



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE ESPECIES DE ESTREPTOMICETOS  
AISLADOS DE SUELOS PAPEROS DE CARCHI Y CHIMBORAZO.

AUTOR

Sofía Andrea Robalino Márquez

AÑO

2018



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE ESPECIES DE ESTREPTOMICETOS  
AISLADOS DE SUELOS PAPEROS DE CARCHI Y CHIMBORAZO.

Trabajo de Titulación presentado en la conformidad con los requisitos  
establecidos para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología.

Profesor Guía

M. Sc. Wilson David Tapia López

Autora

Sofía Andrea Robalino Márquez

Año

2018

## **DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA**

“Declaro haber dirigido el trabajo, Identificación molecular de especies de estreptomicetos aislados de suelos paperos de Carchi y Chimborazo, a través de reuniones periódicas con la estudiante Sofía Andrea Robalino Márquez, en el semestre 2018-1, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

---

Wilson David Tapia López

Máster en Ciencias de Gestión y Planificación Ambiental.

CC: 1714205281

## **DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR**

“Declaro haber revisado este trabajo, Identificación molecular de especies de estreptomicetos aislados de suelos paperos de Carchi y Chimborazo, de la estudiante Sofía Andrea Robalino Márquez, en el semestre 2018-1, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

---

Fabio Marcelo Idrovo Espín

Doctor en Ciencias (Ciencias Biológicas: Biotecnología).

CC: 1705952255

## **DECLARACIÓN DEL DIRECTOR CIENTÍFICO**

“Declaro haber dirigido científicamente al estudiante Sofía Andrea Robalino Márquez, para la realización de su trabajo experimental de titulación, Identificación molecular de especies de estreptomicetos aislados de suelos papeiros de Carchi y Chimborazo, en base al método científico, conduciéndole con coherencia en el conjunto de experimentos realizados, y orientando sus conocimientos para lograr los objetivos propuestos”.

---

Alma Rosel Koch Kaiser

Máster en Ciencias de Control Biológico.

CC: 1708880792

## **DECLARACIÓN DEL ESTUDIANTE**

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”.

---

Sofía Andrea Robalino Márquez

CC: 1715548135

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Dios por darme la vida. A mis padres, por toda su paciencia y comprensión. Gracias a la Msc. Alma Koch, directora del proyecto, al Dr. Francisco Flores y el Grupo GIMA por la información y recursos brindados. A Susana Robalino, por el financiamiento de parte de este proyecto. A mis compañeros del lab Liz, Renato, Ale, Fiama, Pao, Álvaro, Esteban, Jorge, Lalo, Heidi, Lis, Vale, Jeni, Shari, Stefy, Lau, Denyss, Luis, Ari y Pao. A Dany y Ari por su ayuda en el muestreo de suelos.

## **DEDICATORIA**

A mis padres, Blanca y Jorge, por el inmenso amor y todo el apoyo entregado en cada etapa de mi vida. A mi hermano, Jorge, por siempre brindarme alegría. A mis abuelitos, que como luceros me protegen en el día a día. A mis tíos Gladys y Francisco, y mis hermanitos mayores Susi, Erika, Verito, Juan y Xavi, quienes me han cuidado incondicionalmente. Al amor de mi vida Daniel, por enseñarme que el amor de verdad sí existe. A las mininas, Marco y Sofy por su verdadera amistad.

## RESUMEN

En Ecuador, no se tiene información representativa específica que describa a nivel de especie la ecología, fisiología y presencia de estreptomicetos aislados de suelos. Sin embargo, a nivel de género, sí se ha reportado su acción antagónica ante *Phytophthora infestans* y *Rhizoctonia solani*, dos patógenos de cultivos de papa. El objetivo principal del proyecto fue identificar mediante biología molecular las especies de estreptomicetos aislados en el año 2009 de suelos paperos de Carchi y Chimborazo, reportadas como antagónicas frente a dichos patógenos y comparar con información del bioma de suelos de estas provincias en el año 2017. Para ello, se activaron las cepas liofilizadas con mayor capacidad antagónica y se aislaron, se extrajo el ADN y se usaron cebadores genéricos para verificar si pertenecían al género *Streptomyces*. Posteriormente, a partir de cebadores universales 1492R y 27F se realizó una secuenciación Sanger para el gen 16S ARNr y finalmente, una metagenómica de muestras actuales de suelos paperos de las mismas provincias. Las cepas que se aislaron después de la activación fueron C92, CH71, C41, C37, CH44, C72 y C75. Solo las cinco primeras cepas presentaron bandas del tamaño esperado para los cebadores genéricos AM45 (1000pb) y Actino 16S (350 pb). Las especies de las cepas fueron identificadas por secuenciación Sanger como *Streptomyces* sp., *Streptomyces clavifer*, *Streptomyces griseochromogenes*, *Streptomyces anulatus*, *Streptomyces avermitilis*, *Bacillus pseudomycoides* y *Pseudomonas* sp., respectivamente con porcentajes de identidad menores a 98.7% para C37, C72 y C75. En la metagenómica solo se obtuvo indicio de que la especie *Streptomyces hygrosopicus* puede estar presente con un porcentaje de identidad de 60% en los suelos paperos de Chimborazo. Se concluye que los cebadores genéricos permiten descartar especies no pertenecientes al género *Streptomyces*, los cebadores universales ayudan a identificar a nivel de especie en base al gen 16S ARNr y que la cepa C37, podría ser una línea nueva de la especie *Streptomyces anulatus* según su porcentaje de identidad.

## ABSTRACT

In Ecuador, there is no specific representative information that describes the ecology, physiology and presence of streptomycetes isolated from soils at the species level. However, at the level of genus, its antagonistic action has been reported against *Phytophthora infestans* and *Rhizoctonia solani*, two pathogens of potato crops. The main objective of the present investigation was to identify, through molecular biology, the species of streptomycetes isolated in 2009 from paper soils of Carchi and Chimborazo reported as antagonists against the aforementioned pathogens and to compare them with soil biome information from these same provinces in 2017. For this purpose, lyophilized strains with higher antagonistic capacity were activated and isolated, the DNA was extracted, and generic primers were used to verify if they belonged to the genus *Streptomyces*. Subsequently, was carried out a Sanger sequencing for the 16S rRNA gene out from universal primers (1492R and 27F) and a metagenomics of current samples of paper soils from the same provinces. Strains that were isolated after activation were C92, CH71, C41, C37, CH44, C72 and C75. Only the first five strains showed bands of the expected size for the generic primers AM45 (1000 bp) and Actino 16S (350 bp). The species of the strains were identified by Sanger sequencing as *Streptomyces* sp, *Streptomyces clavifer*, *Streptomyces griseochromogenes*, *Streptomyces anulatus*, *Streptomyces avermitilis*, *Bacillus pseudomycooides* and *Pseudomonas* sp., respectively and with identity percentages lower than 98.7% for C37, C72 and C75. In metagenomics, only evidence was obtained that the *Streptomyces hygrosopicus* species may be present with a 60% identity percentage in Chimborazo potato crop soils. Concluding, the generic primers allow to discard species not belonging to the genus *Streptomyces*, the universal primers help to identify at the species level based on the 16S rRNA gene. The C37 strain, could be a new line of the species *Streptomyces anulatus* according to its percentage of identity.

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Antecedentes .....	1
1.2 Planteamiento del problema.....	3
1.3 Objetivo General: .....	4
1.4 Objetivos Específicos: .....	4
1.5 Justificación de la investigación .....	4
2. MARCO TEÓRICO.....	5
2.1 Cultivos de papa ( <i>Solanum tuberosum</i> ) .....	5
2.2 <i>Phytophthora infestans</i> .....	6
2.3 <i>Rhizoctonia solani</i> .....	9
2.4 Control Biológico .....	11
2.4.1 Agentes de biocontrol.....	12
2.5 Suelos supresivos .....	13
2.6 Métodos de identificación de microorganismos.....	15
2.6.1 Pirosecuenciación bTEFAP .....	15
3. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL .....	16
4. PROCEDIMIENTOS.....	17
4.1 Determinación de la población y muestra .....	17
4.1.1 Población.....	17
4.1.2 Muestra.....	18
4.2 Materiales y métodos para la obtención de datos .....	18
4.2.1 Selección de estreptomicetos.....	18
4.2.2 Activación de las cepas seleccionadas aisladas en el año 2009..	18
4.2.3 Extracción de ADN genómico de las muestras activadas y aisladas .....	19
4.2.4 Paneo de cepas aisladas en el año 2009 seleccionadas para verificación del Género <i>Streptomyces</i> .....	20
4.2.5 Identificación a nivel de especie a partir de cebadores universales de las muestras aisladas en el año 2009.....	22

4.2.6	Información del microbioma de los suelos en el año 2017 .....	23
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>23</b>
5.1	Selección de estreptomicetos.....	24
5.2	Activación de las cepas seleccionadas .....	24
5.3	Extracción de ADN genómico.....	29
5.4	Paneo de cepas aisladas para verificación del Género <i>Streptomyces</i> .....	31
5.5	Identificación a nivel de especie a partir de cebadores universales .....	34
5.6	Información del microbioma de los suelos en el año 2017...	38
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>44</b>
6.1	Conclusiones.....	44
6.2	Recomendaciones.....	45
	<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>46</b>

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Antecedentes

Hay aproximadamente quinientas especies de actinomicetos descritos formalmente (Cordovez *et al.*, 2015). Los actinomicetos tienen la capacidad de causar antagonismo ante comunidades microbianas, además, producen compuestos activos, entre ellos reguladores del crecimiento de plantas, antibióticos contra bacterias y hongos y enzimas líticas que degradan la pared celular como protección ante patógenos (Goudjal *et al.*, 2014 y Medina, 2014).

Específicamente, los miembros del género mencionado producen alrededor de diez mil metabolitos secundarios, así como compuestos orgánicos volátiles. Los actinomicetos están siendo usados como agentes biocontroladores de enfermedades de plantas contra patógenos fúngicos, como *Fusarium*, *Alternaria*, *Rhizoctonia solani* y *Phytophthora infestans* (Goudjal *et al.*, 2014 y Medina, 2014).

Una de las familias de los actinomicetos son los Streptomycetes, dentro de estos, el género más común (95%) extraído a partir de suelos es *Streptomyces* (Franco, 2011).

En el Ecuador, no hay suficiente información científica representativa que describa la presencia, ecología, fisiología, e identificación de los estreptomycetos aislados de suelos. El presente trabajo experimental es una continuación de una serie de investigaciones que buscan aportar información novedosa respecto a este tema. En el 2010, se realizó el “estudio de supresión a *Phytophthora infestans* por poblaciones microbianas aisladas de suelos paperos de la provincia de Chimborazo en dos diferentes tiempos de muestreo” (Mogrovejo, 2010). Para el 2011, se demostró la presencia de varias especies de actinomicetos silvestres en suelos paperos de Carchi, Pichincha, Chimborazo y Loja que inhiben el crecimiento de *Phytophthora infestans* (Villamarín, 2011). En el 2014, se reportó su función como biocontroladores frente a *P. infestans* y *R.*

*solani* en tres de estas provincias mediante pruebas de antagonismo *in vitro* y pruebas de invernadero *in vivo* en plantas de papa (*Solanum tuberosum*) (Garcés, 2014; Gómez, 2014; Medina, 2014).

En el 2016, se identificó microbiológica y molecularmente tres de las cepas de actinomicetos aislados en la serie de experimentaciones antes mencionadas con los cebadores genéricos Actino-16S-F (AO3F), Actino-16S-R (AO4R), AM45F y AM45R, obteniendo como resultados las especies *Streptomyces acidiscabies*, *Streptomyces clavifer* y *Streptomyces anulatus* (Paz, 2016). En 2015, una investigación realizada en Emiratos Árabes Unidos utilizó los mismos pares de cebadores para identificación molecular exitosamente, con el fin de determinar si ciertos agentes antitumorales son compuestos bioactivos producidos por cepas de bacterias *Streptomyces* aislados de suelos (Saadoun, Al-Joubori, y Al-Khoury, 2015).

El par de cebadores universales 27F y 1492R, reconocidos por amplificar la secuencia de genes que codifican para 16S ARNr, fueron usados para verificar la presencia de actinomicetos en intestinos de lobos cautivos (Watry, Croonquist, Braido, y Danneman, 2015). En Algeria, se recuperó una bacteria filamentosa del suelo forestal de *Tikjda*, la cual fue identificada mediante el uso del mismo par de cebadores, encontrándose una similitud del 99% con el género *Streptomyces* (Bettache *et al.*, 2016).

