descriptores empleados para la clasificación fenotípica de cubios. **25**

Tabla 3. Composición de los tratamientos realizados para evaluar el efecto de ocho accesiones de cubios sobre *R. solani* y microbiota total. **29**

Tabla 4. Composición de los tratamientos realizados para evaluar el efecto de la accesión Ttun 5 de cubios sobre tres aislamientos de *R. solani* GA-3. **31**

Tabla 5. Composición de los tratamientos realizados para evaluar el efecto de la accesión Ttun 5 de cubios en la incidencia y severidad de la enfermedad en tres cultivares de papa. **32**

Tabla 6. Accesiones de cubios de la colección central de la Universidad Nacional de Colombia evaluados en este estudio. Clasificación fenotípica de acuerdo al color predominante y secundario de la piel del tubérculo. **38**

Tabla 7. Efecto de 65 accesiones de cubios sobre densidad de hifas de *R. solani* (propágulos/g suelo) en suelo naturalmente infestado proveniente de cultivo de papa y concentración de glucosinolatos totales (µmoles/g cubio seco) en cada uno de los cubios de la colección de la Universidad Nacional de Colombia. **40**

Tabla 8. Evaluación del efecto de accesiones de cubios sobre la población de pseudomonads fluorescentes y *Trichoderma* sp. Se muestra el promedio de UFC/g de suelo a los ocho y treinta días después de agregar los cubios. **44**

Tabla 9. Evaluación del efecto de accesiones de cubios sobre bacterias y hongos totales. Se muestra el promedio de UFC/g de suelo a los ocho y treinta días después de agregar los cubios. **44**

Tabla 10. Promedio de las tres réplicas biológicas de la evaluación del efecto de accesiones de cubios sobre *Rhizoctonia solani* GA-3. Se muestra el promedio de no. de colonias/g de suelo a los ocho y treinta días después de agregar los cubios. **45**

Tabla 11. Promedio de tres réplicas biológicas de la evaluación del efecto de cubios sobre la longitud (raíz, tallo y total) de la planta de papa cultivar Diacol Capiro a los treinta días después de agregar los cubios, durante tres réplicas biológicas. **47**

Tabla 12. Promedio de tres réplicas biológicas de la evaluación del efecto de accesiones de cubios sobre las lesiones en estolón, incidencia y severidad en planta de papa cultivar Diacol Capiro a los treinta días después de agregar los cubios. **47**

Tabla 13. Promedio de tres réplicas biológicas de la evaluación del efecto de la accesión Ttun 5 de cubio sobre tres aislamientos de *Rhizoctonia solani* GA-3. Densidad de hifas (Propágulos/ g de suelo) a los ocho y treinta días después de agregar el cubio. **49**

Tabla 14. Promedio de tres réplicas biológicas de la evaluación del efecto de la relación accesión Ttun 5 de cubio y distintos aislamientos de *R. solani* GA-3 sobre pseudomonads fluorescentes y *Trichoderma* sp. Se muestra el promedio de UFC/g de suelo a los ocho y treinta días después de agregar el cubio. **50**

Tabla 15. Promedio de tres réplicas biológicas de la evaluación del efecto de la relación accesión Ttun 5 de cubio y distintos aislamientos de *R. solani* GA-3 sobre bacterias y hongos totales. Se muestra el promedio de UFC/g de suelo a los ocho y treinta días después de agregar el cubio. **51**

Tabla 16. Promedio de tres réplicas biológicas de la evaluación del promedio de tres réplicas biológicas del efecto de la relación accesión Ttun 5 de cubio y distintos aislamientos de *R. solani* GA-3 sobre de la longitud (raíz, tallo y total) de planta de papa cultivar Diacol Capiro a los treinta días después de agregar el cubio. **51**

Tabla 17. Promedio de tres réplicas biológicas de la evaluación del efecto de la accesión Ttun 5 de cubios y distintos aislamientos de *R. solani* GA-3 sobre lesiones en estolón, incidencia y severidad en planta de papa cultivar Diacol Capiro a los treinta días después de agregar el cubio, durante tres réplicas biológicas. Efecto de adición cubio al suelo en la infección de tres aislamientos de *R. solani* GA-3 en estolones de papa. **52**

Tabla 18. Promedio de tres réplicas biológicas de la evaluación del efecto de la accesión Ttun 5 de cubio sobre una mezcla de aislamientos de *Rhizoctonia solani* GA-3. Densidad de hifas (Propágulos/ g de suelo) a los ocho y treinta días después de agregar el cubio en tres diferentes cultivares de papa. **54**

Tabla 19. Promedio de tres réplicas biológicas de la evaluación del efecto de la relación accesión Ttun 5 de cubio y combinación de aislamientos de *R. solani* GA-3 sobre el promedio de la longitud (raíz, tallo y total) de la planta en tres cultivares de papa a los treinta días después de agregar el cubio. **54**

Tabla 20. Promedio de tres réplicas biológicas de la evaluación del efecto de la relación accesión Ttun 5 de cubio y combinación de aislamientos de *R. solani* GA-3 sobre el promedio de lesiones en estolón, severidad e incidencia en tres cultivares de papa a los treinta días después de agregar el cubio, durante tres réplicas biológicas. **55**

Tabla 21. Valores obtenidos de C_t por qPCR a partir de diferentes concentraciones fg/µl de ADN plasmídico de *Pseudomonas* sp. para obtención de la curva estándar de cuantificación absoluta. **58**

Tabla 22. Cuantificación por qPCR de la evaluación del efecto de las accesiones de cubios sobre el promedio de la concentración de ADN de *R. solani* GA-3 (fg/g de suelo) a los ocho y treinta días después de adicionar los cubios. **60**

Tabla 23. Cuantificación por qPCR de la evaluación del efecto de accesiones de cubios sobre el promedio de la concentración de ADN de *Pseudomonas* sp. (fg/g de suelo) a los ocho días después de adicionar los cubios. **61**

Tabla 24. Cuantificación por qPCR de la evaluación del efecto de la accesión Ttun 5 de cubio sobre el promedio de la concentración de ADN de tres aislamientos de *Rhizoctonia solani* GA-3 (fg/g de suelo) a los ocho y treinta días después de adicionar el cubio. **61**

Tabla 25. Cuantificación por qPCR de la evaluación del efecto de la relación accesión Ttun 5 de cubios y tres aislamientos diferentes de *Rhizoctonia solani* GA-3 sobre la concentración de ADN de *Pseudomonas* sp. (fg/g de suelo) a los ocho días después de adicionar el cubio **62**

Tabla 26. Cuantificación por qPCR de la evaluación del efecto de la accesión Ttun 5 de cubio sobre de la concentración de ADN (fg/g de suelo) de una mezcla de aislamientos de *Rhizoctonia solani* GA-3 en tres cultivares de papa a los los ocho y treinta días después de adicionar el cubio. **62**

Lista de Símbolos y abreviaturas

C_t: Número de ciclo, en el que el valor de la fluorescencia emitida cruza la línea umbral.

ESP: Proteína epitioespecifica

GA: Grupo de anastomosis

GLS: Glucosinolatos

ITC: Isotiocianatos

Pb: Pares de bases

qPCR: PCR en tiempo real

RFU: Unidad de fluorescencia relativa

Ttun: Nomenclatura asignada para las accesiones que pertenecen a la Colección Central de Cubios de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia.

UFC: Unidades formadoras de colonias

Introducción

La papa (*Solanum tuberosum* L.) se distribuye a lo largo del continente americano, desde el suroeste de Estados Unidos hasta Chile, Argentina y Uruguay, se considera uno de vegetales más productivos que se cultiva en el mundo, y provee la mayor fuente de nutrición e ingreso para muchas sociedades (Rodríguez, 2009). Ocupa un lugar importante en la agricultura, economía y seguridad alimentaria, situándose en el cuarto lugar de los cultivos o alimentos que sustentan la nutrición a nivel mundial, después del maíz, el trigo y el arroz (Rodríguez, 2009). El principal país productor es China con 74.7 millones de toneladas durante el 2010 (FAO, 2012).

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura para el 2010, el cultivo de papa en América del sur es liderado por Brasil, el cual ocupa el puesto número 17 en la producción mundial con 3.5 millones de toneladas seguido por Perú con 3.3 millones de toneladas y en tercer lugar se encuentra Colombia con una producción de 2.1 millones de toneladas, un área cosechada de 141.967 ha, y un rendimiento de 149.463 hectogramos/ha (FAO, 2012). Los principales departamentos productores son Cundinamarca (35%), Boyacá (30%), Nariño (15%) y Antioquia (10%) (Villareal et al., 2007).

La papa presenta algunas plagas y enfermedades de importancia económica causadas por insectos, bacterias, hongos y virus. Las principales enfermedades causadas por bacterias son pudrición blanda (*Erwinia carotovora*) y marchitez temprana (*Ralstonia solanacearum*); entre las enfermedades por hongos se reconoce el tizón tardío que es causado por *Phytophthora infestans*, la sarna polvosa causada por *Spongospora subterránea* y *Rhizoctonia solani* Kühn que causa la enfermedad “rhizoctoniasis” o “Costra Negra”; finalmente de los virus de mayor importancia en este cultivo se encuentra el virus del amarillamiento de venas de la papa (PYVV).

R. solani es un hongo que presenta diferentes grupos de anastomosis (Carling et al., 2002), siendo que el GA-3 es el que se reporta principalmente en plantas de papa y es el grupo más asociado en causar rhizoctoniasis (Bains & Bisht, 1995; Brewer & Larkin, 2005). La enfermedad causada por el patógeno *R. solani* consiste en lesiones de tallo, brotes, raíces y estolones (Brewer & Larkin, 2005). Esta enfermedad se caracteriza por la formación de esclerocios, estructuras de resistencia que permiten la sobrevivencia del hongo. Los daños de esta enfermedad, se presentan cuando la infección en plántula es severa y cuando la formación de esclerocios reduce la calidad y cantidad comercial de los tubérculos y de tubérculos-semilla (Jeger et al., 1996; Tsror et al., 2001), ademas reduce la densidad de plantas y por lo tanto el rendimiento del cultivo (Jeger et al., 1996). Las pérdidas en cuanto a la producción causada por la enfermedad conocida como “rhizoctoniasis” o “Costra Negra” de la papa en Colombia han sido difícil de documentar (Ñustez 2002).

Debido a que existe un gran desconocimiento sobre esta enfermedad y sobre el manejo del agente causal, se ha favorecido el aumentó de la diseminación del patógeno a otras zonas de producción. Adicionalmente, porque este cultivo es de constante siembra, origina un aumentó de la densidad del patógeno en el suelo (Rodríguez et al., 2002). Como estrategia de manejo de la enfermedad se han llevado a cabo diversas alternativas de prácticas culturales especialmente rotación de cultivos (Secor & Gudmestad, 1999). Larkin & Honeycutt (2006) evaluaron la rotación de cultivos de frijol-canola, frijol-cebada, maíz-canola y cultivo de papa continuo, y evidenciaron una notable reducción de la incidencia y severidad de la enfermedad en tallos y estolones y una mejor calidad del tubérculo debido a la disminución de inóculo del patógeno.

El control biológico es otra posibilidad de manejo que utiliza microorganismos biocontroladores para reducir el inóculo del patógeno como alternativa ambiental y ecológica, y además pueden mejorar las propiedades fisicoquímicas y biológicas del suelo. *Trichoderma harzianum* en combinación con *Bacillus subtilis* han demostrado el control de la rhizoctoniasis (Tsror et al., 2001; Brewer & Larkin, 2005). Sin embargo, la mayoría de agricultores en Colombia tiene como principales estrategias el uso de semilla sana y el empleo de plaguicidas como tratamiento de la semilla (Ñustez, 2002). Esta última es una práctica que tiene limitaciones de uso por la tendencia de la agricultura actual hacia la implementación de las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA), las cuales son un conjunto de normas, recomendaciones y técnicas orientadas a asegurar la protección de la salud humana y el medio ambiente.

Una alternativa de manejo como componente de las BPA es el proceso de biofumigación que tiene como función suprimir plagas y patógenos (Brown & Morra, 1997; Larkin & Griffin, 2007), a través de la liberación de isotiocianatos (ITC), productos de hidrólisis de los glucosinolatos (GLS) por la acción de la enzima mirosinasa causando un efecto biocida (Gimsing & Kirkegaard, 2006; Gimsing & Kirkegaard, 2009). Desde que los isotiocianatos son biológicamente activos, han sido extensamente usados como fumigantes de amplio espectro, por lo tanto existe una relación lógica y un impulso a la idea de aprovechar y desarrollar aun más una fuente biológica de los isotiocianatos para suprimir plagas de suelo y enfermedades (Matthiessen & Kikegaard, 2006).

Los isotiocianatos son tóxicos para muchos organismos, principalmente han sido muy exitosos en la reducción de hongos patógenos de suelo (Brown & Morra, 1997; Kirkegaard & Sarwar, 1999; Gimsing & Kirkegaard, 2009), nemátodos, insectos (Brown & Morra, 1997), y también se ha evaluado su efecto en el mejoramiento del rendimiento de los cultivos (McGuire, 2004). Este proceso de biofumigación permite el control biológico de patógenos del suelo y contribuye al empleo de controles ecológicos que favorezcan el medio ambiente y reduzcan costos de producción, reemplazando los plaguicidas de síntesis química y además como valor agregado, puede contribuir como materia orgánica al cultivo (Matthiessen & Kirkegaard, 2006).

La concentración de GLS y la producción de diferentes formas de ITC varía entre las especies e incluso entre los cultivares de las mismas especies, y también se ve afectado por el desarrollo de la planta (Larkin & Griffin, 2007). Los GLS se encuentran principalmente en especies de Brassica, sin embargo en tubérculos andinos como los cubios (*Tropaeolum tuberosum*) miembro de la familia Tropaeolaceae que se cultiva en

Perú, Ecuador, Bolivia, Venezuela y Colombia se han encontrado este tipo de compuestos de azufre (Chirinos et al, 2007). Por lo tanto existe una posibilidad que indica que la presencia de estos metabolitos secundarios en los cubios puedan ser utilizados como una estrategia de manejo de la enfermedad de rhizoctoniasis en papa, debido a su efecto antimicrobiano, además por ser un método alternativo que es amigable con el ambiente (Gimsing & Kirkegaard, 2009).

La Universidad Nacional de Colombia cuenta con una Colección Central de cubios que está compuesta por 65 accesiones tomadas de diferentes zonas del país, las cuales han sido caracterizadas fenotípicamente y genotípicamente (Piñeros & Ñustez, 2004) y cuantificadas en el contenido total de GLS empleando la reducción del ión ferricianuro (Arias & Higuera, 2011), en donde se estableció que en las accesiones estudiadas este varía entre 1,20 y 30,40 µmoles/g de cubio seco, siendo mayor para la accesión Ttun 30 y menor para la accesión Ttun 37 indicando que la primera presenta un mayor potencial biofumigante por su cantidad de GLS (Arias & Higuera, 2011).

Por lo tanto el objetivo general de este trabajo es evaluar el potencial de liofilizados de cubios para el manejo de la rhizoctoniasis en cultivo de papa mediante bioensayos en laboratorio e invernadero y los específicos son cuantificar por métodos microbiológicos el efecto de cubios liofilizados en las poblaciones de *Rhizoctonia solani*, *Trichoderma* sp*.,* pseudomonads fluorescentes y la microbiota de bacterias y hongos totales en suelo; evaluar la incidencia y la severidad de la enfermedad en invernadero con y sin la aplicación de la accesión del cubio que mostró mejor resultado en la inhibición del crecimiento del patógeno durante los ensayos de laboratorio; evaluar un método molecular para cuantificar *R. solani* a partir del mismo suelo usado en los métodos microbiológicos, y comparar ambas metodologías para cuantificación del patógeno. Todo esto permitirá generar una estrategia de manejo de esta enfermedad en cultivos de papa.

1. Estado del Arte

1.1 Glucosinolatos

Los GLS son aniones orgánicos solubles en agua y están presentes en las vacuolas de las plantas e incluyen más de 120 compuestos identificados (Fahey et al., 2001; Van Dam et al., 2009). Químicamente, como se observa en la Figura 1, son ésteres (Z*)*-N-hidroximinosulfato o *S*-glucopiranosil tiohidroximatos. Poseen un átomo de azufre unido a una β-D-glucopiranosa y una cadena lateral (R) sobre el carbono α del grupo imino. (Fahey et al., 2001; Arias & Higuera, 2011).

La cadena lateral clasifica los GLS en tres clases de acuerdo a las propiedades químicas generales de los aminoácidos precursores (Tokuhisa et al., 2004). La división consiste en alifático, aromático e indol, los cuales pueden tener un impacto significante en la actividad biológica del GLS y en varios de los productos de hidrólisis (Gimsing & Kirkegaard 2006). El GLS indol tiene cadenas laterales derivadas de triptófano y está entre los más extensamente distribuidos en la naturaleza (Agerbik et al., 2009). El alifático presenta una cadena recta de carbón derivada de metionina o cadenas ramificadas de isoleucina, leucina o valina, y por último el aromático se deriva de fenilalanina o tirosina (Tokuhisa et al., 2004).

Estos compuestos de sulfuro que son casi exclusivos de las familias del orden Capparales: Tovariaceae, Resedaceae, Capparaceae, Moringaceae y Brassicaceae (Brown & Morra, 1997; Matthiessen & Shackleton 2005) se clasifican en diez clases de acuerdo a su estructura química (Tabla 1; Fahey et al., 2001).

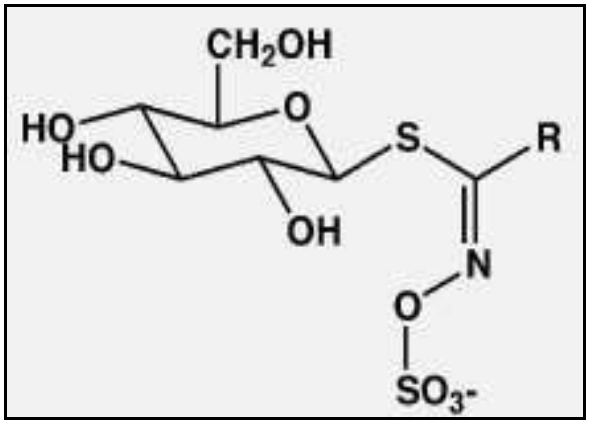
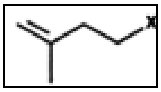
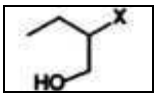


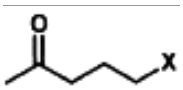
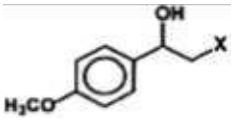
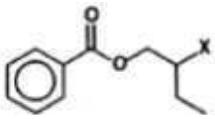
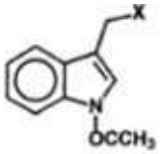
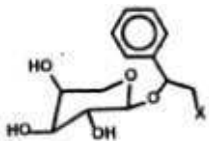
Figura 1. Estructura química general de los glucosinolatos (Fahey et al., 2001).

Tabla 1. Clasificación de los glucosinolatos de acuerdo a su estructura química y su distribución en diferentes familias de angiospermas. Adaptado de Fahey et al. (2001).

Clase	Estructura química	Ejemplo de la estructura química	Familia
A	Cadenas laterales que contienen azufre		Brassicaceae Capparaceae
B	Cadenas laterales alifáticas lineales		Brassicaceae Tropaeolaceae
C	Cadena alifática ramificada		Brassicaceae Euphorbiaceae Gyrostemonaceae Moringaceae Phytolaccaceae Salvadoraceae Tovariaceae Tropaeolaceae
D	Cadena olefínica ramificada lineal		Brassicacea
E	Cadena alifática ramificada con alcoholes		Brassicaceae Bretschineideraceae Euphorbiaceae Limnanthaceae Moringaceae Phytolaccaceae Resedaceae Tropaeolaceae

X, es la estructura central de los glucosinolatos.

Tabla 1. Continuación. Clasificación de los glucosinolatos de acuerdo a su estructura química y su distribución en diferentes familias de angiospermas. Adaptado de Fahey et al. (2001).

Clase	Estructura química	Ejemplo de la estructura química	Familia
F	Cadena alifática con cetona		Brassicaceae
G	Aromáticos		Brassicaceae Bretschineideraceae Caricaceae Limnanthaceae Moringaceae Pentadiplandraceae Phytolaccaceae Pitosporaceae Resedaceae Salvadoraceae Tropaeolaceae
H	ω-hidroalquil o benzoatos		Brassicaceae
I	Indólicos		Brassicaceae, Bataceae Capparaceae Resedaceae
J	Multi-glicosilado y otros		Brassicaceae Moringaceae Resedaceae

X, es la estructura central de los glucosinolatos. Figura 1.

Igualmente los tallos contribuyen proporcionalmente más a la biomasa total del cultivo biofumigante que las raíces y esto constituye una fuente importante del ITC. Por otro lado, se ha encontrado que las concentraciones de GLS en tubérculos disminuye a

medida que las etapas de desarrollo de la planta avanzan, pero el genotipo y el medio ambiente también afectan esta tendencia (Mattner et al., 2008).

Estos compuestos son transformados por la enzima mirosinasa (ß-tioglucosidasa glucohidrolasa), una enzima que se encuentra en la planta o está presente en el suelo (Eylen et al., 2008; Gendy et al., 2010) y es la encargada de catalizar la hidrólisis de GLS a diferentes productos dependiendo de las condiciones de la reacción (Brown & Morra 1997; Laegdsmand et al., 2007). Los principales productos obtenidos de su hidrólisis son los nitrilos, oxazolidinetriones, tiocianatos e isotiocianatos (Figura 2) (Morra & Kirkegaard, 2002). Los isotiocianatos pueden ser utilizados para controlar plagas y patógenos del suelo por su efecto biocida y mayor toxicidad mediante su incorporación al suelo (Brown & Morra, 1997; Kirkegaard & Sarwar, 1998; Gimsing & Kirkegaard, 2009). Esta reacción depende del tejido vegetal, del pH, temperatura y humedad del suelo (Kirkegaard & Matthiessen, 2004; Gimsing & Kirkegaard, 2009).

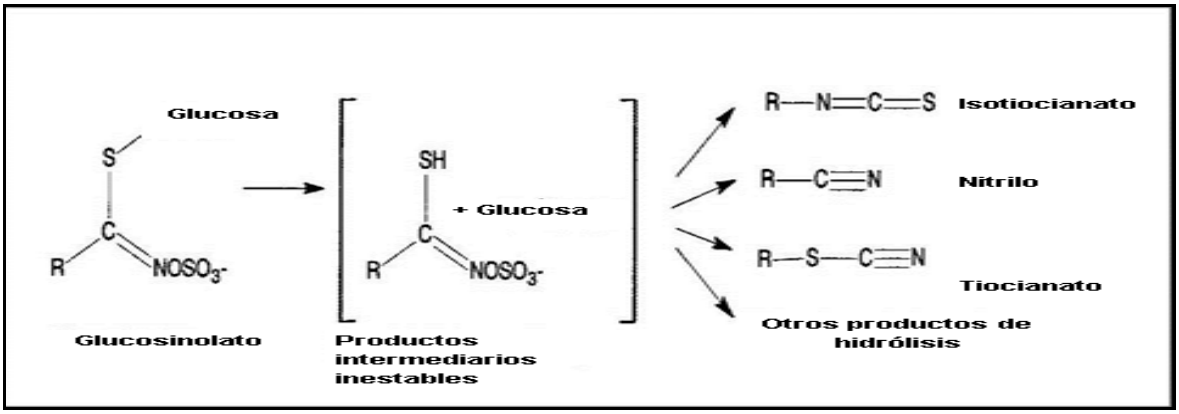


Figura 2. Hidrólisis de los glucosinolatos. Productos de hidrólisis que pueden ser formados dependiendo del glucosinolato específico, presencia de enzimas (mirosinasa y otras) y factores ambientales. Los isotiocianatos, nitrilos y tiocianatos son los que más se encuentran en el suelo. Adaptado de Gimsing & Kirkegaard (2009).

1.1.1 Sistema glucosinolato-mirosinasa

El sistema Glucosinolato-Mirosinasa está involucrado en actividades biológicas que afectan a hongos, plantas, insectos, entre otros organismos. Este sistema tiene funciones en la planta como defensa contra insectos, fitopatógenos, regulación de crecimiento y potencialmente en el metabolismo del nitrógeno y del azufre (Bones & Rossifer, 1996). Los GLS ocurren en plantas en conjugación con una enzima hidrolítica (β-tioglucosidasa glucohidrolasa), conocida comúnmente como mirosinasa (Matthiessen & Kirkegaard, 2006).

La hidrólisis de los GLS catalizada por la enzima implica inicialmente el rompimiento del enlace tioglucosídico en donde se cede una D-glucosa y un inestable tiohidroximato-O-sulfonato que espontáneamente se reordena (Bones & Rossifer, 1996). Esta enzima hidroliza los GLS formando una aglucona, que es inestable y se descompone de forma espontanea en nitrilos, tiocianatos e ITC, y por otro lado forma una D-glucosa (Figura 2).

Los productos de hidrólisis dependen del tipo de cadena, pH, presencia de iones ferrosos, otros cofactores y proteínas como la proteína epitioespecífica (Eylen et al., 2006). Por ejemplo, en semillas de *Brassica napus* y otros miembros de Brassicaceae, una proteína promueve la formación de una clase de nitrilos, llamada proteína epitioespecifica (ESP), la cual está presente durante la hidrólisis de alkenil glucosinolato que lleva a la formación de epitionitrilos (Lambrix et al., 2001). La interrupción de la célula como el corte o la cocción puede generar que la mirosinasa se desactive y no pueda transformar los GLS en los productos con efecto biocida y así mismo disminuye su actividad (Eylen et al., 2008).

1.1.2 Adsorción, hidrólisis y degradación de glucosinolatos

El destino de los GLS en el suelo está determinado por la solubilidad del agua y la falta de grupos funcionales los cuales deben interactuar con las superficies reactivas en el suelo. Los GLS son muy débiles para ser adsorbidos en todos los tipos de suelo, pero son fácilmente extraídos con agua y solventes hidrofílicos (Gimsing & Kirkegaard, 2009). Según Gimsing et al. (2007b) los GLS están disponibles para la hidrólisis en todos los tipos de suelo, por lo tanto la adsorción se descarta como un obstáculo para la biofumigación. Los productos de hidrólisis a partir de los GLS son isotiocianatos (ITC), nitrilos, tiocianatos, epitionitrilos y oxazolidinetiones, los cuales varían dependiendo de la especie de planta, sustitución en la cadena lateral, el pH de la célula, la concentración de hierro de la célula, la temperatura y la humedad del suelo (Gimsing et al., 2007b; Gimsing & Kirkegaard, 2009). Los productos de degradación de muchos GLS son de interés debido a su actividad biocida (Gimsing et al., 2007b; Gimsing & Kirkegaard, 2009), mientras otros tiene atribuciones quimioprotectivas contra el cáncer (Gendy et al., 2010). La degradación de los GLS puede ocurrir por la acción microbiana y una posterior mineralización, o bien por la lixiviación a través del suelo (Figura 3).

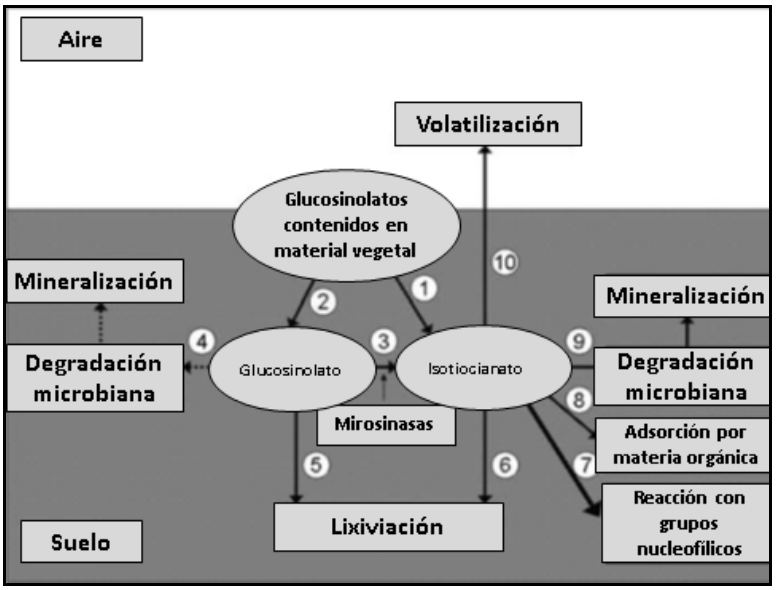


Figura 3. Destino de los glucosinolatos e isotiocianatos en el suelo. Adaptado de Gimsing & Kirkegaard (2009).

1.2 Isotiocianatos

Los ITC son uno de los productos de hidrólisis de los GLS, y son generalmente considerados los productos de hidrólisis mas tóxicos, por lo tanto la biofumigación está concentrada principalmente en la formación de este tipo de compuestos (Laegdsmand et al., 2007). Estos ITC son generalmente de vida corta en el suelo, pero con un gran potencial de actividad biocida. Normalmente sus máximos potenciales de liberación pueden ser estimados cuando se conocen las concentraciones, el tipo de glucosinolatos en los tejidos de la planta y la respectiva cantidad de biomasa (Morra & Kirkegaard, 2002). Los ITC han mostrado actividad toxica contra una gran variedad de organismos como insectos, nemátodos, hongos y bacterias (Smith & Kirkegaard, 2002; Vaughn & Berhow, 2005).

Diferentes ITC muestran una reactividad hacia los distintos organismos que depende de la dosis aplicada (Gimsing et al., 2007b; Gimsing & Kirkegaard, 2009) e incluso otros organismos que no son considerados como blancos pueden verse afectados por la acción de estos compuestos (Rumberger & Marschner, 2003). Smith & Kirkegaard (2002), evaluaron la actividad *in vitro* del 2- feniletilisotiocianato de canola sobre la comunidad microbiana (hongos, oomicetes y bacterias), en donde se concluyó que este compuesto afecta la estructura de la población microbiana evaluada después de la incorporación y durante el crecimiento activo de las plantas, verificándose además que las bacterias son generalmente más tolerantes que los patógenos eucariotas. La variabilidad en la sensibilidad al ITC fue alta entre algunos géneros como *Trichoderma* sp., *Aphanomyces*, *Gaeumannomyces*, *Phytophthora*, *Pythium* y diferentes grupos de anastomosis de *Rhizoctonia solani* (Smith & Kirkegaard, 2002).

1.2.1 Adsorción, volatilización y degradación de isotiocianatos

Los ITC son componentes lipofílicos con baja solubilidad en agua y deben ser adsorbidos y degradados rápidamente en el suelo (Laegdsmand et al., 2007). Estos compuestos pueden reaccionar con grupos nucleofílicos en el suelo, los cuales apuntan a un proceso de biofumigación, en el cual las reacciones ocurren con proteínas que son transmitidas en el suelo por diferentes organismos. Igualmente pueden ser adsorbidos rápidamente por la materia orgánica, la cual obstaculiza la lixiviación pero también disminuye la biodisponibilidad.

Estos compuestos pueden también ser degradados por microorganismos y mineralizados ó finalmente volatilizados (Figura 4) (Gimsing & Kirkegaard, 2009). Por otra parte, númerosas bacterias y hongos pueden descomponer residuos de col y generar compuestos de azufre volátiles, principalmente basados en sulfuro, por lo tanto al introducir este tipo de residuos en el suelo se generan diversos compuestos volátiles que contienen sulfuro tales como dimetil sulfuro y dimetil disulfuro que pueden suprimir algunos patógenos de suelo, plagas y malezas (Pingxiang et al., 2010). La toxicidad de los ITC y otros componentes relacionados a GLS es similar a la degradación del producto activo (metil isotiocianato) de fumigantes sintéticos como el Dazomet (Pingxiang et al., 2010).

1.3 Otros productos de hidrólisis

Los nitrilos y tiocianatos son otros productos de hidrólisis importantes que son encontrados en el suelo. La formación de nitrilo es generalmente favorecida por un pH bajo y la presencia de hierro (II), por lo que es posible que en suelos ácidos con condiciones secas y de baja actividad biológica predomine este tipo de compuestos (Matthiessen & Kirkegaard, 2006), los cuales son de larga vida en el suelo y su pérdida ocurre por degradación y adsorción. (Gimsing & Kirkegaard, 2009). Según Rice y colaboradores (2007) los tiocianatos son de gran importancia para la actividad supresora en especies arvenses y porque no son tan fácilmente degradados como los ITC, y su efecto puede persistir. El tiocianato es un anión y por lo tanto se cree que es débilmente adsorbido en el suelo, pero ha sido demostrado que desaparece en el suelo y esto se debe a una degradación microbiana (Gimsing & Kirkegaard, 2009).

1.4 El concepto de Biofumigación

El concepto de biofumigación tiene origen (~300 años A.C.) con la documentación de Theophrastus que describía que “los olores” de la col causaban efectos perjudiciales sobre las viñas (Mattner et al., 2008). La biofumigación se refiere a una práctica agrícola en donde se usan sustancias volátiles liberadas después de la incorporación de material vegetal fresco (abono verde) y/o material vegetal seco (Gimsing & Kirkegaard, 2009).

Cuando se incorpora plantas principalmente correspondiente a la familia Tovariaceae, Resedaceae, Capparaceae, Moringaceae y Brassicaceae, que contienen metabolitos secundarios que se conocen como glucosinolatos, se genera un efecto supresor de plagas y patógenos de suelo, el cual está relacionado con la liberación de productos de hidrólisis a partir de GLS (Gimsing & Kirkegaard, 2009). Sin embargo, también puede ocurrir una inhibición que no esté relacionada con los ITC, esta supresión se considera que puede generarse debido a la adición de materia orgánica, la cual puede aumentar las poblaciones de organismos antagonistas en el suelo, o aumentar los componentes tóxicos que no se obtienen a partir de los GLS (Mattner et al., 2008; Gimsing & Kirkegaard, 2009).

La efectividad de los ITC se incrementa cuando se incorpora en un sistema de manejo integrado, ya que se puede prolongar el efecto en el tiempo por medio de rotación de cultivos, variedades resistentes, solarización, y otras prácticas culturales, como la época y modo de siembra, labores, manejo de agua, cubiertas, empleo de agentes biológicos de control e incluso baja dosis de pesticidas (Bello et al., 2003). El potencial de la biofumigación como componente de un manejo integrado de plagas ha sido demostrado en varios sistemas agrícolas (Gimsing & Kirkegaard, 2009).

La función de la materia orgánica en la regulación de los patógenos, mediante la acción de los gases resultantes de los procesos de su biodescomposición, es una alternativa basada en los mismos principios que los fumigantes convencionales y fertilizantes inorgánicos. La única diferencia es que los gases obtenidos son el resultado de la biodescomposición de la materia orgánica mediante el efecto biomejorador de los organismos del suelo o aquellos que se encuentran asociados a las enmiendas orgánicas (Matthiessen & Kirkegaard, 2006). La biofumigación estimula la actividad microbiana en el suelo actuando como biomejorador en el suelo (Bello et al., 2003). Los abonos verdes

pueden ayudar en la producción y en la calidad de cultivos comerciales generando beneficios asociados a las propiedades estructurales del suelo (Gimsing & Kirkegaard, 2009). Cuando se agrega la materia orgánica, se produce una secuencia de cambios microbiológicos con una proliferación de microorganismos, este incremento de la actividad microbiana produce también un aumentó de los niveles de enzimas en el suelo (Bello et al., 2003).

El uso de compuestos naturales para el control de plagas y patógenos es una vía que es considerada deseable para reducir la dependencia en compuestos químicos sintéticos (Matthiessen & Shackleton, 2005), además porque los compuestos naturales han sido considerados más amigables con el medio ambiente (Gimsing & Kirkegaard, 2009). El proceso de biofumigación está aumentando como una estrategia efectiva para el manejo de enfermedades y control de patógenos en diferentes cultivos (Motisi et al., 2009) como papa (Larkin & Griffin, 2007), soya (Fayzalla et al., 2009), Brassica (Pingxiang & gilardi, 2010).

1.5 El cubio (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón)

Es un tubérculo andino cultivado por siglos en Perú, Bolivia, Ecuador; Venezuela y Colombia (Chirinos et al., 2007). Es miembro de la familia Tropaeolaceae y es conocido como isañu (Aimara, Bolivia), cubio (Colombia), añu, e isaño (Quechua en Perú y Bolivia). Ocupa el cuarto lugar en importancia en la región Andina después de la papa, oca y ulluco. Este cultivo es el menos popular debido a su sabor amargo causado por la presencia de ITC liberados por la hidrólisis de los GLS (Ortega et al., 2006). Sus principales propiedades están relacionadas con el contenido de GLS así como el contenidos de componentes fenólicos antioxidantes que son importantes para la salud (Ortega et al., 2006; Chirinos et al., 2007).