Múltiples investigaciones acerca de la diversidad microbiana en muestras ambientales se han hecho a partir de la pirosecuenciación FLX amplicón bacteriana codificada en cadena (bTEFAP de las siglas en inglés *Bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing*). Por ejemplo, el lago de Lonar, en la India se evaluó mediante dicho método la codificación de la diversidad bacteriana y arquea (Dudhagara, Ghelani, Patel, Chaudhari, y Bhatt, 2015). También, se han realizado comparaciones del microbioma del suelo entre suelos afectados manejados con fin agrícola y suelos naturales (Acosta, Dowd, Sun, y Allen, 2008).

En Canadá, se realizó una bioprospección de la diversidad bacteriana en sedimentos marinos de cuatro sitios diferentes de *New Brunswick* con el objeto de hallar la presencia de actinomicetos, por su perfil como productores de metabolitos secundarios de interés biotecnológico (Duncan, Haltli, Gill, y Kerr, 2014).

## 1.2 Planteamiento del problema

La papa (*Solanum tuberosum*) es uno de los cultivos de fuente alimentaria más consumido a nivel mundial y uno de los más representativos de la zona andina, sobre todo, por su función como fuente de ingresos económicos, no solo a nivel nacional, sino también para los agricultores de clase social baja (Culqui, 2006; López y Yoelquis, 2009). Ocupa el séptimo lugar de producción nacional y se centra en Carchi, Chimborazo, Cotopaxi, Pichincha y Tungurahua (Andrade, Bastidas, y Sherwood, 2002).

*Phytophthora infestans* Mont. De Bary y *Rhizoctonia solani* Khün, son conocidos mundialmente como patógenos responsables del tizón tardío y costra negra en papa, respectivamente (Carrera, 2010; Pérez y Forbes, 2008). Los patógenos mencionados causan devastación de los cultivos, generando importantes pérdidas económicas debido a bajos índices de productividad en países en los que el producto representa el consumo diario de poblaciones enteras. En Ecuador, el 69% de los cultivos de papa se han perdido a causa de *R. solani* (Oyarzún *et al.*, 2002)

Las enfermedades del suelo se encuentran distribuidas en zonas de cultivos de papa alrededor de todo el Ecuador, principalmente en zonas frías y/o húmedas. Por ello, el problema se ha intentado solucionar con la aplicación de fungicidas e insecticidas, incluso, aplicados en los cultivos como medidas de prevención lo que genera también un riesgo de desarrollo de resistencia en microorganismos patógenos. Además, su utilización es poco competitiva si se toma en cuenta que

aumentan los costos de producción. Adicionalmente, causan daño al ecosistema debido a que pueden generar erosión del suelo (Medina, 2014).

A pesar de que se ha demostrado la capacidad antagónica de estreptomicetos frente a los dos patógenos citados, no se tiene suficiente información exacta a nivel de especies del género *Streptomyces*, lo que frena un avance a nivel científico, ya que, en base al conocimiento de la diversidad microbiana existente en los suelos papeiros, se puede investigar y establecer soluciones integrales para el control de dichos patógenos. También, se conoce que hay especies de estreptomicetos patógenos para plantas de papa y para humanos, por lo que el antagonismo frente a los patógenos de interés no certifica seguridad para la salud humana (Mora, 2010).

### **1.3 Objetivo General:**

Identificar por métodos de biología molecular las especies de estreptomicetos aislados de suelos papeiros de Carchi y Chimborazo.

### **1.4 Objetivos Específicos:**

- Realizar un paneo de las cepas aisladas en el año 2009 con cebadores genéricos.
- Identificar a nivel de especie a los aislados obtenidos mediante secuenciación y análisis del gen 16S con cebadores universales.
- Obtener información genética del microbioma de los suelos en el año 2017 mediante metagenómica y pirosecuenciación bTEFAP.

### **1.5 Justificación de la investigación**

A partir del conocimiento de la presencia de variedad de especies de estreptomicetos en suelos papeiros de cuatro provincias del país, que son antagónicas a patógenos de interés de cultivos de papa, la identificación

molecular a nivel de especie sentaría un punto de partida para investigaciones científicas en el tema.

Tener un conocimiento específico de la microbiota de los suelos, así como estar al tanto sobre el antagonismo ante *P. infestans* y *R. solani* permitiría comparar metodologías para contrarrestar a dichos patógenos y hacer un contraste con estudios que se desarrollan en otros países sobre el mismo problema.

Otro beneficio, a partir de la identificación de las especies de las cepas, sería la posible producción de biocontroladores específicos para patógenos, lo cual sería una alternativa sustentable para producción agrícola y amigable con el ecosistema que a su vez promovería el campo de acción de la agrobiotecnología.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Cultivos de papa (*Solanum tuberosum*)**

Existen reportes de que la papa fue domesticada en Sudamérica hace aproximadamente siete a diez mil años. Pertenece a la familia Solanaceae, así como el tabaco, tomate o el ají. Es una planta dicotiledónea herbácea, con tallo leñoso y grueso, hojas completas y alternas, desarrollo recto o rastrero, con una altura de tallos aéreos de entre 0.6 hasta 1 m. Tiene la capacidad de reproducirse mediante semillas o a partir de la siembra del tubérculo (Crissman, Sherwood, y Yanggen, 2003). La papa se produce a una temperatura entre 6 a 18°C en zonas templadas frías de la sierra ecuatoriana y en alturas de 2800 a 3500 msnm (Andrade *et al.*, 2002)

La papa ha ido adquiriendo gran importancia a nivel mundial a lo largo de los años, de la cual ya existen distintas variedades que son cultivadas y aprovechadas alrededor del mundo, razón por la cual, la investigación del tubérculo ha adquirido gran relevancia (Zepeda y Menjivar, 2016) y su genoma

ya se encuentra secuenciado gracias al Consorcio de Secuenciación del Genoma de la Papa (The Potato Genome Sequencing Consortium, 2011).

En el Ecuador, la papa resulta en uno de los alimentos básicos de la ingesta diaria, además de constar como el cuarto alimento de mayor consumo en el mundo. Puede implementarse en dietas saludables y variadas y proporciona el sustento económico de una gran cantidad de familias de la zona rural interandina ecuatoriana (Arismendi, 2002). Para el mejoramiento de los cultivos de papa, se requiere de variadas condiciones indispensables, como el aplicar una estrategia específica y cambiante de mejoramiento, además de un control constante del crecimiento que garanticen un buen rendimiento y estabilidad del producto (Estévez, Salomón, Castillo, Ortiz, y Ortiz, 2005).

## **2.2 *Phytophthora infestans***

*Phytophthora infestans* es un protista fungoide perteneciente a los Oomycetes, y se considera como uno de los principales patógenos que afectan al género *Solanum*. Las especies que abarca el género de *Phytophthora* son responsables de distintas enfermedades a lo largo de todo el ciclo de crecimiento de las plantas del género mencionado, provocando la pudrición de tubérculos (Figura 1), raíces, yemas e incluso frutos; además de causar tizones que pueden afectar al follaje, ramas jóvenes y frutos. Ciertas especies atacan selectivamente a un tipo de hospedero, sin embargo, existen otras menos específicas que pueden parasitar varios tipos de hospederos, causando tanto signos y síntomas similares, como diferentes (Agris, 2002).

De entre las especies responsables de enfermedades en la papa, *Phytophthora infestans* es la que más se ha estudiado. La enfermedad característica provocada por este espécimen se conoce como tizón tardío de la papa, y es capaz de destruir los tallos y el follaje. En caso de que el protista cuente con condiciones climáticas favorables y no exista algún tipo de control en los cultivos,

le tomará un promedio de entre una a dos semanas en infectar y marchitar el total de las plantas (Agrios, 2002).



Figura 1. Papa con tizón tardío y papa sana.

Tomado de (BAYER, s/f).

El tizón tardío representa la enfermedad de más riesgo para los cultivos de papa en el Ecuador, presentándose generalmente a alturas entre los 2800 y 3400 msnm. El desarrollo de esta enfermedad se ve favorecida por condiciones como: temperaturas entre 12 a 18°C, humedad, lluvias matinales, niebla, sol intenso por la tarde; condiciones que encajan con la sierra ecuatoriana, además de siembras escalonadas de las papas durante todo el año. El uso de especies de papa susceptibles a la enfermedad también es una causa del agravamiento de la situación (Oyarzún *et al.*, 2002).

*P. infestans* es capaz de reproducirse de manera sexual y asexual. La reproducción sexual resulta en la creación de anteridios de tipo diploide y oogonios que después de la meiosis producen una oospora diploide que forma el esporangio, así las zoosporas que se liberan de este siguen el ciclo infeccioso (Ulloa, 2015). Por otro lado, la reproducción asexual involucra necesariamente a un hospedero, motivo por el cual se le considera como un parásito obligado. Conforme infecta los cultivos de papa, *P. infestans* puede completar varios ciclos

de reproducción asexual, encontrando que en la sierra ecuatoriana, un solo ciclo puede culminar entre tres y quince días (Fry, Thurston, y Stevenson, 2001).

El modo en que se transmite la enfermedad entre las plantas de papa es por medio de esporangios que se liberan cuando existe un cambio brusco de humedad, y cuyas esporas serán transportadas por el viento. Dependiendo la temperatura, ocurrirán diferentes eventos de la enfermedad, teniendo que la penetración del patógeno en la planta se da a temperaturas entre 10 y 29°C, el máximo crecimiento con lesiones se da a 22.5°C, la esporulación a 13.7°C y el periodo de latencia mínimo ocurre a 23°C (Andrade, Hijmans, Forbes, Fry y Nelson, 2005).

Cuando se presenta una temperatura de entre 12 a 15°C con una humedad relativa del 95 al 100%, se producen zoosporas en el interior del esporangio. Con una humedad relativa alta en el ambiente y temperaturas que fluctúan entre los 20 y 24°C, los esporangios producirán un tubo germinativo que ingresará directamente en los tejidos, con lo que ingresarán también las zoosporas. Este modo de infección resulta ser menos agresivo en comparación a cuando se enquistan las zoosporas y germinan sobre la planta (Torres *et al.*, 2011).

Los signos más comunes que se suelen presentar incluyen manchas húmedas circulares y de forma irregular, que generalmente se sitúan en la punta o bordes de las hojas, las cuales pueden extenderse rápidamente si las condiciones les favorecen, formando zonas cafés o atizonadas con bordes irregulares. En la parte contraria de la hoja, situada al borde de las lesiones, se forman manchas blancas, correspondientes a las hifas del patógeno. Al poco tiempo de la infección, todos los folíolos se verán afectados, provocando la muerte de las hojas. En caso de tener estaciones de humedad prolongada, la enfermedad se presentará de manera agresiva, generando la pudrición de los órganos internos y aéreos, con la consecuente muerte de la planta. En climas secos, las funciones normales del patógeno se inhiben, permaneciendo en estado de latencia hasta que el ambiente se torne húmedo (Agrios, 2002).

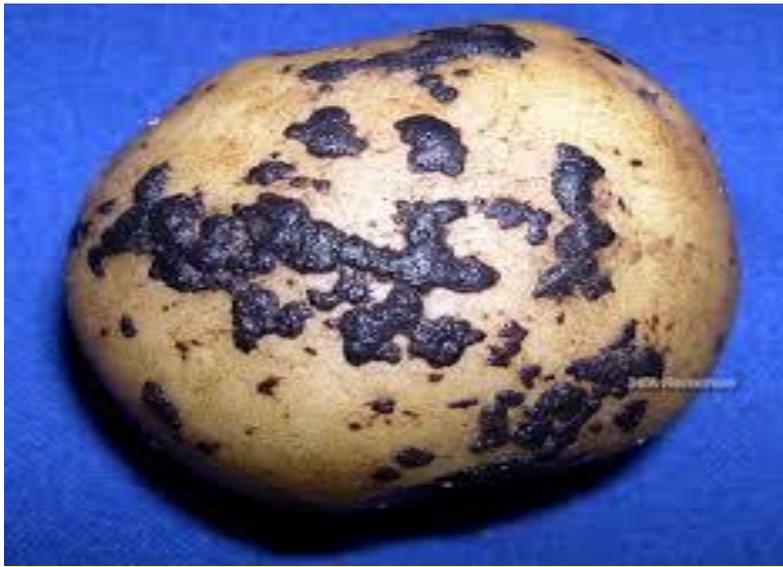
De forma natural, la papa presenta dos tipos de resistencias genéticas frente al tizón tardío: resistencia diferencial y resistencia general o de campo. La primera resistencia funciona específicamente para determinadas características del patógeno y está dirigida por una cantidad reducida de genes. Por otro lado, la resistencia general funciona de manera continua y está dirigida por una gran cantidad de genes que presentan un efecto no específico frente al patógeno. La resistencia diferencial, es fácilmente eludida por el tizón tardío, por lo cual no resulta en un método efectivo para combatir la enfermedad (Oyarzún *et al.*, 2002).