Piñeros & Ñustez (2004) clasificaron la colección central de cubios de la Universidad Nacional de Colombia de acuerdo a sus características fenotípicas teniendo en cuenta la variación del cubio en el color del tubérculo, forma, características de las yemas y color de la pulpa. La piel de los tubérculos varía desde el blanco hasta el violeta-purpura muy oscuro, pasando por el amarillo, naranja, rojo y rosado (Figura 4). La piel puede ser de un solo tono o presentar manchas y rayas contrastantes con el ápice. Esta colección fue colectada en diferentes zonas del país, específicamente en Guasca, Junín, Lenguazaque, Paramo de Guerrero, Soacha y Ubaté en Cundinamarca; Chinquinquira, Paipa, Saboyá y Tunja en Boyacá (Piñeros & Ñustez, 2004).

La especie *Tropaeolum tuberosum* presenta dos subespecies: 1) la especie cultivada *Tropaeolum tuberosum* subespecie *tuberosum* y 2) la especie silvestre *Tropaeolum tuberosum* subespecie *silvestre,* las cuales se comparan por sus diferencias quimiotaxonomicas. Para la primera subespecie los compuestos químicos principales son p-metoxybenzil glucosinolato y N, N-di (methoxi-4-benzil) tiourea, mientras que para la subespecie silvestre los compuestos son el benzil glucosinolato, 2–propil glucosinolato y 2-benzil glucosionolato (Piñeros & Ñustez, 2004). Según Fahey (2001) en la familia Tropaeolaceae se han reportado ocho tipos de glucosinolatos (bencil, etil, 4-hidroxibencil, 2-hidroxil-2-metilpropil, 4-metoxibencil, 1- metiletil, 1-metilpropil y 2-metilpropil). En un

estudio en la región de Cuzco, Perú, mediante el análisis de cromatografía liquida de alta resolución (HPLC), se identificó y cuantificó dos diferentes tipos de GLS en accesiones de cubios, y los principales GLS detectados fueron aromáticos: 4-Hidroxibencil GLS, Bencil GLS, y Methoxibencil GLS. El total de la cantidad de GLS que encontraron en los cubios estuvo en un rango de 0,27 a 50,75 micromoles por gramo (µmol/g) de tejido seco de cubio (Ortega et al., 2006).

Figura 4. Accesiones de cubios de la Colección Central de la Universidad Nacional de Colombia. A, Accesión Ttun 14; B, Accesión Ttun 45; C, Accesión Ttun 31; D, Accesión Ttun 25; E, Accesión Ttun 28; F, Accesión Ttun 1; G,. Accesión Ttun 7; H, Accesión Ttun 29.

1.6 La papa (*Solanum tuberosum* L.)

La papa como producto alimenticio presentó una fuerte expansión a nivel mundial, situándose como el cuarto alimento básico, después del trigo, el arroz y el maíz. Es uno de los alimentos más importantes producidos y su expansión se deriva de la gran capacidad de adaptación a diferentes climas y sistemas de cultivo que presenta este tubérculo, lo cual ha permitido el aumentó en su producción y consumo (Espinal et al., 2005). *Solanum tuberosum* L. juega un rol muy importante y significativo en el sistema global de alimentación, por su potencial nutricional y energético, encontrándose por esta razón entre los diez productos alimenticios más importantes en el mundo (Villareal et al., 2007).

Actualmente, la papa cultivada es conocida colectivamente bajo el nombre de *S. tuberosum* L, esta constituido por 190 especies silvestres que forman tubérculos (Rodríguez, 2009). El principal país productor es China con 74,7 millones de toneladas durante el 2010 (FAO, 2010). En América latina, Brasil lidera la producción ocupando el puesto número 17 en la producción mundial con 3,5 millones de toneladas seguido por Perú con 3,3 millones de toneladas y en tercer lugar se encuentra Colombia con una

producción de 2.121.880 toneladas, un área cosechada de 141.967 hectáreas, y un rendimiento de 149.463 hectogramos/hectárea (FAO, 2010).

En Colombia mas de 90.000 familias se dedican al cultivo de papa generándose en él, a su vez, alrededor de 20 millones de jornales al año (Villareal et al., 2007). Los principales departamentos productores son Cundinamarca (35%), Boyacá (30%), Nariño (15%) y Antioquia (10%), y el 10% restante se distribuye en las zonas altas e intermedias de los departamentos de Caldas, Cauca, Norte de Santander, Quindío, Santander y Tolima (Villareal et al., 2007). La papa es un cultivo de carácter transitorio del que se obtiene dos cosechas al año y la producción comercial en Colombia se realiza entre los 2.000 m.s.n.m. hasta alcanzar zonas de páramo con alturas cercanas a los 3.500 m.s.n.m. (Villareal et al., 2007). El 90% de la producción comercial de papa se realiza en terrenos de ladera y el 10% en suelos planos mecanizables (Espinal et al., 2005).

El manejo agronómico tradicional que utilizan los pequeños productores de papa en el país, integra la preparación de los suelos para la siembra con surcos. La siembra se realiza antes de iniciarse la época de lluvias con el fin de aprovechar las aguas lluvia para la germinación y desarrollo del cultivo (Espinal et al., 2005). El aporque (acumular suelo alrededor de los tallos de las plantas) se realiza aproximadamente dos meses después de la siembra; treinta días después de la siembra se aplican fungicidas con frecuencia de siete a nueve días; los insecticidas se aplican en el momento de la siembra y antes de aporcar. Estas actividades varían de acuerdo a la región y dependen de la susceptibilidad de los cultivares sembrados y de la localización de los cultivos (Espinal et al., 2005). Según FEDEPAPA, en el país existen más de 30 variedades de papa cultivadas pero tan solo 10 de ellas cuentan con importancia comercial, además existe un amplio número de materiales de papa mejorados en Colombia (Espinal et al., 2005). Las variedades de mayor empleo en el país son: Parda Pastusa, Diacol Capiro, ICA Puracé, ICA Nariño y la Papa Criolla (*Solanum phureja*) (Villareal et al., 2007).

El cultivo de papa se ve afectado por númerosas enfermedades que son persistentes, lo cual genera problemas en la producción comercial del tubérculo reduciendo el vigor de la planta, el rendimiento y la calidad del tubérculo (Larkin & Griffin. 2007). Es el cultivo que mayor demanda hace en el país de fungicidas e insecticidas y el segundo de fertilizantes químicos después del café (Villareal et al., 2007). Las principales plagas que afectan el cultivo son la polilla guatemalteca (*Tecia solanivora*), el gusano blanco (*Premnotrypes vorax*), chizas (varias especies) y el tiroteador (*Naupactus sp*.). Las enfermedades son causadas por bacterias, hongos y virus. Entre las enfermedades se encuentra la pudrición blanca (*Erwinia carotovora*), marchites temprana (*Ralstonia solanacearum*) y sarna común (*Streptomyces scabies*); hongos como: Sarna o roña polvosa (*Spongosopra subterránea*), Tizón tardío (*Phytophthora infestans*) y rhizoctoniasis o costra negra (*Rhizoctonia solani*) y finalmente enfermedades virales como la del Potato Leafroll Virus (PLRV) y Potato Yellow Vein Virus (PYVV) (Villareal et al., 2007).

1.6.1 *Rhizoctonia solani* Kühn

Rhizoctonia solani Kühn (telemorfo *Thanatephorus cucumeris*) es una de las especies más estudiadas dentro del género *Rhizoctonia*. El concepto actual de las especies

estipula que los aislamientos de *R. solani* poseen características como una hifa de pigmentación marrón, ramificación cercana al septo distal de las células en la hifa vegetativa joven, constricción de hifa y formación de septo a una distancia corta del punto de origen en la ramificación de la hifa, septo dolíporo (Figura 5), el cual se caracteriza por presentar un poro dilatado en forma de barril situado en el centro de la pared septal y células multinucleadas en la hifa vegetativa joven (Truter 2005, Ferrucho & García, 2012). Las características como células monilioides, esclerocio, hifas de 5 µm de diámetro, rápido crecimiento y patogenicidad están usualmente presentes. Las características morfológicas que no están presentes incluyen las conexiones, conidias, esclerocios diferenciados dentro de la corteza y la medula, rizomorfos y otros pigmentos que no son de color marrón (Truter 2005). El telemorfo de *Rhizoctonia* pertenece a la subdivisión Basidiomycotina, clase Hymenomycetes y casi todas las rhizoctoniasis pertenecen a la subclase Holobasidiomycetidae (Ferrucho & García, 2012).

En la naturaleza *R. solani* existe principalmente como hifas vegetativas y esclerocios, estos últimos están compuestos de masas de células generando fuertes grupos de hifas que protegen y preservan el hongo durante mucho tiempo (Ferrucho & García, 2012). *Rhizoctonia solani* presenta un amplio rango de hospederos y causa enfermedades conocidas como “damping off”, podredumbre de la raíz, mustia hilachosa, cáncer de tallo, pudrición en la corona, pudrición de yemas y frutos y quemazón del follaje en una variedad de cultivos susceptibles de importancia agrícola (Blazier & Conway, 2004).

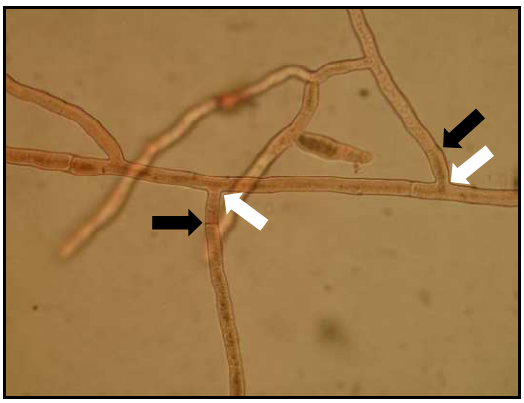


Figura 5. Micelio café, ramificación de micelio en ángulo recto, constricción de la hifa (Flechas blancas) y formación del septo cerca a la ramificación (Flechas negras) (400X, azul de lactofenol) (Ferrucho & García, 2012).

1.6.1.1. Grupo de anastomosis de *R. solani*

R. solani es un complejo de especies que está compuesto por hongos morfológicamente similares que son bastante variables en la apariencia en el cultivo, características de crecimiento y patogenicidad. Los varios biotipos son divididos en grupos de anastomosis (Carling et al., 2002). La afinidad por la fusión de las hifas es lo que se conoce como anastomosis y fue el primer método usado para agrupar aislamientos de *Rhizoctonia* sp. Existen cuatro categorías de agrupación de cepas basándose en la anastomosis de hifas:

perfecta, imperfecta, contacto y no reacción. La muerte celular fue incluida como criterio de evaluación en la relación entre individuos.

Las categorías que se utilizan actualmente emplean los criterios anteriores y son definidas como C3 (reacción perfecta, esto muestra una relación muy cerrada indicando el mismo GA); C2 (reacción más distante, relaciona aislamientos, los cuales son de mismo GA pero pertenecen a diferentes grupos compatibilidad vegetativa (GCV); C1 (representa el grupo más distante en relación y puede encontrarse en GAs con subgrupos) y C0 (No hay reacción, diferente GA) (Ferrucho & García, 2012). En el momento hay 13 grupos de anastomosis (designados GA-1 a GA-13) y 21 subgrupos, los cuales primordialmente se diferencian en uno o más características bioquímicas, genéticas, o características patogénicas (Truter, 2005). El GA-3 de *R. solani* se ha encontrado principalmente en plantas de papa y es el grupo más asociado en causar la rhizoctoniasis (Bains & Bisht 1995; Brewer & Larkin 2005). El análisis basado en la secuencia de ADN conduce a la subdivisión de los grupos de anastomosis GA-3 en subgrupos de papa (PT), tabaco (TB) y tomate (TM) (Ferrucho & García, 2012).

1.6.2 Costra negra o rhizoctoniasis y agente causal

La costra negra y chancro en tallo en papa causado por este hongo es una enfermedad de importancia económica, causando tanto daño cuantitativo como cualitativo en cultivos de papa (*Solanum tuberosum* L.) alrededor del mundo (Jeger et al., 1996; Tsror et al., 2001). La enfermedad causa reducciones y perdidas en la calidad del tubérculo, generando malformaciones y alteraciones en el tamaño y el número de tubérculos (Tsror et al., 2001; Truter 2005). La costra negra consiste en lesiones en el tallo que pueden reducir el rendimiento por la reducción de transporte de nutrientes a través de la planta (Figura 6) (Brewer & Larkin, 2005; Ferrucho & García, 2012), pudiendo además afectar brotes, raíces y estolones Esta enfermedad se caracteriza por la formación de esclerocios, estructuras de resistencia en el tiempo que permiten la sobrevivencia del hongo.

La severidad de los síntomas de la enfermedad causada por *Rhizoctonia solani* en papa depende del potencial de inóculo en tubérculos que están cubiertos con esclerocios (Figura 6) y micelio y en suelo (Ritchie et al., 2006). El grupo de anastomosis (GA-3) es más virulento en condiciones frías de crecimiento (Bains & Bisht, 1995). El impacto económico de la costra negra depende del destino de los tubérculos, por lo tanto, el alto impacto ocurre en el mercado de la semilla (tubérculo) y depende de las normas de cada país por su comercio interno, así como para la importación de países externos (Ferrucho & García et al., 2012).

1.6.2.1 Ciclo de la enfermedad

El proceso de infección por *R. solani* en tallos y estolones en plantas de papa inicia cuando el micelio o la hifa que germina a partir del esclerocio crecen atraídas por exudados químicos de las plantas (aminoácidos, azucares, ácidos orgánicos y fenoles). La penetración debe ser mecánica o enzimática. La primera ocurre cuando el hongo encuentra un punto débil en la superficie de la planta donde puede romper la capa protectora, y una vez adentro del hospedero, el hongo comienza a crecer inter e intracelular degradando el tejido. Finalmente se obtiene como resultados lesiones necróticas en tejidos de tallos, raíces y estolones (Jeger et al., 1996, Agrios, 2005; Ferrucho & García, 2012). La infestación en tubérculos inicia cuando la planta madre inicia la senescencia. La formación de esclerocios es inhibida durante el crecimiento activo de la planta y la inhibición desaparece gradualmente con la muerte de la planta madre y la maduración del tubérculo (Ferrucho & García, 2012).

1.6.2.2 Síntomas

La fase de chancro en tallos es caracterizada por lesiones, parduscas, hundidas y secas que se desarrollan en la base del tallo por debajo de la línea del suelo. Estas lesiones pueden rodear el tallo o convertirse en grandes chancros que obstruyan el movimiento de nutrientes (Fox, 2006), reduciendo el vigor de la planta, debilitamiento y reducción del número de tallos (Agrios 2005). Las hojas se tornan amarillas a rojizas purpuras y empiezan a curvarse hacia arriba. Los tallos se hinchan particularmente los nodos, y ocasionalmente se forman pequeños tubérculos morados en el lugar donde las hojas se unen a las raíces (Fox, 2006). Los chancros que se forman en los estolones inhiben el potencial de los tubérculos jóvenes. La superficie agrietada puede afectar los tubérculos maduros, finalmente como consecuencia la infección sobre los estolones reduce el número, tamaño y calidad de los tubérculos, debido a la malformación y agrietamiento (Agrios, 2005; Fox, 2006).

Más tarde una baja temperatura de suelo fortalece a la formación de esclerocios en el suelo. Estas estructuras son esenciales para la sobrevivencia y dispersión del patógeno, y se forman en tubérculos maduros bajo condiciones de frio y humedad (Fox, 2006). Otro síntoma es un collar blanco superficial en la base del tallo, este síntomas es causado por el telemorfo *T. cucumeris* (Ferrucho & García, 2012).

Figura 6. Lesiones causadas por *R. solani* en papa. Derecha, Lesiones en tallo color marrón (Ferrucho & García, 2012). Izquierda Tubérculos de papa con esclerocios (Fox, 2006).

1.6.2.3 Estrategias de manejo de la enfermedad

El control de la enfermedad se puede empezar con la reducción de inóculo inicial usando semilla-tubérculo certificada (libre de esclerocios), asegurando una rápida emergencia en donde se debe evitar suelos pesados y con poco drenaje (Fox, 2006). Por otro lado, también se debe evitar cubrir (más de 5 cm de suelo) la semilla-tubérculo (Fox, 2006). Para el control de este patógeno ubicuo se utilizan fungicidas comerciales para tratar el tubérculo-semilla, generando un beneficio que pueden causar menor persistencia de infección en campo por *Rhizoctonia solani* GA-3 en cultivos de papa (Fox, 2006).

Hace algunos años se ha implementado el uso de microorganismos biocontroladores para reducir el inóculo del patógeno como alternativa ambiental y ecológica. *Trichoderma harzianum* en combinación con *Bacillus subtilis* han demostrado el control de la costra negra (Tsror et al., 2001; Brewer & Larkin, 2005). Igualmente se ha estudiado un biofungicida PBGG que contiene *Pseudomonas boreopolis,* semillas de pulpa de *Brassica,* glicerina y alginato de sodio, con el cual los resultados demostraron un aumentó de actinomicetos y una reducción en el porcentaje de la colonización por parte del patógeno en cultivos de col (Chung et al., 2005).

Sobre cultivos de papa se han realizado trabajos para el control de la enfermedad utilizando la rotación de cultivos con frijol-canola, frijol-cebada, maíz-canola, y como cultivo continuo papa en donde se evidenció una notable reducción de la incidencia y severidad de la enfermedad en tallos y estolones y una mejor calidad del tubérculo por la disminución de inóculo del patógeno (Larkin & Honeycutt, 2006). Estudios sobre cultivos de *Brassica* con rotación de cultivos de canola y papa muestran características

microbianas diferentes a otros cultivos de rotación y también resulta en una baja incidencia y severidad de los síntomas de la rhizoctoniasis (Larkin & Griffin 2007).

1.7 Métodos para conteo de microorganismos de suelo

1.7.1 Métodos microbiológicos

La identificación de microorganismos requiere su extracción de suelo y, por lo tanto, la separación de su hábitat natural, operación que se denomina aislamiento, que puede ser simplemente mecánico a partir de muestras tamizadas del suelo, o puede ser una combinación de disgregación física del suelo seguida de incubación de los propágulos aislados (Wild 1992). Una vez que se obtiene un aislamiento en cultivo puro, la identificación se basa en características morfológicas (Wild 1992). Los métodos actualmente disponibles para contabilizar los organismos del suelo se agrupan en dos grandes categorías: 1) los que se realiza el recuento de células en cámara de Neubauer, o determinación de peso seco (conteo directo) y 2) y los que se basan en el conteo indirecto (Aquiahuati & Pérez, 2004).

La determinación de peso seco es un método usado para cuantificación de hongos y levaduras, en donde se somete a procesos de filtración, lavado y secado, generando perdidas importantes de biomasa y errores de cuantificación (Aquiahuati & Pérez, 2004). Por otro lado, el método de cámara tiene la ventaja de ser rápido y económico, pero no se puede distinguir las células viables y no viables, y la cuantificaciones se dificulta en células muy pequeñas (Aquiahuati & Pérez, 2004). Dentro de los métodos indirectos se encuentra la medición de turbidez en un espectrofotómetro, que se basa en la capacidad de las células microbianas de dispersar la luz que incide sobre ellas, pero no diferencia la turbidez dada por células viables y no viables (Aquiahuati & Pérez, 2004).

Los métodos para el conteo de células viables mas utilizado en microbiología del suelo se basa en las técnica de dilución y conteo en placas con medios de cultivo específicos para la microbiota de interés (Aquiahuati & Pérez, 2004). La cuantificación se realiza con el conteo de las colonias microbianas desarrolladas sobre la placa después de la incubación y se calcula las unidades formadoras de colonias / gramo de suelo, en donde se tiene en cuenta el factor de dilución, el volumen inoculado en la caja Petri y el número de colonias encontradas por caja (Wild 1992). Esta técnica da una estimación aproximada del número total de microorganismos, dependiendo del medio de cultivo utilizado, pero pueden existir problemas relacionados con falta de homogeneidad de las diluciones y en la inoculación de las muestras, por lo que se pueden obtener valores bajos si las células no se separan bien y valores elevados si la toma de muestras se hace al fondo del tubo donde se han concentrado la mayor parte de microorganismos (Aquiahuati & Pérez, 2004).

1.7.2 Métodos moleculares

Para el estudio de comunidades microbianas se ha utilizado los ácidos nucleicos, debido a la gran cantidad de información que proporciona y a la relativa facilidad metodológica que implican los análisis de estos compuestos, especialmente tras el gran desarrollo

tecnológico que ha experimentado la biología molecular durante los últimos años (Nogales, 2005).

Dos factores son importantes en la extracción de ácidos nucleicos de suelo: (1) la eficiencia de la extracción, que se realiza mediante procesos físicos, químicos y enzimáticos que aseguren la rotura de las resistentes estructuras celulares características de algunos microorganismos del suelo o de las esporas; y (2) la eliminación de sustancias contaminantes (por ejemplo, ácidos húmicos) que se extraen conjuntamente con los ácidos nucleicos y que interfieren en los análisis moleculares posteriores (Nogales, 2005).

El uso de marcadores moleculares permite la identificación de organismos fitopatógenos (Alves et al., 2002) y la cuantificación de patógenos se obtiene mediante diferentes técnicas moleculares como la MPN-PCR que utiliza el número más probable, el cual se fundamenta en un análisis estadístico basado en la distribución de Poison, la cual es usada para determinar el número de bacterias en diluciones seriadas en un medio de cultivo líquido (Picard et al., 2004). Otra técnica utilizada para cuantificación de ácidos nucleícos es la PCR competitiva que se considera un método semi-cuantitativo que consiste en la co-amplificación de una muestra de ADN blanco con cantidades conocidas de un ADN competidor que comparta la mayoría de la secuencia de nucleótidos con el blanco. Permite la cuantificación del número absoluto de moléculas blanco en comparación a la cantidad del ADN competidor (Zentilin & Giacca 2007). Finalmente hoy en diá se utiliza la técnica de PCR en tiempo real para la cuantificación absoluta de un ADN blanco de acuerdo a la obtención de una curva estándar (Mackay, 2004).

1.7.2.1. PCR en tiempo real (qPCR)

Está diseñada para evaluar la concentración del producto de amplificación (amplicon) cuando la reacción está ocurriendo, por la incorporación de marcadores fluorescente o el uso de pruebas fluorescentes, siendo los datos medidos en la fase exponencial de la reacción (Logan et al., 2009). Este método proporciona gran precisión y cuantificación reproducible de copias del gen (Heid et al., 1996). A diferencia de otros métodos de PCR cuantitativos, la PCR en tiempo real no requiere manipulación de muestras *post*-PCR, previniendo la contaminación potencial del producto de PCR, y además genera un rendimiento más alto (Heid et al., 1996).

El monitoreo de la acumulación del amplicon en tiempo real ha sido posible por cebadores marcados, sondas oligonucleótidos o amplicones con moléculas capaces de fluorescer. Estas producen un cambio en la señal seguido directamente por la interacción, o hidridización del amplicon (Mackay, 2004). La señal es relacionada con la cantidad de amplicon presente durante cada ciclo. La PCR cuantitativa en tiempo real es la conversión de la señal fluorescente de cada reacción dentro de los valores numéricos de cada muestra (Tevfik, 2006).

La cuantificación en tiempo real puede ser absoluta o relativa. En la absoluta, el ensayo es utilizado para cuantificar muestras no conocidas por la extrapolación de su cantidad a partir de una curva estándar, la cual se obtiene por el trazado de los valores de C_T,

termino que indica el número del ciclo en el cual la fluorescencia generada está dentro de una reacción que cruza el umbral, este valor es inversamente proporcional a la cantidad inicial de moléculas especificas en la muestra original. Por otro lado, la cuantificación relativa se utiliza para analizar cambios en la expresión de genes en una determinada muestra o haciendo comparación con otra (Mackay, 2004; Tevfik, 2006).

La amplificación por PCR en tiempo real tiene diferentes fases (Figura 7): La primera fase contiene toda la amplificación que está por debajo del nivel de detección del equipo de tiempo real, (usualmente ciclos 3 a 15). La fase exponencial está compuesta por la señal temprana de detección de la reacción de la cadena de la polimerasa donde la amplificación está procediendo a su máxima tasa exponencial. La longitud de esta fase depende de la concentración de la plantilla y la calidad del ensayo de tiempo real. En la fase lineal, la eficiencia de la amplificación comienza con la disminución y finalmente en la fase *plateau*, donde no se obtienen o se obtienen productos (Schena et al., 2004; Tevfik, 2006).

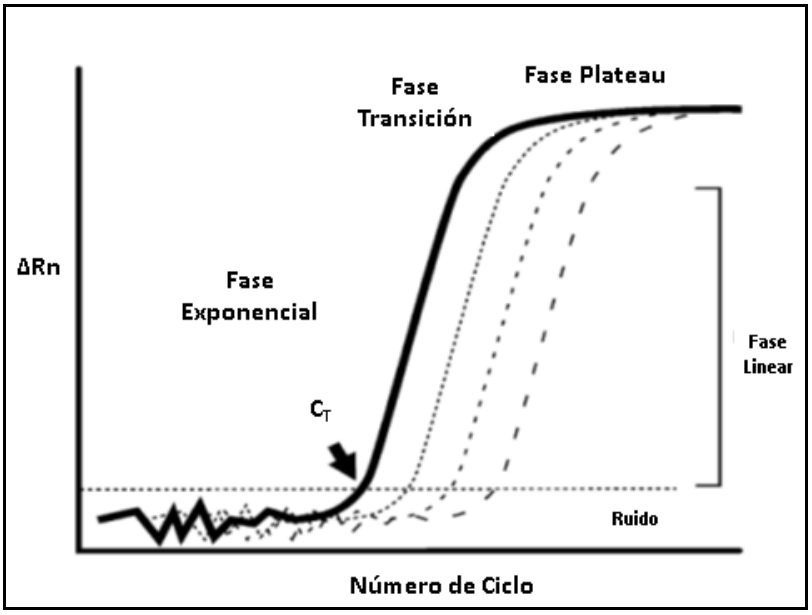


Figura 7. La curva de amplificación ideal de PCR en tiempo real. Representa la intensidad de fluorescencia frente al número de ciclos, es una curva sigmoidal. La amplificación temprana no se puede observar porque las emisiones son enmascaradas por el ruido. Cuando el amplicon esta presente, el progreso exponencial puede ser monitoreado y la velocidad de la amplificación entra a una fase linear. Como los cebadores y la enzima comienzan a limitarse, y los productos inhibidores de la PCR, hace que la reacción disminuya su velocidad, y entre a una fase de transición y eventualmente llega a la fase plateau donde hay poco o no aumentó de la fluorescencia. El punto en el cual la fluorescencia supera el ruido, se conoce como umbral (línea horizontal) y es llamado el ciclo umbral o punto de cruce (Ct o CP), y este valor es usado en el cálculo de la cantidad de molde durante la cuantificación en PCR en tiempo real. Adaptado de Mackay (2004).

Los instrumentos de tiempo real están basados en detección de señal de fluorescencia. El aumentó en la fluorescencia es directamente proporcional con el aumentó del producto amplificado durante la PCR. Las moléculas de fluorescencia absorben la luz en forma de fotones dentro de un rango de longitud de onda de luz (Tevfik, 2006). La longitud de onda en el que el colorante absorbe la máxima luz se conoce como excitación de la longitud de onda para esta molecula. Despues de esto, la molecula se empuja a un estado de alta energía, la cual es transitoria y de corta duración, en donde la molecula excitada vuelve a su estado fundamental y, cuando esto se produce, un foton de luz es emitido a una longitud de onda mayor (Tevfik, 2006).

Los ensayos de fluorescencia usados para PCR en tiempo real están basados en la técnica FRET (Transferencia de energía de la resonancia de fluorescencia) y están marcados con dos fluorocromos, uno de elevada energía que es el donador de fluorescencia y usualmente se conoce como molécula reportera. La señal de fluorescencia del reportero es una de las más monitoreadas durante todo el experimento; el segundo es el de baja energía y se conoce como el aceptor o *quencher* (Tevfik, 2006).

Las sondas que más frecuentemente se utilizan son las de tipo TaqMan®. Su funcionamiento es el siguiente (Figura 8): 1.) Se construye una sonda oligonucleótida con un fluorocromo reportero unido al extremo 5´ y un aceptor en el extremo 3´, mientras la sonda esta intacta, la proximidad del aceptor reduce la fluorescencia que emite el fluorocromo reportero por medio de FRET a través del espacio; 2.) Si el blanco esta presente, la sonda se anilla entre las localizaciones de los cebadores y se rompe por la actividad de la 5´-nucleasa de la Taq polimerasa, durante la extensión; 3.) Ruptura de la sonda, primero se separa el fluorocromo receptor del aceptor, lo que aumenta la señal del fluorocromo receptor, y luego, se quita la sonda de la cadena del blanco, lo que permite que la extensión del cebador continúe hasta el final de la cadena del molde; y 4.) En cada ciclo se separan mas moléculas del fluorocromo receptor de sus respectivas sondas, lo que produce un aumentó de la intensidad de la fluorescencia que es proporcional a la cantidad de amplicon producido (Schena et al., 2004; Tevfik, 2006).

Finalmente existe el fluorocromo no especifico que se conoce con SYBR Green (Mackay, 2004; Tevfik, 2006). Los reactivos SYBR Green se utiliza para detectar productos de PCR uniéndose al ADN de doble cadena que se forma durante la PCR. La excitación y emisión máxima de SYBR® Green es de 494 nm y 521nm. El ensayo con este tipo de fluorocromo debe ser verificado usando el análisis de la curva de temperatura de fusión para la detección de dimeros de primers y productos inespecíficos (Schena et al., 2004; Tevfik, 2006). Este reactivo funciona de la siguiente manera (Figura 9): 1.) Cuando se agrega SYBR® Green a la muestra, el fluorocromo se une inmediatamente a todo el ADN de doble cadena; 2.) Durante la PCR, la Taq polimerasa amplifica el blanco, lo que crea el producto de PCR o “amplicon”; 3.) Posteriormente, el fluorocromo se une a cada copia nueva dela ADN de doble cadena; 4.) A medida que se produce la PCR, se crea más amplicon. Como este fluorocromo se une a todo el ADN de doble cadena, el resultado es un aumentó de la intensidad de la fluorescencia que es proporcional a la cantidad de producto de PCR de doble cadena producido (Mackay, 2004; Tevfik, 2006).

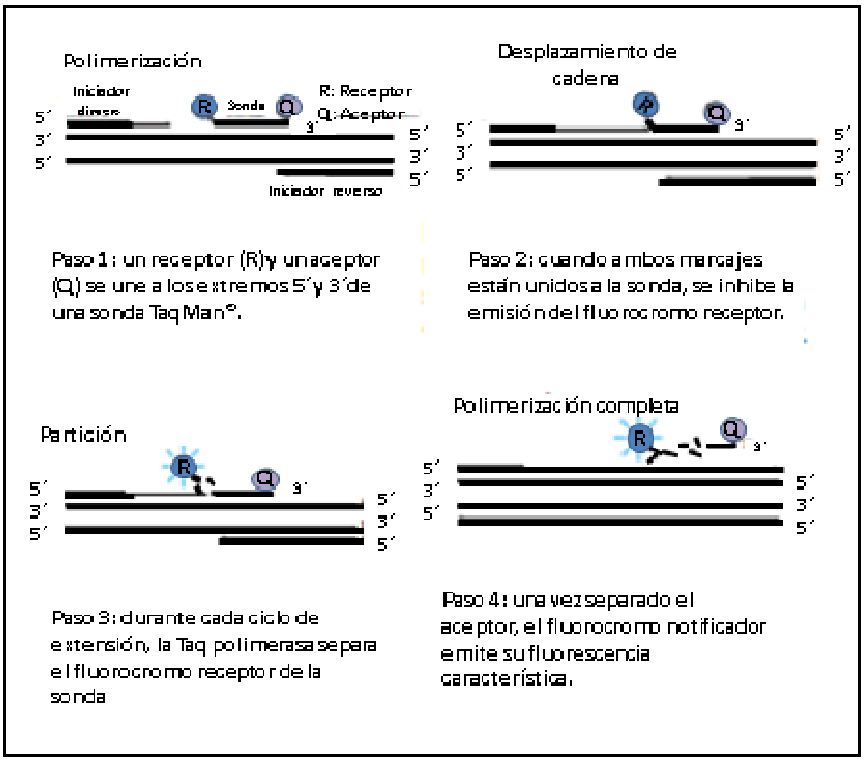


Figura 8. Ilustración grafica que muestra la señal de fluorescencia generada por sondas TaqMan ®. Adaptado de Tevfik (2006).

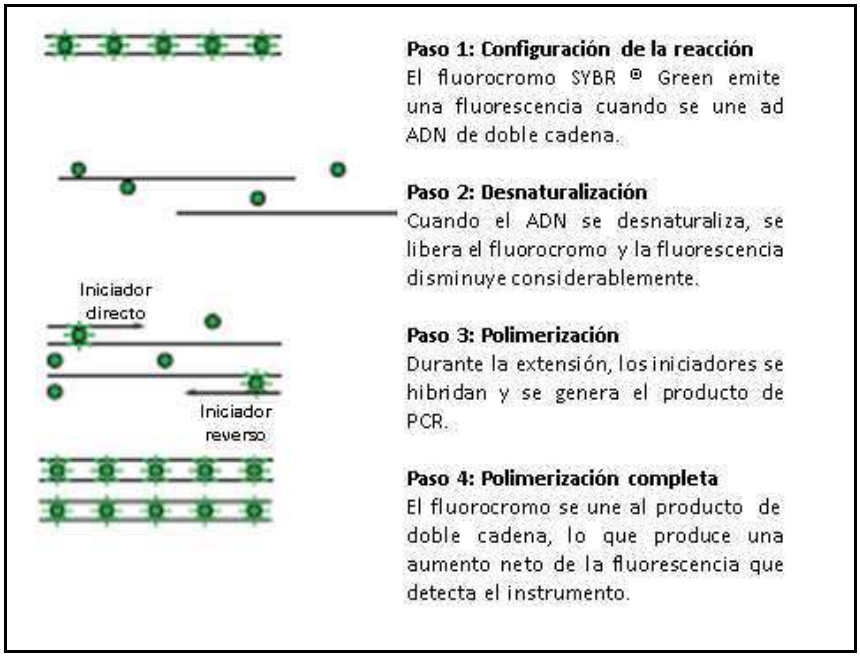


Figura 9. Ilustración grafica que muestra la señal de fluorescencia generada por SYBR Green ®. Adaptado de Tevfik (2006).

1.7.3 Métodos para cuantificación de *R. solani*

La cuantificación de *Rhizoctonia* spp. de suelo es difícil, porque la densidad de inóculo en el suelo es baja y, por lo tanto, la dilución en platos no puede ser usada. Varios métodos han sido usados, aislando directamente el hongo de fracciones orgánicas concentradas del suelo. Para esto se han empleado métodos de tamizaje en húmedo en donde se utiliza un tamiz para remover las partículas orgánicas que contengan el patógeno (Weinhold, 1977), y elutriación que consiste en la separación de partículas, mas ligeras de las mas pesadas por medio de una corriente de flujo (aire y agua) (Clark et al, 1978). Otros métodos que se han utilizado han sido el uso de varias plantas como soporte para el aislamiento del hongo para esto se han usado semillas y tallos de algodón (*Gossypium hirsutum*), remolacha (*Beta vulgaris*) y trigo sarraceno (*Fagopyrum sagittatum*) y esto ha permitido observar la actividad y la distribución espacial del patógeno en el suelo (Paulitz & Schroeder 2005). De la misma manera se han empleado técnicas inmunológicas basadas en anticuerpos monoclonales, pero no son disponibles comercialmente (Thornton & Gilligan, 1999). La reacción en cadena polimerasa (PCR) ha sido utilizada para detectar varios AGs (Grupo de Anastomosis) y especies pero la PCR cuantitativa ha sido desarrollada solamente para *R. solani* AG-3 y *R. cereales* (Lees et al., 2002).

Otra técnica que se ha utilizado para el aislamiento y cuantificación de *Rhizoctonia* spp. de suelo es el uso de palillos planos, la cual ha permitido conocer la cantidad de inóculo y cuantificación de la actividad de la hifa de *R. solani* AG-8 (Paulitz & Schroeder, 2005). Este ensayo de cuantificación de hifas activas fue desarrollado utilizando palillos planos, los cuales son insertados dentro de muestras de suelo, y después de dos días, son llevados a medio selectivo, para posteriormente realizar una observación bajo microscopio. Este método utiliza regresiones para comparar la densidad de inóculo o curvas de colonización de palillos para predecir curvas basadas en el volumen de los palillos (Paulitz & Schroeder, 2005). Esta técnica es económica y simple, y puede ser usada para la detección y diagnostico en campo y el estudio de la ecología y epidemiologia de este patógeno (Paulitz & Schroeder, 2005).

2. Metodologia

2.1 Material vegetal

El material vegetal utilizado en este estudio correspondió a 65 accesiones de cubios de la colección central de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia (Piñeros & Ñustez, 2004). Cada accesión presenta un código designado como Ttun 1 hasta Ttun 69, donde las accesiones Ttun 32, Ttun 34, Ttun35, y Ttun70 no estaban presentes para utilizar en este estudio. La colección de los tubérculos se mantiene en la finca San Jorge en el municipio de Soacha, Cundinamarca a una temperatura promedio de 12 °C y a 2500 m.s.n.m..

Una vez en el laboratorio, los tubérculos fueron lavados y secados por separado (o sea, por accesión), se eliminaron del análisis los cubios que presentaban algún tipo de daño y/o corte en su superficie. Los tubérculos seleccionados fueron desinfectados sumergiéndolos en etanol 70 % por un minuto, hipoclorito 1 % por 3 minutos seguido de tres lavados con agua destilada, dejándose posteriormente secar a temperatura ambiente. Luego de la desinfección se colocaron en nitrógeno líquido durante un minuto los cubios de menor tamaño y durante minuto y medio los cubios de mayor tamaño, y se almacenaron por accesión en bolsas con cierre hermético a -80 °C.

Finalmente, en un liofilizador industrial (Terroni) se colocaron las accesiones de cubios completos durante tres ciclos (24 horas cada uno). Cada accesión liofilizada fue triturada en una licuadora (Oster), teniendo en cuenta que cada vez que se cambiaba de accesión se colocaba la cuchilla en etanol al 96% durante cinco minutos y en luz UV durante 20 minutos. Las accesiones fueron almacenadas en bolsas con cierre hermético y se colocaron dentro de una caja plástica a temperatura ambiente en un sitio oscuro y con humedad controlada.

2.1.1 Clasificación física de los cubios

Según Piñeros & Ñustez (2004), para la clasificación de los tubérculos de cubio se emplea los siguientes descriptores: color predominante de la piel, color secundario de la piel, distribución del color secundario de la piel y las formas de coloración secundaria (Tabla 2). Para este estudio solamente se tuvo en cuenta el primer y segundo descriptor que corresponde al color predominante de la piel del tubérculo.

Tabla 2. Descriptores y opciones de descriptores empleados para la clasificación fenotípica de cubios.

Descriptor	Opciones
Color predominante de la piel	Blanco, amarillo claro, amarillo, amarillo oscuro, anaranjado, morado oscuro.
Color secundario de la piel	Ausente, rosado, púrpura, morado, morado oscuro.
Distribución del color secundario de la piel	Ápice, debajo del ápice, ojos, ápice y ojos, todo el tubérculo, anillo, anillo parcial.
Formas de coloración secundaria	Ausentes, jaspes, bandas, bandas en ojos, bandas en ojos y puntos, bandas en ojos y jaspes, bandas y jaspes, igualmente distribuidos, puntos, manchas.

Tomado de (Piñeros & Ñustez, 2004).

2.2 Muestreo de suelo

Las muestras de suelo utilizadas en los ensayos fueron colectadas en dos puntos del municipio de Zipaquirá (N 05º 08’ 43’’y W 74º 02’ 01’’; N 05º 08’ 43’’ y W 74º 01’ 54.1’’) (Figura 10), a partir de una gradilla de 1000 m X 1000 m en puntos equidistantes de 20 metros para un área total de 100 ha. Los puntos correspondieron a fincas productoras de papa con problemas de rhizoctoniasis. Las muestras de suelo fueron depositadas en bolsas de cierre hermético y almacenadas en cuarto frio a 4 ºC hasta su uso.

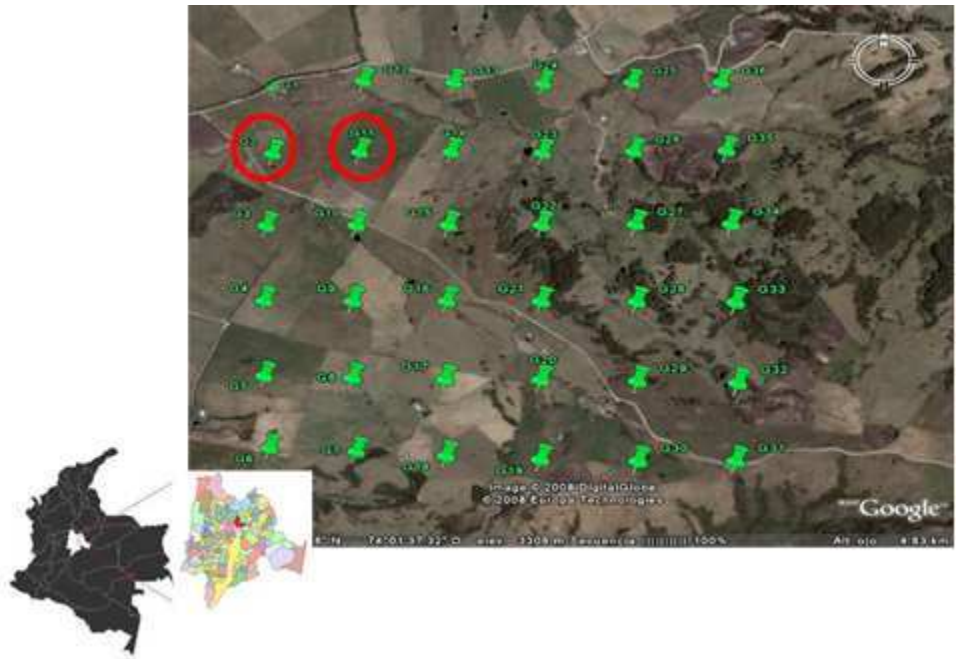


Figura 10. Municipio de Zipaquirá, Cundinamarca. Los dos puntos (G2 y G11) georeferenciados subrayados corresponden a las fincas productoras de papa donde se obtuvieron las muestras de suelo utilizadas en el presente estudio.

2.3 Bionsayos de laboratorio: Evaluación del efecto de accesiones de cubios sobre *Rhizoctonia solani.*

Se realizó la evaluación del efecto de las 65 accesiones de cubios de la Colección Central de Cubios de la Universidad Nacional de Colombia sobre el crecimiento de hifas de *Rhizoctonia solani.*

2.3.1 Preparación de cubio-suelo

Se realizó una mezcla con 0,1 g de liofilizado por accesión en 100 g de suelo infestado naturalmente con antecedentes de rhizoctoniasis (comunicación personal) (Suelo de Zipaquirá, punto G2) en vasos plásticos de 8 oz. Para el control de este bioensayo, se utilizó suelo naturalmente infestado sin accesión de cubios. La mezcla anterior fue homogenizada utilizando una espátula y fue incubada por ocho días en incubadora (Thermo) a una temperatura entre 14 ºC y 16 ºC. Se realizó un riego diario con agua de grifo hasta capacidad de campo, es decir el contenido de agua que es capaz de retener el suelo luego de haber sido mojado abundantemente y después de dejarlo drenar libremente.

2.3.2 Evaluación del efecto de las 65 accesiones de cubios sobre *R. solani*

La cuantificación del patógeno se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Paulitz y Schroeder (2005) con algunas modificaciones debido al volumen del palillo. Brevemente, el procedimiento consiste en un método de cuantificación basándose en el volumen de los palillos (en este estudio cada palillo tienen un volumen de 0,1 cm^3) para un volumen total de los cinco palillos de 0,5 cm^3. Según Paulitz y Schroeder (2005), se asume que el total de propágulos desplazados por el volumen de los palillos que están en contacto con la superficie de los palillos, germinan y producen hifas, y como resultado se obtiene una colonia. Por lo tanto, una colonia por cada cinco palillos = 1 propagulo/0,5 cm^3 de suelo, y teniendo en cuenta que la densidad del suelo es de 1, entonces 1 propagulo/0,5 cm^3 g de suelo = 2 propágulos/g de suelo. Finalmente, se obtiene que la densidad de la hifa (propágulos/g de suelo) = 2 x el número total de colonias en los cinco palillos (Paulitz & Schroeder, 2005).

La metodología se llevó a cabo ocho días después de la incubación donde se tomaron cinco palillos de madera estériles (6 cm de largo y 2 mm de ancho) y se insertaron dentro del suelo a una profundidad de 5 cm uniformemente distribuidos en cada uno de los vasos del ensayo y se mantuvieron a una temperatura entre 14 °C y 16 °C. Después de 48 horas, cada palillo fue retirado y colocado en un medio selectivo para Basidiomicetos (cinco palillos por caja de Petri) (Ko & Hora, 1971) a temperatura ambiente. Después de 24 y 48 horas, se cuantificó el número de colonias de *R. solani,* para esto se utilizó un microscopio (objetivo 10-40X). Se conto cada hifa que emergía del palillo con una longitud máxima de 5 mm, esta longitud se selecciona para evitar contar dos veces la misma hifa debido a que la distancia entre palillo es aproximadamente de 1 cm.

El ensayo se llevó a cabo en dos réplicas biológicas (dos veces en el tiempo) en un diseño completamente al azar. Por cada accesión se realizaron cinco repeticiones y la densidad de hifas se calculó como 2 x el número total de colonias en los cinco palillos.

2.3.3 Análisis de datos

Los datos obtenidos en los ensayos fueron analizados mediante el software SAS versión 9.2. Se realizó un análisis de varianza no paramétrico Kruskal-Wallis ($p \leq 0.05$) y para comparación de medias se llevó a cabo una prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

2.4 Bioensayos en invernadero

2.4.1 Obtención de aislamientos de *R. solani* GA-3 y preparación de inóculo para ensayos de invernadero

Se seleccionaron tres cultivos de papa en tres localidades (Subachoque, Cundinamarca; Villa Pinzón, Boyacá y Zipaquirá, Cundinamarca) y se tomaron muestras de plantas sintomáticas, es decir que presentaran lesiones características de rhizoctoniasis, como chancros en tallo, lesiones en estolón y raíces.

Las plantas fueron lavadas y con una cuchilla estéril se tomó parte de la lesión y se colocó en medio selectivo de Basidiomicetos (Ko & Hora, 1971). A las 24 horas se confirmó en microscopio las características generales de *R. solani* (Figura 14). Después de esto, se tomó micelio joven y se llevó a medio PDA (Oxoid; 39 g/L) con papel celofan, para permitir separar el micelio del medio de cultivo y así poder obtener el micelio para extracción de ADN.

Para la identificación de las cepas recuperadas, a cada aislamiento se le realizó la extracción de ADN a partir de micelio del hongo, utilizando un kit comercial (DNeasy Plant Mini kit, Quiagen; Anexo A) y posteriormente se realizó la amplificación de la región ITS utilizando los primers específicos Rs1F2 (5'-TTGGTTGTAGCTGGTCTATTT-3') y Rs2R1 (5'-TATCACGCTGAGAGTGGAACCA-3') descritos por Lees et al. (2002) que permitieron identificar las cepas como *Rhizoctonia solani* GA-3.

Después de la identificación del grupo de anastomosis GA-3, se realizó un aumentó de inóculo en caldo de papa autoclavado (200 g papa *Solanum tuberosum* L. cortada en rodajas, 20 g dextrosa y 1000 ml de agua destilada). En bandejas de aluminio estériles se agregó 200 ml de caldo de papa y 12 discos (7 mm de diámetro) de micelio *R. solani* GA-3 previamente obtenidos con un sacabocado. Las bandejas se taparon con aluminio y se forraron con papel vinipel y se mantuvieron durante 10 días a temperatura ambiente. El micelio que se obtuvo después del tiempo de incubación fue retirado y se colocó sobre toallas de papel estériles en cabina de flujo laminar y se dejó secar durante 48 h a temperatura ambiente. Posteriormente, el inóculo fue macerado bajo condiciones asépticas y tamizado para obtener partículas entre 250 µm y 500 µm de diámetro; las partículas menores de 250 µm y mayores a 500 µm no fueron utilizadas como inóculo. El inóculo (200 g de micelio seco) fue almacenado a 4ºC en tubos falcon para su posterior uso en los experimentos de invernadero.

Todos los tratamientos utilizados en invernadero fueron realizados con cinco repeticiones en un diseño de bloques completamente al azar. Cada uno de los ensayo se realizaron en tres réplicas biológicas en el tiempo para mirar el comportamiento de la enfermedad y comparación de resultados. Se tomaron 2 g de suelo por cada repetición de los tratamientos, y fueron almacenadas a -80 ºC para los ensayos de cuantificación por PCR en tiempo real.

2.4.2 Evaluación del efecto ocho accesiones de cubio sobre *R. solani* GA-3 y microbiota total

A partir de los resultados obtenidos en laboratorio de la evaluación de las 65 accesiones de cubios se realizaron ensayos bajo condiciones de invernadero con ocho accesiones (Ttun 5, Ttun 19, Ttun 30, Ttun 54, Ttun 56, Ttun 61, Ttun 62 y Ttun 69). Estas accesiones fueron seleccionadas por su mayor efecto sobre la densidad de hifas *de R. solani,* y por su contenido de glucosinolatos totales (µmoles/g cubio seco) (Arias et al., 2011). La composición de cada uno de los tratamientos que se realizaron se indica en la tabla 3.

En materas plásticas con capacidad de 1000 g se mezcló el inóculo de *R. solani* GA-3 Zipaquirá (0,5 g) con el suelo punto G11 naturalmente infestado (500 g). Cada

tratamiento fue homogenizado con espátula y se mantuvo en invernadero con una temperatura promedio entre 12 ºC y 20 ºC, y el riego se llevó a capacidad de campo utilizando agua de grifo. A los ocho días se agregó a cada tratamiento la accesión de cubio correspondiente (0,5 g) y se mantuvo con las mismas características de riego y temperatura. Finalmente, ocho días después se colocó una plántula de papa *Solanum tuberosum* L. cultivar Diacol Capiro por matera de tratamiento. Las plántulas fueron obtenidas a partir de brotes en bandejas de germinación con turba estéril y con una fertilización de tres veces por semana con solución MS al 10 % (Anexo B).

Tabla 3. Composición de los tratamientos realizados para evaluar el efecto de ocho accesiones de cubios sobre *R. solani* y microbiota total.

Tratamiento	Composición
Ttun 5	Suelo naturalmente infestado + Aislamiento *R. solani* GA-3 Zipaquirá + Accesión Ttun 5 + Cultivar Capiro
Ttun 19	Suelo naturalmente infestado + Aislamiento *R. solani* GA-3 Zipaquirá + Accesión Ttun 19 + Cultivar Capiro
Ttun 30	Suelo naturalmente infestado + Aislamiento *R. solani* GA-3 Zipaquirá + Accesión Ttun 30 + Cultivar Capiro
Ttun 54	Suelo naturalmente infestado + Aislamiento *R. solani* GA-3 Zipaquirá + Accesión Ttun 54 + Cultivar Capiro
Ttun 56	Suelo naturalmente infestado + Aislamiento *R. solani* GA-3 Zipaquirá + Accesión Ttun 56 + Cultivar Capiro
Ttun 61	Suelo naturalmente infestado + Aislamiento *R. solani* GA-3 Zipaquirá + Accesión Ttun 61 + Cultivar Capiro
Ttun 62	Suelo naturalmente infestado + Aislamiento *R. solani* GA-3 Zipaquirá + Accesión Ttun 62 + Cultivar Capiro
Ttun 69	Suelo naturalmente infestado + Aislamiento *R. solani* GA-3 Zipaquirá + Accesión Ttun 69 + Cultivar Capiro
Testigo aislamiento *R. solani* GA-3 Zipaquirá	Suelo naturalmente infestado + Aislamiento *R. solani* GA-3 Zipaquirá + Cultivar Capiro
Testigo	Suelo naturalmente infestado + Cultivar Capiro

2.4.2.1. Cuantificación de *R. solani* y la microbiota del suelo

Para verificar el efecto de los cubios seleccionados sobre *Rhizoctonia solani* del suelo se llevó a cabo en diferentes etapas de desarrollo del cultivo en invernadero: 1) después de agregar el inóculo al suelo, 2) después de adicionar el liofilizado de cubio, y 3) 30 días después de adicionar el liofiliazado de cubio. Con respecto a la microbiota del suelo se realizó la evaluación en la etapa 2 y 3. La metodología utilizada para la cuantificación del patógeno *R. solani* fue la misma descrita anteriormente (sección 2.3.2). Para cuantificar la microbiota de bacterias totales, hongos totales, pseudomonads fluorescentes y *Trichoderma* sp., se realizó el procedimiento descrito a continuación para diluciones de suelo a partir de cada repetición y por tratamiento.

Se tomó 1 g de suelo y se agregó a un tubo falcon (50 ml) con 9 ml de agua destilada estéril. Se colocó en vortex para homogenizar y luego se realizó diluciones hasta 10^{-4}. Se sembraron 100 µl de las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} en medio King B (Sharlab; 39 g/L + Glicerol; 10 ml/L) para el conteo de pseudomonads fluorescentes y en medio TSA (Tryptic Soy Broth, Difco; 32 g/L + Agar bacteriológico, Oxoid; 10 g/L) para el conteo de bacterias totales. Para el conteo de *Trichoderma* sp. y hongos totales se sembró 100 µl de las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} en medio PDA con rosa de bengala (Oxoid; 39 g/L + Rosa de Bengala Sigma; 0,05 g/L). El conteo de colonias de los cultivos se realizó a las 24, 48 y 72 horas para bacterias totales y pseudomonads fluorescentes y a los 15 días para hongos totales y *Trichoderma* sp.. Para el conteo de pseudomonas fluorescentes unicamente se tomaron en cuenta las colonias que emitían fluorescencia bajo luz UV. Se calculó las UFC/ g de suelo a partir del número de colonias contadas y el factor de dilución.

2.4.2.2. Evaluación de la incidencia y severidad de la enfermedad

La evaluación de la incidencia y severidad de la enfermedad se realizó 30 días después de agregar los cubios. Para esto se midió el tamaño de la lesión en estolón y raíces, severidad en tallo. Para evaluar la severidad en tallo se midió el tamaño de la lesión, el diámetro del tallo (en cm), y se calculó el área en mm^2 = longitud de la lesión x (% de la lesión x diámetro del tallo/100). La incidencia se evaluó teniendo en cuenta el número de plantas enfermas sobre el número de plantas evaluadas por 100 %. La incidencia se evaluó por separado (tallo y estolón). Para evaluar el efecto de los cubios sobre el crecimiento de las plantas se midió la longitud de raíz, longitud de tallo y la longitud total.

2.4.3 Evaluación de una accesión de cubios sobre tres aislamientos de *R. solani* GA-3

A partir de los resultados anteriores, se seleccionó la accesión Ttun 5 por el mayor efecto inhibitorio sobre el patógeno *R. solani* GA-3. El objetivo de este ensayo fue evaluar el efecto de la accesión escogida sobre tres diferentes aislamientos de *R. solani* GA-3 de la localidad de Zipaquirá (ZIP), Subachoque (SB) y Villa pinzón (VP). Para esto se diseñaron ocho tratamientos (Tabla 4) y se utilizó suelo naturalmente infestado y suelo esterilizado en autoclave.

En materas plásticas se mezcló el inóculo de *R. solani* GA-3 de cada localidad (0,5 g) con el suelo punto G11 naturalmente infestado y suelo estéril dependiendo del tratamiento (Tabla 4). Se homogenizó y se mantuvo en invernadero con una temperatura promedio entre 12 ºC y 20 ºC, y el riego se llevó a capacidad de campo utilizando agua de grifo. A los ocho días se agregó a cada tratamiento la accesión Ttun 5 (0,5 g) y se mantuvo con las mismas características de riego y temperatura. Ocho días después se colocó una plántula de papa *Solanum tuberosum* L. cultivar Diacol Capiro por matera de tratamiento. Las plántulas fueron obtenidas a partir de brotes en bandejas de germinación con turba estéril y con una fertilización de tres veces por semana con solución MS al 10 % (Anexo B).

Se realizó la evaluación de *R. solani* GA-3, microbiota de suelo y evaluación de incidencia y severidad siguiendo las metodologías descritas en las secciones 2.4.2.1 y 2.4.2.2.

Tabla 4. Composición de los tratamientos realizados para evaluar el efecto de la accesión Ttun 5 de cubios sobre tres aislamientos de *R. solani* GA-3.

Tratamiento	Composición
Aislamiento Zipaquirá	Suelo naturalmente infestado + Aislamiento *R. solani* GA-3 Zipaquirá + Accesión Ttun 5 + Cultivar Capiro
Aislamiento Subachoque	Suelo naturalmente infestado + Aislamiento *R. solani* GA-3 Subachoque + Accesión Ttun 5 + Cultivar Capiro
Aislamiento Villa Pinzón	Suelo naturalmente infestado + Aislamiento *R. solani* GA-3 Villa Pinzón + Accesión Ttun 5 + Cultivar Capiro
Control aislamiento de Zipaquirá	Suelo estéril + Aislamiento *R. solani* GA-3 Zipaquirá + Accesión Ttun 5 + Cultivar Capiro
Control aislamiento de Subachoque	Suelo estéril + Aislamiento *R. solani* GA-3 Subachoque + Accesión Ttun 5 + Cultivar Capiro
Control aislamiento de Villa Pinzón	Suelo estéril + Aislamiento *R. solani* GA-3 Villa Pinzón + Accesión Ttun 5 + Cultivar Capiro
Testigo Ttun 5	Suelo naturalmente infestado + Accesión Ttun 5 + Cultivar Capiro
Testigo	Suelo naturalmente infestado + Cultivar Capiro

2.4.4 Evaluación del efecto de una accesión de cubio en la incidencia y severidad de la enfermedad en tres cultivares de papa

Para evaluar el efecto de la accesión de cubio Ttun 5 en la incidencia y severidad de la enfermedad en tres cultivares de papa, bajo las condiciones de invernadero, se realizaron seis tratamientos (Tabla 5). Se utilizó 0,5 g de una mezcla de inóculo del patógeno (aislamientos Zipaquirá, Subachoque y Villa Pinzón en proporción 1:1:1 p/p) y 500 g de suelo naturalmente infestado punto G11 para cada tratamiento. Cada tratamiento fue homogenizado y se mantuvo en invernadero con una temperatura promedio entre 12 ºC y 20 ºC, y el riego se llevó a capacidad de campo utilizando agua de grifo. A los ocho días se agregó a cada tratamiento la accesión Ttun 5 (0,5 g) y se mantuvo con las mismas características de riego y temperatura. Ocho días después se colocó una plántula de los diferentes cultivares correspondiente a cada tratamiento. Las plántulas fueron obtenidas a partir de brotes en bandejas de germinación con turba estéril y con una fertilización de tres veces por semana con solución MS al 10 % (Anexo B).

Se realizó la evaluación de *R. solani* GA-3, microbiota de suelo y evaluación de incidencia y severidad siguiendo las metodologías descritas en las secciones 2.4.2.1 y 2.4.2.2.

Tabla 5. Composición de los tratamientos realizados para evaluar el efecto de la accesión Ttun 5 de cubios en la incidencia y severidad de la enfermedad en tres cultivares de papa.

Tratamiento	Composición
Capiro	Suelo naturalmente infestado + Mezcla de tres aislamientos *R. solani* GA-3 (Zipaquirá, Subachoque y Villa Pinzón) + Accesión Ttun 5 + Cultivar Diacol capiro
Suprema	Suelo naturalmente infestado + Mezcla de tres aislamientos *R. solani* GA-3 (Zipaquirá, Subachoque y Villa Pinzón) + Accesión Ttun 5 + Cultivar Pastusa suprema
Criolla	Suelo naturalmente infestado + Mezcla de tres aislamientos *R. solani* GA-3 (Zipaquirá, Subachoque y Villa Pinzón) + Accesión Ttun 5 + Cultivar Criolla Colombia
Ttun 5	Suelo naturalmente infestado + Accesión Ttun 5 + Cultivar Capiro
Testigo *R. solani* GA-3	Suelo naturalmente infestado + Mezcla de tres aislamientos *R. solani* GA-3 (Zipaquirá, Subachoque y Villa Pinzón) + Cultivar Capiro
Testigo	Suelo naturalmente infestado + Cultivar Capiro

2.4.5 Análisis de datos

Los datos obtenidos para la microbiota de hongos y bacterias totales, pseudomonads fluorescentes y *Trichoderma* sp. fueron transformados por el log de conteo más 1. Se obtuvo un promedio por tratamiento y se realizó un análisis de varianza no paramétrico utilizando el test de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$) y se hizo una comparación de diferencias mínima significativa (LSD) a los rangos. Para las poblaciones de *R. solani* GA-3, y las variables de lesiones en estolón, severidad en tallo, y longitud de la plantas se obtuvo un promedio por tratamiento y se realizó un análisis de varianza no paramétrico utilizando el el test de Friedman ($p \leq 0,05$) para comparar las tres réplicas biológicas en el tiempo y se hizo una comparación de diferencias mínima significativa (LSD) a los rangos (Sofware SAS versión 9.2).

2.5 Cuantificación absoluta de *R. solani* GA-3 y *Pseudomonas* sp. por PCR en tiempo real (qPCR)

2.5.1 Cuantificación de *R. solani* GA-3 por qPCR

La obtención de la curva estándar para la cuantificación absoluta de *R. solani* GA-3 mediante PCR en tiempo real se llevó a cabo por el grupo de Investigación en papa (García C., datos no publicados). Esta curva se realizó a partir de ADN de micelio de un aislamiento de *R.solani* GA-3 de Zipaquirá. El ADN de esta cepa fue extraído utilizando un kit comercial (DNeasy Plant Mini kit, Quiagen). Mediante PCR convencional utilizando los primers RsTqF1 (5'-AAGAGTTTGGTTGTAGCTGGTCTATTT-3' y RsTqR1 (5'-AATTCCCCAACTGTCTCACAAGTT-3) se verificó la banda esperada de 98 pb (Lees et al., 2004). A partir de este producto de PCR se realizó la clonación siguiendo el procedimiento descrito en un kit comercial (TOPO-TA cloning kit, Invitrogen), y se

manipuló un vial de células competentes *Escherichia coli* DH5α (Invitrogen) y posteriormente se realizó la extracción de ADN plasmídico mediante el método Mini-prep. Una vez se obtuvo y se purificó el ADN plasmídico se obtuvó la curva estándar para qPCR con las diluciones de 50 ng, 500 pg, 50 pg, 5 pg, 500 fg y 50 fg, con un R^2 de 0,97 (Anexo C).

2.5.2 Cuantificación de *Pseudomonas* sp. por qPCR

La curva estándar para la cuantificación absoluta de *Pseudomonas sp. e*n suelo fue estandarizada en este trabajo. Las siguientes secciones describen los procedimientos realizados para este fin.

2.5.2.1. Extracción de ADN

Se utilizó una cepa de *Pseudomonas fluorescens* para la estandarización de la cuantificación de *Pseudomonas* sp. en suelo, fue suministrada por laboratorio de Microbiología Agrícola del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN). La extracción del ADN de esta cepa se realizó con un kit comercial siguiendo los procedimientos descritos (PureLink Genomic DNA Mini Kit, Invitrogen; ver Anexo D.1).

2.5.2.2. PCR convencional

El ADN extraído de *Pseudomonas fluorescens* fue usado para amplificar una región génica especifica para el género *Pseudomonas* (16S rRNA) utilizando los primers Pf (5'-GGGTGGTGGAATTTCCTGTGT-3') y Pr (5'-GAAGCGGTGACCACAAGGAA-3') descritos por Lloyd-Jones et al. (2005). Una reacción de 15 µl contenía en cantidades o concentraciones finales los siguientes reactivos (Von Felten et al., 2010): 10 ng de ADN plantilla, 0,1 mM de dNTPs, 0,1 mM de cada iniciador, 1,5 mM de $MgCl_2$, 1X de buffer PCR (Invitrogen) y 0,7 U de Taq polimerasa (Invitrogen). El programa de amplificación utilizado fue el siguiente: 1) denaturación inicial a 94 °C por 5 minutos, 2) 38 ciclos de 94 °C por 30 s, 60 °C por 15 s, y 72 °C por 15 s, y 3) una extensión final a 72 °C por 5 minutos. El producto de PCR fue analizado usando un gel de agarosa al 1,5% (en 1x TAE) (Maniatis et al, 1982). Se obtuvo una banda esperada de 65 pb utilizando los primers Pf y Pr (Lloyd-Jones et al., 2005).

2.5.2.3. Clonación, extracción de ADN plasmídico y purificación

Los productos obtenidos de la amplificación se purificaron a partir de gel utilizando un kit comercial (Purification PureLink Kit, Invitrogen; Anexo D.2). Los productos de amplificación purificados, fueran clonados utilizando y siguiendo el procedimiento descrito en un kit comercial (TOPO-TA cloning kit, Invitrogen), y se manipuló un vial de células

competentes *Escherichia coli* DH5α (Invitrogen). Para la ligación se utilizaron 4 µl de producto de PCR purificado y se dejó 24 horas a 4 °C para posteriormente hacer la transformación con las células competentes.

Para la transformación se adicionaron 2 µl de producto de ligación a un vial de células competentes, se incubaron en hielo por 30 minutos y se hizo choque térmico a 42 °C por 30 s. Inmediatamente se pasó a hielo y luego se agregó medio líquido 2XYT (Bactotriptona, Oxoid 8 g / 500 ml; Extracto de levadura, Oxoid 5 g / l; NaCl) sin ampicilina, y se incubó en agitador orbital por dos horas a 37 °C a 225 rpm. Las células transformadas se sembraron por duplicado en cajas de Petri con medio solido 2XYT (medio líquido 2XYT suplementado con Agar bacteriológico, Oxoid 2.5 g/ l) con ampicilina (50 µg/µl) y se incubó durante la noche a 37 °C.

La extracción de ADN plasmídico a partir de las células transformadas se realizó mediante el método Mini-prep (Anexo D.3), en donde se seleccionaron 21 clones que fueron purificados siguiendo la metodología descrita en el Anexo D.4. Las muestras purificadas de ADN plasmídico fueran evaluadas mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % (teñido con bromuro de etidio) y se midió la concentración de las mismas mediante el sistema Qiubit (Invitrogen).

2.5.2.4. Obtención de la curva estándar

Para obtener la curva estándar para la cuantificación absoluta de *Pseudomonas* sp. por qPCR, se escogió un ADN plasmídico con la mejor relación de absorbancia A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230}. A partir del clon número 1 se realizaron diluciones seriadas obteniendo las siguientes diluciones finales: 25 ng, 10 ng, 5 ng, 500 pg, 50 pg, 25 pg, 10 pg, 5 pg, 500fg, 100 fg, 10 fg y 5fg. Sin embargo, se seleccionó solamente las diluciones de 50 pg, 25 pg, 10 pg, 5 pg, 100 fg, 10 fg y 5fg para la obtención de la curva.

Para *Pseudomonas* sp. los ensayos de qPCR fueron realizados por duplicado en un termociclador Bio-rad CFX Manager optical 96-well. Se realizaron reacciones con un volumen final de 12 µl que incluían: 1 µl de ADN plasmídico molde para cada una de las concentraciones indicadas arriba, 5 µl de SYBR Green (Biorad) que contiene buffer 2X, dNTPs, iTaq DNA polimerasa, 6 mM $MgCl_2$ y SYBER Green I y por último cebadores Pf/Pr a una concentración final de 0,1 µM por reacción (Lloyd-Jones *et al*., 2005). El protocolo de amplificación realizado fue: 1) 95 °C por 2 minutos y 2) 40 ciclos a 95°C por 15 segundos y 62 °C por 30 segundos. La curva de *melting* se realizó entre 55 °C a 95 °C incrementándose 0,5 °C por cada 10 segundos (Anexo F).

Finalmente, para la validación de la curva se tuvieron en cuenta varios aspectos: 1) Curva estándar linear (R^2>0.960 ó r>|-0.970|); 2) Alta eficiencia de amplificación (90-105%); y 3) Consistencia a través de las réplicas de las reacciones. Los valores obtenidos en el ciclo de umbral (C_t) para las diluciones fueron calculados por CFX Manager versión 1.0 de Biorad. El análisis se realizó mediante una regresión y correlación entre el Log de la concentración de ADN versus los valores obtenidos en C_t. Así, se obtuvo una ecuación linear que permitió analizar y extrapolar los valores de C_t de las muestras de suelo.

2.5.3 Ensayos de PCR en tiempo real con muestras de suelo

2.5.3.1. Extracción de ADN de muestras de suelo

Se tomó cada muestra de suelo obtenida en invernadero y se escogió solamente las tres primeras repeticiones de las cinco obtenidas por cada tratamiento para la extracción de ADN. Para esto, se pesaron 0,25 g de suelo mantenido a – 80 ºC y se utilizó un kit comercial (Power soil® DNA, MOBIO) para realizar la extracción del ADN del suelo (Anexo E).

2.5.3.2. Cuantificación de *R. solani* GA-3 y *Pseudomonas* sp. en suelo por qPCR

Las muestras que se seleccionaron para cuantificar *Rhizoctonia solani* GA-3 por PCR en tiempo real fueron las tres primeras repeticiones por cada tratamiento de la primera réplica biológica en el tiempo. Se cuantificó cada una de las muestras por duplicado correspondientes en las tres evaluaciones (ocho días después de agregar inóculo de *R. solani* GA-3, y ocho y treinta días después de agregar los cubios).

Las condiciones de qPCR que se utilizaron para *Rhizoctonia solani* GA-3 fueron: 1 µl de ADN de suelo, 6 µl de Express qPCR SuperMixes (Invitrogen), cebadores RsTqF1/RsTqR1 a una concentración final de 0,2 µM por reacción, y la sonda Taqman® RQP1 (5'TTTAGGCATGTGCACACCTCCCTCTTTC 3') a 0,2 µM, en un volumen final de 12 µl. El protocolo de amplificación utilizado fue el reportado por Lees *et al*. (2002): 1) 50 °C por 2 minutos, 2) 95 °C por 2 minutos y 3) 45 ciclos a 95 °C por 15 segundos y 60 °C por un minuto. Para el análisis, se utilizó un termociclador Bio-rad CFX Manager optical 96-well. Para *Pseudomonas* sp. se seleccionaron únicamente las primeras tres repeticiones por tratamiento de la primera réplica biológica en el tiempo. Se cuantificó por duplicado únicamente la evaluación correspondiente a los ochos días después de agregar los cubios utilizando las mismas condiciones de qPCR señaladas en 2.5.2.4, pero remplazando el ADN plasmídico por ADN de suelo.

Los datos obtenidos con las muestras de suelo fueron extrapolados utilizando cada una de las curvas estándar para cada microrganismos por Microsoft Excel para así obtener la concentración de ADN de *Rhizoctonia solani* GA-3 y *Pseudomonas* sp. presentes en cada muestra de suelo. Se realizó un análisis de varianza no paramétrico utilizando el test de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$) y se hizo una comparación de diferencias mínima significativa (LSD) (Sofware SAS versión 9.2).

2.6 Comparación de metodologías de cuantificación microbiológica y molecular

A partir de los datos obtenidos en la cuantificación mediante métodos microbiológicos en donde se obtuvo densidad de hifas (propágulos/g de suelo) para *Rhizoctonia solani*, GA-

3 y UFC/g de suelo para *Pseudomonas* fluoresecentes, y mediante PCR en tiempo real (qPCR) en donde se obtuvo la concentración de ADN (fg/g de suelo) de cada microrganismo en las muestras de suelo.

El análisis estadístico se realizó haciendo un análisis de regresión y correlación entre las UFC/g de suelo y concentración de ADN/g suelo para *Pseudomonas* sp., y densidad de hifas y concentración de ADN/g de suelo para *R. solani* GA-3. Estos resultados fueron analizados mediante el sofware R versión 2.1.4.2.

3. Resultados

3.1 Clasificación física de los cubios

Las 65 accesiones de cubios fueron clasificadas de acuerdo a sus características fenotípicas (Piñeros y Ñustez, 2004). Para este estudio se tuvo en cuenta principalmente el color predominante y secundario de la piel en donde se obtuvo que cinco accesiones mostraron color morado, 18 color amarillo, 21 color blanco-morado y 21 color blanco-rojo (Figura 11 y Tabla 6).

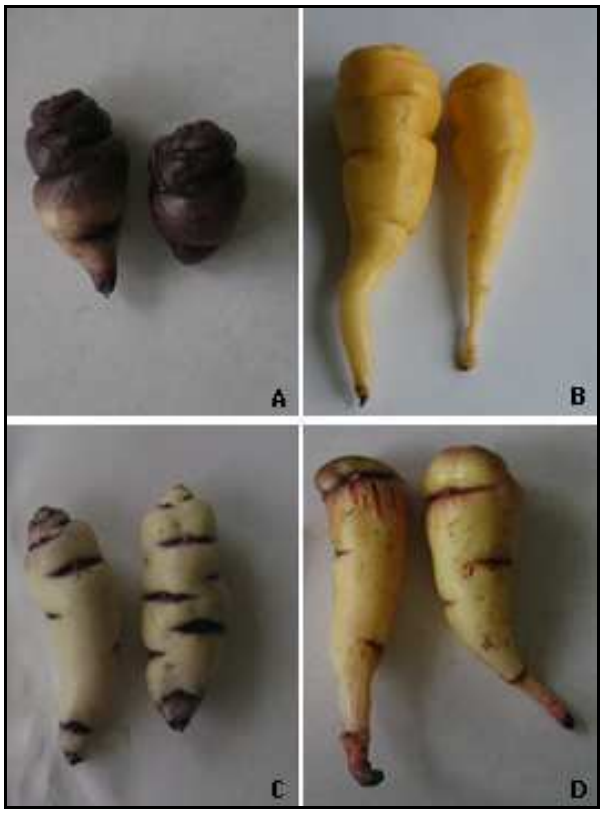


Figura 11. Clasificación fenotípica de algunos ejemplares de los cubios utilizados en este estudio de acuerdo a su color predominante y secundario de piel: A, accesión Ttun 31 (morado); B, accesión Ttun 19 (amarillo); C, accesión Ttun 4 (blanco-morado); y D, accesión Ttun 62 (blanco-rojo).