### **2.3 *Rhizoctonia solani***

*Rhizoctonia solani* es un hongo que pertenece al grupo de los basidiomicetos. Julius Khün lo describió por primera vez en 1858. Se conforma de células alargadas, donde la hifa principal crece conforme le brotan ramificaciones en un ángulo de 90 grados, característica que suele ser usada para detectar la enfermedad (Agrios, 2002).

Cuando se dan las condiciones de humedad y altas temperaturas, el hongo desarrolla su fase de reproducción sexual o teleomorfa, produciendo basidiosporas y se denomina como *Thanatephorus cucumeris* (Agrios, 2002). A pesar de que esta forma de vida no sea muy común en la naturaleza ha habido reportes en Carchi, Tungurahua y Chimborazo. No produce esporas asexuales, debido a sus células somáticas multinucleadas la forma de supervivencia del hongo ocurre por reproducción asexual o anamorfa como esclerocio indiferenciado, es decir, como una masa compacta de micelio duro que reserva nutrientes, ya sea en los tubérculos, o formando un micelio vegetativo en el resto de la planta (Cedeño *et al.*, 2001 y Oyarzún *et al.*, 2002). De este modo, puede sobrevivir por tiempos prolongados en el suelo sin la presencia de hospederos siendo capaz de colonizar variedad de sustratos y soportar cambios ambientales repentinos (Tovar, 2008).

Este microorganismo se encuentra en los suelos paperos en el país causando la enfermedad denominada como rizoctoniasis o costra negra, la cual hace brotar pequeños esclerocios negros y endurecidos sobre la superficie del tubérculo (Figura 2), siendo muy difíciles de desprender (Agrios, 2002).



*Figura 2.* Papa con Costra negra o rizoctoniasis.

Tomado de (INIA Remehue, 2015).

La anastomosis es la unión entre dos elementos anatómicos pertenecientes al mismo organismo o estructura. Se reconocen alrededor de doce grupos anastomóticos (AGs) que permiten diferenciar cepas de *R. solani* por la fusión de sus hifas (AG-1 al AG-11 y AG-BI), característica que puede ser vista fácilmente en un microscopio. La anastomosis ha sido evaluada mediante análisis bioquímicos y comprobada por métodos moleculares. Pueden o no ser patógenos, tanto AG-8 como AG-BI pueden interactuar con los otros AGs. Los AG-1 al AG-5 y AG-8 han sido relacionados con cultivos y suelos de papa (Cedeño *et al.*, 2001). Los AGs que producen efectos bien definidos son: AG-1, que produce pudrición de hipocótilo y semillas, además de generar tizones en las partes aéreas de la planta, AG-2, que genera chancro y problemas en la raíz de las crucíferas, AG-3, que se caracteriza por atacar principalmente a la planta, generando cancrrosis de tallo y estolones, además de formar esclerocios negros

en los tubérculos y AG-4, que menos específica en cuanto a su hospedero, puede afectar a una gran variedad de especies, produciendo la pudrición de semillas y del cuello de la planta (Agrios, 2002).

Una vez que *R. solani* ha infectado un cultivo, este hongo se quedará de forma indefinida, ya sea en forma de esclerocio en el suelo o micelio en las plantas infectadas. Son capaces de diseminarse por la lluvia, el riego e incluso por los tubérculos infectados. La temperatura ideal para su desarrollo se encuentra entre 15 a 18°C, variando según la raza o grupo de anastomosis, sin embargo, se ha observado que algunos llegan a su mayor actividad a temperaturas de 35°C, favoreciendo la infección cuando existen suelos húmedos y se trata de plantas de crecimiento lento (Agrios, 2002).

## **2.4 Control Biológico**

La integridad de los suelos, así como su fertilidad, se ve afectada por el uso intensivo de fertilizantes, además de la sobreexplotación agrícola. Con el fin de promover una agricultura sostenible, se investigan alternativas biológicas que reemplacen el uso de agroquímicos. El desarrollo de posibles técnicas basadas en microorganismos asociados a plantas pueden ser la solución, por ello, los estudios relacionados con los factores que regulan la actividad microbiana en combinación con el mantenimiento de la fertilidad del suelo y la nutrición vegetal resultan de suma importancia, por lo cual se ha fomentado su estudio en los últimos años (Franco, 2011).

Como ya se ha mencionado, el control biológico tiene el potencial de controlar y eliminar organismos indeseables, considerados como nocivos, mediante el uso de especies, ya sean de origen natural o modificadas. Existen varios mecanismos con la capacidad de ofrecer un biocontrol, tales como: competencia, antibiosis (interacción biológica entre organismos perjudicial para uno de estos), resistencia sistemática, secreción de enzimas, parasitismo, entre otros, los cuales se verán afectados por factores bióticos y abióticos. Otro punto de

relevancia es que el antagonismo puede producirse por la acción de uno de los mecanismos mencionados o por varios de ellos, ya sea que un solo microorganismo esté implicado o un consorcio microbiano (Lara y Ferrera, 2007).

#### **2.4.1 Agentes de biocontrol**

En cuanto a la producción agrícola, un gran número de microorganismos con potencial antagónico han sido estudiados, multiplicados y formulados para su uso comercial. Varios productos ya se encuentran disponibles en el mercado, cuya base se sustenta en algún organismo antagónico, como es el caso de *Trichoderma harzianum* o Trichosoil (nombre comercial) para el control de *Rhizoctonia* y *Fusarium*, *Bacillus subtilis* y *B. licheniformis* como Nemix C utilizado para reducir las poblaciones de nemátodos, *Lecanicillum lecanii* o Lecafol y *Bacillus thuringiensis* utilizados como insecticida, entre otros.

A pesar de conocer el poder antagónico de varios organismos saprófitos (organismo que consume sustancias y residuos en descomposición) usados para el control de patógenos, dado principalmente por la producción de compuestos activos líticos, antibióticos, antifúngicos, volátiles, entre otros, el mecanismo de acción específico a nivel bioquímico y molecular de cómo algunos de ellos actúan sobre un patógeno aún no se tiene totalmente claro, debido a la falta de estudios. Sin embargo, se conoce dos tipos de tratamiento a la hora de combatir enfermedades presentes en el suelo, uno directo, donde se introduce un organismo benéfico, y otro indirecto, que consiste en propiciar las condiciones necesarias para que los organismos benéficos se desarrollen de forma natural, como el monocultivo (Oyarzún *et al.*, 2002).

##### **2.4.1.1 Actinomicetos**

Los actinomicetos corresponden a un filo y clase de bacterias Gram positivas en forma de bacilos, que presentan ciertas características que les asemejan a los hongos, como la capacidad de desarrollar un micelio filamentoso. Estos

organismos abundan en suelos, aunque también se los puede encontrar en ambientes acuáticos. En el suelo se comportan como bacterias aerobias, desarrollándose mejor en ambientes calientes que fríos, además que presentan poca tolerancia a la acidez, donde su actividad biológica se ve disminuida a un pH menor a cinco (Ezziyyani, Sánchez, Requena, Rubio, y Castillo, 2004).

Algunas especies de actinomicetos se han aislado a partir de suelo, donde los microorganismos encontrados son predominantemente del género *Streptomyces*. Presentan un olor característico a tierra húmeda (geosmina), y colonizan la rizósfera, donde ejercen su acción antagónica contra hongos fitopatógenos, además de promover, indirectamente, el crecimiento vegetal (Carrillo, 2003). Se ha encontrado que promueven el equilibrio ecológico en zonas de producción agrícola, gracias a que proporcionan un mejoramiento estructural del suelo, producen enzimas como quitinasas, glucanasas o peroxidasas con poder antibacterial, que inhibe la proliferación de microorganismos patógenos, ayudando directamente al desarrollo de las plantas y mejorando la producción agrícola (Franco, 2011).

La importancia del género *Streptomyces* radica en el control de enfermedades en plantas causadas por *Phytophthora infestans* y *Rhizoctonia solani* (Quiñones, Evangelista, y Rincón, 2016). Sus enzimas extracelulares secretadas tienen la capacidad de producir la lisis de paredes celulares, debilitar la integridad estructural y viabilidad del organismo objetivo. Ejemplos de enzimas como la celulasa,  $\beta$ -(1-3)-glucanasa y quitinasa, degradan las estructuras vegetativas de los hongos, e incluso tienen la capacidad de destruir conidios y esporangiosporas a una menor velocidad, convirtiéndolas en moléculas idóneas para un estudio de control biológico (Prescott, Harley, y Klein, 2002).

## **2.5 Suelos supresivos**

El suelo es un medio que permite mantener el desarrollo de la planta, un ecosistema biológico activo que contiene un microbioma que puede ser benéfico

o dañino (Hao, 2016). Cuando el suelo presenta condiciones que favorecen el crecimiento y desarrollo de poblaciones de microorganismos antagonicos, se habla de un suelo supresivo, caso contrario se denominan conductivos (Oyarzún *et al.*, 2002).

Existe la supresión general y específica según el número de microorganismos supresivos. La supresión general se refiere al bioma total del suelo, debe existir más de un grupo específico de microorganismos, no puede eliminarse por completo en presencia de fungicidas y bactericidas y deben ser activas desde temperaturas entre 5 a 60 °C. Por otro lado, la supresión específica, consiste en un grupo de microorganismos que actúan sobre un patógeno específico, son activos en temperaturas menores a 20°C y no soportan fungicidas, bactericidas o calor húmedo. La supresividad puede perdurar incluso sin presencia de plantas (Doussoulin y Moya, 2011).

Los microorganismos presentes en suelos supresivos pueden ayudar a desarrollar la respuesta de defensa de la planta o bien o inhibir el desarrollo del fitopatógeno mediante competencia por nutrientes o por producción de enzimas líticas. Si se trata de un hongo benéfico, se denomina PGPF (Fungi promotor del crecimiento vegetal), si es una bacteria PGPB y para una rizobacteria PGPR, que son las bacterias benéficas más comunes en suelos (Rossi, 2016). Se conoce que las poblaciones bacterianas más comunes en suelos supresivos son los bacilos, pseudomonas y estreptomicetos, A pesar de existir especies supresivas y patogénicas del género *Streptomyces* en suelos de papa, superan en cantidad los estreptomicetos benéficos (Hao, 2016).

Una clara evidencia de suelos supresivos se ha podido encontrar en suelos ecuatorianos, los cuales presentan una respuesta contra *P. infestans* en papa, reduciendo las lesiones que el patógeno provoca en el tubérculo (Oyarzún *et al.*, 2002). La supresividad puede interrelacionarse con factores físicos (como temperatura, aireación, altitud), factores químicos (como ácidos orgánicos,

exudados de las plantas, potasio) y factores biológicos (presencia de raíces y de materia orgánica) (Doussoulin y Moya, 2011).

## 2.6 Métodos de identificación de microorganismos

Se han desarrollado múltiples técnicas para diferenciar entre los tipos de microorganismos: observación morfológica macro en medio de cultivo, *in vivo* o en microscopio, determinación morfológica de estructuras reproductivas, crecimiento en medios específicos, pruebas de tinción sobre la afección causada y sobre los mismos. Sin embargo, las técnicas moleculares de secuenciación y metagenómica son más confiables. La metagenómica es una herramienta molecular que permite obtener información genómica más completa a partir de una muestra ambiental o clínica, para lo cual se usan distintos tipos de secuenciación (Rodríguez *et al.*, 2009).

### 2.6.1 Pirosecuenciación bTEFAP

La pirosecuenciación bTEFAP (*Bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing*) es un método universal de identificación de bacterias en poblaciones o comunidades bacterianas (Smith *et al.*, 2010).

El proceso que utiliza la pirosecuenciación Illumina consta de cuatro pasos básicos y estos son: Preparación de la muestra, construcción de la biblioteca, secuenciación y generación de datos sin procesar (Figura 3).



Figura 3. Resumen del proceso de Illumina.

Tomado de (Illumina, 2017).

La preparación de la muestra, parte de la muestra de ADN o ARN, pasa por un control de calidad y aquellas que lo superan permiten construir la biblioteca. Se prepara por fragmentación al azar de ADN o ADNc (complementario), se une el adaptador (5' y 3') y aquellos fragmentos ligados se amplifican por PCR y se purifican en gel (Illumina, 2017).

La etapa de la secuenciación es el punto más complejo, en la producción de un clúster, se carga la biblioteca a una celda de flujo que atrae segmentos en un campo de cebadores incorporados en la superficie y complementarios a los adaptadores mencionados. Se originan clones de cada amplificación y al completar el clúster, los moldes pueden ser secuenciados (Illumina, 2017).