Tabla 6. Accesiones de cubios de la colección central de la Universidad Nacional de Colombia evaluados en este estudio. Clasificación fenotípica de acuerdo al color predominante y secundario de la piel del tubérculo.

Accesión de cubio	Color de piel	Accesión de cubio	Color de piel	Accesión de cubio	Color de piel
Ttun 1	Blanco-morado	**Ttun 23**	Blanco-morado	**Ttun 49**	Blanco-morado
Ttun 2	Blanco-morado	**Ttun 24**	Blanco-rojo	**Ttun 50**	Blanco-morado
Ttun 3	Blanco-morado	**Ttun 25**	Morado	**Ttun 51**	Blanco-morado
Ttun 4	Blanco-morado	**Ttun 26**	Blanco-rojo	**Ttun 52**	Blanco-morado
Ttun 5	Blanco-morado	**Ttun 27**	Blanco-rojo	**Ttun 53**	Amarillo
Ttun 6	Blanco-morado	**Ttun 28**	Blanco-rojo	**Ttun 54**	Blanco-rojo
Ttun 7	Blanco-rojo	**Ttun 29**	Amarillo	**Ttun 55**	Amarillo
Ttun 8	Amarillo	**Ttun 30**	Blanco-rojo	**Ttun 56**	Blanco-morado
Ttun 9	Blanco-rojo	**Ttun 31**	Morado	**Ttun 57**	Blanco-rojo
Ttun 10	Amarillo	**Ttun 33**	Amarillo	**Ttun 58**	Blanco-morado
Ttun 11	Blanco-morado	**Ttun 36**	Morado	**Ttun 59**	Morado
Ttun 12	Blanco-rojo	**Ttun 38**	Blanco-rojo	**Ttun 60**	Blanco-morado
Ttun 13	Amarillo	**Ttun 39**	Amarillo	**Ttun 61**	Blanco-rojo
Ttun 14	Blanco-rojo	**Ttun 40**	Amarillo	**Ttun 62**	Blanco-rojo
Ttun 15	Blanco-morado	**Ttun 41**	Amarillo	**Ttun 63**	Amarillo
Ttun 16	Amarillo	**Ttun 42**	Amarillo	**Ttun 64**	Blanco-morado
Ttun 17	Blanco-rojo	**Ttun 43**	Blanco-rojo	**Ttun 65**	Blanco-rojo
Ttun 18	Blanco-morado	**Ttun 44**	Blanco-morado	**Ttun 66**	Blanco-rojo
Ttun 19	Amarillo	**Ttun 45**	Amarillo	**Ttun 67**	Amarillo
Ttun 20	Blanco-rojo	**Ttun 46**	Blanco-morado	**Ttun 68**	Amarillo
Ttun 21	Blanco-morado	**Ttun 47**	Morado	**Ttun 69**	Blanco-rojo
Ttun 22	Amarillo	**Ttun 48**	Blanco-rojo		

3.2 Bioensayos de laboratorio: Evaluación del efecto de accesiones de cubios sobre *Rhizoctonia solani*

La evaluación del efecto de las 65 accesiones de cubios sobre el patógeno causante de rhizoctoniasis se cuantificó mediante la densidad de hifas (propágulos/g de suelo) siguiendo la metodología descrita por Paulitz et al. (2005). Para el reconocimiento e identificación de *Rhizocotnia solani* se evaluó en microscopio las características más importantes como son el micelio café e hifas de pigmentación marrón, ramificación de micelio en ángulo recto, constricción de la hifa y formación del septo cerca a la ramificación (Figura 12).

En la tabla 7, se observa los promedios de la densidad de hifas registradas para cada accesión así como la concentración de GLS totales (µmoles/gramo de cubio seco) medida por Arias & Higuera (2011). En la evaluación de la densidad de hifas se obtuvo que entre las accesiones hay diferencias significativas ($p < 0,0001$). De las 65 accesiones

evaluadas, se encontró que la accesión 10 no presentó ningún efecto sobre la densidad de hifas del patógeno (30,1 propágulos/g de suelo).

La densidad de hifas obenidas en 45 accesiones, es decir el 69,2 % de la colección de cubios, presentó un valor entre 2,0 y 3,0 propágulos/g de suelo, permitiendo ubicar las accesiones dentro del grupo de accesiones con mayor efecto sobre el patógeno que causa rhizoctoniasis en cultivos de papa. Para las accesiones Ttun 13, Ttun 16, Ttun 22, Ttun 29, Ttun 33, Ttun 39, Ttun 40, Ttun 45, Ttun 55 y Ttun 63 se obtuvo una densidad de hifas entre 9,0 y 14,6 propágulos/g de suelo. Sin embargo, comparando la densidad de hifas de las accesiones anteriores (14,6; 11,7; 9,1; 13,6; 9,6; 14,0; 9,2; 9,9; 8,1 y 9,0 propágulos/g de suelo) respectivamente con el tratamiento control (suelo naturalmente infestado sin accesión) (14,8 propágulos/ g de suelo) señala que todas estas accesiones se encuentran por debajo de la densidad obtenida en el suelo control, demostrando un efecto sobre el hongo patógeno (Tabla 7).

Con respecto a las accesiones Ttun 30, Ttun 16 y Ttun 59, que mostraron la mayor cantidad de GLS (30,40; 29,98 y 26,31 µmoles/gramo de cubio seco, respectivamente), estas mostraron un efecto de supresión sobre las hifas activas disminuyendo su número a 1,08, 5,84 y 1,16 propágulos/g de suelo, respectivamente. Por otro lado, comparando la densidad de hifas obtenidas después de agregar las accesiones de cubios con la cantidad total de GLS se observa que las accesiones con mayor efecto inhibitorio sobre los propágulos de *R. solani* (2,0 propágulos/ g de suelo) tienen una cantidad total de GLS entre 6,01 y 10,11 µmoles/gramo de cubio seco, por lo tanto las accesiones con mayor efecto en la reducción de *R. solani* no siempre corresponden a las accesiones con la mayor cantidad de glucosinolatos totales (Arias & Higuera, 2011). Finalmente, el 98.4 % de los cubios de la colección de cubios de la Universidad Nacional de Colombia tiene un efecto sobre la densidad de hifas (propágulos/ g de suelo) de *Rhizocotonia solani*.

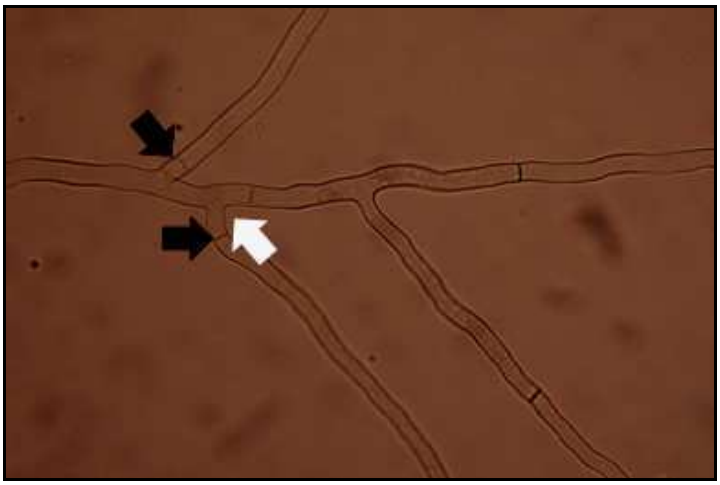


Figura 12. Observación bajo microscopio de luz de ejemplar *Rhizocotonia solani* aislado a partir de suelo de Zipaquirá punto G2. Ramificación de micelio en ángulo recto y constricción de la hifa (flechas blancas) y formación del septo cerca a la ramificación (flechas negras). Aumentó de 40X, tinción con azul de lactofenol.

Tabla 7. Efecto de 65 accesiones de cubios sobre densidad de hifas de *R. solani* (propágulos/g suelo) en suelo naturalmente infestado proveniente de cultivo de papa[1] y concentración de glucosinolatos totales (µmoles/g cubio seco) en cada uno de los cubios de la colección de la Universidad Nacional de Colombia [2].

Accesión de cubio	Promedio de densidad de hifas (propágulos/g de suelo) [1]	Glucosinolatos totales µmoles/g cubio seco [2]	Accesión de cubio	Promedio de densidad de hifas (propágulos/g de suelo) [1]	Glucosinolatos totales µmoles/g cubio seco [2]
Ttun 1	2,3 [h]	17,12 ± 6,77	**Ttun 38**	2,6 [gh]	8,26 ± 2,65
Ttun 2	2,2 [h]	13,69 ± 5,20	**Ttun 39**	14,0 [b]	-
Ttun 3	3,3 [gh]	8,87 ± 2,78	**Ttun 40**	9,2 [de]	3,16 ± 1,04
Ttun 4	2,4 [h]	7,92 ± 1,47	**Ttun 41**	7,8 [ef]	12,47 ± 3,26
Ttun 5	2,2 [h]	17,58 ± 3,26	**Ttun 42**	5,2 [fgh]	10,22 ± 4,79
Ttun 6	2,2 [h]	10,00 ± 0,06	**Ttun 43**	2,6 [gh]	11,26 ± 1,04
Ttun 7	3,8 [gh]	16,51 ± 3,78	**Ttun 44**	2,2 [h]	10,49 ± 3,02
Ttun 8	2,2 [h]	9,35 ± 2,73	**Ttun 45**	9,9 [cde]	6,49 ± 2,70
Ttun 9	2,5 [h]	13,79 ± 1,58	**Ttun 46**	2,0 [h]	9,30 ± 0,39
Ttun 10	30,1 [a]	18,77 ± 3,07	**Ttun 47**	2,5 [h]	11,10 ± 0,96
Ttun 11	2,2 [h]	18,91 ± 4,92	**Ttun 48**	2,8 [gh]	18,50 ± 7,84
Ttun 12	2,6 [gh]	15,17 ± 5,0	**Ttun 49**	3.7 [gh]	-
Ttun 13	14,6 [b]	4,80 ± 1,91	**Ttun 50**	5,0 [fgh]	7,39 ± 0,12
Ttun 14	2,4 [h]	13,36 ± 3,30	**Ttun 51**	2,2 [h]	8,60 ± 3,29
Ttun 15	2,5 [h]	8,41 ± 1,07	**Ttun 52**	2,6 [gh]	7,34 ± 1,53
Ttun 16	11,7 [bcd]	29,98 ± 8,71	**Ttun 53**	6,3 [efg]	7,45 ± 2,64
Ttun 17	2,4 [h]	13,68 ± 4,27	**Ttun 54**	2,0 [h]	9,84 ± 4,11
Ttun 18	2,0 [h]	9,14 ± 0,51	**Ttun 55**	8,1 [def]	6,33 ± 1,05
Ttun 19	2,2 [h]	14,62 ± 0,59	**Ttun 56**	2,0 [h]	6,46 ± 2,23
Ttun 20	2,6 [gh]	14,37 ± 0,44	**Ttun 57**	2,7 [gh]	5,43 ± 2,18
Ttun 21	2,1 [h]	3,95 ± 0,87	**Ttun 58**	2,5 [h]	6,86 ± 1,20
Ttun 22	9,1 [de]	8,70 ± 3,21	**Ttun 59**	2,3 [h]	26,31 ± 1,54
Ttun 23	2,1 [h]	4,49 ± 1,07	**Ttun 60**	2,3 [h]	7,39 ± 2,09
Ttun 24	2,0 [h]	9,53 ± 2,09	**Ttun 61**	2,1 [h]	2,77 ± 0,51
Ttun 25	2,2 [h]	12,01 ± 0,41	**Ttun 62**	2,1 [h]	4,19 ± 0,83
Ttun 26	2,8 [gh]	14,43 ± 4,43	**Ttun 63**	9,0 [de]	2,53 ± 3,23
Ttun 27	2,2 [h]	15,11 ± 3,17	**Ttun 64**	2,6 [gh]	14,44 ± 3,72
Ttun 28	2,1 [h]	11,08 ± 2,80	**Ttun 65**	2,0 [h]	10,11 ± 3,93
Ttun 29	13,6 [bc]	9,91 ± 3,03	**Ttun 66**	2,3 [h]	22,87 ± 6,84
Ttun 30	2,2 [h]	30,40 ± 8,69	**Ttun 67**	4,5 [fgh]	8,95 ± 0,47
Ttun 31	2,1 [h]	21,52 ± 6,15	**Ttun 68**	3,8 [gh]	12,35 ± 0,85
Ttun 33	9,6 [de]	8,10 ± 1,40	**Ttun 69**	2,0 [h]	6,01 ± 1,53
Ttun 36	2,0 [h]	6,45 ± 1,23	**Control** (Suelo naturalmente infestado sin accesión de cubios)	14,8 [b]	-

[1]Análisis de varianza no paramétrica Kruskal Wallis ($p \leq 0,05$). Valores en la misma columna seguidos por la misma letra(s) no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) de acuerdo a la prueba de Tukey.

[2]Concentración de glucosinolatos (Arias & Higuera, 2011).

3.3 Bioensayos en invernadero

3.3.1 Obtención de aislamientos de *R. solani* GA-3 y obtención de inóculo

Se seleccionó un aislamiento por localidad (Zipaquirá, Subachoque y Villa Pinzón) y se verificó por PCR la presencia de un fragmento ITS de 500 pb en su ADN genómico utilizando los primers específicos para la detección de *R. solani* GA-3 Rs1F2 (5'-TTGGTTGTAGCTGGTCTATTT-3') y Rs2R1 (5'-TATCACGCTGAGAGTGGAACCA-3') descritos por Lees et al. (2002). Estos permitieron identificar los aislamientos de *R. solani* GA-3 (Figura 13).

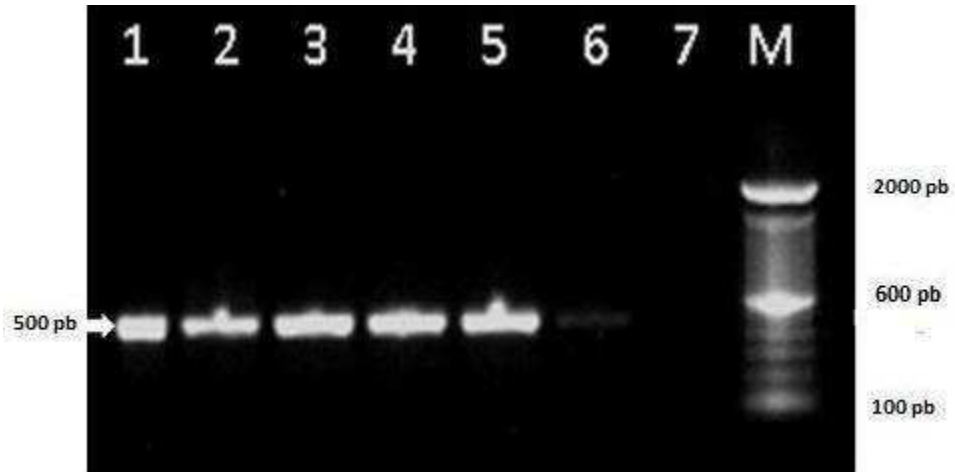


Figura 13. Productos de PCR amplificados a partir de la región ITS (500 pb) utilizando los primers Rs1F2/Rs2R1 para identificación de aislamientos de *R. solani* GA-3. Fila 1: aislamiento Zipaquirá 1; Fila 2: aislamiento Zipaquirá 2; Fila 3: aislamiento Subachoque 1; Fila 4: aislamiento Subachoque 2; Fila 5: aislamiento Villa Pinzón 1; Fila 6: aislamiento Villa Pinzón 2; Fila 7: control negativo; M: Marcador de 100pb (Invitrogen).

3.3.2 Evaluación del efecto de accesiones de cubios seleccionadas sobre *R. solani* y la microbiota del suelo

La selección de las accesiones a evaluar se realizó tomando en cuenta los resultados obtenidos en el bioensayo de laboratorio para las accesiones con un mejor efecto sobre la densidad de hifas de *R. solani* (valores menores a 2,2 propágulos/g de suelo, Tabla 7). Así, se seleccionaron las accesiones Ttun 5, Ttun 54, Ttun 62 y Ttun 69. También se seleccionó la accesión Ttun 30 que mostró el mayor contenido de glucosinolatos (30,40 µmoles/g cubio seco) y las accesiones con un contenido intermedio de glucosinolatos Ttun 19 (14,64 µmoles/g cubio seco) y Ttun 43 (11,26 µmoles/g cubio seco), y finalmente la accesión Ttun 61 que mostró 2,1 propágulos/g de suelo y un contenido de GLS de 2,77 µmoles/g cubio seco (Arias & Higuera, 2011) (Tabla 7). Las ocho accesiones seleccionadas para los ensayos de invernadero fueron evaluadas en tres réplicas biológicas en el tiempo. En cada una de esta réplicas se evaluó el número de hifas

activas de *R. solani* GA-3 y solamente durante la primera réplica biológica se evaluó la microbiota de suelo en UFC/g de suelo.

Primero se aislaron colonias obtenidas de cada uno de los medios de cultivo para verificar microscópicamente las características de pseudomonads fluorescentes. y *Trichoderma* sp. Para la primera, se observó la presencia de colonias blancas brillantes de consistencia mucoide y no uniforme y microscópicamente con la forma de bacilos Gram negativos (Figura 14A); para *Trichoderma* sp. se observó la presencia de colonias con apariencia algodonosa y pigmentación verde oliva y microscópicamente con la forma de fiálides y conidióforo (Figura 15B). Con respecto a la microbiota bacteriana se aislaron colonias de consistencia mucoide, pigmentación blanca y de forma circular uniforme y microscópicamente se presenció la forma de bacilos Gram positivos (Figura 14B).

Con respecto a la microbiota de hongos, se seleccionaron las colonias que predominaban en el medio de cultivo. Microscópicamente se encontraron esporangios esféricos y esporangióforo ramificado caraterisiticas del género *Rhizopus* sp., y a partir de otras colonias asiladas se observaron estructuras similares a conidiosporas y ramificaciones filoides y cadenas de conidas indicando la presencia de *Penicillium* sp. en el suelo de Zipaquirá (Figura 15A y C). Finalmente para *Rhizoctonia solani* se evaluó en microscopio las siguientes características: micelio café e hifas de pigmentación marrón, ramificación de micelio en ángulo recto, constricción de la hifa y formación del septo cerca a la ramificación (Figura 12).

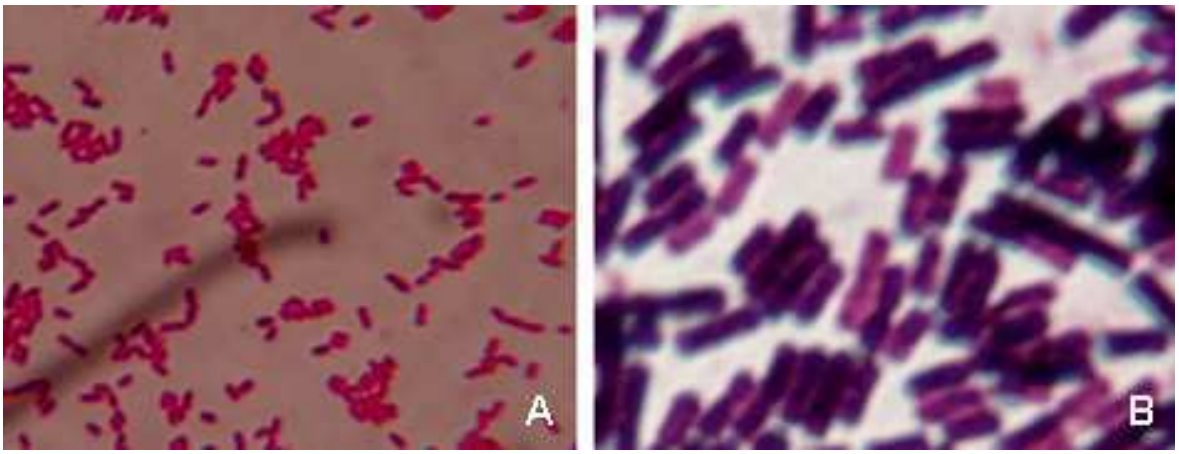


Figura 14. Ejemplares observados bajo microscopio de luz de bacterias aisladas a partir de suelo de Zipaquirá punto G2, teñidos con tinción de Gram. A, Bacilos Gram negativos; B, Bacilos Gram positivos. Aumentó de 100X utilizando aceite de inmersión.

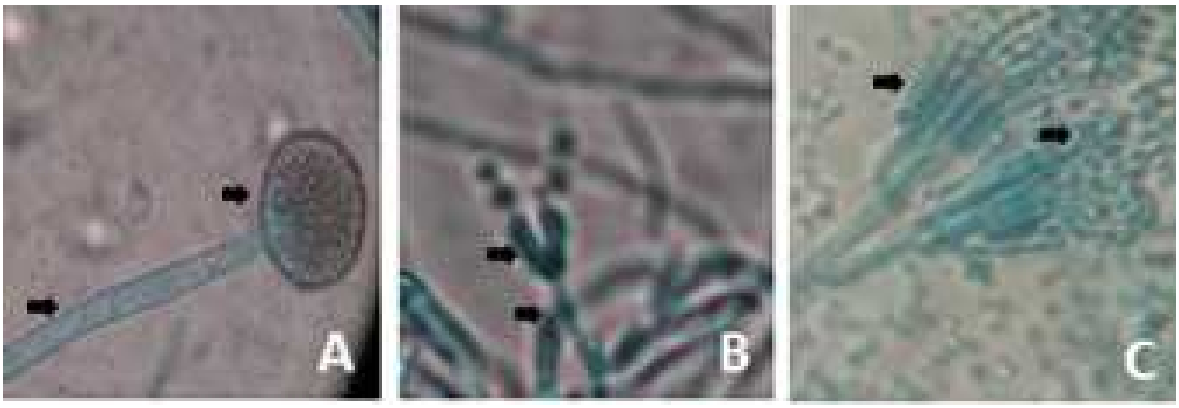


Figura 15. Ejemplares observados bajo microscopia óptica de hongos aislados a partir de suelo de Zipaquirá punto G2. A. *Rhizopus* sp., flechas negras indican esporangióforo y esporangio esférico; B. *Trichoderma* sp., flechas negras indican fiálides y conidióforo; C. *Penicilium* sp., flechas negras indican coniosporas y ramificaciones filoides. Aumentó de 40X; tinción con azul de lactofenol.

La cuantificación de la microbiota de suelo se realizó a los ocho días después de agregar 0,5 g de cubios de cada una de las accesiones obteniendose mediante el análisis de Krustal Wallis un valor de p= 0,0219 y 0,0001 para las poblaciones de pseudomonads fluorescentes y bacterias totales respectivamente, indicando un efecto por la incorporación de lo cubios. Con el análisis de diferencia mínima significativa (LSD) se encontró que con todas las accesiones evaluadas hubo un aumentó en las poblaciones de pseudomonads fluorescentes comparado con el tratamiento testigo(suelo naturalmente infestado sin accesión de cubios y sin inóculo de *R. solani* GA-3) y con el tratamiento de *R. solani* GA-3, que no tenia ninguna incorporación de cubios (Tabla 8); mientras que para bacterias totales se evidenció un aumentó hasta 9,8 X 10^5 ; 1,10 X 10^6 ; 5,00 X 10^5 y 8,10 X 10^5 UFC/g de suelo con la incorporación de las accesiones Ttun 5, Ttun 19, Ttun 30 y Ttun 56, respectivamente (Tabla 9). A los 30 días después de incorporar los cubios se observó que las UFC/ g de suelo de pseudomonads fluorescentes no presentaron ninguna diferencia entre los tratamientos (p= 0,1045) (Tabla 8) y en bacterias totales si se evidenció que con las accesiones Ttun 5 y Ttun 30 hubo un aumentó hasta 1,40 X 10^6 y 1,10 X 10^6 UFC/g de suelo respectivamente, comparado con el testigo absoluto en donde la cantidad de bacterias totales fue de 7,90 X 10^4 UFC/g de suelo (Tabla 9).

Para la cuantificación de hongos totales y *Trichoderma* sp. a los ocho días después de agregar los cubios no se observaron diferencias entres las accesiones con respecto al testigo (Tablas 8 y 9). Sin embargo a los 30 días, en las poblaciones de hongos totales se evidenció un aumentó significativo con la accesión Ttun 56, en donde se obtuvo 2,30 X 10^5 UFC/g de suelo (Tabla 9). Por otro lado, con las accesiones Ttun 30, Ttun 54 y Ttun 61 las poblaciones de hongos totales también aumentaron con respecto al testigo, aunque en menor proporción que en el caso de la accesión anterior (Tabla 9). El testigo de *R. solani* GA- 3, que no tenia ninguna accesión aplicada fue el tratamiento con el menor número de colonias de hongos totales (Tabla 9). Las poblaciones de *Trichoderma* sp. no presentaron diferencias entre los tratamientos en la evaluación a los 30 dias después de adicionar el cubio (Tabla 8).

Tabla 8. Evaluación del efecto de accesiones de cubios sobre la población de pseudomonads fluorescentes y *Trichoderma* sp. Se muestra el promedio de UFC/g de suelo a los ocho y treinta días después de agregar los cubios.

Tratamiento[1] / Tiempo	(UFC/g de suelo)[2]			
	pseudomonads fluorescentes		*Trichoderma* sp.	
	Ocho días después de adicionar cubio	Treinta días después de adicionar cubio	Ocho días después de adicionar cubio	Treinta días después de adicionar cubio
Ttun 5	1,30E+05 [ab]	7,20E+04 [a]	5,50E+03 [a]	5,50E+03 [a]
Ttun 19	1,00E+05 [abc]	9,40E+04 [a]	8,30E+03 [a]	4,60E+04 [a]
Ttun 30	1,10E+05 [ab]	2,90E+05 [a]	3,10E+04 [a]	5,50E+03 [a]
Ttun 54	5,80E+04 [bc]	9,10E+04 [a]	2,00E+04 [a]	6,50E+03 [a]
Ttun 56	1,90E+05 [a]	5,50E+04 [a]	5,50E+03 [a]	4,40E+04 [a]
Ttun 61	7,30E+04 [abc]	1,40E+05 [a]	1,20E+04 [a]	2,50E+04 [a]
Ttun 62	5,80E+04 [bc]	5,60E+04 [a]	3,00E+04 [a]	2,50E+04 [a]
Ttun 69	5,50E+04 [c]	5,50E+04 [a]	5,50E+03 [a]	5,50E+03 [a]
Testigo *R. solani* GA-3 Zipaquirá	5,50E+04 [c]	5,60E+04 [a]	4,60E+04 [a]	5,50E+03 [a]
Testigo	5,60E+04 [bc]	9,40E+04 [a]	3,60E+04 [a]	5,50E+03 [a]

[1]Composicion de los tratamientos en la sección 2.4.2 de Metodología.
[2]Test de Kruskall Wallis ($p \leq 0,05$). Valores en la misma columna seguidos por la misma letra(s) no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) de acuerdo al test de LSD.

Tabla 9. Evaluación del efecto de accesiones de cubios sobre bacterias y hongos totales. Se muestra el promedio de UFC/g de suelo a los ocho y treinta días después de agregar los cubios.

Tratamiento[1] / Tiempo	(UFC/g de suelo)[2]			
	Bacterias totales		Hongos totales	
	Ocho días después de adicionar cubio	Treinta días después de adicionar cubio	Ocho días después de adicionar cubio	Treinta días después de adicionar cubio
Ttun 5	9,80E+05 [a]	1,40E+06 [a]	7,50E+04 [a]	6,80E+04 [de]
Ttun 19	1,10E+06 [a]	4,70E+05 [abc]	1,10E+05 [a]	9,50E+04 [de]
Ttun 30	5,00E+05 [ab]	1,10E+06 [a]	5,30E+04 [a]	1,50E+05[abc]
Ttun 54	1,10E+05 [bc]	4,00E+06 [ab]	5,30E+04 [a]	1,40E+05[bcd]
Ttun 56	8,10E+05 [ab]	5,70E+04 [d]	2,70E+04 [a]	2,30E+05 [a]
Ttun 61	1,40E+05 [c]	5,70E+04 [cd]	4,90E+04 [a]	1,70E+05 [ab]
Ttun 62	3,80E+05 [c]	5,60E+04 [d]	4,50E+04 [a]	9,30E+04[cde]
Ttun 69	1,30E+05 [c]	4,80E+04 [d]	5,40E+04 [a]	8,40E+04 [de]
Testigo *R. solani* GA-3 Zipaquirá	1,10E+05 [c]	5,90E+04 [bcd]	3,90E+04 [a]	6,50E+04 [e]
Testigo	1,20E+05 [c]	7,90E+04 [cd]	4,10E+04 [a]	1,00E+05[cde]

[1]Composicion de los tratamientos en la sección 2.4.2 de Metodología.
[2]Test de Kruskall Wallis ($p \leq 0,05$). Valores en la misma columna seguidos por la misma letra(s) no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) de acuerdo al test de LSD.

Como la evaluación del patógeno se realizó en tres réplicas biológicas, se realizó un promedio, ya que mediante el análisis del test de Friedman se comparó la cuantificación del patógeno en cada una de las réplicas biológicas, y se obtuvo diferencias en las evaluaciones a los ocho y treinta días después de incorporar los cubios ($p< 0,0001$ y $p=0,043$ respectivamente). Se observó que la accesión Ttun 5 presentó el mayor efecto sobre el patógeno comparando la densidad de hifas obtenidas con el testigo del aislamiento *R. solani* GA-3 Zipaquirá (10 propágulos/g de suelo). Sin embargo con las accesiones Ttun 30 y Ttun 56 se obtuvo 2,6 propágulos/g de suelo y 3,1 propágulos/g de suelo respectivamente. Las accesiones Ttun 19 y Ttun 61 mostraron el menor efecto en la disminución de la densidad de hifas. Sin embargo, la densidad de hifas del patógeno fue disminuida por el efecto de las ocho accesiones evaluadas (Tabla 10).

En la evaluación a los 30 días de incorporación de cubios, el efecto sobre *Rhizoctonia* se mantuvo con un ligero incremento en el número de 1,4 colonias con respecto a los ocho días despues de agregar los cubios para la accesión Ttun 5. En esta evaluación se observó que con la accesión Ttun 30 se obtuvo 2,6 propágulos/g de suelo y fue la de mayor efecto sobre el patógeno. Sin embargo, comparando el efecto de las ocho accesiones con el tratamiento correspondiente al testigo del aislamiento *R. solani* GA-3 Zipaquirá se observa la disminución de la densidad de hifas debido al efecto de los cubios. Sin embargo, en la evaluación a los 30 días aumenta considerablemente con respecto a la evaluación a los ocho días, excepto con las accesiones Ttun 19 y Ttun 30 (Tabla 10).

Tabla 10. Promedio de las tres réplicas biológicas de la evaluación del efecto de accesiones de cubios sobre *Rhizoctonia solani* GA-3. Se muestra el promedio de no. de colonias/g de suelo a los ocho y treinta días después de agregar los cubios.

Tratamiento[1] / **Tiempo**	***Rhizoctonia solani* GA-3 (propágulos/ g de suelo)**[2]	
	Ocho días después de adicionar cubio	**Treinta días después de adicionar cubio**
Ttun 5	2,5 [ef]	3,9 [bc]
Ttun 19	4,6 [ab]	4,2 [bc]
Ttun 30	2,6 [ef]	2,6 [c]
Ttun 54	3,4 [cde]	8,7 [ab]
Ttun 56	3,1 [cd]	5,6 [bc]
Ttun 61	3,8 [bc]	5,6 [bc]
Ttun 62	3,3 [cde]	8,3 [ab]
Ttun 69	3,7 [bc]	4,9 [bc]
Testigo aislamiento *R. solani* GA-3 Zipaquirá	10 [a]	12,7 [a]
Testigo	2,0 [f]	5,7 [bc]

[1]Composicion de los tratamientos en la sección 2.4.2 de Metodología.
[2]Test de Friedman ($p\leq 0,05$). Valores en la misma columna seguidos por la misma letra(s) no son significativamente diferentes ($p\leq 0,05$) de acuerdo al test de LSD.

En las tres réplicas también se midió la longitud de raíz, tallo y total de la planta para observar si había cambios en variables de crecimiento de la planta debido a la incorporación de los cubios. Mediante el análisis de Friedman se comparó las tres réplicas en el tiempo y se observó que para longitud de raíz, longitud de tallo y longitud

total no hubo diferencias entre los tratamientos para ninguna de las variables de longitud (p= 0,40; p= 0,21 y p= 0,28, respectivamente; Tabla 11).

Igualmente, se evaluó incidencia y severidad de la enfermedad en el cultivar Diacol Capiro. En la tabla 12 se observa que en la lesión en estolon hay diferencias significativas (p< 0,0001). Como era de esperarse el tratamiento que solo tiene aislamiento de *R. solani* GA-3 muestra una mayor longitud del tamaño de la lesión en estolón. En los tratamientos con las accesiones Ttun 61, Ttun 56 y Ttun 5, el tamaño de la lesión disminuye notablemente (3,6; 2,5 y 0,9 mm, respectivamente; Figura 16). Los tratamientos Ttun 5, Ttun 30 y Ttun 54 mostraron el mismo tamaño de lesión en estolón (Tabla 12).

Por otro lado, en el tratamiento testigo que no tiene el inóculo del aislamiento de *R. solani* GA-3 de Zipaquirá y tampoco tiene accesión de cubio, es decir el suelo naturalmente infestado, se observó que en las plantas evaluadas hubo lesiones en tallo (0,1 mm^2) al igual que el tratamiento de la accesión Ttun 5. En los tratamientos con las accesiones Ttun 19, Ttun 56, Ttun 61, Ttun 62, Ttun 69 y el tratamiento del aislamiento de *R. solani* GA-3 de Zipaquirá, que no tiene accesión de cubio, se evidenció la mayor severidad de la enfermedad (Tabla 12). La incidencia se evaluó tanto para estolón como para tallo, donde en estolón fue menor para el tratamiento de la accesión Ttun 5 y Ttun 62 al igual que el tratamiento testigo, el cual no tiene ni cubios ni inóculo del patógeno. En tallo se obtuvo una incidencia del 60% para los tratamientos Ttun 19 y el tratamiento de testigo de *R. solani* GA-3 y un 40% para el tratamiento Ttun 30 y con las otras accesiones se observó un 20% de incidencia en tallo (Tabla 12).

Comparando cada una de las evaluaciones realizadas, se evidenció que las accesiones Ttun 5, Ttun 30, Ttun 56 y Ttun 69 son las que presentan un mayor efecto sobre la densidad de hifas del patógeno y sobre el tamaño de las lesiones que causa en las plantas de papa (Figura 17). Sin embargo, con la accesión Ttun 5 se observó que en dos réplicas biológicas disminuía el conteo del patógeno a los ocho y 30 días después de la incorporación de cubios (Tabla 12 y 13). Además, en la evaluación de severidad en tallo aunque no hubo diferencias entre los tratamientos, con esta accesión se evidenció el menor tamaño de lesión (Tabla 16), y con respecto a la incidencia se obtiene un 60% (Tabla 16), es decir el número de plantas enfermas por cada cinco plantas evaluadas, por lo tanto, tres de ellas presentan algún tipo de lesión causada por el patógeno. Por otro lado, con la incorporación al suelo de la accesión Ttun 5, se evidencia que no hay disminución en las UFC/g de suelo de poblaciones benéficas como pseudomonads fluorescentes y *Trichoderma* sp. (Tablas 8 y 11). De acuerdo a estos resultados se seleccionó la accesión Ttun 5 para continuar con el siguiente paso de evaluación en condiciones de invernadero.

Tabla 11. Promedio de tres réplicas biológicas de la evaluación del efecto de cubios sobre la longitud (raíz, tallo y total) de la planta de papa cultivar Diacol Capiro a los treinta días después de agregar los cubios, durante tres réplicas biológicas.

Tratamiento[1]	Longitud[2] (cm)		
	Raíz	Tallo	Total
Ttun 5	20,5 [a]	27,9 [a]	49,2 [a]
Ttun 19	22,1 [a]	28,3 [a]	48,3 [a]
Ttun 30	18,4 [a]	23,3 [a]	40,1 [a]
Ttun 54	18,4 [a]	29,6 [a]	37,1 [a]
Ttun 56	18,0 [a]	27,1 [a]	47,5 [a]
Ttun 61	18,1 [a]	26,0 [a]	44,9 [a]
Ttun 62	19,3 [a]	27,2 [a]	49,7 [a]
Ttun 69	18,3 [a]	29,1 [a]	49,8 [a]
Testigo aislamiento *R. solani* GA-3 Zipaquirá	19,5 [a]	27,8 [a]	46,5 [a]
Testigo	19,1 [a]	26,9 [a]	49,0 [a]

[1]Composicion de los tratamientos en la sección 2.4.2 de Metodología.
[2]Test de Friedman ($p \leq 0,05$). Valores en la misma columna seguidos por la misma letra(s) no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) de acuerdo al test de LSD.

Tabla 12. Promedio de tres réplicas biológicas de la evaluación del efecto de accesiones de cubios sobre las lesiones en estolón, incidencia y severidad en planta de papa cultivar Diacol Capiro a los treinta días después de agregar los cubios.

Tratamiento[1]	Enfermedad[2]			
	Longitud lesión estolón (mm)	Severidad en tallo (mm^2)	Incidencia (%)	
			Estolón	Tallo
Ttun 5	0,9 [e]	0,1 [d]	20	20
Ttun 19	2,4 [bc]	0,4 [ab]	40	60
Ttun 30	0,9 [e]	0,2 [bc]	40	40
Ttun 54	0,9 [e]	0,2 [bc]	40	20
Ttun 56	2,5 [bc]	0,4 [ab]	40	20
Ttun 61	3,6 [ab]	0,4 [ab]	40	20
Ttun 62	1,6 [cd]	0,4 [ab]	20	20
Ttun 69	1,2 [cd]	0,5 [a]	40	20
Testigo aislamiento *R. solani* GA-3 Zipaquirá	4,2 [a]	0,4 [ab]	40	60
Testigo	1,6 [cd]	0,1 [d]	20	20

[1]Composicion de los tratamientos en la sección 2.4.2 de Metodología.
[2]Test de Friedman ($p \leq 0,05$). Valores en la misma columna seguidos por la misma letra(s) no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) de acuerdo al test de LSD.

Figura 16. Efecto de las accesiones de cubios sobre lesiones en estolón causado por *Rhizoctonia solani* GA-3. Lesiones en estolón obtenidas en diferentes tratamientos (flechas blancas). Accesiones: A, Ttun 61; B, Ttun 5; C, Ttun 56; y D, Sin cubio.

3.3.3 Evaluación de accesión Ttun 5 sobre tres aislamientos de *R. solani* GA-3

Esta evaluación se realizó con el fin de evaluar el efecto de la accesión Ttun 5 sobre tres diferentes aislamientos de *R. solani* GA-3 recuperados de distintas localidades (Zipaquirá, Subachoque y Villa Pinzón). Durante las tres réplicas biológicas se observó un comportamiento similar para cada una de las tres evaluaciones, como es evidenciado por el análisis de Friedman (p= 1,00). El promedio de las tres réplicas indica que en la evaluación a los ocho días después de adicionar los cubios se evidencia que el mayor efecto del cubio de la accesión Ttun 5 se tiene con el aislamiento de Subachoque en suelo naturalmente infestado, seguido del aislamiento de *R.solani* GA-3 de Zipaquirá y Villa Pinzón (2,7; 4,0 y 4,7 propágulos/g de suelo, respectivamente; Tabla 13). Igualmente, se observa el mayor efecto en los tratamientos con suelo estéril para cada uno de los aislamientos evaluados principalmente para el aislamiento de Subachoque. Estos tratamientos en suelo esteril se realizaron con el fin de evaluar y comparar cada aislamiento y su patogenecidad. Asi mismo, permitió comparar el efecto de la accesión Ttun 5 en suelo naturalemnte infestado con suelo esteril. La composición de los tratamientos se diferencia únicamente por el suelo utilizado (Tabla 13).

A los treinta días se observa que la densidad de hifas de los tratamientos correspondientes al aislamiento de Subachoque, Villa Pinzón y testigo (sin cubio ni inóculo) en suelo naturalmente infestado, y los tratamientos con aislamient de Zipaquirá y Villa Pinzón en suelo esteril aumenta, pero en el tratamiento de Ttun 5, que tiene solamente inóculo natural, se observa una disminución de los propagulo/g de suelo, esto

también ocurre con el aislamiento de Zipaquirá en suelo naturalmente infestado y el aislamiento de Subachoque en suelo esteril (Tabla 13).

Tabla 13. Promedio de tres réplicas biológicas de la evaluación del efecto de la accesión Ttun 5 de cubio sobre tres aislamientos de *Rhizoctonia solani* GA-3. Densidad de hifas (Propágulos/ g de suelo) a los ocho y treinta días después de agregar el cubio.

Tratamiento[1] / **Tiempo**	***Rhizoctonia solani* GA-3 (propágulos/g de suelo)**[2]	
	Ocho días después de adicionar cubio	**Treinta días después de adicionar cubio**
Aislamiento Zipaquirá	4,0 [ab]	2,0 [cd]
Aislamiento Subachoque	2,7 [d]	6,1 [ab]
Aislamiento Villa Pinzón	4,7 [a]	9,7 [a]
Control aislamiento Zipaquirá	2,7 [d]	4,0 [bc]
Control aislamiento Subachoque	2,6 [d]	1,7 [d]
Control aislamiento Villa Pinzón	3,3 [bc]	4,6 [bc]
Testigo Ttun 5	3,1 [bc]	2,6 [cd]
Testigo	3,1 [bc]	6,0 [ab]

[1]Composicion de los tratamientos en la sección 2.4.3 de metodología.

[2]Test de Friedman ($p \leq 0,05$). Valores en la misma columna seguidos por la misma letra(s) no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) de acuerdo al test de LSD.

Por otro lado, nuevamente se cuantificó la microbiota del suelo para observar si había cambios en las poblaciones de microorganismos biocontroladores y microbiota total de suelo. La tabla 14 muestra las UFC/g de suelo obtenidas para las poblaciones de *Trichoderma* sp. La evaluación a los ocho días después de la incorporación de la accesión no hubo diferencias significativas entre los tratamientos ($p= 0,07$) y a los 30 días se observó que en el tratamiento en suelo naturalmente infestado que tiene inóculo de la localidad de Subachoque presentó un aumentó en las UFC/g de suelo ($9,70 \times 10^3$) comparado con los otros tratamientos evaluados. Sin embargo, en los tratamientos en donde se utilizó suelo estéril se evidenció la menor densidad de hifas de *Trichoderma* sp. La tabla 14 indica que las diferencias entre los tratamientos evaluados y en los tiempos de evaluación de pseudomonads fluorescentes. A los ocho días después de adicionar la accesión Ttun 5 se evidenció que hay un aumentó de las poblaciones de esta bacteria en los tratamientos de aislamiento de Zipaquirá en suelo naturalmente infestado y el testigo Ttun 5, el cual no tiene adición de inóculo.

Mientras que para la microbiota bacteriana del suelo las diferencias fueran bastante significativas. A los ocho y treinta días después de agregar Ttun 5, se observa que en los tratamientos con suelo estéril y suelo adicionado con inóculo de *R.solani* GA-3 de las diferentes localidades, las poblaciones de bacterias totales son bajas en comparación con el testigo que es suelo naturalmente infestado y con el testigo de la accesión Ttun 5 que no tiene inóculo adicional del patógeno (Tabla 15). Para las poblaciones de hongos totales se obtiene las menores UFC/g de suelo en los tratamientos con suelo estéril, con excepción del tratamiento del aislamiento de Zipaquirá en suelo naturalmente infestado, donde las poblaciones de hongos en el suelo aumentaron significativamente ($1,20 \times 10^5$ UFC/g de suelo) comparado con el testigo ($3,30 \times 10^3$ UFC/g de suelo) (Tabla 15).

Tabla 14. Promedio de tres réplicas biológicas de la evaluación del efecto de la relación accesión Ttun 5 de cubio y distintos aislamientos de *R. solani* GA-3 sobre pseudomonads fluorescentes y *Trichoderma* sp. Se muestra el promedio de UFC/g de suelo a los ocho y treinta días después de agregar el cubio.

Tratamiento[1] / **Tiempo**	**(UFC/g de suelo)**[2]			
	Pseudomonads fluorescentes		***Trichoderma* sp.**	
	Ocho días después de adicionar cubio	**Treinta días después de adicionar cubio**	**Ocho días después de adicionar cubio**	**Treinta días después de adicionar cubio**
Aislamiento Zipaquirá	1,10E+04 [a]	1,60E+04 [a]	1,00E+01 [a]	2,00E+03 [b]
AislamientoSubachoque	1,00E+03 [ab]	5,00E+03 [ab]	1,00E+01 [a]	9,70E+03 [a]
Aislamiento Villa Pinzón	2,00E+03 [ab]	1,00E+03 [c]	1,30E+01 [a]	1,60E+03 [b]
Control aislamiento Zipaquirá	3,00E+02 [c]	1,10E+03 [c]	1,50E+01 [a]	5,76E+01 [c]
Control aislamiento Subachoque	3,00E+02 [c]	1,10E+03 [c]	6,08E+01 [a]	4,06E+01 [c]
Control aislamiento Villa Pinzón	2,00E+02 [c]	1,10E+03 [c]	3,57E+01 [a]	8,74E+01 [c]
Testigo Ttun 5	1,10E+04 [a]	2,00E+03 [c]	1,30E+01 [a]	4,40E+03 [b]
Testigo	6,00E+03 [ab]	6,00E+03 [ab]	1,00E+01 [a]	2,10E+03 [b]

[1]Composicion de los tratamientos en la sección 2.4.3 de metodología.

[2]Test de Kruskall Wallis ($p \leq 0,05$). Valores en la misma columna seguidos por la misma letra(s) no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) de acuerdo al test de LSD.

En la tabla 16, se muestran los promedios obtenidos en la longitud de raíz, longitud de tallo y longitud total de la planta. Los datos muestran que los tres tratamientos realizados en suelo estéril tienen menor longitud (cm) para las tres variables evaluadas en comparación con los otros tratamientos en suelo naturalmente infestados. Por otro lado, la evaluación de incidencia de las lesiones en estolón confirman que con el aislamiento de Villa Pinzón en suelo esteril se evidencia el menor porcentaje de incidencia. Sin embargo, el aislamiento en Subachoque en suelo naturalmente infestado presentó un 60 % de incidencia, mientras que en tallo la incidencia fue del 100 % para el control de aislamiento de *R. solani* GA-3 de Subachoque (Tabla 17). Por otro lado, en los tratamientos control de los diferentes aislamientos se observó menor longitud de lesión en estolón excepto con el tratamiento control de Zipaquirá, en el cual las lesiones aumentan 0,3 mm, y el mayor tamaño de lesión en estolón se observó en los tratamientos en suelo naturalmnete infestados de Subachoque y Villa Pinzón (Figura 17). La severidad en tallo indica la menor severidad en los tratamientos control en suelo esteril y como era de esperarse en el tratamiento testigo de la accesión Ttun 5, que no tiene inóculo del patógeno (Tabla 17) y las lesiones de mayor tamaño en tallo se evidenció en el tratamiento de Subachoque en suelo naturalmente infestado (Figura 18) y suelo esteril.

Tabla 15. Promedio de tres réplicas biológicas de la evaluación del efecto de la relación accesión Ttun 5 de cubio y distintos aislamientos de *R. solani* GA-3 sobre bacterias y hongos totales. Se muestra el promedio de UFC/g de suelo a los ocho y treinta días después de agregar el cubio.

Tratamiento[1] / Tiempo	(UFC/g de suelo)[2]			
	Bacterias totales		Hongos totales	
	Ocho días después de adicionar cubio	Treinta días después de adicionar cubio	Ocho días después de adicionar cubio	Treinta días después de adicionar cubio
Aislamiento Zipaquirá	1,50E+05 [ab]	3,00E+05 [a]	1,20E+05 [a]	6,10E+03 [bc]
AislamientoSubachoque	3,00E+05 [a]	7,40E+04 [c]	1,00E+03 [bc]	1,20E+04 [ab]
Aislamiento Villa Pinzón	1,60E+05 [ab]	2,10E+05 [b]	6,80E+03 [ab]	5,80E+03 [c]
Control aislamiento Zipaquirá	1,10E+03 [c]	1,00E+00 [d]	1,20E+01 [c]	1,10E+02 [d]
Control aislamiento Subachoque	7,00E+02 [c]	1,00E+00 [d]	1,50E+01 [c]	1,10E+02 [d]
Control aislamiento Villa Pinzón	8,10E+02 [c]	1,00E+02 [d]	2,00E+01 [c]	5,00E+01 [e]
Testigo Ttun 5	2,10E+05 [ab]	4,20E+05 [a]	1,70E+03 [bc]	4,50E+04 [a]
Testigo	2,20E+05 [ab]	4,00E+05 [a]	3,30E+03 [ab]	2,30E+04 [ab]

[1]Composicion de los tratamientos en la sección 2.4.3 de metodologia.

[2]Test de Kruskall Wallis ($p \leq 0,05$). Valores en la misma columna seguidos por la misma letra(s) no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) de acuerdo al test de LSD.

Tabla 16. Promedio de tres réplicas biológicas de la evaluación del promedio de tres réplicas biológicas del efecto de la relación accesión Ttun 5 de cubio y distintos aislamientos de *R. solani* GA-3 sobre de la longitud (raíz, tallo y total) de planta de papa cultivar Diacol Capiro a los treinta días después de agregar el cubio.

Tratamiento[1]	Longitud[2] (cm)		
	Raíz	Tallo	Total
Aislamiento Zipaquirá	14,5 [a]	17,9 [a]	32,4 [a]
Aislamiento Subachoque	14,6 [a]	16,1 [b]	30,8 [a]
Aislamiento Villa Pinzón	13,0 [a]	18,3 [a]	31,0 [a]
Control aislamiento Zipaquirá	14,7 [a]	13,3 [ab]	26,3 [b]
Control aislamiento Subachoque	12,5 [a]	13,6 [ab]	25,8 [bc]
Control aislamiento Villa Pinzón	13,5 [a]	11,5 [c]	25,1 [bc]
Testigo Ttun 5	12,0 [a]	18,3 [a]	30,0 [a]
Testigo	14,9 [a]	18,2 [a]	33,1 [a]

[1]Composicion de los tratamientos en la sección 2.4.3 de metodología.

[2]Test de Friedman ($p \leq 0,05$). Valores en la misma columna seguidos por la misma letra(s) no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) de acuerdo al test de LSD.

Tabla 17. Promedio de tres réplicas biológicas de la evaluación del efecto de la accesión Ttun 5 de cubios y distintos aislamientos de *R. solani* GA-3 sobre lesiones en estolón, incidencia y severidad en planta de papa cultivar Diacol Capiro a los treinta días después de agregar el cubio, durante tres réplicas biológicas. Efecto de adición cubio al suelo en la infección de tres aislamientos de *R. solani* GA-3 en estolones de papa.

Tratamiento[1]	Enfermedad[2]			
	Longitud de lesión estolón (mm)	Severidad en tallo (mm^2)	Incidencia (%)	
			Estolón	Tallo
Aislamiento Zipaquirá	2,7 [bc]	0,3 [bc]	100	20
Aislamiento Subachoque	5,4 [a]	0,5 [ab]	60	40
Aislamiento Villa Pinzón	5,5 [a]	0,2 [bc]	100	20
Control aislamiento Zipaquirá	3,0 [bc]	0,1 [c]	80	20
Control aislamientoSubachoque	3,1[bc]	0,8 [a]	100	100
Control aislamiento Villa Pinzón	0,7 [d]	0,1 [c]	40	20
Testigo Ttun 5	4,2 [ab]	0,1 [c]	100	20
Testigo	4,4 [ab]	0 [c]	100	0

[1]Composicion de los tratamientos en la sección 2.4.3 de metodología.

[2]Test de Friedman ($p \leq 0,05$). Valores en la misma columna seguidos por la misma letra(s) no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) de acuerdo al test de LSD.

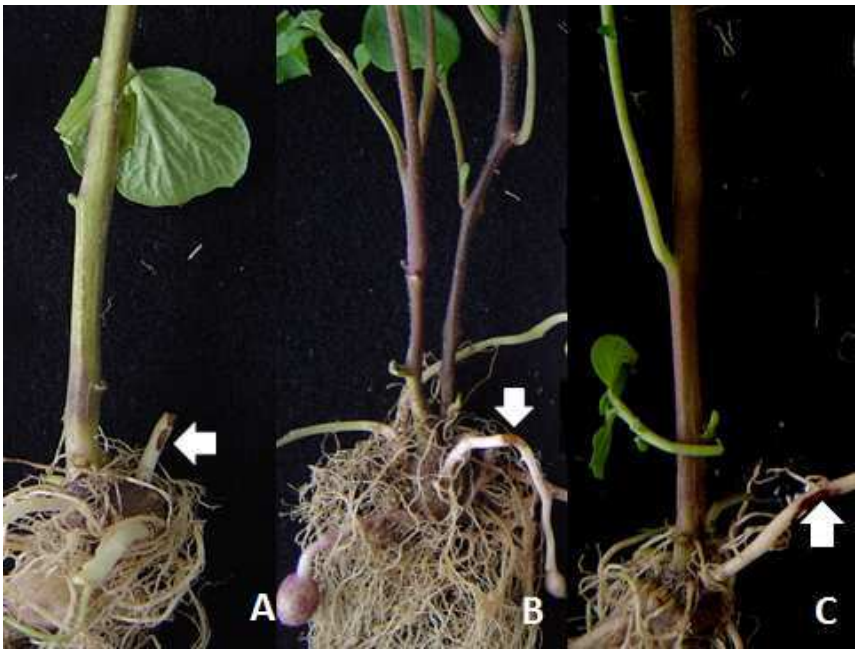


Figura 17. Efecto de la accesión Ttun 5 de cubio sobre tres aislamientos de *Rhizoctonia solani* GA-3. Lesión en estolón obtenida con diferentes aislamientos (flechas blancas). A, Zipaquirá; B, Subachoque 54; C, Villa Pinzón. Lesiones producidas por tres aislamientos de R. solani GA-3 en estolones de papa, cultivar Diacol Capiro. El suelo naturalmente infestado fue adicionado con (cantidad) polvo de cubio liofilizado.

Figura 18. Efecto de la accesión Ttun 5 de cubio sobre tres aislamientos de *Rhizoctonia solani* GA-3. Severidad en tallo obtenida con diferentes aislamientos (flechas blancas) en la réplica dos. A, Subachoque; B, Zipaquirá; C, Testigo. Lesiones producidas por tres aislamientos de R. solani GA-3 en base de tallo de plantas de papa, cultivar Diacol Capiro. El suelo fue adicionado con 0,5 g de cubio liofilizado.

3.3.4 Evaluación del efecto de una accesión de cubio en la incidencia y severidad de la enfermedad en tres cultivares de papa

La cuantificación del patógeno indicó que a los ocho y treinta días después de agregar la accesión de cubio, el menor número de propágulos sobre *R. solani* se obtuvo en el tratamiento con el cultivar Pastusa Suprema (Tabla 18), lo cual significó menor tamaño de lesión en estolón (Tabla 20), mientras que el cultivar Diacol Capiro fue mas susceptible al inóculo del patógeno. Sin embargo la lesión en estolón no fue la mayor y se obtuvo 1,2 mm, mientras que con el cultivar de Criolla Colombia fue de 4,0 mm (Tabla 20 y Figura 19). La densidad de hifas del patógeno aumentó a los treinta días después de adicionar la accesión Ttun 5 (Tabla 18). Sin embargo, en la evaluación de severidad en tallo se evidenció mayor lesión en estolón que severidad en tallo (Tabla 20). Con respecto a la incidencia de la enfermedad se observó un 100 % en estolón y tallo en el tratamiento de Diacol Capiro. El porcentaje de incidencia en tallo fue menor que en estolón, indicando que hubo menor número de plantas con lesión en tallo (Tabla 20).

No se observáron diferencias en la evaluación de longitd de tallo, raíz y total en los tres cultivares. Sin embargo, la longitud de la planta fue menor en el cultivar Pastusa Suprema comparado con los otros dos cultivares evaluados (Tabla 19).

Tabla 18. Promedio de tres réplicas biológicas de la evaluación del efecto de la accesión Ttun 5 de cubio sobre una mezcla de aislamientos de *Rhizoctonia solani* GA-3. Densidad de hifas (Propágulos/ g de suelo) a los ocho y treinta días después de agregar el cubio en tres diferentes cultivares de papa.

Tratamiento[1] / **Tiempo**	***Rhizoctonia solani* GA-3 (propágulos/g de suelo)**[2]	
	Ocho días después de adicionar el cubio	**Treinta días después de adicionar el cubio**
Capiro	5,3 [a]	7,7 [ab]
Suprema	3,1 [ab]	5,4 [ab]
Criolla	3,4 [ab]	6,2 [ab]
Testigo Ttun 5	2,9 [bc]	3,2 [c]
Testigo *R. solani* GA-3	6,3 [a]	11,5 [a]
Testigo	2,3 [c]	3,8 [bc]

[1]Composicion de los tratamientos en la sección 2.4.4 de metodología.

[2]Test de Friedman ($p \leq 0,05$). Valores en la misma columna seguidos por la misma letra(s) no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) de acuerdo al test de LSD.

Tabla 19. Promedio de tres réplicas biológicas de la evaluación del efecto de la relación accesión Ttun 5 de cubio y combinación de aislamientos de *R. solani* GA-3 sobre el promedio de la longitud (raíz, tallo y total) de la planta en tres cultivares de papa a los treinta días después de agregar el cubio.

Tratamiento[1]	**Longitud**[2]		
	Raíz	**Tallo**	**Total**
Capiro	18,6 [a]	18,3 [a]	36,9 [a]
Suprema	16,0 [a]	15,7 [a]	31,7 [a]
Criolla	19,3 [a]	17,7 [a]	31,4 [a]
Testigo Ttun 5	17,3 [a]	17,5 [a]	34,9 [a]
Testigo *R. solani* GA-3	18,0 [a]	16,8 [a]	34,8 [a]
Testigo	16,4 [a]	18,5 [a]	34,9 [a]

[1]Composicion de los tratamientos en la sección 2.4.4 de metodología.

[2]Test de Friedman ($p \leq 0,05$). Valores en la misma columna seguidos por la misma letra(s) no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) de acuerdo al test de LSD.

Tabla 20. Promedio de tres réplicas biológicas de la evaluación del efecto de la relación accesión Ttun 5 de cubio y combinación de aislamientos de *R. solani* GA-3 sobre el promedio de lesiones en estolón, severidad e incidencia en tres cultivares de papa a los treinta días después de agregar el cubio, durante tres réplicas biológicas.

Tratamiento[1]	**Enfermedad**[2]			
	Longitud de lesión estolón (mm)	**Severidad en tallo (mm2)**	**Incidencia (%)**	
			Estolón	Tallo
Capiro	1,2 [bc]	0,2 [a]	100	100
Suprema	0,9 [c]	0,2 [a]	60	20
Criolla	4,0 [a]	0,2 [a]	100	60
Testigo Ttun 5	3,0 [ab]	0,2 [a]	60	20
Testigo *R.solani* GA-3	3,7[ab]	0,1 [ab]	100	20
Testigo	1,5 [bc]	0 [b]	60	0

[1]Composicion de los tratamientos en la sección 2.4.4 de metodología.

[2]Test de Friedman (p≤ 0,05). Valores en la misma columna seguidos por la misma letra(s) no son significativamente diferentes (p≤ 0,05) de acuerdo al test de LSD.

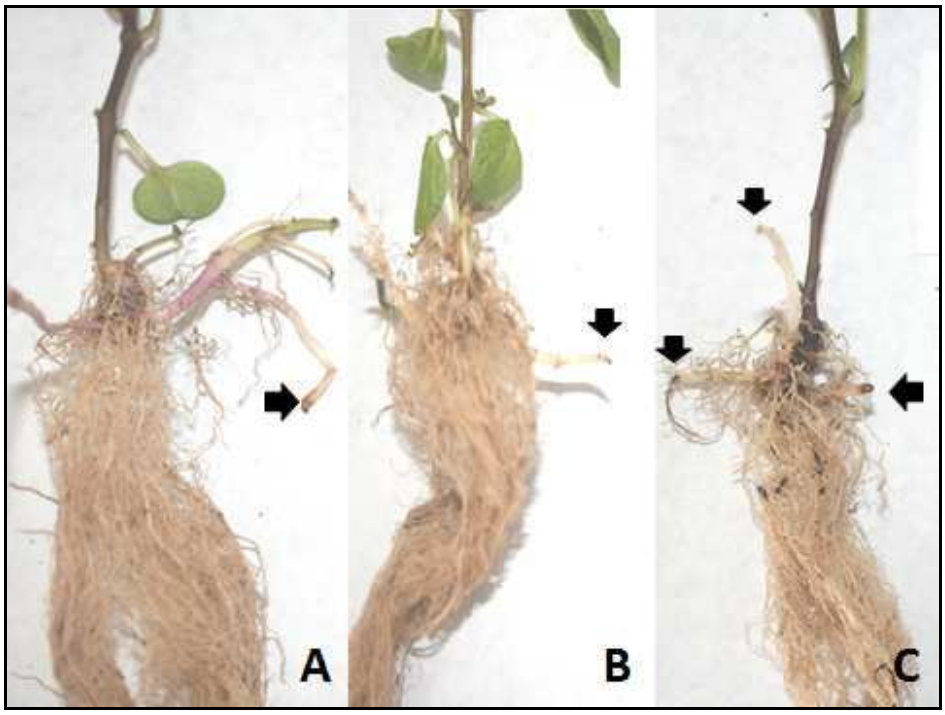


Figura 19. Efecto de la accesión Ttun 5 de cubio sobre *Rhizoctotnia solani* GA-3. Lesiones en estolón (flechas negras) en tres cultivares de papa: A, Cultivar Diacol Capiro; B, Cultivar Criolla; y C, Suprema.

3.4 Cuantificación absoluta de *R. solani* GA-3 y *Pseudomonas* sp. por PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

3.4.1 Cuantificación de *Rhizoctonia solani* GA-3 por qPCR

De acuerdo a los valores de C_t y la concentración de Log ADN (fg/ g de suelo), se obtuvo de la curva estándar de *R. solani* GA-3 y la ecuación linear y = -3,25 x + 32,655 (datos no publicados).

3.4.2 Cuantificación de *Pseudomonas* sp. por qPCR

3.4.2.1. PCR convencional

A partir del ADN genómico (gADN) extraído de *Pseudomonas fluorescens*, se amplificó una región del gen 16S de RNA ribosomal específica del género *Pseudomonas* utilizando las condiciones de PCR y los primers Pf (5'-GGGTGGTGGAATTTCCTGTGT-3') y Pr (5'-GAAGCGGTGACCACAAGGAA-3') descritos por Lloyd-Jones *et al*. (2005). El fragmento obtenido fue verificado en un gel de agarosa al 2,0 % donde se observó una banda con el tamaño esperado de 65 pb. Se servieron nueve pozos del mismo ADN genómico (gADN) para corroborar el fragmento y debido a su tamaño se utilizó marcador de 10 pb y 100pb para evitar confundir con dimeros de primer (Figura 20).

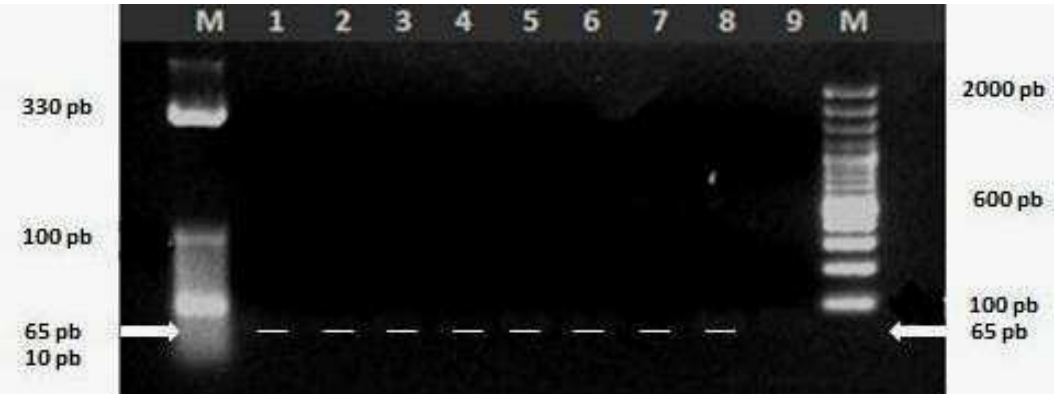


Figura 20. Productos de PCR obtenidos por amplificación parcial del gen 16S rRNA (65 pb) utilizando los primers Pf/Pr específicos para la identificación del género Pseudomonas. Carril 1-9: amplicones de 65 pb del gen 16S rRNA de *Pseudomonas fluorescens*; M: Marcador de 10 pb (izquierda) y 100 pb (Invitrogen).

3.4.2.2. Clonación y obtención de ADN plasmídico

Para la realización de la curva absoluta de *Pseudomonas* sp. por PCR en tiempo real, se realizó una clonación con el fin de obtener varias copias de un fragmento de la región del gen 16S rRNA de *Pseudomonas*, y asi asegurar que realmente lo que se obtenia en PCR en tiempo real correspondia al genero *Pseudomonas*, debido a que esta curva seria utilizada para la cuantificación de esta población a partir de muestras de suelo. Se obtuvieron 21 muestras de ADN plasmídico de *Pseudomonas fluorescens*, y se verificó la concentración de ADN y su calidad. Se seleccionó la muestra no. 1 de ADN plasmídico debido a su concentración 31,6 ng/µl y por que se obtuvo una relación de absorbancia 260/280 de 1,82 lo que nos indico que no existía contaminación por proteínas y también se tuvo en cuenta la relación 260/230, que fue de 2,13, lo que significa que no hay contaminación por péptidos, hidratos de carbono ni fenoles. Cada una de estas relaciones fueran verificadas espectrofotométricamente en el sistema Nanodrop 2000c (ThermoScientific).

3.4.2.3. Obtención de la curva estándar

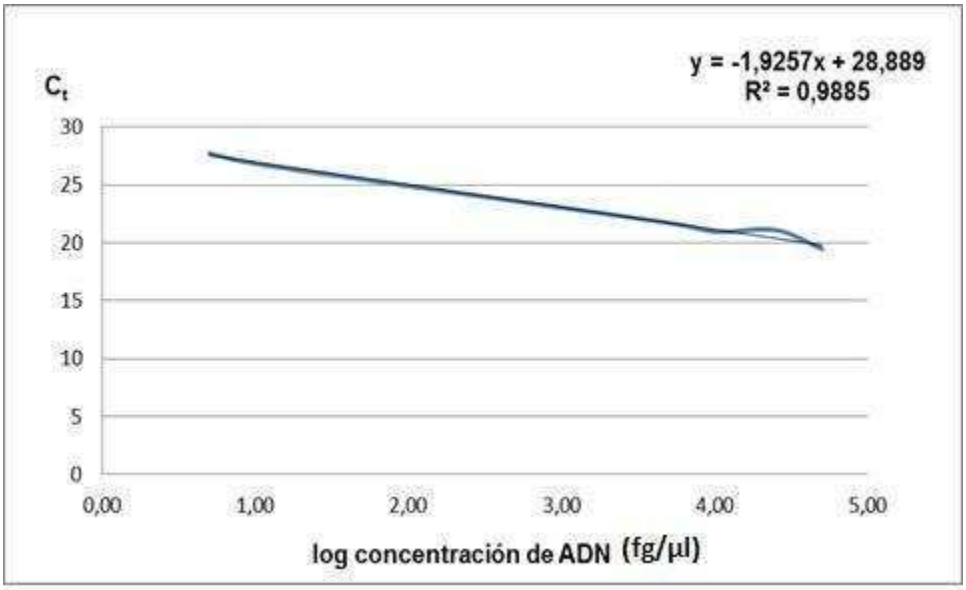
Una vez conocida la concentración del ADN plasmídico no. 1 se realizaron 13 diluciones, a las cuales se les verificó el producto de PCR (65 pb) utilizando los primers Pf/Pr (Figura 21). La curva estándar absoluta fue construida a partir de las siguientes diluciones (concentración de *Pseudomonas* sp): 50 pg/µl, 25 pg/µl, 10 pg/µl, 5 pg/µl, 100 fg/µl, 10 fg/µl y 5 fg/µl. Se obtuvo una correlación a partir del promedio de los dos duplicados de los valores de C_t (C_t1 y C_t2) arrojados por el programa CFX Manager de BioRad *versus* la concentración del log de ADN de *Pseudomonas* sp. (Tabla 21). A partir de estos valores se obtuvo una regresión lineal con un R^2 de 0,98 y un coeficiente de correlacion (r =-0,99), demostrando que hay una relación lineal e inversamente proporcional entre de estas dos variables (Figura 22). La ecuación que se obtuvo a partir del análisis de datos se utilizó para calcular la concentración de ADN/g de suelo de *Pseudomonas* sp. en cada una de las muestras de suelo analizadas. En el anexo F se encuentra la curva estándar obtenida por el programa CFX Manager BioRad y la curva de disociación para comprobar la especificidad de los fragmentos detectados en la PCR.

Figura 21. Diluciones de ADN plasmídico de *Pseudomonas* a distintas concentraciones. Fila 1: 500 ng/µl; fila 2: 250 ng/µl; fila 3: 100 ng/µl; fila 4: 50 ng/µl; fila 5: 25 ng/µl; fila 6: 10 ng/µl; fila 7: 5 ng/µl; fila 8: 500 pg/µl; fila 9: 50 pg/µl; fila 10: 5 pg/µl; fila 11: 500 fg/µl; fila 12: 50 fg/µl; fila 13: 5 fg/µl; fila M: Marcador de 100 pb (Invitrogen).

Tabla 21. Valores obtenidos de C_t por qPCR a partir de diferentes concentraciones fg/µl de ADN plasmídico de *Pseudomonas* sp. para obtención de la curva estándar de cuantificación absoluta.

Concentración (fg/µl)	log Concentración ADN (fg/µl)	C_t1	C_t2	C_t
50000	4,70	19,59	19,36	19,47
25000	4,40	21,28	20,93	21,10
10000	4,00	21,55	20,38	20,96
5000	3,70	22,07	21,36	21,71
100	2,00	25,21	24,62	24,91
10	1,00	26,54	27,16	26,85
5	0,70	27,73	27,72	27,73

Figura 22. Correlación entre los valores de Ct (línea azul) obtenidos en PCR en tiempo real y el log de la concentración de ADN (fg/µl) de *Pseudomonas* sp. Ecuación obtenida a partir de la regresión lineal.



3.4.3 Ensayos de PCR en tiempo real con muestras de suelo

En la evaluación del efecto de las ocho accesiones sobre *R. solani* GA-3, de acuerdo a la cuantificación por PCR en tiempo real se obtuvo que a los ocho días después de agregar las accesiones de cubios existen diferencias significativas entre los tratamientos. La accesión Ttun 5 mostró el mayor número de C_t (32,4), lo que indica una menor concentración de ADN de 7,48X10 ^{1} fg/g comparado con los valores obtenidos para las otras accesiones evaluadas y el testigo absoluto, lo que muestra un posible efecto de los GLS y sus productos de hidrólisis sobre el patógeno (Tabla 22). Las accesiones Ttun 30, Ttun 54 y Ttun 56 obtuvieron las mayores concentraciones de ADN (2,01X10^{3}; 1,48X10^{3} y 1,76X10^{3}, respectivamente) (Tabla 22).

La cuantificación de las poblaciones de *Pseudomonas* sp. a los ocho días después de agregar los cubios no muestra diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 33). Los datos indican que las concentraciones de ADN de *Pseudomonas* sp.en las muestras de suelo son mucho mayores que las concentraciones del patógeno en la evaluación a los ocho días después de adicionar accesiones de cubios (Tabla 22 y 23). En la evaluación de la accesión Ttun 5 de cubios sobre tres aislamientos de *R. solani* GA-3 (Tabla 24) la cuantificación por PCR en tiempo real mostró valores de C_t que indican que el tratamiento con el tratamiento del aislamiento de Zipaquirá fue el que presentó menor concentración del patógeno (4,74X10^{2}) concentración ADN (fg)/g suelo), es decir donde la accesión Ttun 5 tenía un mayor efecto. Sin embargo, la concentración obtenida en los aislamientos de Subachoque y Zipaquirá fue muy similar (1,16X10^{3} y 6,42X10^{2}) concentración ADN (fg)/g suelo, respectivamente).