El método de Illumina es un proceso patentado en base a un terminador capaz de detectar cada base mientras se une a las cadenas del ADN molde, es por ello que se obtiene una secuencia más precisa y con eliminación de errores específicos según la secuencia, mejor que los métodos de primera generación. Finalmente, aquellos datos se convierten en datos en bruto para análisis bioinformáticos (Illumina, 2017).

### **3. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL**

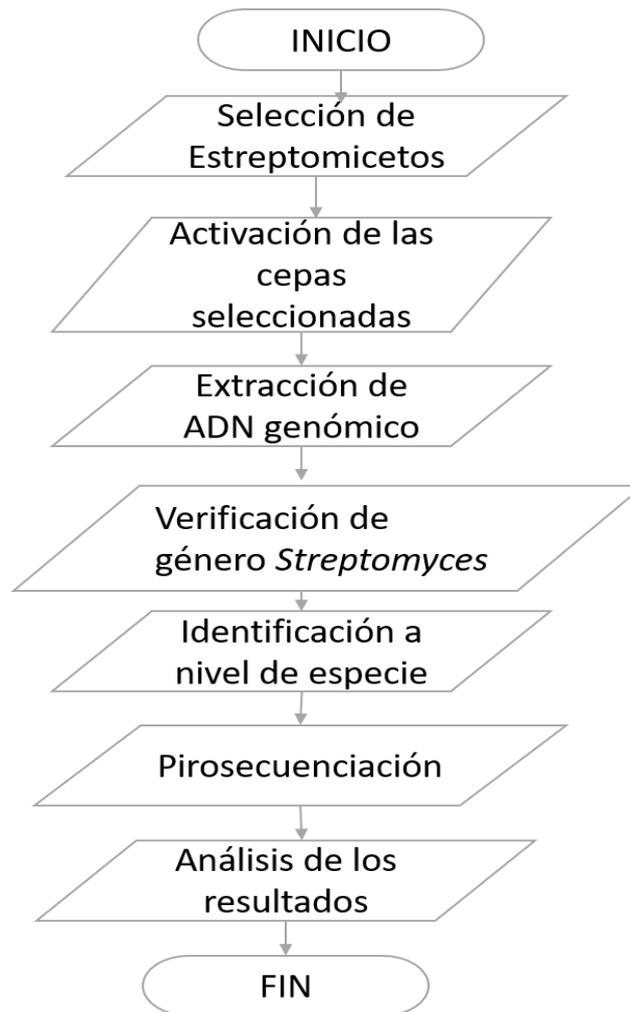


Figura 4. Diagrama de flujo del trabajo experimental.

## 4. PROCEDIMIENTOS

### 4.1 Determinación de la población y muestra

#### 4.1.1 Población

La población consistió en cepas de actinomicetos aisladas en el año 2009 por Orquera (2010) y Mogrovejo (2010) a partir de campos de cultivo de papas nativas y variedades comerciales de la provincia del Carchi y Chimborazo, respectivamente. De allí, 66 cepas de Carchi y 51 cepas de Chimborazo fueron

liofilizadas y determinadas como antagónicas a *Phytophthora infestans* en ensayos *in vitro* por Villamarín (2011).

En la fase de metagenómica, la población fueron los suelos paperos de Carchi y Chimborazo en el año 2017.

#### **4.1.2 Muestra**

Se seleccionó como muestra cinco cepas liofilizadas del trabajo de titulación de Villamarín (2011) de las provincias de Carchi y Chimborazo, las cuales han sido reportadas en los trabajos de titulación de Garcés (2014) y Gómez (2014) como las de mayor antagonismo *in vitro* frente a *P. infestans* y *R. solani*.

Para la fase de metagenómica, se realizó un muestreo de suelos paperos de Carchi y Chimborazo, en el mes de septiembre del 2017 en lugares aledaños a donde fueron tomadas originalmente las cepas aisladas en el año 2009. Las coordenadas de donde se tomó las muestras de suelo fueron 0°36'17.5"N 77°50'19.4"O en la parroquia Piartal del cantón Montufar y 1°44'35.4"S 78°35'47.0"O en la parroquia de Chambo, para las provincias antes mencionadas, respectivamente.

## **4.2 Materiales y métodos para la obtención de datos**

### **4.2.1 Selección de estreptomicetos**

Las cepas de posibles estreptomicetos a utilizarse en el presente trabajo de titulación se seleccionaron a partir de los resultados estadísticos previos (Garcés, 2014 y Gómez, 2014) de antagonismo *in vitro* ante *P. infestans* y *R. solani* de dos trabajos de titulación, una para cada provincia.

### **4.2.2 Activación de las cepas seleccionadas aisladas en el año 2009**

Se realizó la activación de cepas dentro de una cabina de seguridad biológica ESCO de clase II del tipo A2. Una porción de los microorganismos liofilizados seleccionados se colocó uno por uno en agua peptonada al 0.1% p/v, se dejó reposar por una hora, se agitó la muestra mediante un vórtex Gemmy VM-300 y se colocó 10 µL de cada cepa resuspendida con la ayuda de una pipeta Labnet de 0.5-10 µL en tubos con medio de cultivo caldo extracto de levadura y glicerol (YGB), realizando tres repeticiones para las cinco cepas más un tubo con el medio y los 10 µL de agua peptonada como control negativo. Una vez inoculados, se incubó los tubos a 25°C y agitación de 200 rpm durante diez días en una incubadora con agitación VWR. Transcurrido este tiempo, se sembró 50 µL de cada tubo en cajas Petri con medio sólido de extracto de levadura y glicerol (YGA) mediante un asa digralsky por la técnica de disseminación en superficie y se incubó por diez días más a 28°C en una incubadora Memmert. Se aisló los cultivos en cajas nuevas en caso de contaminación. Se realizó tinciones Gram para comprobar, de manera microscópica, que sean bacilos Gram positivos. Se renovó los cultivos de las cajas una vez por mes (Franco, Gómez, Castro, y Rendón, 2009).

El medio líquido YGB se preparó a partir de 2 g de extracto de levadura, 5 mL de glicerol, 1 g de fosfato ácido de potasio ( $K_2HPO_4$ ) para aforar a 1 L y para el medio sólido YGA se añadió 20 g de agar a los compuestos mencionados, aforando a 1 L con agua destilada (Franco *et al.*, 2009).

#### **4.2.3 Extracción de ADN genómico de las muestras activadas y aisladas**

Mediante palillos estériles, se raspó y recogió en un tubo de microcentrífuga de 2 mL de capacidad entre 200 a 500 mg de tejido bacteriano según fue posible en dependencia del crecimiento de las cepas bacterianas después de los diez días de incubación. Sobre la muestra se colocó cuatro perlas de vidrio, una de 5 mm de diámetro y tres de 3 mm, se agregó 500 µL de buffer de extracción (0.1 M cloruro de sodio NaCl, 0.5 M ácido clorhídrico Tris HCl, pH 8 y 5% dodecilsulfato sódico) a cada tubo y se homogenizó por medio de vórtex a máxima velocidad por 10 min, se centrifugó los tubos a 11000 g por 10 min en una microcentrífuga

Sigma 1-14. Se absorbió el sobrenadante de cada tubo mediante una micropipeta y se los puso en nuevos tubos de 2 mL. Este procedimiento se repitió para el pellet y el nuevo sobrenadante se agrega al obtenido en el primer proceso de la misma muestra. A la suma de sobrenadantes se añadió un volumen igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) en cada tubo, se realizó un breve vórtex y se centrifugó a 10000 g por 5 min, se descartó el pellet y a los tubos con sobrenadante se aumentó un volumen igual de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se sometieron a vórtex vigorosamente y se centrifugó a 10000 g por 10 min, nuevamente se descartó el pellet y al sobrenadante se le agregó 2.5 veces su volumen en isopropanol frío para precipitar el ADN, se homogenizó los tubos por inversión y se almacenó a 4°C por al menos dos horas. Después, se colocó los tubos en la microcentrífuga y se centrifugó a 14000 g por 10 minutos, se descartó los sobrenadantes y se lavó los pellets con etanol frío al 70%, se dejó reposar boca abajo los tubos en la cabina de seguridad biológica con flujo por media hora y luego se agregó 50 µL de agua doblemente destilada y 2 µL de ARNasa Promega, y se incubó los tubos a 37°C por media hora en un termobloque con agitación *ProvoCell* de ESCO. A continuación, se midió la concentración de ADN de las muestras en el *Nanodrop 8000 Thermo Scientific* y se ajustó a una concentración de 40 ng µL<sup>-1</sup> con agua estéril desionizada para su uso inmediato (Plaza, Upchurch, Brigmon, Whitman, y Ulfig, 2004).

#### 4.2.4 Paneo de cepas aisladas en el año 2009 seleccionadas para verificación del Género *Streptomyces*

La amplificación se ejecutó mediante PCR a partir de la enzima *GoTaq® Green Master Mix* (Promega) de acuerdo con las especificaciones del manual, como se observa en la Tabla 1 (Promega Corporation, 2016).

Tabla 1.

*Volúmenes usados para realizar la PCR para ambos pares de cebadores.*

Reactivo / Concentración	Para una reacción (25µL)
<i>GoTaq® Green Master Mix</i> (2X)	12.5 µL

Cebador <i>Reverse</i> (5 $\mu$ M)	1 $\mu$ L
Cebador <i>Forward</i> (5 $\mu$ M)	1 $\mu$ L
ADN (40 ng $\mu$ L <sup>-1</sup> )	1 $\mu$ L
Agua libre de ARNasa	9.5 $\mu$ L
<b>TOTAL</b>	<b>25 <math>\mu</math>L</b>

Adaptado de (Promega Corporation, 2016).

Los dos pares de cebadores usados fueron: AO3F y AO4R (Macrogen), homólogos a los extremos conservados del gen 16S de ADNr en actinomicetos y AM45F y AM45R (Macrogen), definidos para especies del género *Streptomyces* (González, Ayuso, Anderson, y Genilloud, 2005; Saadoun *et al.*, 2015). Las secuencias de los cebadores se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2.

*Cebadores genéricos para actinomicetos y Streptomyces.*

<b>Primer</b>	<b>Secuencia</b>
AO3F	5 - AAA TGG AGG AAG GTG GGG AT - 3
AO4R	5 - AGG AGG TGA TCC AAC CGC A - 3
AM45F	5 - GTG AGT CCC CAG ATC ACC CCG AAG - 3
AM45R	5 - GTG GGC AAT CTG CCC TTG CAC TCT - 3

Tomado de (Saadoun, AL-Joubori y AL-Khoury, 2015).

Las muestras fueron colocadas en un termociclador Proflex 3 bloques (Thermo Fisher) con las mismas condiciones (Tabla 3) para ambos pares de cebadores.

Tabla 3.

*Condiciones para PCR con cebadores genéricos en el termociclador.*

<b>Temperaturas</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
95°C	2 min	1 ciclo
94°C	1 min	30 ciclos
55°C	1 min	
72°C	3 min	

72°C	10 min	1 ciclo
4°C	10 min	1 ciclo

Adaptado de (Franco, 2009).

La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 0.5% con tampón borato de sodio (SB) 1X y 2  $\mu$ L de visualizador *Gel Star Nucleic Acid Gel Stain* (Lonza). Los componentes del tampón SB se especifican en la Tabla 4. Para analizar el tamaño de las bandas de los amplicones, se cargó 3  $\mu$ L de marcador molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen) de 100 a 2000 pares de bases (pb) de tamaño. Se cargó por pocillo 3  $\mu$ L de producto de PCR y se corrieron en el gel de agarosa a 200 V por 35 min mediante una fuente de poder ENDURO™ modelo 300V de Labnet (Franco *et al.*, 2009).

Tabla 4.

*Composición de la solución madre en concentración 20X del tampón SB.*

<b>Solución Madre (20X)</b>	<b>Cantidades</b>
Ácido bórico	45 g
Hidróxido de sodio (NaOH)	8 g
Agua (H <sub>2</sub> O)	Aforar a 1 L

Tomado de (Admin eLabJournal, 2015).

#### **4.2.5 Identificación a nivel de especie a partir de cebadores universales de las muestras aisladas en el año 2009**

La amplificación con los cebadores 27F y 1492R del gen 16S se realizó similar al procedimiento explicado para el paneo. En la Tabla 5 se observan las secuencias de los cebadores universales y en la Tabla 6 se muestran las condiciones para dichos cebadores en el termociclador. Adicional a la electroforesis, la secuenciación de los productos de PCR se ejecutó con la ayuda de la empresa Macrogen Inc. Se envió los productos de PCR a Corea del Sur, donde se realizó secuenciación Sanger. Posteriormente, se analizó los resultados bioinformáticamente, se ensambló cada secuencia mediante el

software *Geneious* y se alineó con el algoritmo *BlastN* (*Basic Local Alignment Search Tool*).

Tabla 5.

*Cebadores universales gen 16S.*

Primer	Secuencia
27F	5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3'
1492R	5' CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT 3'

Tomado de (Weisburg, Barns, Pelletier, y Lane, 1991).

Tabla 6

*Condiciones para PCR con cebadores universales en el termociclador.*

Temperaturas	Tiempo	Ciclos
94°C	5 min	1 ciclo
94°C	30 s	} 30 ciclos
57°C	45 s	
72°C	3 min 30 s	
72°C	7 min	1 ciclo
4°C	10 min	1 ciclo

Tomado de (Bettache *et al.*, 2016).

#### 4.2.6 Información del microbioma de los suelos en el año 2017

De las muestras de suelo tomadas en el año 2017 se extrajo el ADN total mediante los protocolos ya mencionados y del mismo modo se cuantificó la concentración. Se envió las muestras a Macrogen y se procesó mediante pirosecuenciación *bTEFAP*. Se analizó los resultados mediante un servidor de aplicaciones web que indica el análisis filogenético y funcional automático de metagenomas llamado *MG-RAST Argonne National Laboratory*.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 5.1 Selección de estreptomicetos

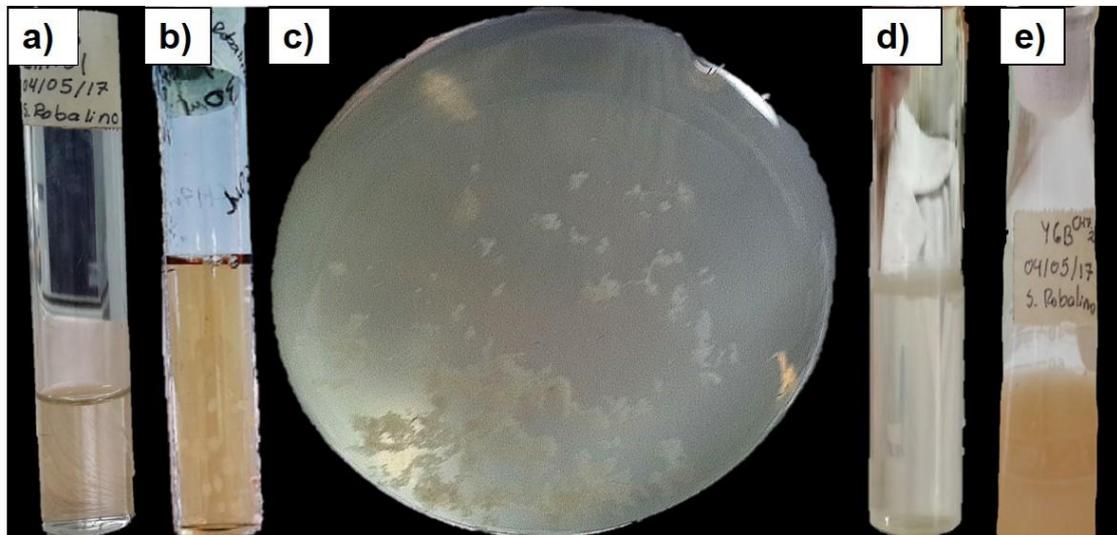
En un principio, las cepas seleccionadas fueron CH29 y CH44 (Chimborazo), C92 C41 y C72 (Carchi), reportadas por Garcés (2014) y Gómez (2014) como las cepas que más antagonismo *in vitro* mostraron ante *Phytophthora infestans* y *Rhizoctonia solani*. Sin embargo, como no todas pudieron activarse para obtener cultivos puros se escogieron cinco cepas más (CH71, CH7, C93, C75 y C37) con menor antagonismo que las primeras para una segunda activación.

## 5.2 Activación de las cepas seleccionadas

Al quinto día de inoculación, el caldo de cultivo de los tubos de ensayo con YGB mostró crecimiento en forma de agregados celulares para las cepas CH71, CH44 y C92, las cuales no presentaron mayor turbidez (Figura 5b) con respecto al control negativo (Figura 5a). Los medios de las cepas C72, C75 y C37 resultaron con similar turbidez que los anteriores en los primeros cuatro días, pero no formaron agregados. Al quinto día, solo se observó un tipo de micelio blanco en el fondo de los tubos de la cepa C72 (Figura 5c). El tubo de la cepa C41 era similar al control en lo traslúcido y sin turbidez visible, por lo que al parecer no había crecimiento bacteriano (Figura 5d). El resto de los tubos con las cepas CH29, CH7 y C93 tomaron una apariencia mucho más turbia, característica de un cultivo con crecimiento bacteriano masivo (Figura 5e). En un estudio realizado por Paz (2016), también pudo evidenciar la formación de agregados celulares en el medio YGB después de cuatro días de inoculación en matraces de tres cepas que posteriormente fueron identificadas dentro del género *Streptomyces*, lo que se asemeja con lo obtenido en la Figura 5B del presente trabajo de titulación.

En la primera activación de las primeras cinco cepas seleccionadas solamente se pudo obtener el cultivo puro de las cepas C72 y C41 y en una segunda activación de las tres cepas restantes se pudo conseguir un cultivo axénico de CH44 y C92. En una tercera activación no se pudo lograr cultivos ya sea por contaminación o por ausencia de crecimiento. En la activación de las segundas

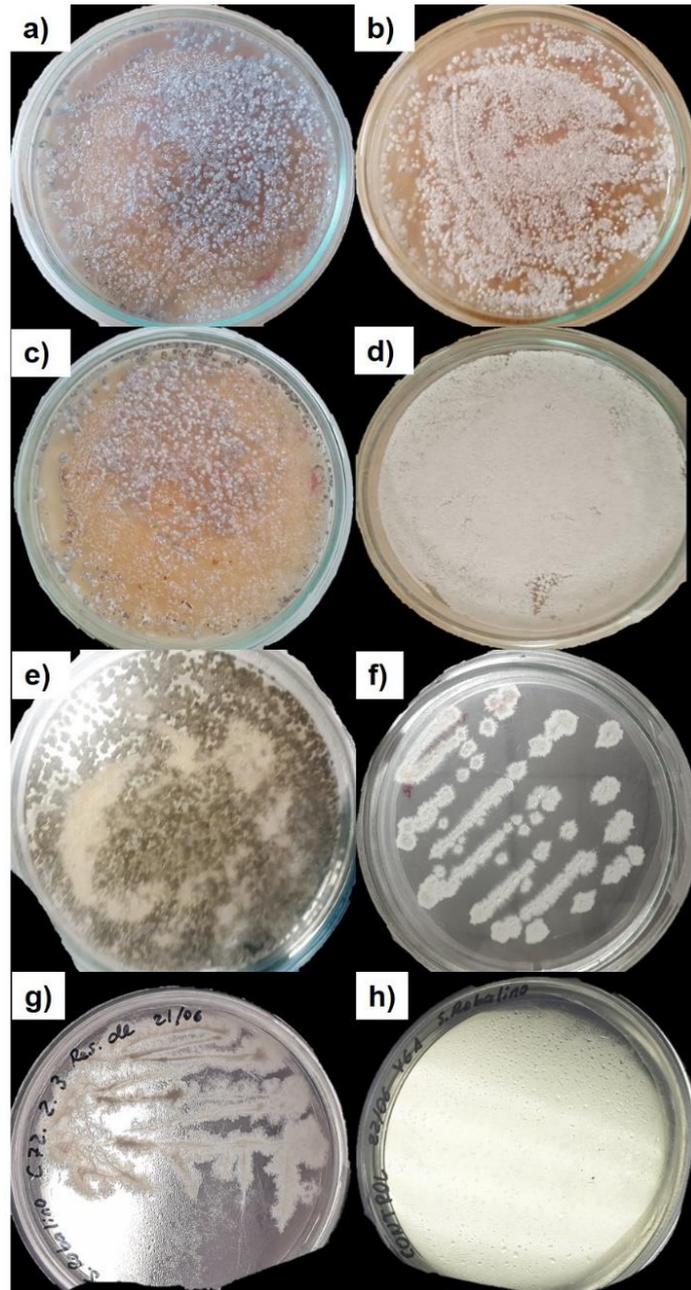
cinco cepas, en tres repeticiones se obtuvo cultivos puros de las cepas CH71, C93, C37 y C75.



*Figura 5.* Ejemplos de cepas de cinco días de crecimiento en caldo de cultivo YGB.

- a) Control negativo.
- b) Agregados celulares (CH71, CH44 y C92).
- c) Formación de micelio blanco precipitado (C72).
- d) Medio inoculado sin turbidez (C41).
- e) Cultivo con crecimiento masivo (CH29, CH7 y C93).

Posteriormente, a siete días del cultivo en medio sólido YGA todas las cepas presentaron aspectos petrosos o terrosos (Figura 6a-e) y despedían un aroma particular a tierra húmeda, con excepción de las cepas C72 (Figura 6f) y C75 (Figura 6g), en las cuales su apariencia no era como las cepas bacterianas comunes, es decir con una consistencia viscosa o pastosa, más bien presentaban ramificaciones similares al micelio de un hongo y eran inodoras.



*Figura 6.* Cultivos aislados de las cepas activadas con siete días de crecimiento en medio YGA.

- a) C92.
- b) CH71.
- c) C41.
- d) C37.
- e) CH44.
- f) C75.
- g) C72.
- h) Control negativo.

Las cepas C92, CH71, C41, C37, CH44 y C72 resultaron ser bacilos Gram positivos, como se aprecia en la Figura 7 (a-e y h). Solo la cepa C75 resultó ser un bacilo Gram negativo (Figura 7i).

Según el estudio realizado por Paz en 2016, en el cual se realizó una tinción Gram a una bacteria posteriormente identificada como *Streptomyces acidiscabies*, dio lugar a bacilos Gram positivos como se aprecian en la Figura 7g, lo que se corrobora con lo obtenido en el presente estudio de acuerdo con la similitud de las Figuras 7 (a-e). Igualmente, Erasmus MC, (s/f) en su estudio a través de la misma prueba de tinción obtuvo que la cepa *Streptomyces griseus* fue Gram positiva (Figura 7f), resultado que se asemeja al obtenido en la presente investigación. A pesar, de que en la Figura 7h de la cepa C72 se observan bacilos Gram positivos, se puede notar que estos bacilos forman filas, que, al juntarse en paralelo, se ven más aglomeradas y menos filamentosas que las demás, lo que fue un indicio de que esta podía no pertenecer al mismo género.

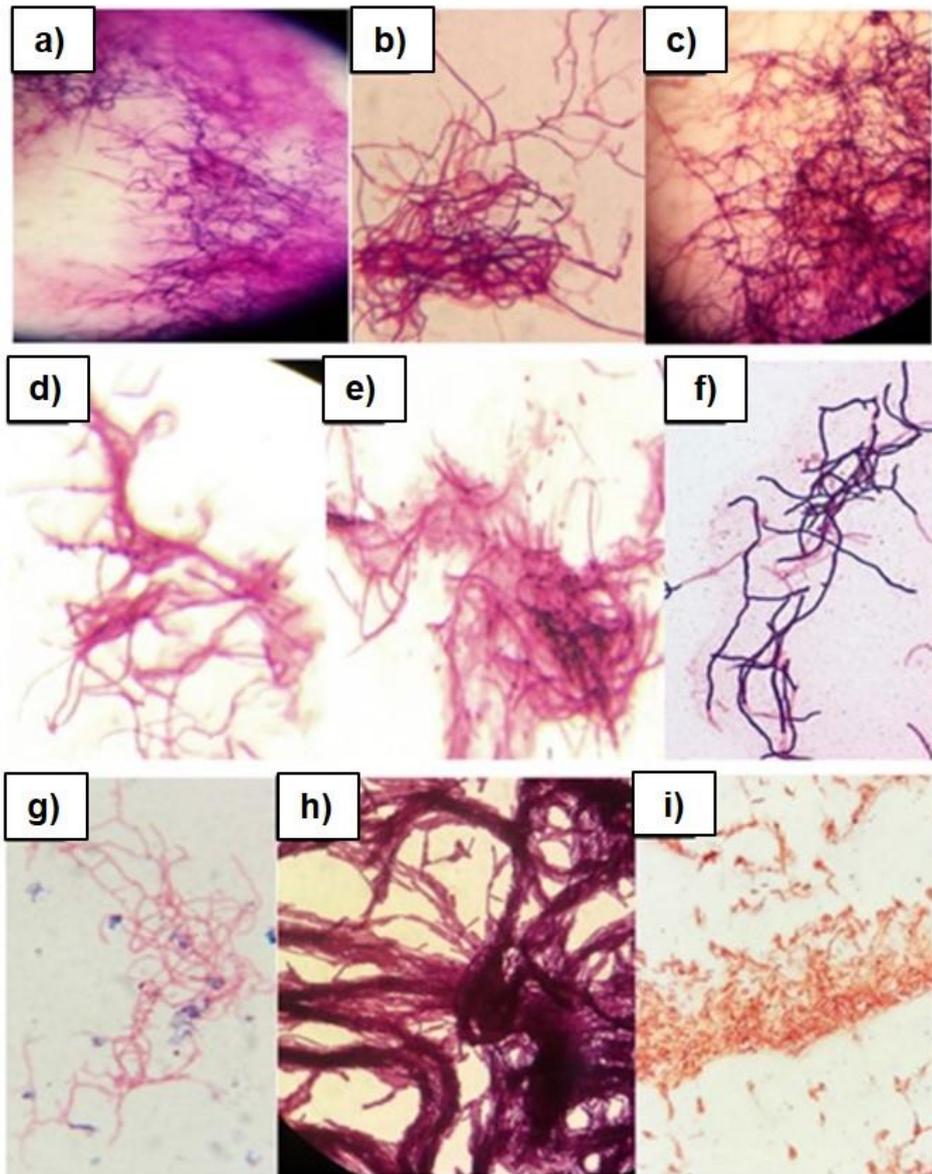


Figura 7. Tinción Gram de las cepas activadas observado en microscopio en resolución 100X.