Para las poblaciones de *Pseudomonas* sp., que fueron cuantificadas para verificar si existía algún efecto sobre ellas después de agregar la accesión Ttun 5 (Tabla 25), se observó que el testigo absoluto presentó la mayor concentración de ADN ($6{,}02X10^2$) concentración ADN (fg)/g suelo) en comparación con los otros tratamientos evaluados. Sin embargo, en los tres primeros tratamientos que se realizaron en suelo naturalemnte infestados se evidencian los valores menores de fg/µl de suelo de *Pseudomonas* sp., en cambio en los tratamientos que se evaluarón en suelo estéril las poblaciones son muy similares al testigo absoluto (Tabla 25). Finalmente, en la Tabla 26, se muestran las concentraciones de ADN en femtogramos del patógeno obtenidas en los tratamientos que se realizaron con el fin de evaluar incidencia y severidad en tres cultivares de papa diferentes. En las dos evaluaciones sobre *R. solani* GA-3, las concentraciones de ADN a los ocho días fueron menores en los tratamientos a los que se agregó la accesión Ttun 5 que en el tratamiento absoluto (suelo naturalmente infestado sin accesión de cubios). Cada una de las curvas obtenidas por el programa CFX Manager BioRad se encuentra en el Anexo G.

Tabla 22. Cuantificación por qPCR de la evaluación del efecto de las accesiones de cubios sobre el promedio de la concentración de ADN de *R. solani* GA-3 (fg/g de suelo) a los ocho y treinta días después de adicionar los cubios.

Tratamiento[1] / **Tiempo**	***Rhizoctonia solani* GA-3**[2]			
	Ocho días después de adicionar el cubio		**Treinta días después de adicionar el cubio**	
	C_t	**Concentración ADN (fg)/g suelo**	**C_t**	**Concentración ADN (fg)/g suelo**
Ttun 5	32,4	7,48E+01 [a]	31,8	2,62E+02 [b]
Ttun 19	29,7	9,03E+02 [bc]	28,9	1,16E+03 [a]
Ttun 30	26,1	2,01E+03 [a]	28,7	1,20E+03 [a]
Ttun 54	28,5	1,48E+03 [a]	32,5	4,76E+01 [c]
Ttun 56	26,9	1,76E+03 [a]	31,5	3,45E+02 [b]
Ttun 61	32,0	1,44E+02 [bc]	32,5	4,76E+01 [c]
Ttun 62	30,8	5,71E+02 [ab]	31,5	3,36E+02 [b]
Ttun 69	28,0	1,42E+03 [a]	30,9	5,34E+02 [ab]
Testigo aislamiento *R. solani* GA-3 Zipaquirá	30,8	5,59E+02 [ab]	32,5	4,76E+01 [c]
Testigo	31,8	2,42E+02 [bc]	30,9	5,38E+02 [ab]

[1]Composicion de los tratamientos sección 2.4.2.
[2]Test de Kruskall Wallis ($p \leq 0{,}05$). Valores en la misma columna seguidos por la misma letra(s) no son significativamente diferentes ($p \leq 0{,}05$) de acuerdo al test de LSD.

Tabla 23. Cuantificación por qPCR de la evaluación del efecto de accesiones de cubios sobre el promedio de la concentración de ADN de *Pseudomonas* sp. (fg/g de suelo) a los ocho días después de adicionar los cubios.

Tratamiento[1] / Tiempo	***Pseudomonas* sp.**[2]	
	Ocho días después de adicionar el cubio	
	C_t	**Concentración ADN (fg)/g suelo**
Ttun 5	27,5	6,99E+02 [a]
Ttun 19	28,0	4,57E+02 [a]
Ttun 30	32,0	6,02E+02 [a]
Ttun 54	28,1	3,84E+02 [a]
Ttun 56	27,0	9,52E+02 [a]
Ttun 61	27,3	7,84E+02 [a]
Ttun 62	27,6	6,28E+02 [a]
Ttun 69	27,9	4,83E+02 [a]
Testigo aislamiento *R. solani* GA-3 Zipaquirá	29,1	6,02E+02 [a]
Testigo	27,9	5,00E+02 [a]

. [1]Composicion de los tratamientos sección 2.4.2.
[2]Test de Kruskall Wallis (p≤ 0,05). Valores en la misma columna seguidos por la misma letra(s) no son significativamente diferentes (p≤ 0,05) de acuerdo al test de LSD.

Tabla 24. Cuantificación por qPCR de la evaluación del efecto de la accesión Ttun 5 de cubio sobre el promedio de la concentración de ADN de tres aislamientos de *Rhizoctonia solani* GA-3 (fg/g de suelo) a los ocho y treinta días después de adicionar el cubio.

Tratamiento[1] / Tiempo	***Rhizoctonia solani* GA-3**[2]			
	Ocho días después de adicionar el cubio		**Treinta días después de adicionar el cubio**	
	C_t	**Concentración ADN (fg)/g suelo**	**C_t**	**Concentración ADN (fg)/g suelo**
Aislamiento Zipaquirá	31,1	4,74E+02 [b]	32,6	1,69E+01 [c]
AislamientoSubachoque	28,8	1,16E+03 [a]	32,6	1,69E+01 [c]
Aislamiento Villa Pinzón	30,5	6,42E+02 [b]	32,6	1,69E+01 [c]
Control aislamiento Zipaquirá	29,2	1,04E+03 [a]	32,2	1,40E+02 [ab]
Control aislamiento Subachoque	31,9	2,14E+02 [bc]	29,5	9,67E+02 [a]
Control aislamiento Villa Pinzón	30,5	6,42E+02 [b]	32,6	1,69E+01 [c]
Testigo Ttun 5	32,0	1,97E+02 [bc]	29,6	9,29E+02 [a]
Testigo	32,6	1,69E+01 [c]	32,1	1,71E+02 [ab]

[1]Composicion de los tratamientos sección 2.4.2.
[2]Test de Kruskall Wallis (p≤ 0,05). Valores en la misma columna seguidos por la misma letra(s) no son significativamente diferentes (p≤ 0,05) de acuerdo al test de LSD.

Tabla 25. Cuantificación por qPCR de la evaluación del efecto de la relación accesión Ttun 5 de cubios y tres aislamientos diferentes de *Rhizoctonia solani* GA-3 sobre la concentración de ADN de *Pseudomonas* sp. (fg/g de suelo) a los ocho días después de adicionar el cubio

Tratamiento[1] / Tiempo	*Pseudomonas* sp.[2]	
	Ocho días después de adicionar el cubio	
	C_t	Concentración ADN (fg)/g suelo
Aislamiento Zipaquirá	26,8	1,07E+03 [a]
AislamientoSubachoque	27,0	9,64E+02 [a]
Aislamiento Villa Pinzón	27,4	7,73E+02 [ab]
Control aislamiento Zipaquirá	28,2	3,46E+02 [b]
Control aislamiento Subachoque	29,0	6,02E+02 [ab]
Control aislamiento Villa Pinzón	29,2	6,02E+02 [ab]
Testigo Ttun 5	28,6	1,14E+02 [c]
Testigo	29,3	6,02E+02 [ab]

[1]Composicion de los tratamientos sección 2.4.2.
[2]Test de Kruskall Wallis (p≤ 0,05). Valores en la misma columna seguidos por la misma letra(s) no son significativamente diferentes (p≤ 0,05) de acuerdo al test de LSD.

Tabla 26. Cuantificación por qPCR de la evaluación del efecto de la accesión Ttun 5 de cubio sobre de la concentración de ADN (fg/g de suelo) de una mezcla de aislamientos de *Rhizoctonia solani* GA-3 en tres cultivares de papa a los los ocho y treinta días después de adicionar el cubio.

Tratamiento[1] / Tiempo	*Rhizoctonia solani* GA-3[2]			
	Ocho días después de adicionar el cubio		Treinta días después de adicionar el cubio	
	C_t	Concentración ADN (fg)/g suelo	C_t	Concentración ADN (fg)/g suelo
Capiro	32,5	3,79E+01 [bc]	32,6	1,69E+01 [c]
Suprema	32,6	1,69E+01 [c]	30,0	7,91E+02 [ab]
Criolla	31,5	3,43E+02 [ab]	30,2	7,51E+02 [ab]
Testigo Ttun 5	31,8	2,63E+02 [ab]	29,8	8,68E+02 [a]
Testigo *R. solani* GA-3	32,6	1,69E+01 [c]	29,4	9,95E+02 [a]
Testigo	30,2	7,40E+02 [a]	32,6	1,69E+01 [c]

[1]Composicion de los tratamientos sección 2.4.4.
[2]Test de Kruskall Wallis (p≤ 0,05). Valores en la misma columna seguidos por la misma letra(s) no son significativamente diferentes (p≤ 0,05) de acuerdo al test de LSD.

3.5 Comparación de metodologías de cuantificación microbiológica y molecular

De acuerdo a la cuantificación de *R. solani* GA-3 de cada una de las muestras de suelo que se realizó utilizando la metodología de los palillos propuesta por Paulitz & Schroeder, (2005) y la cuantificación por PCR en tiempo real se hizo una comparación de ambas metodologías por medio de un análisis de regresión entre la densidad de hifas (propágulos / g de suelo) y la concentración de ADN (fg/µl) (Figura 23). Se encontró que la densidad de hifas no está correlacionada con la concentración de ADN. El coeficiente de correlación fue de 0,108161 con un p= 0,1113. Sin embargo, se realizó el mismo análisis de regresión para cada evaluación (ocho y treinta días después de adicionar cubios) y tampoco se obtuvo ninguna correlacion entre las dos variables (Figura 24).

Para *Pseudomonas* sp., la comparación de ambas metodologías fue realizada utilizando las muestras de suelo cuantificadas por PCR en tiempo real (sección 3.4.3) con las muestras cuantificadas por dilución en placa utilizando medio selectivo (King B) (sección 3.3.2 y 3.3.3). La correlacion se realizó entre los datos obtenidos por dilución en placa con los datos obtenidos por PCR en tiempo real (Figura 25). Se observó que no hay una correlación entre las variables evaluadas (r=0,129411 y p= 0,2786).

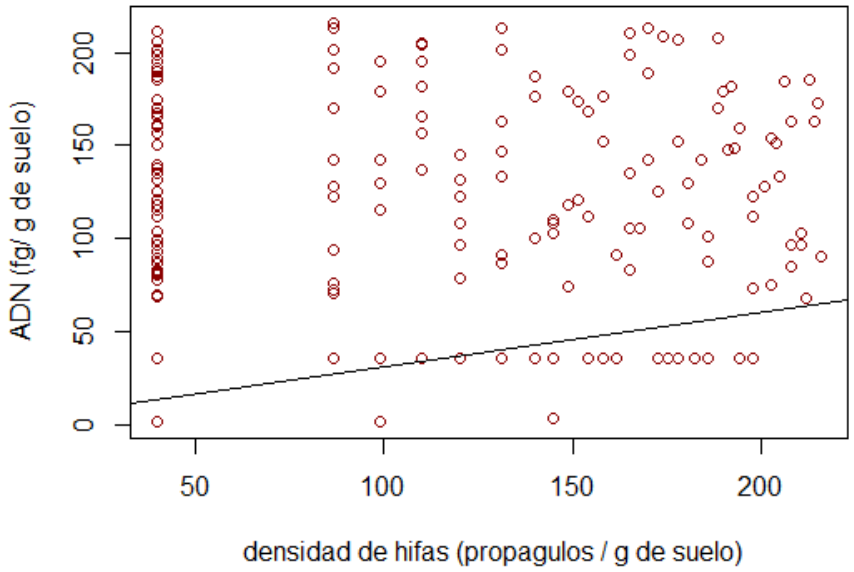


Figura 23. Correlación de la densidad de hifas de *R. solani* GA-3 (propágulos/g de suelo) y la concentración de ADN (fg/µl) detectada por PCR en tiempo real a partir de muestras de suelo obtenidas en bioensayos de invernadero.

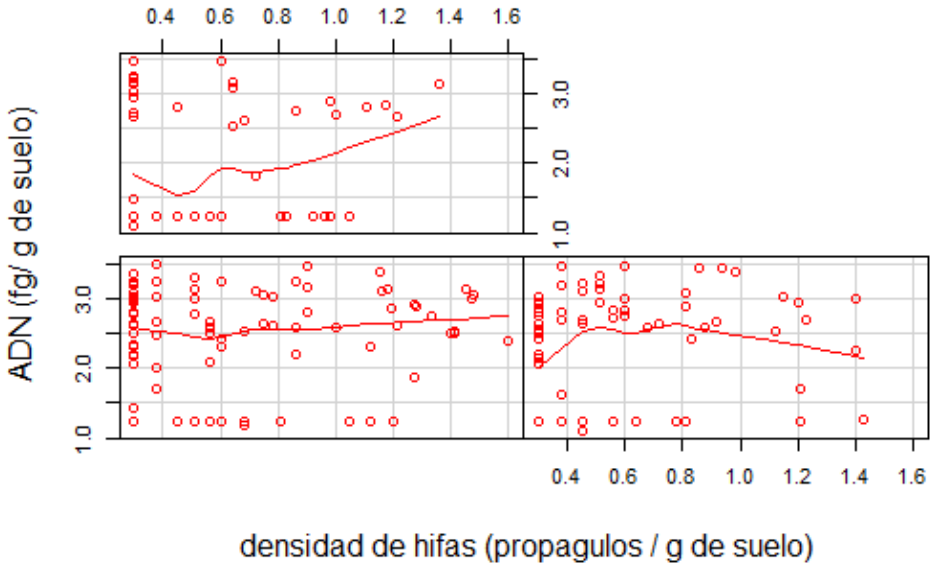


Figura 24. Correlación de la densidad de hifas de *R. solani* GA-3 (propágulos/g de suelo) y la concentración de ADN (fg/µl) detectada por qPCR. Arriba: Evaluación del efecto de ocho accesiones de cubios. Abajo Izquierda: Evaluación del efecto de la accesión Ttun 5 sobre tres aislamientos del patógeno; Abajo derecha: Evaluación del efecto de la accesión Ttun 5 sobre incidencia y severidad de la enfermedad en tres cultivares de papa.

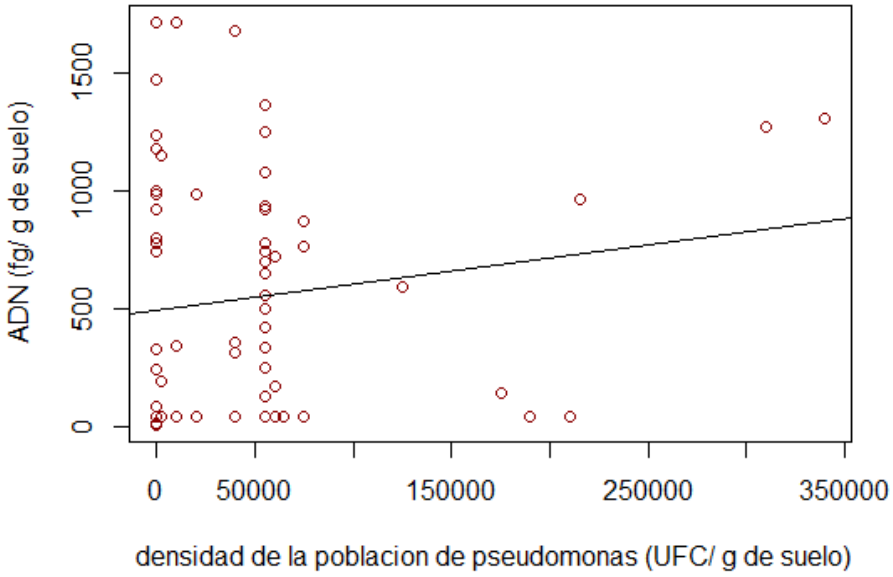


Figura 25. Correlación de las UFC/g de suelo de *Pseudomonas* sp. y la concentración de ADN (fg/µl) detectada por PCR en tiempo real a partir de muestras de suelo obtenidas en bioensayos de invernadero.

4. Discusión

4.1 Bioensayos de laboratorio: Evaluación del efecto de accesiones de cubios sobre *Rhizoctonia solani*

En el ensayo de laboratorio se evaluó una novedosa metodología para la cuantificación de la densidad de hifas de *Rhizoctonia solani* (propágulos/ g de suelo) usando palillos de madera. Los resultados indican que la técnica de palillos es un método que permite detectar la presencia o ausencia del patógeno en muestras de suelo, y que además permite cuantificar la densidad de hifas de *R. solani* a partir de palillos de madera estériles como soporte. Esta metodología es demorada, reproducible a través del tiempo, económica y permite contar únicamente hifas activas. Sin embargo, la cantidad de hifas activas que se cuantifican mediante esta metodología depende de varios factores como disponibilidad de nutrientes, pH, aireación del suelo, estructura del suelo, temperatura, humedad y la densidad del suelo, la cual puede alterar el crecimiento de las hifas a lo largo de la superficie del suelo debido a los espacios de los poros llenos de aire (Harris et al., 2003). Otro factor de gran importancia es la interacción del palillo con el hongo. Armentrout et al. (1987) indican que la interacción depende de la cadena de hifas producidas por el hongo para que encuentre el palillo y por tigmotropismo, es decir la respuesta del hongo al estimulo por contacto, en donde el hongo se une y crece a lo largo de la superficie del palillo. Esta relación hongo-palillo también se da debido a que el patógeno puede descomponer la celulosa que se encuentra en los palillos y utilizarla como única fuente de carbono, por tal razón este hongo puede colonizar y descomponer la celulosa en el suelo y es por esto que existe un crecimiento saprófito del hongo, así no exista raíces vivas o material orgánico fresco en el suelo (Garrett, 1962).

Otra limitante de la técnica del palillo, es que no puede ser usada para la cuantificación total de inóculo en el suelo, lo cual lo hace un método que realmente no indica una cantidad exacta del patógeno en el suelo. Paulitz & Schroeder (2005) demostraron que los esclerocios de *R. oryzae* pueden no ser detectados a menos que hayan germinado o que germinaran en ausencia del hospedero, y así es cuando se evidencia un aumentó en la colonización de los palillos; todo esto puede ocurrir si se adiciona agua constantemente en el suelo. Sin embargo, si se agrega inóculo y se evalúa dos semanas después, el número de colonias en los palillos disminuye, probablemente debido a la conversión de las hifas a esclerocios (Paulitz & Schroeder, 2005). Pero, la técnica si permite hacer una estimación precisa del potencial de inóculo en el suelo, aunque para esto se deba crear una curva de calibración de inóculo para cada suelo que se evalue. Esta curva permitirá correlacionar la densidad de inóculo del patógeno y el porcentaje de

tallo colonizado, pero es necesario tener en cuenta la densidad del suelo, la temperatura de incubación en la que se colocan los palillos, la cual varía de acuerdo al tipo de cultivo (Paulitz & Schroeder, 2005).

Otras alternativas de cuantificación han sido evaluadas como por ejemplo diluciones y siembra en medios selectivos, pero la cuantificación de *Rhizoctonia* sp. a partir de suelo es bastante difícil, porque es un patógeno que se encuentra en bajos niveles (baja densidad de inóculo) en suelos naturalmente infestados y principalmente en forma de micelio y esclerocios, por lo tanto la dilución en placa no puede ser usada (Paulitz & Schroeder, 2005; Truter, 2005). Sin embargo, Ko & Hora (1971) evaluaron el método de dilución de suelo que fue usado en experimentos para contar poblaciones de *R. solani*, y los resultados evidenciaron que es un método demasiado tedioso, ya que el factor más limitante de esta técnica es que solamente se puede usar en muestras que contengan alto número de propágulos (aproximadamente 100/g), y esta cantidad está por encima de lo que normalmente se puede encontrar en suelos naturalmente infestados con *R. solani* (1-9 propágulos/10 g de suelo seco) (Ko & Hora., 1971). Existen otros tipos de procedimientos que emplean colonización del patógeno utilizando semillas y tallos de varias plantas; sin embargo estos procedimientos solo permiten observar la patogenicidad del hongo y la distribución espacial del patógeno (Paulitz & Schroeder, 2005), y por tal razón no pueden ser comparados con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

La densidad de hifas que se obtuvo en este trabajo después de agregar las accesiones de cubios (Tabla 7), permitió observar que los propágulos/g de suelo resultaron en valores muy bajos indicando una baja densidad del patógeno en el suelo. Paulitz & Schroeder (2005) evaluaron la densidad de inóculo en un suelo naturalmente infestado y evidenciaron una baja densidad de *R. solani* (2.70 propágulos/g). Usando otras metodologías (tamizado en húmedo y elutriación) que cuantifican directamente el número de propágulos de *R. solani* presentes en suelos de cultivo de algodón, se ha obtenido igualmente bajas densidades de inóculo 0,04 propágulos/g y 0,07 propágulos/g, respectivamente (Clark et al., 1978).

Los resultados de los propágulos/g suelo indican que solamente 64 accesiones de la colección central tuvieron un efecto en la densidad de inóculo del patógeno en el suelo (Tabla 7). Por lo tanto, estos resultados sugieren un efecto biocida de los glucosinolatos y los productos de hidrólisis de los cubios probados contra *Rhizoctonia solani*, que es muy sensible a este tipo de compuestos de azufre comparado con otros hongos fitopatógenos como *Pythium* sp. y *Fusarium* sp. (Sarwar et al., 1998). La mayoría de estudios relacionados con estos metabolitos secundarios de las plantas y sus productos de hidrólisis están relacionados con miembros de la familia Brassicaceae y Capparaceae (Kirkegaard & Sarwar, 1999; Gimsing & Kirkegaard, 2009). Existen varias investigaciones donde se han evaluado el efecto biofumigante de los glucosinolatos de plantas del género Brassica para el manejo de *R. solani* en donde se han obtenido resultados de disminución de la colonización del patógeno y la incidencia de la enfermedad en diferentes cultivos (Kasuya et al., 2006; Larkin & Griffin, 2007; Friberg et al., 2009).

Así mismo, la Tabla 7 indica los glucosinolatos (GLS) totales de la colección central de cubios de la Universidad Nacional obtenidos por el método espectofotométrico del

ferricianuro (Arias & Higuera, 2011). El contenido se encuentra en un intervalo entre 1,20 y 30,4 µmoles/g de cubio seco, demostrando que la concentración de GLS es muy variable entre las accesiones, al igual que el efecto producido por ellas sobre la densidad de hifas de *R. solani*. Cohen et al. (2005) indican que el efecto de los glucosinolatos sobre los patógenos es independiente al contenido de glucosinolatos de la planta. Las diferencias encontradas en el contenido de GLS totales de las accesiones de cubios pueden ser atribuidas a que la clase y la cantidad de metabolitos secundario está estrechamente relacionado con las condiciones ambientales durante el crecimiento de la planta como nutrición mineral, temperatura, luz y agua, metales pesados (Antonious et al., 2009). Agerbirk & Olsen (2012) indican que las concentraciones de azufre y nitrógeno juegan un papel importante en la obtención de GLS alifáticos, aromáticos o indol, ya que los GLS alifáticos muestran una mayor sensibilidad a deficiencia de azufre que los GLS indol. Por otro lado, su actividad biológica depende de la estructura del glucosinolato, del sistema GLS-mirosina y de los órganos de la planta, ya que varían las concentraciones de GLS. Por lo tanto el efecto biocida sobre otros microrganismos es atribuido principalmente a los productos de hidrólisis de los GLS que dependen de las condiciones de la reacción (Adarsh et al., 2009).

Martín & Higuera (2012) utilizaron un método mas específico para cuantificar los GLS totales de la colección de cubios de la Universidad Nacional, para lo cuál implementaron la desulfatación de los glucosinolatos. Estas autoras encontraron que la accesión Ttun 30 tuvo el mayor contenido de GLS (25,8 µmol/g de cubio seco) seguido de Ttun 17 (15,6 µmol/g de cubio seco), y además establecieron que el glucosinolato mayoritario presente en las accesiones de cubio colombianas es el *p*-metoxibencilglucosinolato (o glucoaubrietina). Esta molécula no se encuentra con frecuencia en otras especies comestibles y como consecuencia no existen reportes de su actividad biológica, ya que actualmente las investigaciones se han enfocado en GLS más comunes y reportados en colza, brócoli, repollo y en general en especies vegetales pertenecientes a la familia *Brassicaceae* (Martín & Higuera, 2012). Sin embargo, Kirkegaard & Sarwar (1998) han evidenciado la actividad antifúngica del bencilglucosinolato, que es un GLS relacionado estructuralmente con *p*-metoxibencilglucosinolato (Martín & Higuera, 2012).

La glucoaubrietina es un glucosinolato aromático reportado por Johns et al. (1982) como un metabolito secundario principal en *T. tuberosum* subs*. tuberosum*, siendo únicamente encontrado en la familia Tropacolaceae (Fahey et al., 2001). Como se trata de un GLS aromático, los aminoácidos precursores son fenilalanina y tirosina. Químicamente, está compuesto por un azúcar ramnosa o arabinosa, en el enlace glicosídico con el anillo aromático (Fahey et al., 2001). Según Martín & Higuera (2012) su estructura química es muy similar a un bencilglucosinolato. Este tipo de GLS es débilmente adsorbido en todos los tipos de suelo y es muy fácil de extraer del suelo con agua y otros solventes hidrofílicos, teniendo además un tiempo de vida de 6,8 a 15,5 horas en el suelo (Gimsing & Kirkegaard, 2009). Con respecto a su actividad biológica se ha reportado que la mineralización de bencil GLS a bencil isotiocianato (ITC) no ocurre de forma rápida y que su proceso es incompleto debido a su degradación en productos menos disponibles en el suelo (Poulsen et al., 2008). Sarwar y colaboradores (1998) compararon el efecto de varios isotiocianatos sobre poblaciones de *Rhizoctonia* sp. en suelo, y los resultados indicaron que este hongo es muy sensible a benzil ITC comparado con otros hongos como *Fusarium* sp.*, Bipolaris* sp. y *Pythium* sp..

De acuerdo a lo anterior, se podría sugerir que en nuestros ensayos de laboratorio *R. solani* GA-3 es sensible a este tipo de GLS (glucoaubrietina), debido a que se observa una reducción de la densidad de las hifas al incorporar los cubios en el suelo (Tabla 7). Comparando los resultados de este trabajo con el estudio realizado por Martín & Higuera (2012), donde evaluaron la actividad biológica *in vitro* de la accesión Ttun 30, Ttun 46 y un bencilglucosinolato, se observa que el bencilglucosinlato y la accesión Ttun 30 presentan actividad fungistática frente a *R. solani* (inhibición del hongo y aumenta nuevamente con el tiempo), reduciendo su crecimiento micelial en un 27,3 y 11,4 % respectivamente. Por lo tanto, esto indica que el efecto producido por los GLS de los cubios es un efecto fungistático, es decir solamente se observa una inhibición en el crecimiento del patógeno y no hay un efecto fungicida, ya que no hay una destrucción total del hongo.

Los isotiocianatos producto de hidrólisis de los GLS son los principales inhibidores de la actividad microbiana. El modo de acción de este tipo de biofungicidas puede ser realizado mediante la activación de mecanismos de defensa de la planta, la producción de toxinas que eliminan el organismo blanco y por la producción de una barrera de defensa alrededor de las raíces de la planta hospedera para así mismo protegerse de los daños producidos por patógenos de suelo (Adarsh et al., 2009). La base general de la toxicidad a un amplio rango de organismos se encuentra en que los ITC son compuestos que pueden reaccionar con grupos nucleofílicos como los grupos sulfihidrilo, los enlaces disulfuro y aminas presentes en la materia orgánica (Gimsing & Kirkegaard, 2009). De la misma manera un estudio realizado en levaduras reportó que los ITC actúan inhibiendo el consumo de oxígeno de *Saccharomyces cerevisiae* a través de la acción desacopladora de la fosforilación oxidativa en la mitocondria de la levadura, resultados que proporcionaron un modelo del mecanismo bioquímico de la actividad fungicida de los ITC (Adarsh et al., 2009).

En los resultados del bioensayo en laboratorio se esperaba que a mayor concentración de GLS se obtuviera mayor inhibición del patógeno, pero en las accesiones con poca concentración de GLS se observó un efecto sobre el patógeno. Este resultado parece indicar que las accesiones que tenían mayor cantidad de GLS, al entrar en contacto con la enzima mirosinasa, no obtenían la hidrólisis completa de GLS a ITC y en cambio se formaban productos de menor capacidad supresora como los nitrilos, los cuales se forman con un pH, humedad y temperatura baja (Mattner et al., 2008). Además si se le suma otro factor importante como lo es el agua, también se limitaría la producción de ITC. Morra & Kirkegaard (2002) demostraron que en suelos anegados se duplicó la concentración de ITC liberados después de incorporar material vegetal. También pudo ocurrir que los GLS fueron adsorbidos, degradados o mineralizados en el suelo (Gimsing & Kirkegaard, 2009). Así mismo, como el suelo usado era naturalmente infestado no se conocía si el inóculo del patógeno se encontraba en mayor cantidad en micelio o en esclerocios. Mattner et al. (2008) indican que los esclerocios de *R. solani* son más tolerantes a los gases volátiles de los biofumigantes comparado con el micelio.

4.2 Bioensayos en invernadero: Evaluación del efecto de ocho accesiones de cubios sobre *R. solani* y microbiota total

Las accesiones de cubios evaluadas en invernadero no causaron disminución de las colonias de poblaciones antagonistas evaluadas en este trabajo (pseudomonads fluorescentes y *Trichoderma* sp.) (Tabla 8). Esto es importante porque indica que la prevalencia de poblaciones de microorganismos benéficos pueden suprimir patógenos y por lo tanto enfermedades, mejorar la nutrición de la planta, promover el crecimiento, y aumentar la productividad. Larkin (2003) indica que los microrganismos de suelo tiene un impacto importante en el suelo y en las funciones de la planta, y que además son determinantes en el estado de los nutrientes, en la salud del cultivo y en la productividad total del cultivo.

Las pseudomonads fluorescentes pueden ser encontradas en la rizosfera y la colonización en el suelo depende de características como textura del suelo, pH, temperatura, flujo de agua en el suelo y especies de plantas (Bautista et al., 2007). En este trabajo, la evaluación de pseudomonads fluorescentes ocho días después de agregar la accesión de cubio mostró un aumentó de población, indicando que posiblemente esta comunidad de bacterias utiliza los cubios como sustrato para su crecimiento. Se conoce que la incorporación de material vegetal con contenido de GLS estimula el crecimiento saprofíto de bacterias y hongos de suelo debido a que proporciona una mayor cantidad de sustrato para el crecimiento microbiano, aunque esto depende de la tolerancia del microrganismo a los productos de hidrólisis de GLS y de su habilidad para competir (Ishimoto et al., 2000; Friberg et al., 2009; Omirou et al., 2011). Así, el aumentó observado en las poblaciones de estas bacterias se considera positivo para la investigación debido a que las poblaciones de pseudomonads fluorescentes fueron cuantificadas microbiológicamente por su capacidad antagonista frente a *Rhizoctonia solani* (Cohen et al., 2005; Bautista et al., 2007).

Por otro lado, se observó que las poblaciones de *Trichoderma* sp. evaluadas, comparando con el testigo del suelo, aumentaron ligeramente por la incorporación de algunas accesiones de cubios mientras que con otras se mantuvieron en una concentración constante (Tabla 8). Galleti et al. (2008) afirman que *Trichoderma* sp. es un hongo menos sensible a los productos liberados por los GLS que los hongos como *R. solani* o *P. ultimum* que pueden sobrevivir en el suelo como esclerocios y oosporas respectivamente. Estos autores también indican que en el suelo ocurre un enriquecimiento en fuente de carbono por incorporación de los GLS lo que puede estimular y alterar la microflora o introducir una nueva microflora, tanto benéfica como patogénica.

Estos resultados que muestran que las poblaciones benéficas de suelo no fueran inhibidas por la incorporación de los cubios fue de gran importancia para este trabajo, ya que estas poblaciones evaluadas han sido reportadas como control biológico para reducir inóculo de *R. solani* en diferentes cultivos (Uribe et al., 1999; Cohen et al., 2005; Bautista et al., 2007). Los mecanismos que utilizan pseudomonads fluorescentes para lograr la inhibición de patógenos de suelo incluye producción de antibióticos, componentes quelantes de hierro, enzimas hidrolíticas y biosurfactantes (Bautista et al., 2007). Larkin & Honeycut (2006) evidenciaron que estas bacterias benéficas reducen patógenos de

suelo, particularmente *R. solani*, lo que conllevó a una disminución de la incidencia de la enfermedad en cultivos de papa.

En Colombia, Uribe et al. (1999) encontraron que diferentes aislamientos nativos de pseudomonads fluorescentes provenientes de cultivos de papa de la región cundiboyacense tienen una actividad antagonista sobre *R. solani* en ensayos *in vitro*. Bautista et al. (2007) evaluaron cepas nativas de *Pseudomonas fluorescens* como control biológico de *Rhizoctonia solani* en plantas de papa criolla y obtuvieron que a pesar de las diferencias encontradas en términos de la dinámica y capacidad de colonización, todas las seis cepas evaluadas indujeron el crecimiento en las plantas de *S. phureja* y redujeron los síntomas de la enfermedad producidos por *R. solani* a nivel de invernadero.

En el caso de *Trichoderma sp.*, que es un hongo benéfico encontrado en el suelo, se sabe que este interactúa en la rizosfera a través de múltiples mecanismos, como antagonismo, competencia por espacio y nutrientes, micoparasitismo y liberación de antibióticos y enzimas líticas, los cuales inhiben directamente el crecimiento organismo patógenos, siendo por esta razón muy usado en la agricultura con el propósito de control biológico (Galleti et al., 2008). Brewer & Larkin (2005) evaluaron la actividad antagonista de las especies *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma virens*, frente a *R. solani*. en papa y determinaron una reducción de la severidad en tallo (52,1 % y 50,3 %, respectivamente) y de la costra negra (46,0 % y 82 %, respectivamente)

A pesar de que en los ensayos de invernadero se utilizó suelo naturalmente infestado con el patógeno *R. solani*, para estos experimentos se agregó inóculo de *R. solani* AG-3 con concentración conocida, y por esta razón se asumió que la cuantificación que se realizó del patógeno correspondió principalmente al grupo de anastomosis 3 de *R. solani*. Sin embargo, no se puede ignorar la posibilidad que existan otros grupos de anastomosis en el suelo, aunque Ferrucho & García (2012) indican que el grupo de anastomosis GA-3 es el principal en cultivo de papa en Colombia, ya que observaron que 383 de 433 aislamientos de *R. solani* asociados con síntomas de costra negra en cultivos de papa corresponden a GA-3 y los otros 50 aislamientos se identificaron como AG-2-1, AG-A, AG-E, AG-I y otros no identificados.

El efecto de las ocho accesiones de cubios evaluadas sobre la densidad de hifas de *R. solani* GA-3, demostró nuevamente la disminución de los propágulos/g de suelo, indicando que los GLS y los productos de su hidrólisis causaron la inhibición del patógeno (Tabla 10). Un factor de gran importancia en el efecto de los GLS sobre *R. solani* puede ser que algunos microrganismos producen la enzima mirosinasa (Ishimoto et al., 2000; Gimsing & Kierkegaard, 2009). Así, es posible que hongos como *Rhizopus* sp., que se aislaron del suelo de cultivo de papa que se empleó en los ensayos de invernadero, estén contribuyendo a la actividad de la enzima y así mismo a la hidrólisis de GLS. Ishimoto et al. (2000) evaluaron la actividad mirosinasa a partir de la disminución en la concentración de sinigrin y de la formación de allyl isotiocianato a partir de sinigrin, concluyendo que dos aislamientos de *Rhizopus* sp. y *Fusarium* sp. podían catabolizar el sinigrin y generar allyl isotiocianato. Por otro lado, también se puede atribuir que la supresión de patógenos ocurra porque se agregó material vegetal seco (cubios liofilzados), por lo tanto esto puede aumentar la población de organismos antagonistas en

el suelo o también puede ocurrir por la liberación de compuestos tóxicos que no son originados a partir de los glucosinolatos (Mattner et al., 2008).

En este trabajo se observó que en la evaluación del patógeno treinta días después de adicionar los cubios, la densidad de hifas aumentó nuevamente, posiblemente debido a que los GLS se pueden adsorber en el suelo o pueden ser degradados por la microbiota del suelo lo cual limita su disponibilidad, aunque Gimsing & Kirkegaard (2009) indican que los GLS tienen bastante movilidad en el suelo y tienen una alta biodisponibilidad. Los isotiocianatos son productos de hidrólisis de los GLS y su formación depende del glucosinolato presente y de los factores ambientales y poseen una alta actividad antimicrobiana. La perdida de los ITC puede ocurrir por volatilización, degradación o adsorción (Morra & Kirkegaard, 2002; Gimsing & Kirkegaard, 2009). De acuerdo a lo anterior es posible que la perdida de los isotiocianatos también este involucrada con el aumentó de la población de *R. solani* GA-3 en el suelo. Mattner et al. (2008) afirman que la liberación de los ITC alcanza su punto más alto a las 4 horas después de la incorporación del material vegetal, y luego cae drásticamente cuando se realiza la lectura a las 24 horas, indicando que la reducción de la liberación de ITC es mayor al 90 % en las primeras 24 horas.