Adaptado de (Erasmus MC, s/f).

- a) C92.
- b) CH71.
- c) C41.
- d) C37.
- e) CH44.
- f) *Streptomyces griseus*.
- g) *Streptomyces acidiscabies*.
- h) C72.
- i) C75.

Los cultivos contaminados se refieren a aquellos que fueron descartados solo después de realizar la tinción Gram a cada cepa de la caja y comprobar que no eran bacilos Gram positivos. Aquellas cepas de aspecto notablemente pastoso tampoco se tomaron en cuenta.

Paz (2016) en su investigación evidenció que la esporulación se produce a partir del sexto día en medio YGA, lo que según Shepherd *et al.* (2010) es un indicativo de que la fuente de carbono del medio se ha terminado. Sin embargo, en la presente investigación, la esporulación se dio en el séptimo día, lo que puede deberse a que las cajas Petri se mantuvieron a temperatura ambiente (26 - 30°C). Se decidió no mantener las cepas de estreptomicetos en incubadora debido a que, por dicha fluctuación, la temperatura de la incubadora se incrementaba por si sola hasta los 49°C a pesar de haber sido configurada en los 37°C, por lo que se inhibió su crecimiento. Esto puede corroborarse con la investigación de Ripa, Nikkon, Zaman, y Khondkar (2009), en la cual la temperatura de crecimiento de sus estreptomicetos osciló en un rango entre 25 y 45°C y temperaturas superiores se observó que inhibían el crecimiento, rango e inhibición que también se relacionan a lo ocurrido en el presente estudio.

### **5.3 Extracción de ADN genómico**

Para conseguir un promedio de 30 mg de muestra fue necesario raspar el contenido de al menos dos cajas Petri de la misma cepa. El movimiento de las perlas permitió una lisis mecánica de las cepas, es decir, la ruptura de la membrana celular. Los componentes escogidos para el protocolo de extracción dieron los resultados esperados en las cepas C41, C37 y C75 en cuanto a calidad y concentración de ADN obteniendo los valores que se indican en la Tabla 7. En cuanto a los resultados de absorbancia 260/280 obtenidos (Tabla 7), se observa que las dos primeras cepas anteriormente mencionadas se encuentran en el rango de pureza de ADN óptima, mientras que la última está en un rango de pureza aceptable, valores de calidad que se aprecian en la Tabla

8. Sin embargo, para las cepas C92, CH71, CH44 y C72, se obtuvieron concentraciones por encima de  $40 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ , por lo que fue necesario una nueva dilución en agua ultra pura, para alcanzar aproximadamente la concentración de  $40 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ , de modo que al realizar nuevamente la cuantificación de estas cuatro cepas, el equipo mostró los valores de absorbancia 260/280 que se muestran en la Tabla 7, que las tres primeras cepas antes citadas se encontraron dentro de los rangos aceptables de pureza de muestras de ADN (Tabla 8), en tanto que en el último caso se encontró en un rango de pureza óptima, valores de calidad que se aprecian en la Tabla 8 (Banco Nacional de ADN Carlos III, s/f).

Tabla 7.

*Calidad y concentración de muestras de ADN genómico de cepas diluido a aproximadamente  $40 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  medido en el equipo NanoDrop 8000.*

<b>Cepa</b>	<b>Concentración <math>\text{ng } \mu\text{L}^{-1}</math></b>	<b>Absorbancia 260/280</b>	<b>Absorbancia 260/230</b>
C92	26.55	1.73	0.77
CH71	31.49	1.78	0.77
C41	16.51	1.88	0.67
C37	19.96	1.89	1.24
CH44	37.98	1.55	1.10
C75	25.48	1.75	1.35
C72	33.74	1.98	1.02

Tabla 8.

*Valores indicativos de pureza en muestras de ADN según las absorbancias 260/280 y 260/230.*

<b>RADIO</b>	<b>VALOR</b>	<b>PUREZA</b>
<b>A260/280</b>	1.8 - 2	ADN de pureza óptima
	1.6 - 1.8	ADN pureza aceptable
	< 1.6	Presencia de compuestos aromáticos
	> 2.1	Contaminación con ARN

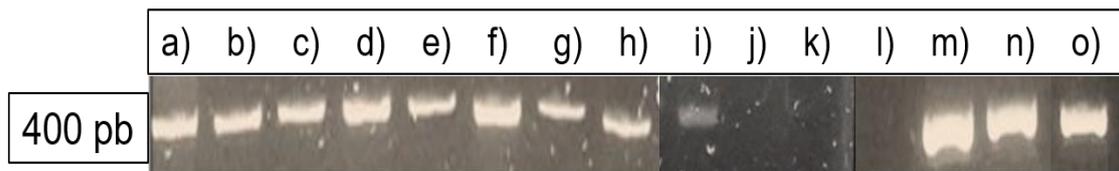
<b>A260/230</b>	< 1.5	Contaminación con sales, carbohidratos, fenoles.
-----------------	-------	--

Tomado de (Banco Nacional de ADN Carlos III, s/f).

La cepa CH44 presentó un valor de 1.55 que indica la posible presencia de compuestos aromáticos, en la cual no se pudo obtener una pureza mayor a pesar de haber realizado repeticiones de extracción; sin embargo, se decidió usarla para los procedimientos de PCR. Según los resultados de absorbancia 260/230 que se observan en la Tabla 7, todas las muestras presentan contaminación con sales, carbohidratos o fenoles (Tabla 8), lo cual pudo darse debido al raspado de las cepas con palillo, ya que hubo cepas que se rasparon con parte de agar debido a que sus micelios estuvieron adheridos al mismo.

#### **5.4 Paneo de cepas aisladas para verificación del Género *Streptomyces***

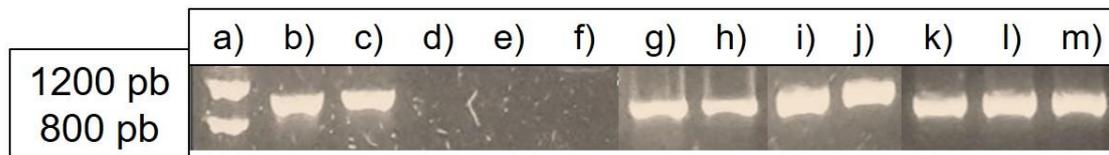
Como se aprecia en la Figura 8, la PCR realizada con el par de cebadores AO3F y AO4R presentó bandas de aproximadamente 350 a 400 pb según el marcador molecular *Low DNA Mass Ladder* en el gel de agarosa al 0.5%. Las bandas de las muestras de PCR de los pocillos b) a i), m) y n) obtuvieron el número de pb para los cebadores utilizados lo que se corrobora con el estudio realizado por Saadoun (2015), donde la corrida que realizó con los cebadores AO3F y AO4R dio lugar a una única banda para cada cepa de aproximadamente 350 pb indicando que obtuvieron una secuencia común en el ADN ribosómico 16S de Actinomicetos (Figura 10a). Por ello se deduce que las muestras corridas en el gel de la presente investigación contienen amplificada dicha secuencia, así como se corrobora también la similitud del tamaño de pares de bases con el control positivo del pocillo o) el cual es una muestra de ADN ya secuenciada e identificada como *Streptomyces acidiscabies* determinada en el estudio de Paz (2016).



*Figura 8.* Gel de agarosa al 0.5% revelado tras corrida electroforética de las muestras de PCR con los cebadores AO3F y AO4R.

- a) marcador molecular en 400 pb.
- b) C37.
- c) C37.
- d) C92.
- e) C92.
- f) CH71.
- g) C41.
- h) C41.
- i) CH71.
- j) C75.
- k) C75.
- l) control negativo.
- m) CH44.
- n) CH44.
- o) control positivo.

En la Figura 9, se aprecia que las bandas obtenidas tras la electroforesis con los cebadores AM45R y AM45F presentaron un tamaño de aproximadamente 1000 pb según el marcador molecular ya mencionado. Las bandas para la PCR de los pocillos b), c), g), h) y de j) a m) se observaron según el tamaño de pb esperado para los cebadores según lo obtenido en la investigación de Saadoun (2015), donde la corrida que realizó con los cebadores AM45R y AM45F dieron lugar a una única banda para cada cepa de aproximadamente 1000 pb indicando que obtuvieron una secuencia diana específica del género *Streptomyces* (Figura 10b). Debido a esto, se determina que el presente estudio obtuvo dicha secuencia diana amplificada y del mismo modo, se confirma también a partir de la similitud del tamaño de pares de bases de las bandas resultantes con el control positivo del pocillo i) a partir de la misma cepa identificada como *Streptomyces acidiscabies* en el estudio de Paz (2016).



*Figura 9.* Gel de agarosa al 0.5% revelado tras corrida electroforética de las muestras de PCR con los cebadores AM45R y AM45F.

- a) Marcador molecular.
- b) C37.
- c) C37.
- d) C75.
- e) C75.
- f) Control negativo.
- g) CH71.
- h) CH71.
- i) Control positivo.
- j) C41.
- k) CH44.
- l) CH44.
- m) C92.

Debido a que no hubo presencia de bandas con ambos pares de cebadores para la cepa C75 (Figura 8j y 8k; Figura 9d y 9e), se dedujo que esta cepa no pertenece al género *Streptomyces* ni a la familia de los Actinomicetos.

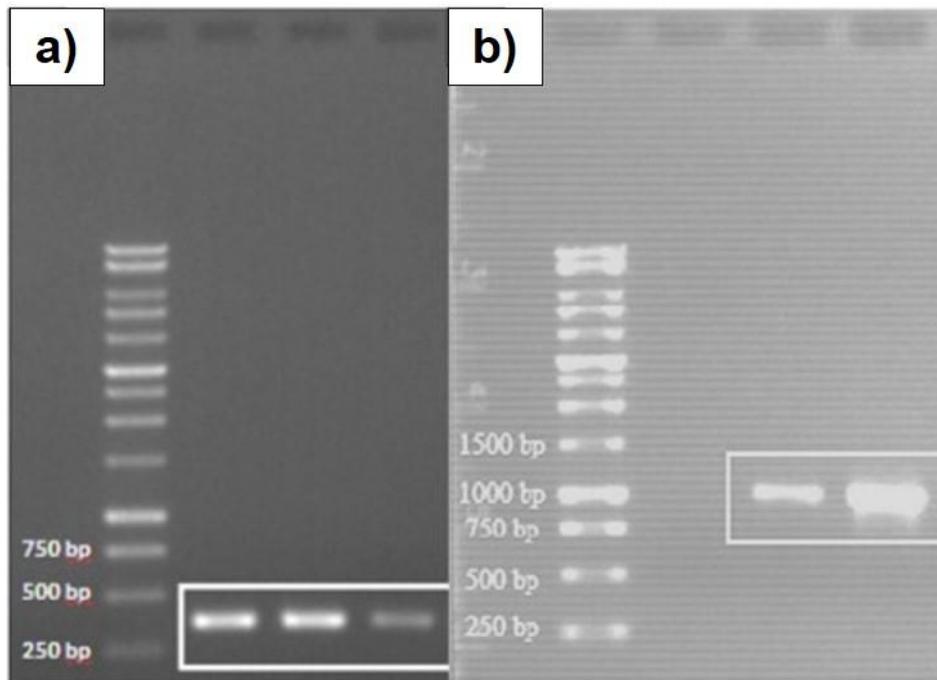


Figura 10. Gel de agarosa 1% de muestras de PCR de aislados de estreptomicetos amplificadas por el par de cebadores.

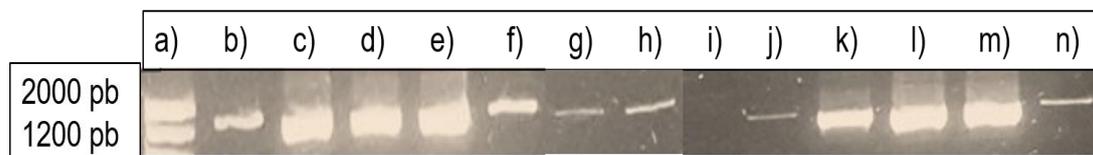
Tomado de (Saadoun, 2015).

a) AO3F y AO4R.

b) AM45R y AM45F.

### 5.5 Identificación a nivel de especie a partir de cebadores universales

Como se aprecia en la Figura 11, la PCR realizada con el par de cebadores 1492R y 27F presentó bandas de aproximadamente 1500 pb según el marcador molecular *Low DNA Mass Ladder* en el gel de agarosa al 0.5%. Las bandas de las muestras de PCR de los pocillos c) a h) y j) a n) del presente estudio se observaron del mismo tamaño de pb para los cebadores usados en el estudio de Bettache (2016), en el cual se obtuvo una banda de 1454 pb en la corrida a partir de los cebadores universales, en la que se amplificó una región común en la secuencia que codifica para ARN ribosómico 16S. Esto indica que la banda obtenida en la presente investigación corresponde a dicha secuencia, así como también se corrobora con la similitud que poseen con la banda del control positivo del pocillo b), el cual partió de la misma muestra de PCR de *Streptomyces acidiscabies* de Paz, 2016.



*Figura 11.* Gel de agarosa al 0.5% revelado tras corrida electroforética de las muestras de PCR con los cebadores 1492R y 27F.

- a) Marcador molecular.
- b) Control positivo.
- c) C92.
- d) CH71.
- e) CH71.
- f) C75.
- g) C41.
- h) C37.
- i) Control negativo.
- j) C41.
- k) C72.
- l) CH44.
- m) CH44.
- n) C37.

En la Tabla 9 se presentan los resultados de la secuenciación Sanger para cada cepa. Para la parte del ensamblaje, los porcentajes de calidad sobrepasaron el 80% y los tamaños de las secuencias fueron en promedio de 1400 pb, tal como se había determinado tras la corrida en gel con los cebadores universales. Las especies según la alineación *BlastN* correspondieron a aquellas observadas en la cuarta columna de la Tabla 9. Se aprecia además en la tabla que ninguna muestra obtuvo un 100% de identidad, sin embargo las cepas C37, C72 y C75 tienen un porcentaje de identidad menor a 98.7%, que según la reseña de Yarza *et al.*, (2014), es el umbral para el criterio de demarcación de especies identificadas a partir de la secuencia del gen 16S ARNr, es decir, que en la presente investigación los porcentajes menores a dicho valor probablemente serían de una nueva cepa de la misma especie alineada. Según dicha reseña, a pesar, de que, las secuencias casi completas del gen 16S ARNr proveen

mediciones precisas para la diversidad taxonómica, es necesario realizar al menos ocho secuenciaciones de esta cepa y tener estudios fenotípicos discriminantes para afirmar efectivamente que se trata de una nueva cepa de la misma especie.

En el estudio de Hao (2016), se encontró que las mayores poblaciones antagónicas encontradas en suelos, que favorecen al desarrollo sano del cultivo de papa y supresividad de suelos son pseudomonas, bacilos y estreptomicetos. Lo que se comprueba con los resultados que se muestran en la Tabla 9 ya que todas las especies que habían sido reportadas como antagónicas pertenecen al género *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Streptomyces*.

Tabla 9.

*Resultados del ensamblaje con el software Geneious y alineación con BlastN de las secuencias recibidas.*

Resultados	Ensamblaje <i>Geneious</i>		Alineación <i>BlastN</i>	
	Muestra	Calidad HQ%	Tamaño pb	Descripción Especie
C92	95.7	1404	<i>Streptomyces sp.</i> 6-23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
CH71	85.3	1402	<i>Streptomyces clavifer</i> strain AS 4.1604 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
C41	80.5	1426	<i>Streptomyces griseochromogenes</i> strain 1a- 3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
C37	89.1	1404	<i>Streptomyces anulatus</i> strain KCTC 9710 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97

<b>CH44</b>	93.1	1419	<b><i>Streptomyces avermitilis</i></b> <i>strain MA-4680 16S ribosomal RNA, complete sequence</i>	99
<b>C72</b>	82.2	1423	<b><i>Bacillus pseudomycooides</i></b> <i>strain GF14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	98
<b>C75</b>	80.3	1324	<b><i>Pseudomonas sp. strain C4-11</i></b> <i>16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	96

---

A partir de los resultados de la secuenciación, se tiene un indicio más de lo obtenido en la Figura 6, según los estudios que se mencionan a continuación. Balakrishnan, Sudhamani, Sukumaran, y Sugathan (2015), consiguieron una línea de la especie *Streptomyces clavifer* aislada de muestra de suelo, inoculada en medio sólido con micelio vegetativo de color marrón y micelio aéreo blanco o gris a los doce días de crecimiento, características morfológicas similares a las observadas en la cepa CH71 (Figura 6b). Joachim (2017), en su estudio inoculó una línea de la especie *Streptomyces griseochromogenes* aislada a partir de una muestra de suelo y observó colonias de micelio vegetativo color beige y micelio aéreo de color blanco y gris, así como las observadas en la Figura 6c de este trabajo. El autor mencionado, obtuvo también, colonias de *Streptomyces anulatus* con micelio de color blanco, que en siete días de crecimiento tomaron forma de colonias irregulares papiladas que fueron cubriendo toda la superficie del medio, similar a lo observado en la Figura 6d del presente estudio. Según American Type Culture Collection (2013), *Streptomyces avermitilis* tiene un micelio vegetativo de color beige, de aspecto áspero, forma circular y elevación umbonada, de la misma manera ocurrió con la cepa CH44 de la presente investigación, que en 10 días de crecimiento cambió su color beige a micelio aéreo café como se observa en la Figura 6e. Nakamura, 1998, encontró una posible nueva especie a la que propuso llamar *Bacillus pseudomycooides* y la describió como un falso hongo debido a sus colonias, que observadas en agar tienen un aspecto rizoideo, además son de color blanco o crema y son Gram

positivas, crecen en un rango de 15 a 40°C con una temperatura óptima de 28°C. Estas características concuerdan con la cepa C72 (Figura 6g).

## 5.6 Información del microbioma de los suelos en el año 2017

Se recibió dos archivos, uno que contenía las secuencias en formato *fastq* sin cortar los adaptadores de los extremos usados en el proceso de *Illumina NGS* y otro con los datos con los segmentos del adaptador cortado.

Se usaron los archivos con los adaptadores cortados, que según Macrogen (2017) permite producir datos más confiables ya que se eliminan todas las secuencias de menos de 36 pb.

La Tabla 10 indica que la muestra de ADN tanto de Chimborazo (RIO2) como de Carchi (CP1) obtuvieron un total de más de un millón de bases secuenciadas, mayor porcentaje de guaninas y citocinas (GC) que de adeninas y timinas (AT) y que tanto las calidades Q20 y Q30 son lo suficientemente altas para dar resultados confiables según se explica en el mismo documento de Macrogen (2017), donde dice que un valor Q más alto significa un puntaje mayor de precisión para cada nucleótido, por ejemplo, si se denota un puntaje para Q30 a una base quiere decir que su probabilidad de tener un error es de base 1 en 1000.

Tabla 10.

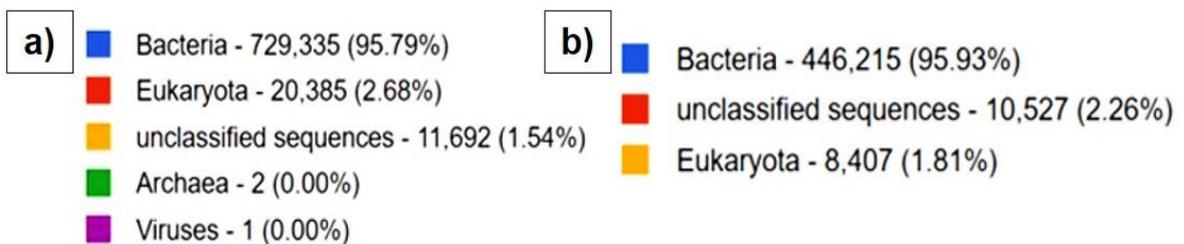
*Datos estadísticos de las muestras de metagenómica sin las secuencias de los adaptadores.*

<b>Muestra</b>	<b>Pb Totales de leídas</b>	<b>Leídas totales</b>	<b>GC%</b>	<b>AT%</b>	<b>Q20%</b>	<b>Q30%</b>
RIO2	117924260	393110	58.074	41.93	82.185	71.306
CP1	122506154	408730	56.458	43.52	83.918	73.340

Tomado de (Macrogen, 2017).

Nota: Resultados obtenidos del documento recibido de Macrogen.

Posteriormente, la herramienta bioinformática en línea MG-RAST (*Metagenomic Rapid Annotations using Subsystems Technology*), la cual permite un análisis filogenético y funcional automático de metagenomas, permitió obtener información sobre el microbioma de los suelos de Carchi y Chimborazo por separado. Para los resultados del análisis de Carchi fueron tomados en cuenta secuencias con un promedio de 376 pb y para Chimborazo de 368 pb. Los dominios encontrados Carchi y Chimborazo fueron los indicados en la Figura 12a y 12b, respectivamente.



*Figura 12.* Porcentajes de los dominios encontrados por MG-RAST a partir de la pirosecuenciación.

a) Carchi.

b) Chimborazo.

En el caso de Carchi, solo se observó el rastro del orden Actinomycetales en un 14.47% (Figura 13a), mas, según datos más detallados se encontró al género *Streptomyces* solo en un 0.36%, porcentaje insignificante para ser considerado en la Figura 13b obtenida de MG-RAST para la muestra CP1.

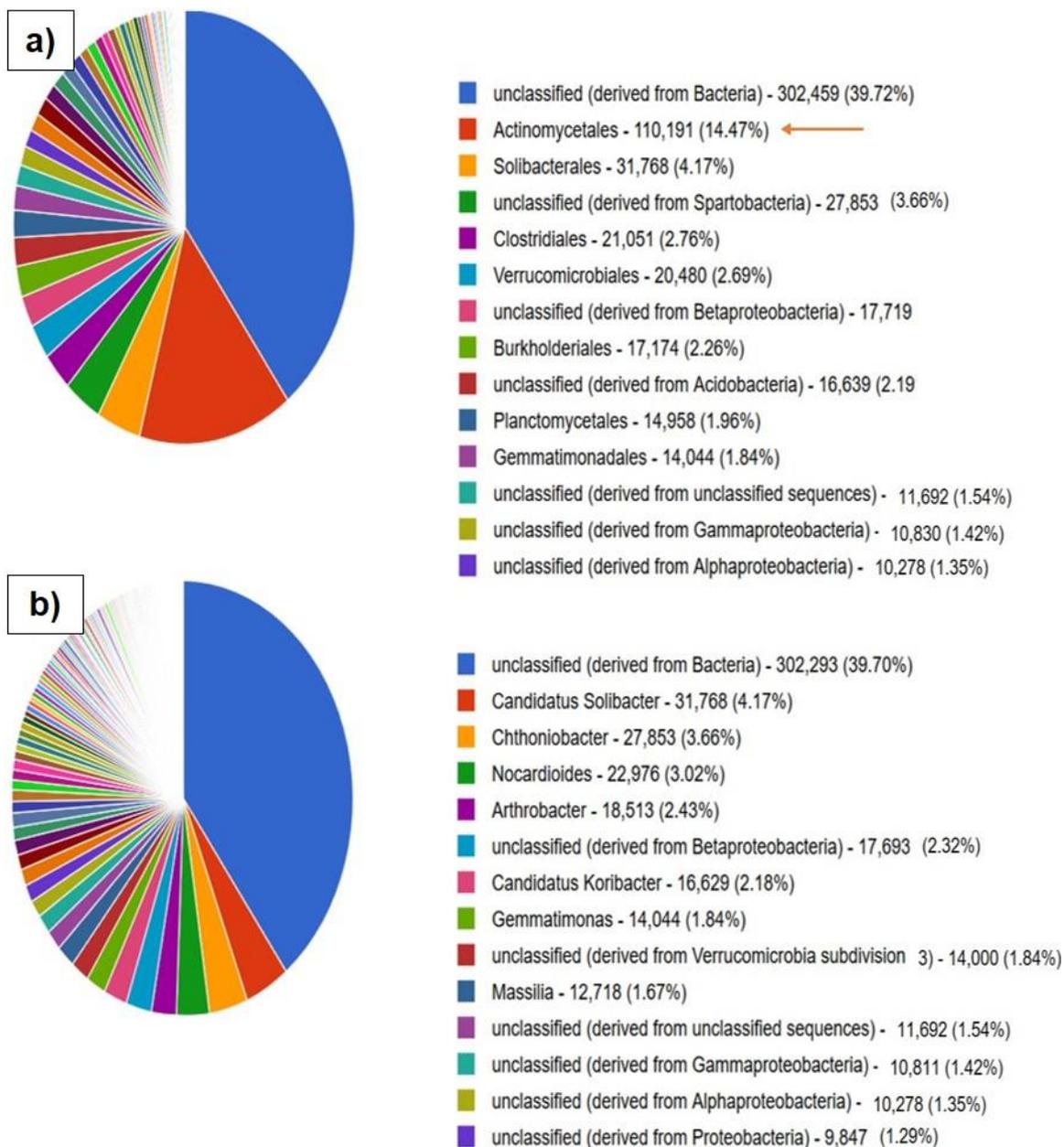


Figura 13. Porcentajes de órdenes y géneros encontrados por MG-RAST según los resultados de la pirosecuenciación en la provincia del Carchi.

a) Órdenes.

b) Géneros.