Los resultados de este trabajo muestran que las lesiones en estolón en el cultivar Diacol Capiro se disminuyeron con la incorporación de las ocho accesiones de cubios evaluadas con respecto al tratamiento testigo de *R.solani* GA-3, el cual no tiene cubios (Tabla 12), mientras que las lesiones de tallo disminuyeron principalmente con la accesión Ttun 5, Ttun 30 y Ttun 54 (Tabla 12), indicando una reducción de la severidad de la enfermedad. Con respecto a la incidencia en estolón se observó que el efecto de los GLS fue mayor con la accesión Ttun 5 y Ttun 62 y la incidencia en tallo fue de 20 % para todas las accesiones evaluadas, excepto con las accesiones Ttun 19 y Ttun 30 que se obtuvo un 60 % y 40 % respectivamente (Tabla 12). La incidencia de las lesiones en tallo obtenida en este trabajo después de incorporar los cubios (20 % para seis accesiones de cubios) está por debajo de la que reportan para canola (32,5 %) y cebada (31,3%) (Larkin & Griffin, 2007).

4.3 Bioensayos en invernadero: Evaluación del efecto de la accesión Ttun de cubio sobre la incidencia y severidad en tres cultivares de papa y sobre la patogenecidad de tres aislamientos de *R. solani* GA-3

Los principales estudios de biofumigación para el control de rhizoctoniasis han sido mediante el uso de GLS de la familia Brassicaceae que, de acuerdo a su estructura química, se clasifican en GLS con cadenas laterales que contienen azufre y múltiples glucosinolatos y otros (Fahey et al., 2001). Larkin & Honeycutt (2006) evaluaron la incidencia y severidad de la enfermedad (rhizoctoniasis) en plantas de papa después de realizar cultivos de rotación con canola, maíz dulce, cebada y papa, reportando reducciones del 25 % al 75 % sobre las lesiones en tallo. Por otro lado, en ensayos realizados en invernadero, Larkin & Griffin (2007) obtuvieron una severidad de la enfermedad de 0,63 mm con cultivos de rotación mostaza-papa, observando además una reducción del inóculo (%) de *R. solani* en plántulas de papa.

Con respecto a los aislamientos, los resultados de este trabajo indican que en el aislamiento de *R. solani* GA-3 de Subachoque es donde se observa el mayor efecto de la accesión Ttun 5 sobre la densidad de hifas (Tabla 13). Sin embargo, los aislamientos de las tres localidades (Zipaquirá, Subachoque y Villa Pinzón) causan chancros en tallos y lesiones que afectan estolones en el cultivar Capiro (Tabla 17), pero se observó que las raíces no se ven afectadas probablemente porque las condiciones ambientales no permitieron la infección en raíces. Las lesiones en estolón y tallo producida por los tres aislamientos indicó que no está relacionada con la cantidad de inóculo, ya que en el aislamiento proveniente de Subachoque se evidenció el mayor efecto de la accesión de cubios sobre la densidad de hifas. Sin embargo, es con este aislamiento que se observa mayor severidad en tallo y lesión en estolón y se evidenció que el aislamiento de Villa Pinzón fue el menos patogénico ya que la severidad en tallo fue la menor (Tabla 17).

Por otro lado, comparando la severidad en tallo y la longitud de la lesión en estolón obtenida en los tres cultivares Diacol Capiro, Pastusa Suprema y Criolla Colombia, se observa que todos fueron susceptibles al patógeno *R. solani* (Tabla 20). Sin embargo, el tamaño de las lesiones producidas por *R. solani* fueron menores que en el tratamiento del testigo de *R. solani* GA-3 que no contenía accesión de cubio. Cifuentes et al. (2011) evaluaron la susceptibilidad de diferentes cultivares de Colombia a la inoculación con *R. solani* GA-3 y reportaron que los seis cultivares evaluados (Ica única, Parda pastusa, Pastusa suprema Diacol capiro, Criolla Colombia y Criolla guaneña) son susceptibles al patógeno, que la incidencia y severidad aumentaron en las cuatro evaluaciones realizadas y que el porcentaje de esclerocios en tubérculos fue bajo para todos los cultivares. Comparando esos resultados con los obtenidos en este trabajo (Tabla 20) nos indica que los cultivares que fueran evaluados son susceptibles al patógeno y por tal razón no se observaron diferencias entre los cultivares. Larkin & Griffin (2007) evaluaron la reducción de inóculo de *R. solani* por el efecto de la rotación de cultivos con mostaza amarilla y canola obteniendo una reducción del inóculo de 14,1 %, una severidad de la enfermedad de 0,88 % y una incidencia de lesiones de 18,8 %; mientras que con canola la reducción de inóculo fue de 31,9 % y la severidad de la enfermedad fue de 1,19 %. Esto nos confirma que así se reduzca el inóculo en el suelo es probable que se evidencien chancros en tallos y lesiones en estolón.

Finalmente, en la evaluación realizada para observar el efecto de la accesión Ttun 5 de cubios sobre la longitud de tallo, longitud de raíz y longitud total, se observó diferencias entre los tratamientos (Tabla 16). Sin embargo, las longitudes de tallo obtenidas en los tratamientos que se realizaron en suelo estéril fueron menores a los tratamientos que se realizaron en suelo naturalmente infestado (Tabla 16). La menor longitud de crecimiento en tallo pudo ocurrir probablemente por la perdida de nutrientes por el proceso de esterilización, aunque se realizara fertilización con solución MS. Además, se asume que al realizar el autoclavado del suelo, la microbiota del suelo fue eliminada totalmente, por lo tanto no existe en el suelo quien contribuya con la disponibilidad de nutrientes para la planta y tampoco ayuda a la formación de materia orgánica que es indispensable para el crecimiento de la planta.

Los ensayos en invernadero indicaron que las accesiones de cubios evaluadas tienen un efecto sobre la densidad de inóculo de *R. solani* GA-3, patógeno de cultivos de papa, y que por esta razón pueden servir como potenciales enmiendas biológicas para el manejo

de este patógeno en campo. Es de gran importancia reconocer que este tipo de tubérculos pueden ser empleados en estrategias de manejo, principalmente rotación de cultivos de cubios y papa, o la siembra de ambos tubérculos de manera intercalada en campo para generar un efecto sobre el número de colonias del patógeno en suelo para así lograr evidenciar la disminución de incidencia y severidad de la enfermedad en campo. Además, como los GLS son productos de vida corta en el ambiente, hace que este proceso de biofumigación sea una ventaja cuando se piensa en el impacto ambiental que pueda tener (Brown & Morra, 1997).

4.4 Cuantificación absoluta de *R. solani* GA-3 y *Pseudomonas* sp. por qPCR

La detección y cuantificación de hongos a partir de sustratos como el suelo no es una tarea fácil. Los métodos de cuantificación han sido diluciones a partir de suelo, uso de medios selectivos para poder enumerar el número de propágulos usando unidades formadoras de colonias (UFC). Filion et al. (2003) indican que es factible que aquellos hongos que crecen rápidamente o los que producen propágulos o cuerpos fructíferos, o los hongos que en alguna etapa de su ciclo de vida no esporulan y tienen crecimientos muy específicos, hacen que las técnicas de dilución en placa y conteo de UFC no sean útiles para el caso de *R. solani*. Para la cuantificación de *R. solani* utilizando la metodología de los palillos se demostró que este método es reproducible y económico pero al mismo tiempo muy subjetivo y que se deben tener muy claras las características del hongo para evitar confundir las hifas que se cuantifican con otros basidiomicetos, debido a que el medio selectivo que se utiliza es para basidiomicetos. Filion et al. (2003) mostró que este tipo de técnica en donde se aíslan hifas, especialmente en la determinación y cuantificación de Basidiomicetes, es generalmente muy difícil o casi imposible de realizar.

El enfoque de la nueva tecnología molecular nos permitió realizar la cuantificación mediante PCR en tiempo real (qPCR) de *R. solani* GA-3 y *Pseudomonas* sp. Sin embargo, como se utilizó ADN de suelo fue importante reconocer la importancia de la calidad de la extracción de ADN del suelo, ya que es un factor que puede afectar la detección de un determinado organismo. La alta capacidad de unión del ADN a la superficie de las partículas de suelo pueden influenciar la eficiencia de la extracción del ADN (Martin-Laurent et al., 2001). Además, la presencia de inhibidores en el suelo (polisacáridos, ácidos húmicos, ácidos fúlvicos, sustancias coloides, compuestos fluorescentes endógenos de cultivos de patógeno y tejidos de planta) conducen a una subestimación del número de células por lo menos en un orden de magnitud (Lloyd-Jones et al., 2005) e interfieren con la actividad de la *Taq* polimerasa o la unión del primer (Shena et al., 2004; Okubara et al., 2005). De acuerdo a esto, es probable que la cuantificación mediante PCR en tiempo real de estos dos microrganismos se subestime ya que se asume que no hay una recuperación completa de ADN durante la extracción. Sin embargo, en este trabajo se evaluó el Kit comercial de MoBio Soil DNA (MoBio Laboratories) mediante la comparación de los valores de C_t de las dos réplicas de cada muestra obtenidos por qPCR. Cada una de las muestras de suelo fue evaluada por duplicado en qPCR y estos resultados demostraron una total similitud de los valores

obtenidos (< 1 unidad), evidenciando que mediante la metodología que sigue el kit de extracción de ADN la recuperación de ADN es homogénea entre las muestras.

La cuantificación por qPCR de *R. solani*, es considerada una metodología más rápida, sensible, específica y reproducible (Filion et al., 2003; Shena et al., 2004; Okubara et al., 2005) comparado con la técnica de palillos. Es importante tener en cuenta que mediante la metodología de cuantificación de palillos únicamente se cuantificaron los propágulos vivos del hongo y no es una técnica específica para la detección y cuantificación de grupo de anastomosis cuando se realiza a partir de suelo naturalmente infestado, mientras que en PCR en tiempo real permite la cuantificación absoluta del patógeno (Cullen et al., 2000; Okubara et al., 2005). Por lo tanto se esperaría que los resultados de cuantificación en este trabajo por qPCR fueran superiores que lo obtenido mediante palillos porque en qPCR se cuantifica ADN total y no se discrimina viable de no viable (Lloyd-Jones et al., 2005; Okubara et al., 2005).

Para poder detectar el cambio en la señal, es decir la cantidad de amplicon presente durante cada ciclo en el análisis de *R. solani* por qPCR, se utilizó una sonda TaqMan®, que fue diseñada específicamente para reconocer la secuencia de el grupo de anastomosis GA-3 del patógeno (Lees et al., 2002). Esto implica que en los resultados la cuantificación de *R. solani* mediante qPCR en tiempo real fue únicamente de *R. solani* GA-3. La ventaja de usar en estos ensayos la sonda y los primers RsTqF1 y RsTqR1 reportados por Lees et al. (2002), es que hubo especificidad y se evitó la presencia de falsos positivos en los resultados, lo cual es importante cuando se cuantifica a partir de muestras de suelo. Las sondas TaqMan® permiten medir la producción de productos de PCR mediante un fluoróforo donante y una molécula que bloquea la emisión de la fluorescencia “aceptor”, por lo tanto, esta sonda marcada hibrida específicamente en el amplicon de interés (Tevfik, 2006).

Los resultados de este trabajo para la evaluación de las ocho accesiones de cubios sobre el patógeno indican concentraciones muy bajas de *R. solani* en el suelo (Tabla 22). Sin embargo, se observa reducción en las concentraciones de ADN posiblemente debido a los GLS de los cubios con las accesiones Ttun 5 y Ttun 61, y como se esperaba se obtiene mayor concentración de ADN en el tratamiento testigo de *R. solani* GA-3. Así mismo, se observa que la concentración de ADN aumentó en la evaluación a los 30 días. Estos resultados sugieren que en la cuantificación por qPCR en tiempo real se obtuvo los mismos resultados con respeto al efecto de las accesiones de cubios evaluadas sobre el patógeno comparado con los resultados de la cuantificación mediante la metodología de los palillos. Los resultados en este trabajo sobre la cuantificación de *R.solani* GA-3 mediante qPCR indican bajas concentraciones de ADN del patógeno en suelo, esto también se ha reportado por varios autores que afirman que este hongo se encuentra en niveles muy bajos en suelos naturalmente infestados (Cullen et al., 2000; Lees et al., 2002; Brierley et al., 2009). Es probable que la baja densidad de inóculo del patógeno se atribuya a que si en el suelo hay mayor cantidad de esclerocios estos sean menos susceptibles a la extracción de ADN llevando a que las concentraciones obtenidas de ADN del patógeno sean muy bajas (Okubara et al., 2005).

Por otro lado, los resultados del efecto de la accesión Ttun 5 sobre la concentración de ADN de tres aislamientos de *R. solani* GA-3, mostraron poca concordancia entre las dos

metodologías de cuantificación a los 30 días después de incorporar el cubio. Mediante la técnica de los palillos se observó que en los tratamientos de aislamientos de Subachoque y Villa Pinzón las densidades de hifas del patógeno aumentaron, mientras que en los ensayos de qPCR en tiempo real se observó lo opuesto, o sea, una disminución de la concentración de ADN. Estos resultados no se asemejan a lo que realmente se esperaba obtener por la incorporación de la accesión Ttun 5 de cubios, ya que Mattner et al. (2008) reportan que la reducción de la liberación de los ITC cae drásticamente a las 24 horas, indicando una disminución en el efecto supresor en contra de patógenos. Por lo tanto se esperaba que las poblaciones del patógeno aumentaran nuevamente ya que era poco probable que aun existiera un efecto de los GLS y los productos de hidrólisis en la evaluación a los treinta días.

En este trabajo, para la cuantificación con PCR en tiempo real de *Pseudomonas* sp., se obtuvo una curva estándar con un r^2 de 0,9885 lo que confirma la linealidad en el proceso de cuantificación entre el aumentó exponencial de las concentraciones de ADN y los C_t en PCR de tiempo real (Figura 24), permitiendo así que por extrapolación se pudiera estimar la cantidad de ADN de la bacteria en suelo. Sin embargo, el valor de la pendiente de la curva fue muy bajo lo cual afecto la eficiencia de la curva estándar. Para la obtención de esta curva se utilizó SYBR® Green I, el cual es muy inespecífico, ya que se basa en el uso de un colorante fluorescente que emite luz cuando se intercala dentro de un ADN de doble cadena (Schena et al., 2004), razón por la cual se recomienda que los primers diseñados tengan bastante especificidad con el blanco (Okubara et al., 2005; Von Felten et al., 2010). Las secuencias de los primers que se utilizaron son específicas y el amplicon obtenido es conservado en el gene 16S rRNA de *Pseudomonas* (Lloyd-jones et al., 2005).

Los resultados obtenidos en este trabajo mediante la cuantificación con PCR en tiempo real de *Pseudomonas* sp. demuestran que la concentración de ADN de estas bacterias es muy baja en suelo (Tabla 23), similar al resultado obtenido con *R. solani* GA-3. Sin embargo, se observa que estas bacterias no se ven afectadas por la incorporación de cubios y se evidencia un leve aumentó con las accesiones Ttun 5, Ttun 30, Ttun 56, Ttun, 61, Ttun 62 y Ttun 69, de la misma forma como fue observado para la cuantificación de dilución en placa. Esta cuantificación molecular indica que hay un aumentó de *Pseudomonas* sp. en el suelo luego de incorporar el cubio e indica que los GLS además de suprimir patógenos sirven como fuente de carbono para el crecimiento de otros microrganismos (Ishimoto et al., 2000; Galleti et al., 2008). De acuerdo a estos resultados, la diferencia entre la estimación de pseudomonads fluorescentes y el total de la población de *Pseudomonas* sp. indica que hay mayor concentración de las pseudomonads fluorescentes obtenidas por dilución en placa, que *Pseudomonas* sp obtenidas mediante qPCR. Realmente se esperaba que las pseudomonads fluorescentes tuvieran una concentración menor debido a que representan una pequeña porción del género *Pseudomonas.*; ademas el total estimado de *Pseudomonas* cuantificadas por qPCR incluye células vivas y células muertas por lo tanto su concentración debería ser mayor que las pseudomonads fluorescentes.

4.5 Comparación de metodologías de cuantificación microbiológica y molecular

Finalmente, la correlación de la cuantificación de *R. solani* GA-3 y *Pseudomonas* sp. mediante las dos metodologías evaluadas en este trabajo indica que los valores obtenidos no se correlacionan entre si (Figura 25 y 27). Sin embargo, de acuerdo a los resultados obtenidos, se verificó que la técnica de palillos es útil para cuantificar propágulos vivos siendo esto un indicador del potencial del inóculo que causa enfermedad. Por otro lado, los datos obtenidos con la metodología de qPCR indican la cantidad total de ADN de interés presente en muestras de suelo, aunque la técnica no permite diferenciar viabilidad lo que no ayudaría para conocer que tanto inóculo puede influir en el desarrollo de la enfermedad. Así, aunque es interesante utilizar qPCR por su sensibilidad y facilidad de ejecución, es importante que esta se complemente con metodologías como la de los palillos, o las que utilizan otro tipo de soportes para aislar el hongo y así evaluar el potencial de inóculo. El uso de ambas metodologías brindaría una rápida detección y cuantificación solución en cuanto al manejo de la enfermedad.

La técnica de PCR en tiempo real es una herramienta útil para la detección y cuantificación del patógeno de manera eficiente y veloz, por lo tanto ayuda al diagnostico rápido y adecuado de la enfermedad; además permite cuantificar el inóculo no solo a partir de suelo sino también de material vegetal. La información de interés que se obtiene es útil para conocer la ecología y epidemiologia de patógenos de suelo que son difíciles de cuantificar, y también ayudaría a reconocer la interacción entre patógeno y hospedero y esto generaría el desarrollo de estrategias de manejo en el menor tiempo posible y en el momento indicado.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

- ✓ 64 accesiones de cubio de la colección central de la Universidad Nacional de Colombia causan un efecto en la disminución de la densidad de hifas (propágulos/g de suelo) de *Rhizoctonia solani* en muestras de suelo de cultivo de papa, indicando que posiblemente los cubios tienen un potencial biofumigante sobre el inóculo de *R. solani* en suelo naturalmente infestado. Por lo tanto, se sugiere que estas accesiones de cubios pueden ser utilizadas como posible estrategia de manejo de la enfermedad en campo.

- ✓ El método de palillos de madera es una técnica que permite cuantificar únicamente hifas activas de *Rhizoctonia solani* a partir de muestras de suelo, lo cual lo hace un método útil para detección de la presencia o ausencia y cuantificación del patógeno.

- ✓ En invernadero se evidenció que la accesión Ttun 5, presentó el mayor efecto sobre la densidad de hifas de *R. solani* GA-3 comparado con las otras accesiones evaluadas (Ttun 19, 30, 54, 56, 61, 62, 69). Sin embargo, a los 30 días después de incorporar los cubios se evidenció un aumentó de la población del patógeno lo que demostró que el efecto de los metabolitos secundarios de los cubios, es un efecto fungistático y no fungicida sobre el hongo.

- ✓ Se evidenció que al incorporar los cubios en el suelo, las poblaciones antagonistas de pseudomonads fluorescentes presentan un aumentó de su biomasa posiblemente porque utilizan estos tubérculos como fuente de carbono para su crecimiento y con respecto a las poblaciones de *Trichoderma* sp. se obtuvo que esta población de hongos no aumenta pero tampoco se reduce por efecto de estos metabolitos secundarios producidos por los cubios. Mientras que las bacterias y hongos totales del suelo aumentan ligeramente.

- ✓ El efecto de los productos de hidrólisis de los glucosinolatos de la accesión Ttun 5 sobre la incidencia y severidad de la enfermedad indican una reducción en las lesiones en estolón y severidad en tallo, al igual que la incidencia de la enfermedad en los tres cultivares evaluados.

- ✓ Con respecto al desarrollo de la curva estándar de *Pseudomonas* sp., los primers seleccionados mostraron especificidad con el blanco y disminuyeron la inespecificidad de SYBR® Green. Se obtuvo un R^2 de 0,98 y un coeficiente de correlación de - 0,99. Sin embargo el valor de la pendiente de la curva fue muy bajo lo cual afectó la eficiencia de la curva estándar. Mediante la cuantificación por PCR en tiempo real se observó el mismo efecto supresor de los glucosinolatos producidos por los cubios sobre el patógeno y el aumentó en las poblaciones de *Pseudomonas* sp.

- ✓ La correlación entre ambas metodologías empleadas en este trabajo indica que no se asocian los datos de una metodología con la otra, pues el coeficiente de correlación fue de ρ= 0,1081 y ρ= 0,1294, respectivamente. Ambas metodologías sirven para detección, cuantificación y diagnóstico de *R. solani* GA-3. Sin embargo, por sensibilidad, facilidad, reproducibilidad y precisión se considera más confiable la técnica de PCR en tiempo real.

5.2 Recomendaciones

- ✓ Evaluar en campo las accesiones que se utilizaron en los bioensayos en invernadero de este trabajo para observar el comportamiento del efecto de los glucosinolatos y los productos de hidrólisis sobre el patógeno en condiciones ambientales no controladas. Así mismo, evaluar estas mismas accesiones pero utilizando el tubérculo no liofilizado.

- ✓ Evaluar en invernadero las 57 accesiones restantes de la colección de cubios para verificar si existe alguna con un mejor efecto sobre el patógeno bien como cuantificar este efecto sobre la microbiota del suelo.

- ✓ Cuantificar la concentración de los isotiocianatos y otros productos de hidrólisis después de incorporar los cubios en el suelo.

- ✓ Comparar en un ensayo *in vivo* el efecto de los cubios, *Brassicas* (canola, mostaza, col, entre otras), microrganismos antagonistas y productos químicos sobre el inóculo de *R. solani* en el suelo, sobre la incidencia y severidad de la enfermedad.

A. Anexo: Protocolo de extracción de ADN de micelio de *R. solani* según protocolo del DNeasy Plant Kit (Qiagen)

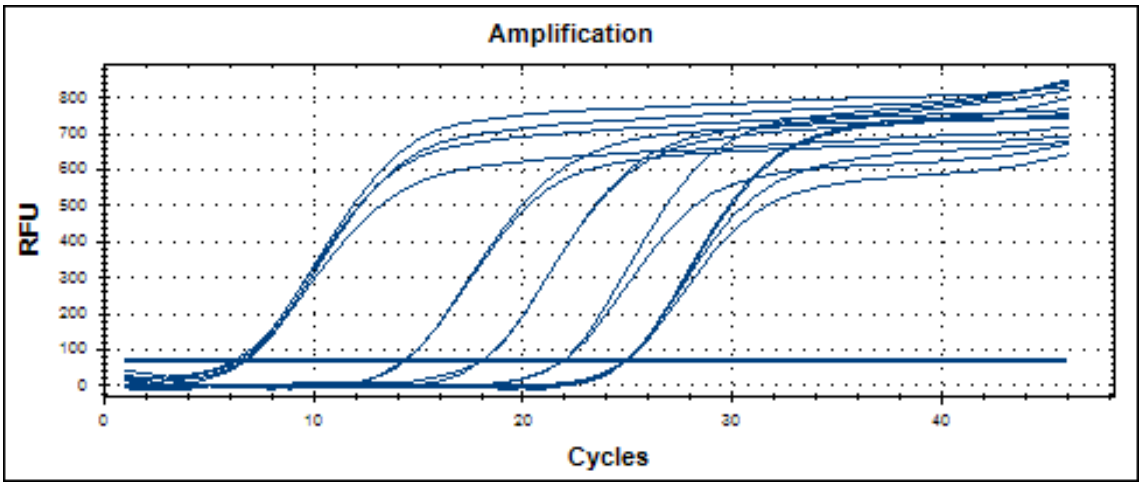
1. Pesar 0,02 g de micelio seco macerado en un microtubo de 2 ml.
2. Adicionar 400 µl de buffer AP1 y 3 µl de RNasa (100mg/ml) y pasar por vortex. Incubar la mezcla por 15 min a 65 °C. Mezclar 2 o 3 veces durante la incubación.
3. Adicionar 130 µl de buffer AP2 al lisado. Pasar por vortex e incubar por 5 min en hielo. Centrifugar por 10 min a 7.000 rpm.
4. Manualmente, pasar el lisado a una columna de QIAshredder Mini Spin (morado) a un microtubo de 2 ml, y centrifugar por 4 min a 7.000 rpm.
5. Transferir lo anterior a un microtubo nuevo (eliminar la columna) y agregar 1.5 volumenes de buffer AP3/E y mezclar manualmente.
6. Pasar la mezcla anterior a una columna DNeasy Mini Spin (blanco) en un microtubo de 2 ml. Centrifugar por 1 min a 8.000 rpm y descartar lo que se filtra. Repetir la centrifugación.
7. Pasar la columna DNeasy Mini Spin a un tubo nuevo de 2 ml, agregar 500 µl de buffer AW, y centrifugar por 1 min a 8.000 rpm. Descartar lo que se filtra.
8. Agregar 500 µl de buffer AW a la columna DNeasy Mini Spin Colum, y centrifugar por 2 min a 14.000 rpm.
9. Transferir la columna a un tubo de 1.5 ml y colocar 100 µl de buffer AE directamente en el centro de la membrana. Incubar por 5 min a temperatura ambiente y centrifugar por 1 min a 8.000 rpm. Repetir la centrifugación y almacenar solución de extracto de ADN eluída a -20 °C.

B. Anexo: Preparación de solución MS (Murashige and Skoog, 1962) al 10 %

En un frasco se coloca 500 ml de agua destilada y se agrega cada uno de los siguientes componentes, mientras se va agitando con barra magnética, y se completa hasta 1000 ml:

Reactivo	**Formula**	**Peso en g/l**
Nitrato de amônio	NH_4NO_3	16,5
Nitrato de potasio	KNO_3	19
Sulfato de magnesio	$MgSO_4.7H_2O$	3,7
Acido bórico	H_3BO_3	0,062
Fosfato biácido potasio	KH_2PO_4	1,7
Cloruro de calcio	$CaCl_2.2H_2O$	3,98
Sulfato de Zinc	$ZnSO_4.7H_2O$	0,086
Sulfato de manganeso	$MnSO_4.H_2O$	0,171
Yoduro de potasio	KI	0,0083
Molibdato de potasio	$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,0025
Sulfato de cobre	$CuSO_4.5H_2O$	0,0025
Cloruro de cobalto	$CoCl_2.6H_2O$	0,0025
Sulfato de hierro	$FeSO_4.7H_2O$	5,56
EDTA de sodio	$Na_2EDTA.2H_2O$	7,46

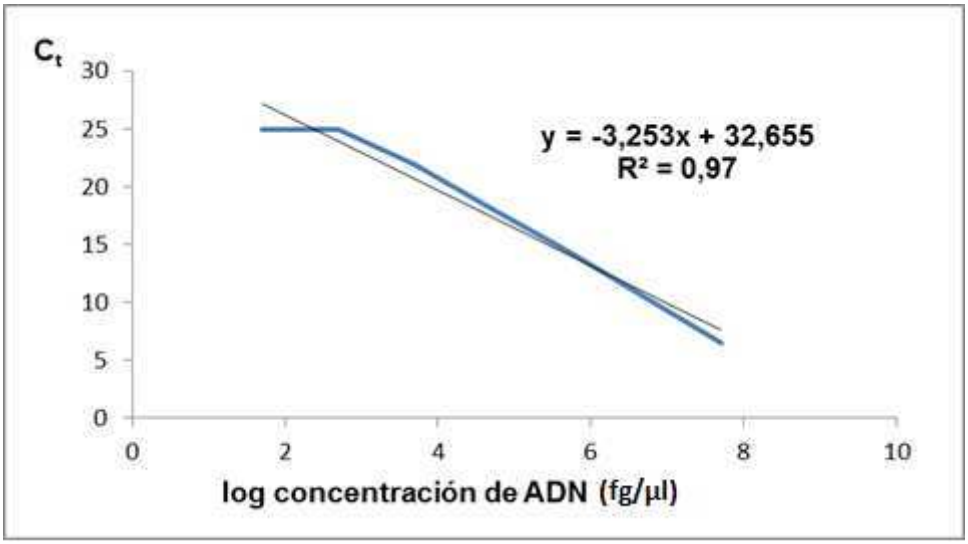
C. Anexo: Curva estándar obtenida en qPCR para cuantificación absoluta de Rhizoctonia solani GA-3. Grupo de investigación en papa (datos no publicados)



Curva de amplificación en PCR en tiempo real de *R. solani* GA-3. utilizando sonda TaqMan® marcada con FAM. Unidad de fluorescencia relativa (RFU) vs. el número de ciclos. El número de ciclo, en el que el valor de la fluorescencia emitida cruza la línea umbral (C_t) es inversamente proporcional a la concentracion de ADN. Los valores obtenidos de C_t para cada una de las diluciones empleadas (Tabla 3.1).

Valores obtenidos del número de ciclo, en el que el valor de la fluorescencia emitida cruza la línea umbral (C_t) por qPCR en tiempo real a partir de diferentes concentraciones fg/µl de ADN plasmídico de *Rhizocotnia solani* GA-3. para obtención de la curva estándar de cuantificación absoluta.

Concentración [fg]	Log [DNA/fg]	CT
50000000	7,70	6,49
500000	5,70	14,345
50000	4,70	18,07
5000	3,70	21,94
500	2,70	24,94
50	1,70	24,935



Correlación entre los valores del número de ciclo, en el que el valor de la fluorescencia emitida cruza la línea umbral (C_t) (línea azul) obtenidos en PCR en tiempo real y el log de la concentración de ADN (fg/µl) de *Rhizocotnia solani* GA-3. Ecuación obtenida a partir de la regresión lineal.

D. Anexo: Protocolos de ensayos para realizar curva de calibración por PCR en tiempo real para *Pseudomonas fluorescens.*

D.1 Extracción de ADN de *Pseudomonas fluorescens* empleando kit comercial PureLink Genomic DNA Mini kit (Invitrogen)

1. A partir de un cultivo de baterías Gram negativas (2 X 10^{9}),
2. Durante 2 horas en baño de maría a 55 °C, incubar un microtubo con la concentración anterior de células. Pasar por vortex ocasionalmente hasta lisar las células.
3. Adicionar 20 µl de RNasa A al lisado. Mezclar en vortex e incubar por 2 min a temperatura ambiente.
4. Adicionar 200 µl de buffer Lysis/binding y mezclar en vortex.
5. Adicionar 200 µl de etanol al 96 % al lisado. Mezcla en vortex.
6. Unión de ADN: Adicionar el lisado anterior (~640 µl) a una columna Spin PureLink. Centrifugar a 10.000 *g* por 1 min a temperatura ambiente. Descartar el microtubo de colección y pasar la columna a un microtubo nuevo de 2 ml.
7. Lavado de ADN: Agregar 500 µl de buffer de lavado 1 a la columna. Centrifugar a 10.000 *g* por 1 min.
8. Descartar el microtubo y pasar la columna a un microtubo nuevo. Agregar 500 µl de buffer de lavado 2. Centrifugar a 16.300 rpm por 3 min a temperatura ambiente. Descartar microtubo.
9. Pasar la columna a un microtubo nuevo y agregar 50 µl de Elution buffer a la columna. Repetir este paso.
10. Incubar a temperatura ambiente por 1 min y centrifugar a 16.300 rpm por 1 min a temperatura ambiente.
11. Remover y descartar la columna. Almacenar el ADN a –20 °C.

D.2 Purificación de ADN empleando kit comercial PureLink Kit (Invitrogen)

1. El producto de PCR se llevó a un volumen final de 25 µl y fue evaluado mediante electroforesis en un gel al 2 % (teñido con bromuro de etidio). A partir de la banda obtenida, se verifico su tamaño (69 pb) en documentador de geles (Biorad). La banda se cortó y se colocó en un microtubo de 1.5 ml.

2. Se peso cada banda. De acuerdo al peso obtenido se agrega 3 volumenes del buffer solubilizador y se coloca en baño de maría a 50 °C durante 10 min hasta disolver la agarosa.

3. Adicionar 1 volumen de isopropanol y pasar todo el volumen a un microtubo con columna. Centrifugar a 12.000 *g* durante 1 min. Eliminar sobrenadante.

4. Agregar 600 µl de buffer de lavado W1 a la columna. Centrifugar a 12.000 *g* por 2 min. Eliminar microtubo.

5. En un microtubo nuevo, colocar la columna y agregar 50 µl de buffer de elución. Incubar durante 30 min a temperatura ambiente. Centrifugar a 12.000 *g* por 1 min y almacenar a –20 °C.

D.3 Extracción de ADN plasmídico por método MINI-PREP (Maniatis et al., 1982).

1. Picar las colonias con un palillo estéril, sumergir cada colonia en un microtubo con taparosca que contenga 3 ml de medio líquido estéril 2XYT con ampicilina (50 µg/µl), y dejar en crecimiento a 37 °C durante 15 horas, a 225 rpm.

2. Transferir el cultivo a microtubos de 1,5 ml y centrifugar 2 min a 12.000 rpm; el *pellet* obtenido se almacena toda la noche a –20 °C.

3. Agregar 210 µl de STET (0.5% de tritan X-100; 8% glucosa; 10mM Tris pH 8.0 y 50 mM EDTA) y resuspender hasta disolver el *pellet*.

4. Adicionar 15 µl de lisozima (10 µg/µl), pasar por vortex y colocar los microtubos durante 50 segundos en baño maría con agua en ebullición.

5. Centrifugar 20 minutos a 14.000 rpm, remover el *pellet* con un palillo estéril, y adicionar 150 µl de acetato de amonio 7,5 M pH 7,0 y 600 µl de etanol absoluto.

6. Almacenar a –20 °C durante la noche.

7. Centrifugar 20 min a 13.000 rpm, descartar el sobrenadante y dejar secar los *pellets*.

8. Resuspender en 50 µl de agua Milli-Q estéril y disolver a 60 °C en baño serológico.

9. Almacenar el ADN plasmídico a –20°C hasta su purificación.

D.4 Purificación de ADN plasmídico (Maniatis et al., 1982)

1. A cada MINI-PREP del ADN plasmídico adicionar 0,2 µl de RNasa A (20mg/ml) e incubar a 37 °C durante dos horas.

2. Aumentar el volumen a 200 µl con agua Milli-Q estéril, y agregar 200 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamilico (25:24:1). Pasar por vortex 20 segundos y centrifugar siete minutos a 12.000 rpm.

3. Tomar la fase acuosa y colocarla en un microtubo nuevo. Adicionar dos volúmenes de etanol al 95 % y 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M, y mantener a –20 °C durante la noche.

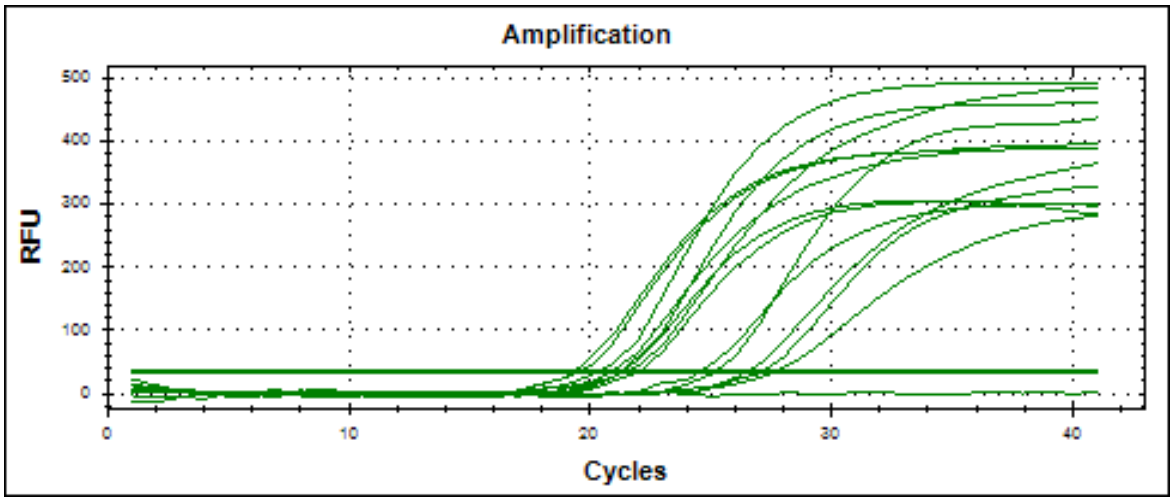
4. Centrifugar por 15 min a 12.000 rpm y eliminar el sobrenadante. El *pellet* se debe lavar con 800 µl de etanol al 70 %, centrifugar por 15 min a 12.000 rpm, y descartar el sobrenadante.

5. Dejar secar el *pellet* y resuspender en 30 µl de agua Milli-Q estéril.

E. Anexo: Protocolo de extracción de ADN de suelo empleando kit comercial Power soil® DNA Isolation kit (Laboratorios MO BIO)

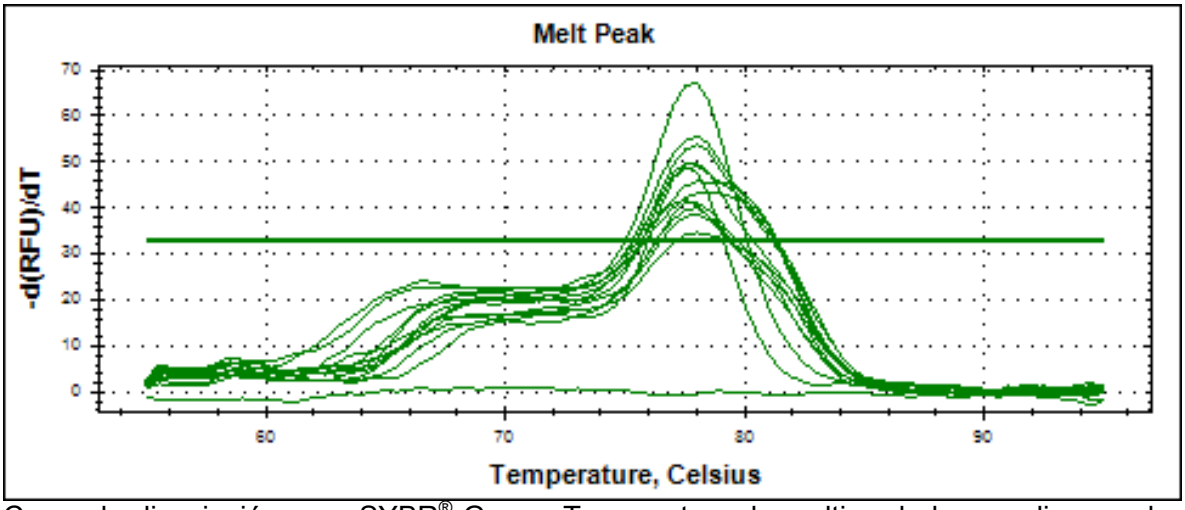
1. Agregar 0,25 g de suelo a los microtubos de Powerbread. Mezclar en vortex.
2. Agregar 60 µl de la solución C1 y mezclar manualmente. Colocar en el vortex MOBIO a máxima velocidad durante 10 min. Centrifugar a 10.000 *g* por 30 seg a temperatura ambiente.
3. Transferir el sobrenadante a un microtubo de 2 ml. Agregar 250 µl de la solución C2 y colocar en vortex por 5 seg. Incubar a 4 °C durante 5 min. Centrifugar a 10.000 *g* por 1 min a temperatura ambiente.
4. Transferir 600 µl del sobrenadante a un microtubo nuevo de 2 ml. Agregar 200 µl de solución C3 y colocar en vortex. Incubar a 4 °C durante 5 min. Centrifugar a 10.000 *g* por 1 min a temperatura ambiente.
5. Transferir 750 µl del sobrenadante a un microtubo nuevo de 2 ml. Agregar 750 µl de la solución C4 y colocar en vortex por 5 s.
6. Tomar 675 µl y llevarlos a un tubo con un *spin filter* y centrifugar a 10.000 *g* por 1 min a temperatura ambiente. Descartar lo que se filtra y repetir este paso.
7. Agregar 500 µl de la solución C5 y centrifugar a 10.000 *g* por 30 seg a temperatura ambiente. Descartar lo que se filtra.
8. Nuevamente centrifugar a 10.000 *g* por 1 min a temperatura ambiente.
9. Cuidadosamente pasar la column a de *spin filter* a un microtubo nuevo de 2 ml. Agregar 100 µl de la solución C6 en el centro de la membrana del filtro. Centrifugar a 10.000 *g* por 30 seg a temperatura ambiente.
10. Descartar el filtro y almacenar a –20 °C.

F. Anexo: Curva de amplificación en PCR en tiempo real de *Pseudomonas* sp. utilizando SYBR® Green.



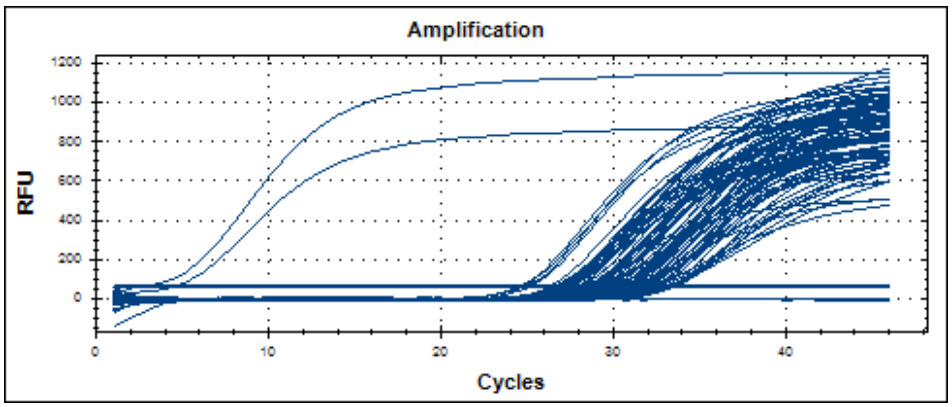
Curva de amplificación en PCR en tiempo real de *Pseudomonas* sp. utilizando SYBR Green. Unidad de fluorescencia relativa (RFU) vs. el número de ciclos. El C_t es inversamente proporcional a la concentracion de ADN. Los valores obtenidos de C_t para cada una de las diluciones empleadas (Tabla 21). Control negativo, no hay valor de C_t.

C_t. Número de ciclo, en el que el valor de la fluorescencia emitida cruza la línea umbral.

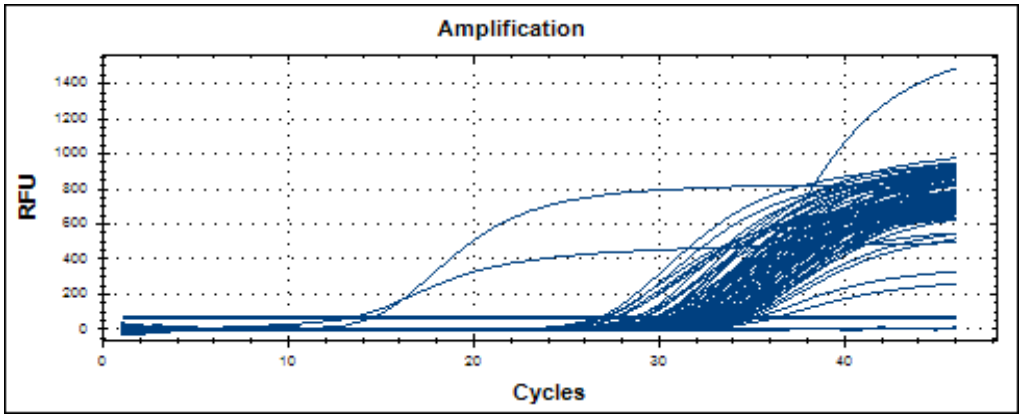


Curva de disociación para SYBR® Green. Temperatura de melting de los amplicones de *Pseudomonas* sp. Producto amplificado con un T_m de 78 Celsius

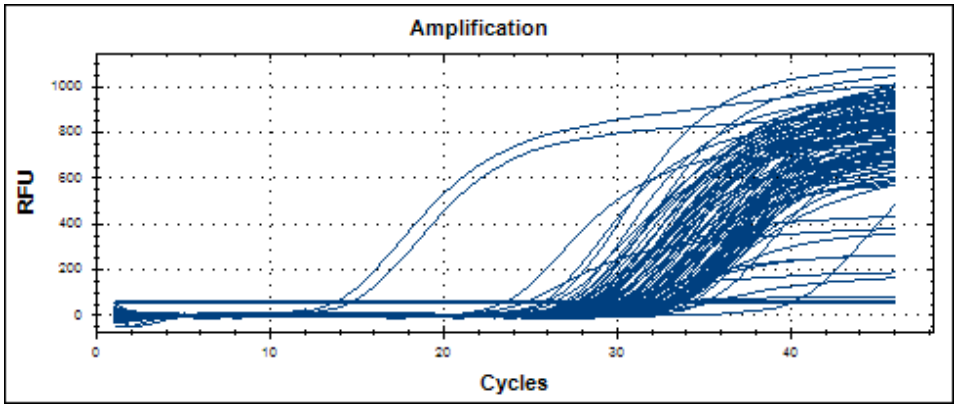
G. Anexo. Curvas de amplificación en PCR en tiempo real de *R. solani* GA-3 y *Pseudomonas* sp en muestras de suelo. Unidad de fluorescencia relativa (RFU) vs. el número de ciclos



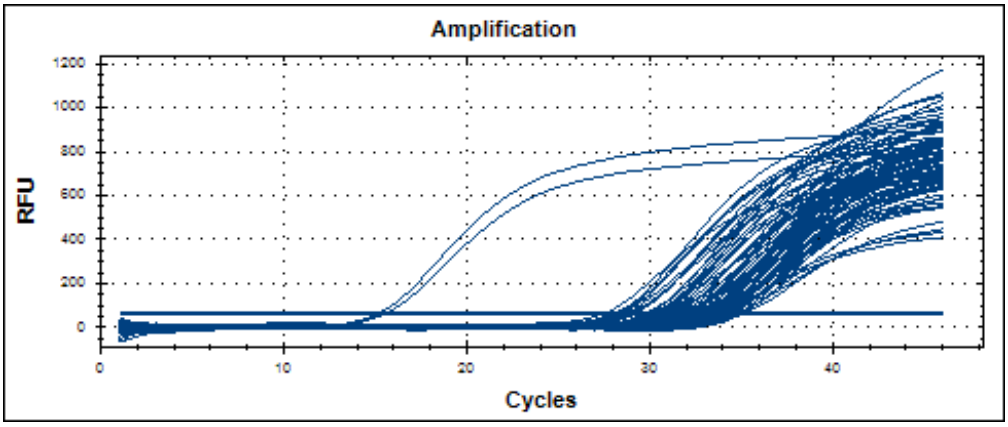
Curva de amplificación en PCR en tiempo real de *R. solani* GA-3 utilizando sonda TaqMan® marcada con FAM. Los valores obtenidos de C_t para cada una de las muestras de suelo. Evaluación del efecto de accesiones de cubios sobre *Rhizoctonia solani GA-3* (Tabla 10).



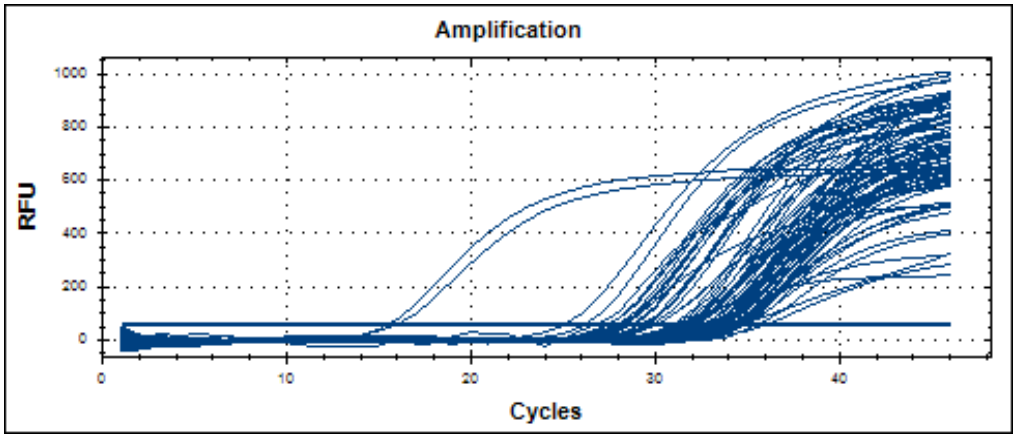
Curva de amplificación en PCR en tiempo real de *R. solani* GA-3 utilizando sonda TaqMan® marcada con FAM. Los valores obtenidos de Ct para cada una de las muestras de suelo Evaluación del efecto de accesiones de cubios sobre *Rhizoctonia solani GA-3* (Tabla 10).



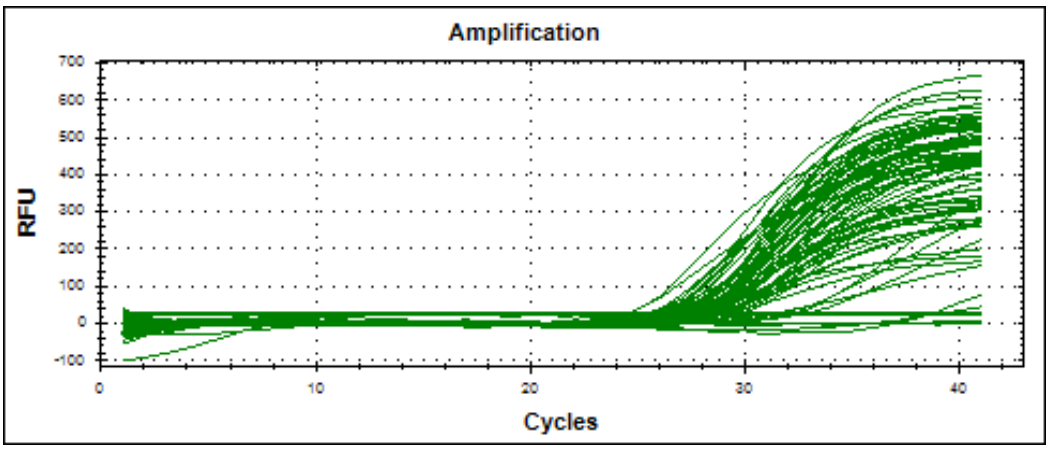
Curva de amplificación en PCR en tiempo real de *R. solani* GA-3 utilizando sonda TaqMan® marcada con FAM. Los valores obtenidos de Ct para cada una de las muestras de suelo. Evaluación del efecto de la accesión Ttun 5 de cubio sobre *Rhizoctonia solani GA-3* (Tabla 13).



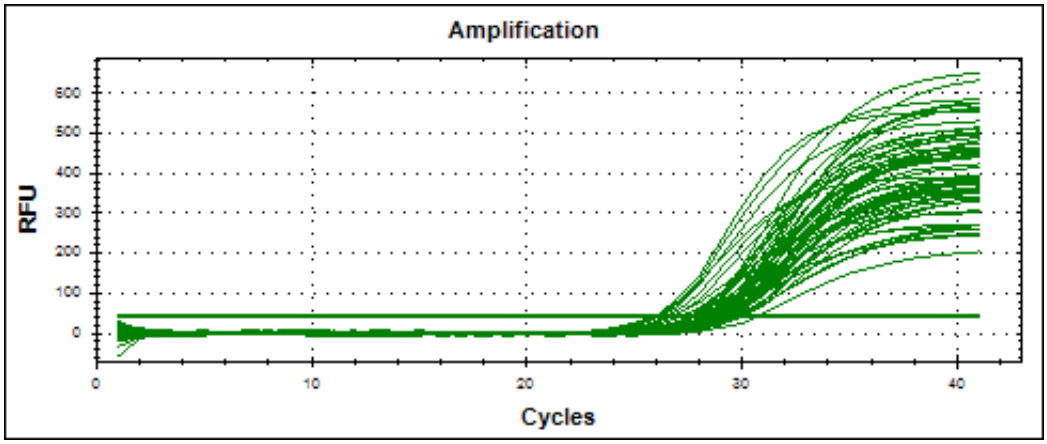
Curva de amplificación en PCR en tiempo real de *R. solani* GA-3 utilizando sonda TaqMan® marcada con FAM. Los valores obtenidos de Ct para cada una de las muestras de suelo. Evaluación del efecto de la accesión Ttun 5 de cubio sobre *Rhizoctonia solani GA-3* (Tabla 13).



Curva de amplificación en PCR en tiempo real de *R. solani* GA-3 utilizando sonda TaqMan® marcada con FAM. Los valores obtenidos de Ct para cada una de las muestras de suelo. Evaluación del efecto de la accesión Ttun 5 de cubio sobre una mezcla de aislamientos de *Rhizoctonia solani GA-3* (Tabla 18).



Curva de amplificación en PCR en tiempo real de *Pseudomonas* sp. utilizando SYBR Green. Los valores obtenidos de Ct para cada una de las muestras de suelo. Evaluación del efecto de accesiones de cubios sobre *Pseudomonas* sp. (Tabla 8).



Curva de amplificación en PCR en tiempo real de *Pseudomonas* sp. utilizando SYBR® Green. Los valores obtenidos de Ct para cada una de las muestras de suelo. Evaluación del efecto de la accesión Ttun 5 de cubio sobre *Pseudomonas* sp. (Tabla 14).

Bibliografía

Adarsh, P.V., Geetanjali, R., Tarunpreet, S.T., Saroj, A. (2009). Bio-protective effects of glucosinolatos: a review. LWT – *Food Science and Technology* 42: 1561-1572.

Agerbirk, N., De Vos, M., Kim, J.H., Jander, G. (2009). Indole glucosinolate breakdown and its biological effects. *Phytochemistry Reviews* 8: 101-120.

Agerbirk, N., Olsen, C.A. (2012). Glucosinolate structures in evolution. *Phytochemistry* 77: 16-45.

Alves, M.F., Ramos, M.A., García-Sánchez, A.P., Eslava, J.M., Díaz-Minguez J.M. (2002). A DNA-based procedure for in plant detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Phytopathology* 92: 237-244.

Agrios, G.N. (2005). Plant Pathology. Quinta Edición. Burlington, MA: Elsevier Academic Press.

Antonious, G.F., Bomford, M., Vincell, P. (2009). Screenig Brassica species for glucosinolate content. *Journal of Enviromental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes* 44: 311-316.

Aquiahuati, R.M.A. & Pérez, C.M.L. (2004). Manual de Prácticas del Laboratorio de Microbiología General. Primera edición. México.

Arias, C.M. & Higuera, M.B. (2011). Análisis y comparación de los glucosinolatos presentes en diferentes accesiones de cubio (*Tropaeolum tuberosum*) para evaluar su uso potencial en el control del patógeno de la papa *Spongospora subterranea* de la Universidad Nacional de Colombia. María Mercedes Arias Cortés; dir. Blanca Ligia Higuera Mancipe.

Armentrout, V.N., Downer, A. J., Grasmick, D.L., Weinhold, A.R. (1987). Factors affecting infection cushion development by *Rhizoctonia solani* in cotton. *Phytopathology* 77: 623-630.

Bains, P., Bisht, V.S. (1995). Anastomosis group identity and virulence of *Rhizoctonia solani* isolates collected from potato plants in Alberta, Canada. *Plant Disease* 79: 241-242.

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.

Bello, A., López, J.A., García, A. (2003). Biofumigación en Agricultura Extensiva de Regadío. Ediciones Mundi-Prensa. México.

Blazier, S., Conway, K.E. (2004) Characterization of *Rhizoctonia solani* isolates associated with patch diseases on turfgrass. *Proceedings Oklahoma Academy Sci*. 84: 41-51.

Bones, A.M., Rossifer, J.T. (1996). The myrosinase-glucosinolate system: its organization and biochemistry. *Physiologia Plantarum* 97: 194-208.

Brewer, M.T., Larkin, R.P. (2005). Efficacy of several potential biocontrol organisms against *Rhizoctonia solani* on potato. *Crop Protection.* 24 (11): 939-950.

Brierley, J.L., Stewart, J.A., Less, A.K. (2009). Quantifying potato pathogen DNA in soil. *Applied Soil Ecology* 41:234-238.

Brown, P.D., Morra, M.J. (1997). Control of soilborne plant pests using glucosinolate containing plants. *Advances in Agronomy.* 61: 167–231.

Caridi, D., Elkins, A., Donkor, O., Jones, R. (2006). The determination of glucoraphanin in broccoli sedes and florets by solid phase extraction and micellar electrokinetic capillary chromatography. *Food chemistry* 98: 179-187.

Carling, D.E., Baird, R.E., Gitaitis, R.D., Brainard, K.A., Kuninaga, S. (2002). Characterization of AG-13, a newly reported anastomosis group of *Rhizoctonia solani. Disease Control & Pest Management* 92: 893-899.

Chirinos, R., Rogez, H., Campos, D. Pedreschi, R., Larondelle, Y. (2007). Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pavón) tubers. *Separation and Purification Technology* 55: 217-225.

Chung, W.C., Huang, J.W., Huang, H.C. (2005). Formulation of a soil biofungicide for control of damping-off Chinese cabbage (*Brassica chinensis*) caused by *Rhizoctonia solani. Biological Control* 32: 287-294.

Cifuentes, C.J., Ferrucho, R., García, D.C. (2011). Evaluación de la respuesta de cultivares de *Solanum tuberosum* con *Rhizoctonia solani* GA-3. *Fitopatología Colombiana* 35: 107.

Clark, C.A., Sasser, J.N., Barker, K.R. (1978). Elutriation procedures for quantitative assay of soils for *Rhizoctonia solani. Phytopathology* 68:1234-1236.

Cohen, M.F., Yamasaki, H., Mazzola, M. (2005). *Brassica napus* seed meal soil amendment modifies microbial community structure, nitric oxide production and incidence of *Rhizoctonia* root rot. *Soil Biology & Biochemistry* 37: 1215-1227.

Cullen, D.W; Lees, A.K., Toth, K.S., Dunca, J.M. (2000). Detection and quantification of fungal and bacterial potato pathogens in plants and soil. Presentado en la conferencia EPPO sobre técnicas de diagnostico de patógenos de plantas. 485-488.

Espinal, C.F., Martínez, H., Pinzón, N., Barrios, C. (2005). La cadena de la papa en Colombia. Una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005. Doc. de trabajo no. 100. En: www.agrocadena.gov.co, consultado el 12 de Mayo de 2012.

Eylen, D.V., Indrawati. M., Hendrickx, A., Loey, A. (2006). Temperature and pressure stability of mustar seed (*Sinapsis alba* L.) myrosinase. *Food Chemistry* 97: 263-271.

Eylen, D.V., Indrawati, M., Hendrickx, M., Loey, V. (2008). Effects of pressure/temperature treatments on stability and activity of endogenous broccoli (*Brassica oleracea* L. *cv. Italica*) myrosinase and on cell permeability. *Journal of Food Engineering* 89: 176-186.

FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. FAOSTAT. En: http://faostat.fao.org/, consultado el 09 de Mayo de 2012.

Fahey, J.W., Zalcmann, A.T., Talalay P. (2001). The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 56: 5-51.

Fayzalla, E.A., El-Barougy, E., El-Reayes, M.M. (2009). Control of soil-borne pathogenic fungi of soybean by biofumigation with mustar seed meal. *Journal of Applied Sciences* 9:1-7.

Ferrucho, R.L. & García, C. (2012). Construction of pathogenic, biologic, and genetic bases of the Colombian populations of *Rhizoctonia solani* AG-3 necessary for the development of management strategies of stem canker and black surf disease of potato de la Universidad Nacional de Colombia. Rosa Lilia Ferrucho; dir. Celsa Garcia Dominguez.

Filion, M., St-Arnaud, M., Jabaji-Hare, S.H. (2003). Direct quantification of fungal DNA from soil substrate using real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods* 53: 67-76.

Fox, R. (2006). *Rhizoctonia* stem and stolon canker of potato. *Mycologist* 20: 116-117.

Friberg, H., Edel-Hermann, V., Faivre, C., Gautheron, N., Fayolle, L., Faloya, V., Montfort, F., Steinberg, C. (2009). Cause and duration of mustar incorporation effects on soil-borne plant pathogenic fungi. *Soil Biology and Biochemistry* 41:2075-2084.

Galletti, S., Sala, E., Leoni, O.,Burzi, P.L., Cerato, C. (2008). *Trichoderma* spp. Tolerance to *Brassica carinata* seed meal for a combined use in biofumigation. *Biological Control* 45: 319-327.

Garrett, S. D. (1962). Decomposition of cellulose in soil by *Rhizoctonia solani* Kühn. *Transactions of the British Mycological Society*. 45: 115-120.

Gendy, A.A., El-Gindi, O.D., Hafez, A.L.S., Ateya, M. (2010). Glucosinolates, volatile constituents and biological activities of *Erysimum corinthium* Boiss. (Brassicaceae) *Food Chemistry* 118: 519-524.

Gimsing, A.L. & Kirkegaard, J,A. (2006). Glucosinolate and isothiocyanate concentration in soil following incorporation of Brassica biofumigants. *Soil Biology & Biochemistry* 38: 2255-2264.

Gimsing, A.L., Sorensen, J.C., Strobel, B.W., Hansen, H.C.B. (2007b). Adsorption of glucosinolates to metal oxides, clay minerals & humic acid. *Applied Clay Science* 35: 212–217.

Gimsing, A.N. & Kirkegaard, J.A. (2009). Glucosinolates and biofumigation: fate of glucosinolates and their hydrolysis products in soil. *Phytochemistry Reviews* 8: 299-310.

Harris, K., Young, I.M., Giligan, C.A., Often, W., Ritz, K. (2003). Effect of bulk density on the spatial organization of the fungus *Rhizoctonia solani* in soil. FEMS *Microbiology Ecology* 44:45-56.

Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M. (1996). Real Time Quantitative PCR. *Genome Research* 6: 986-994.

Ishimoto, H., Fukushi, Y., Yoishida, T., Tahara. S. (2000). *Rhyzopus* and *Fusarium* are selected as dominant fungal genera in rhizosphere of Brassicaceae. *Journal of Chemical Ecology* 26, 2387-2399.

Jeger, M.J., Hide, G.A., Van den Booger, P.H., Termorshuizen, A.J., y Van Baarlen P. (1996). Pathology and control of Soilborne fungal pathogens of potato. *Potato Research* 39: 437-469.

Johns, T. Kitts, W.D, Newsome, F., Tower, G.H. (1982). Anti-reproductive and other medicinal effects of *Tropaeolum tuberosum. Journal of Ethnopharmacology* 5: 149-161.

Kasuya, M., Andriantson, R., Oliver, R., Ota, Y., Tojo, M., Honjo, H., Fukui, R. (2006). Induction of soil suppressiveness against *Rhizoctonia solani* by incorporation of dried plant residues into soil. *Phytopathology* 96:1372-1379.

Kirkegaard, J.A. & Sarwar, M. (1998). Biofumigation potential of Brassicas. Variation in glucosinolate profiles of diverse field-grown Brassicas. *Plant Soil* 201: 71–89.

Kirkegaard, J.A. & Sarwar, M. (1999). Glucosinolate profiles of Australian canola (*Brassica napus annua* L.) and Indian mustard (*Brassica juncea* L.) cultivars: implications for biofumigation. *Australian Journal of Agricultural Research* 50: 315-324.

Kirkegaard, J.A. & Matthiessen, J.N. (2004). Developing and refining the biofumigation concept. *Agroindustria* 3: 233–239.

Ko, W.H. & Hora, F.K. (1971). A selective medium for the quantitative determination of *Rhizoctonia solani* in soil. *Phytopathology* 61: 07-710.

Laegdsmand, M., Gimsing, A.L., Strobel, B.W. et al., (2007). Leaching of isothiocyanates through intact soil following simulated biofumigation. *Plant Soil* 291: 81-92.

Lambrix, V., Reichelt, M., Miltchell-Olds, T., Kiebenstein, D.J., Gershenzon, J. (2001). The *Arabidopsis* epitiospecifier protein promotes the hydrolysis of glucosinolates to nitriles and influences *Trichoplusia* ni Herbivory. *The Plant Cell* 13: 2793-2807.

Larkin, R.P. (2003). Characterization of soil microbial communities under different potato cropping systems by microbial population dynamics, substrate utilization, and fatty acid profile. *Soil Biology & Biochemistry* 35:1451-1466

Larkin, R.P., Honeycutt, C.W. (2006). Effects of different 3-year cropping systems on soil microbial communities and rhizoctonia diseases of potato. *Phytopathology* 96: 68-79.

Larkin, R.P., Griffin, T.S. (2007). Control of soilborne potato diseases using Brassica green manures. *Crop Prot*ection 26: 1067–1077.

Lees, A.K., Cullen, D.W., Sullivan, L., Nicolson, M.J. (2002). Development of conventional and quantitative real-time PCR assays for the detection and identification of *Rhizoctonia solani* AG-3 in potato & soil. *Plant Pathology* 51: 293-302.

Logan, J., Edwards, K., Saunders, N. (2009). Real-time PCR. Current Technology and Applications. Caister Academic Press. Norfolk, UK.

Lloys-Jones, G., Laurie, A.D., Tizzard, A.C. (2005). Quantification of the *Pseudomonas* population in New Zealand soils by fluorogenic PCR assay and culturing techniques. *Journal of Microbiological Methods* 60: 217-224.

Mackay, I.M. (2004). Real time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection* 10: 190-212.

Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J. (1982). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Martin-Laurent F, Philippot L, Hallet S, Chaussod R, Germon JC, Soulas G, Catroux G. (2001). DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. *Applied Environmental Microbiology* 67: 2354–2359.

Martín, R.J.C & Higuera, M.B. (2012). Cuantificación y elucidación estructural de Glucosinolatos en accesiones Colombianas de cubio (Tropaeolum tuberosum) y Evaluación de su actividad Bilógica sobre algunos patógenos de la papa de la Universidad Nacional de Colombia. Jenny Carolina Martín Rincón; dir. Blanca ligia Higuera Mancipe.

Matthiessen, J.N. & Shackleton, M.A. (2005). Biofumigation: environmental impacts on the biological activity of diverse pure & plant-derived isothiocyanates. *Pest Management Sciences* 61: 1043-1051.

Matthiessen, J.N., Kirkegaard, J.A. (2006). Biofumigation and Enhanced Biodegradation: Opportunity and Challenge in Soilborne Pest and Disease Management. *Critical Reviews in Plant Sciences* 25: 235-265.

Mattner, S.W., Porter, I.J., Gounder, R.K., Shanks, A.L., Wren, D.J., Allen, D. (2008). Factors that impact on the ability of biofumigants to suppress fungal pathogens & weeds of strawberry. *Crop Protection* 27: 1165-1173.

McGuire, A.M. (2004). Mustard green manure crops replace fumigant and improve infiltration in potato cropping system. *Agroindustria* 3: 331-333.

Morra, M.J. & Kirkegaard, J.A. (2002). Isothiocyanate release from soil incorporated *Brassica* tissues. *Soil Biology & Biochemistry* 34: 1683–1690.

Motisi, N., Monfort, F., Faloya, V., Lucas, P., Doré, T. (2009). Growing *Brassica Juncea* as a cover crop, then incorporating its residues provide complementary control of *Rhizoctonia* root rot of sugar beet. *Field Crops Research* 113: 238-245.

Murashige, T & Skoog, F. (1962). A revised Medium for Rapid Grownth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.

Nogales, B. (2005). La microbiología del suelo en la era de la biología molecular: descubriendo la punta del iceberg. *Ecosistemas* 14: 41-51.

Ñustez, C. (2002). Efecto de diferentes niveles de inóculo de *Rhizoctonia solani* en semilla y dos sistemas de manejo, sobre el rendimiento y sanidad del tubérculo cosechado. Informe Técnico. Convenio 094 de 2000. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y Centro Internacional de Agricultura Tropical-CIAT. CORPOICA.

Okubara, P.A., Schroeder, K.L., Paulitz; T.C. (2005). Real-time polymeras chain reaction: applications to studies on soilborne pathogens. *Canadian journal Plant Pathology* 27: 300-313.

Omirou, M., Rousidou, C., Bekris, F., Papadopoulou, K.K., Menkissoglou-Spiroudi, U., Ehaliotis, C., Karpouzas, D.G. (2011). The Impact of Biofumigation and Chemical Fumigation Methods on the Structure and Function of the Soil Microbial Community. *Microbial Ecology* 61: 201-213.

Ortega, O.R., Kliebenstein, D.J., Arbizu, C., Ortega, R., Quiros, C.F. (2006). Glucosinolate Survey of Cultivated Masua (*Tropaelum tuberosum* Ruiz & Pavón) in the Cuzco Region of Perú. *Economic Botany* 60: 254-264.

Paulitz, T.C. & Schroeder, K.L. (2005). A New Method for the Quantification of *Rhizoctonia solani* and *R. oryzae* from Soil. *Plant Disease* 89: 767-772.

Picard, C., Nesme, X., Simonet, P. (2004). Detection and enumeration of soil bacteria using the MPN-PCR technique. Molecular Microbial Ecology Manual. Second Edition 2,15: 483-492.

Pingxiang, L., Gilardi, G., Lodovica, M., Garibaldi, A. (2010). Biofumigation with Brassica plants and its effect on the inoculums potential of *Fusarium yellows* of Brassica crops. *European Journal Plant Pathology* 26: 387-402.

Piñeros, N.C.J. & Ñústez, L.C.E. (2004). Evaluación de la variabilidad genética de la colección de cubio *(Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón*)* de la Univerdidad Nacional de Colombia Clara Janneth Piñeros Niño; dir. Carlos Eduardo Ñústez.

Poulsen, J.L., Gimsing, A.L., Halkier, B.A., Bjarnholt, N., Hansen, H.C.B. (2008). Mineralization on benzyl glucosinolate and its hydrolysis product the biofumigant benzyl isothiocyanate in soil. *Soil Biology & Biochemistry* 40: 135-141.

Rice, A.R., Johnson-Maynard, J.L., Thill, D.C., Morra M.J. (2007). Vegetable crop emergence and weed control following amendment with different Brassicaceae seed meals. *Renewable Agriculture and Food Systems* 22: 204-212.

Ritchie, F., McQuilken, P., Bain, R.A. (2006). Effects of water potential on mycelial growth, sclerotial production, & germination of *Rhizoctonia solani* from potato. *Mycological Research* 110: 725-733.

Rodríguez, K., Rivero, R., García, C. (2002). Estudios de la incidencia de los principales patógenos en semilla de papa (*Rhizoctonia*, *Rosellinia*, *Spongospora*, *Erwinia*, *Streptomyces* y *Verticillium*) de la Universidad Nacional de Colombia.

Rodríguez, L.E. (2009). Teorías sobre la clasificación taxonómica de las papas cultivadas (*Solanum* L. sect. *Petota* Dumort.). Una revisión. *Agronomía Colombiana* 3: 305-312.

Rumberger, A., Marschner, P. (2003). 2-Phenylethylisothiocyanate concentration and microbial community composition in the rizosfere of canola. *Soil Biology & Biochemistry* 35: 445-452.

Sarwar ,M., Kirkegaard, J.A., Wong, P.T.W., Desmarchelier, J.M. (1998). Biofumigation potencial of brassicas . *Plant and Soil* 201: 103-112.

Schena, L., Nigro, F., Ippolito, A., Gallitelli, D. (2004). Real-time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. *European Journal of Plant Pathology* 110: 893-908.

Secor, G.A., Gudmestad, N.C. (1999). Managing fungal diseases of potato. *Canadian Journal of Plant Pathology* 21: 213-221.

Smith, B.J. & Kirkegaard, J.A. (2002). *In-vitro* inhibition of soil microorganisms by 2-phenylethyl isothiocyanate. *Plant Pathology.* 51: 585-593.

Tevfik, D.M. (2006). Real time PCR. Taylor & Francis group, New York.

Thornton, C.R., & Gilligan, C.A. (1999). Quantification of the effect of the hyperparasite *Trichoderma Harzianum* on the saprotrosite growth dynamics of *Rhizoctonia solani* in compost using a monoclonal antibody-bases ELISA. *Mycologist Research* 103: 443-448.

Tokuhisa, J.G., Kraker, D., Textor, S., Gershenzon, J. (2004). The biochemical & molecular origins of aliphatic glucosinolate diversity in *Arabidopsis Thaliana*. *Secondary Metabolism in Model Systems* 19-38.

Truter, M. (2005). Etiology and alternative control of potato rhizoctoniasis in South Africa. University of Pretoria.1-122.

Tsror, L., Barak, R., Sneh, B. (2001). Biological control of black scurf on potato under organic management. *Crop Protection* 20: 145-150.

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

Van Dam, N.M., Tytgat, T.O., Kirkegaard, J.A. (2009). Root & shoot glucosinolates: a comparison of their diversity, function & interactions in natural & managed ecosystems. *Phytochemistry Review 8:* 171-186.

Vaughn, S.F. & Berhow, M.A. (2005). Glucosinolates hydrolysis products from various plant sources: pH effects, isolation & purification. *Industrial crops and products* 21: 193-102.

Villareal, H.J., Porras, P.D., Santa, A., Lagoeyte, J., Muñoz, D. (2007). Costos de producción de papa en las principales zonas productoras de Colombia. Federación Colombiana de productores de papa FEDEPAPA 1-38.

Von Felten A., Defago, G. Maurhofer, M. (2010). Quantification of Pseudomonas fluorescens strains F113, CHAO and Pf153 in the rhizosfere of maize by strain-specific real-time PCR unaffected by the variability of DNA extraction efficiency. Journal of *Microbiological Methods* 81: 108-115.

Weinhold, A.R. (1977). Population of *Rhizoctonia solani* in Agricultural Soils Determined by a Screening Procedure. *Phytopathology* 67: 566-569.

Wild, A. (1992). Condiciones del Suelo y Desarrollo de las Plantas según Russell. Mundi-Prensa Libros. 1045 p.

Zentilin, L., Giacca, M. (2007). Competitive PCR for precise nucleic acid quantification. Nature Protocols. 2: 2092-2104.