En Chimborazo, sí se observó el género *Streptomyces* en un porcentaje de 36.28%, como se observa en la Figura 14 obtenida a través de MG-RAST para la muestra RIO2.

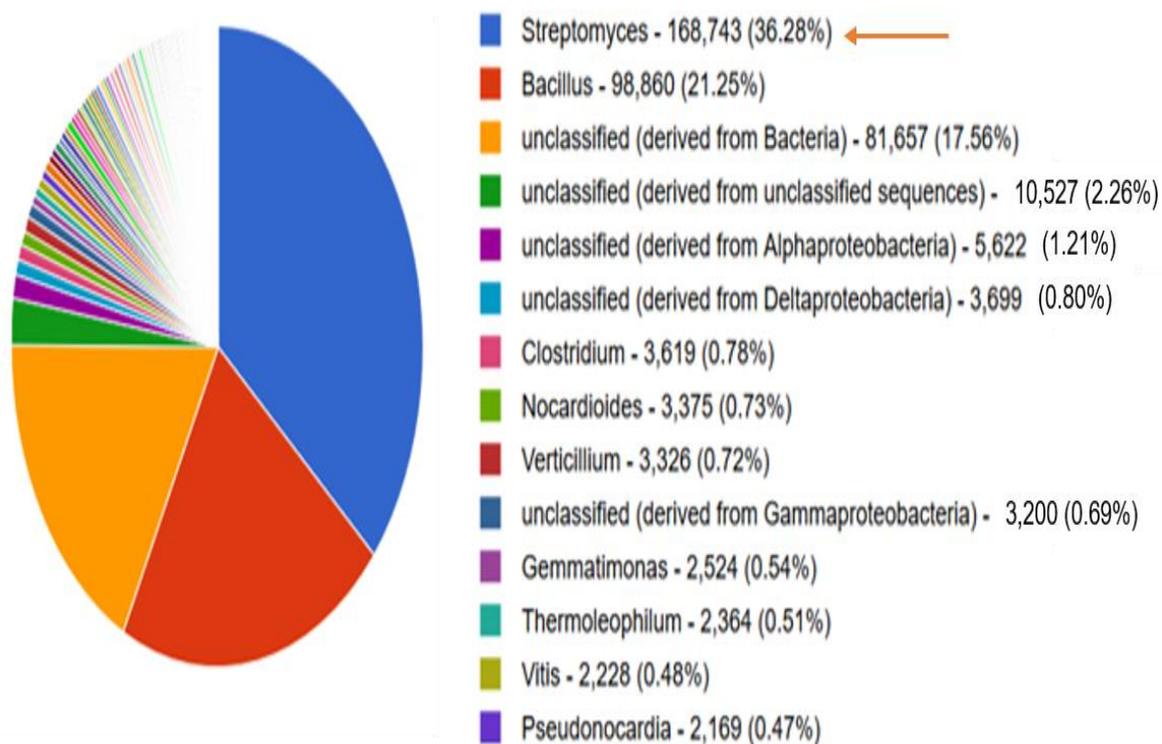
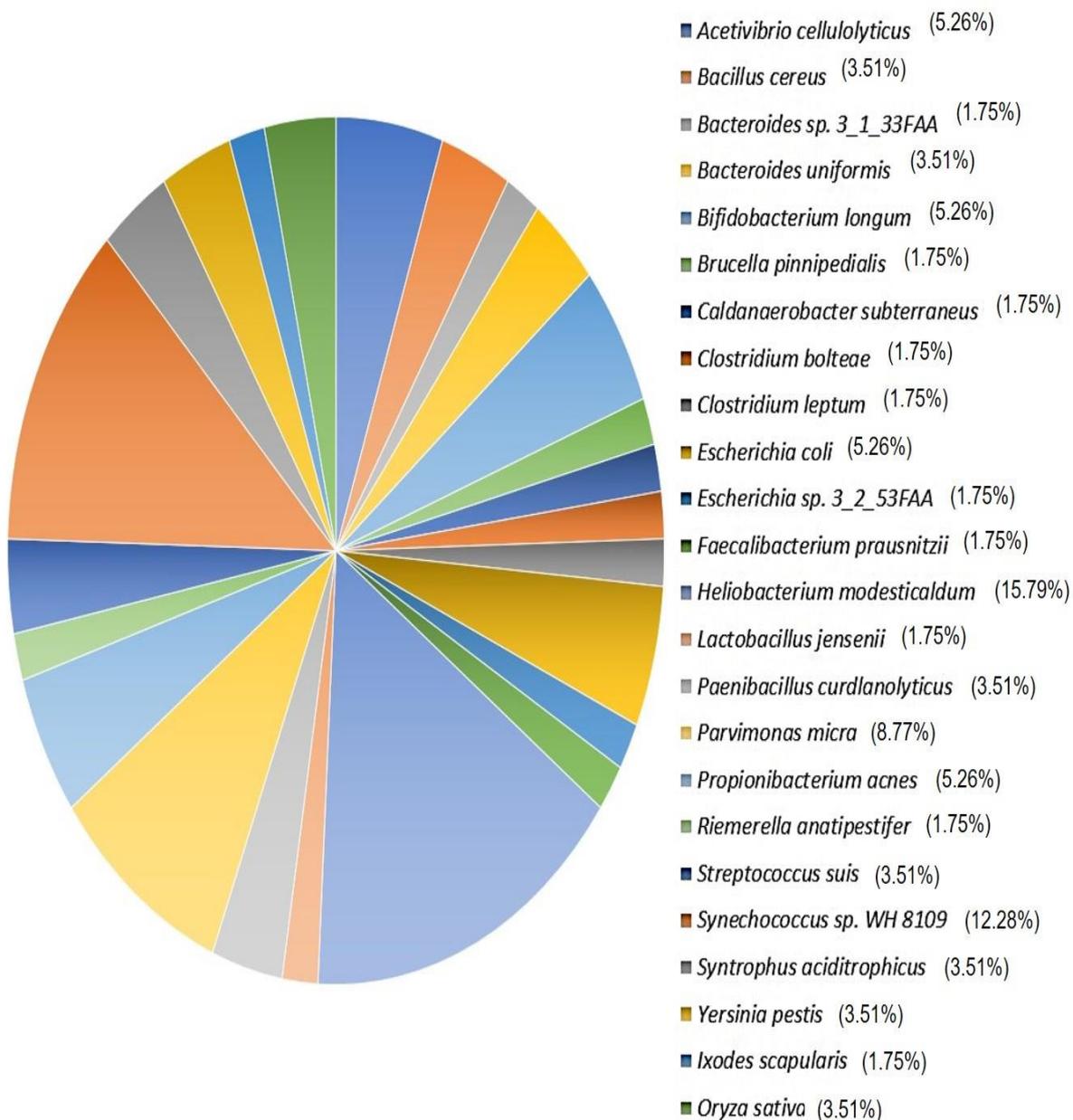


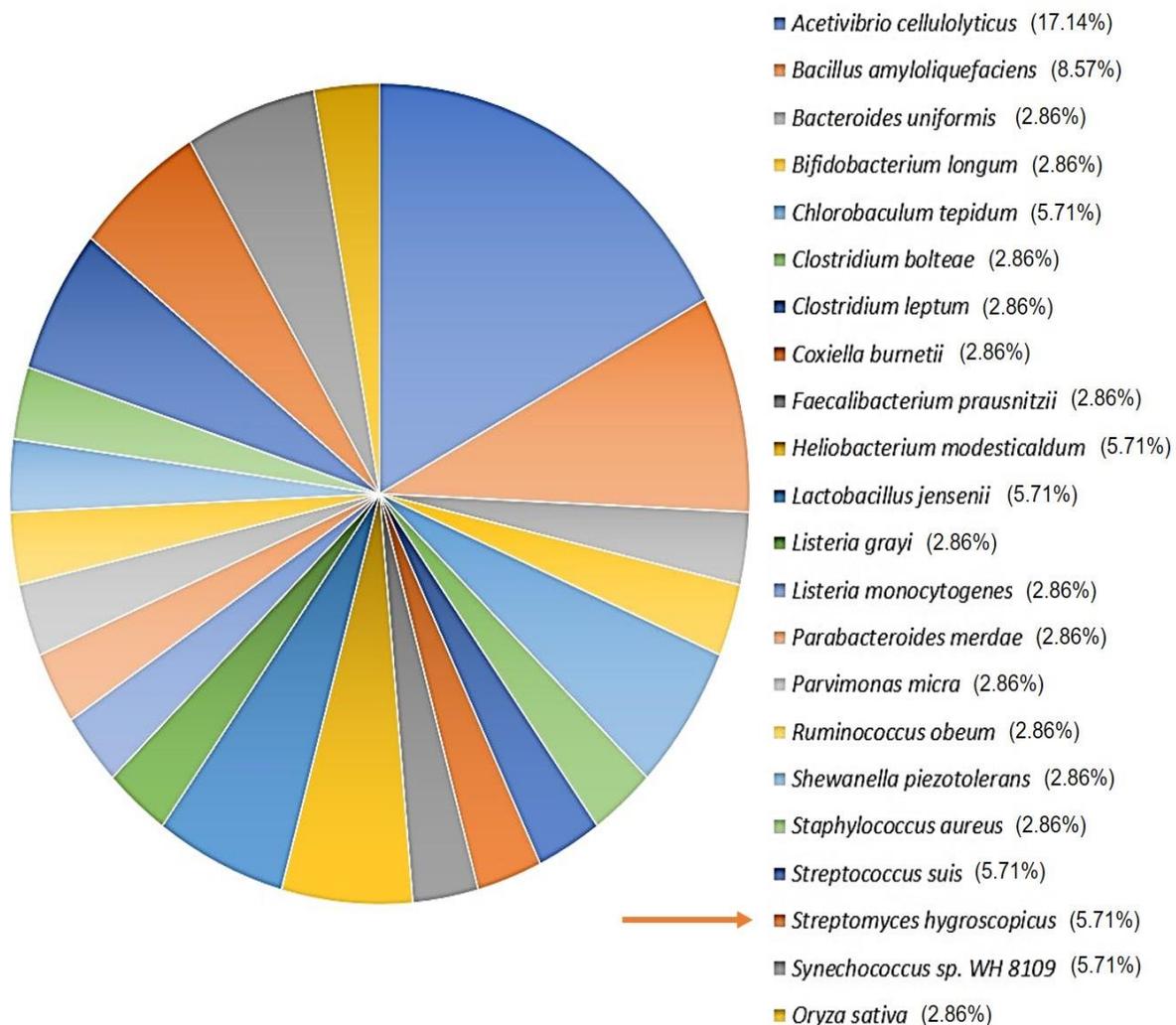
Figura 14. Porcentajes obtenidos a nivel de los géneros encontrados en la pirosecuenciación de la provincia de Chimborazo.

A partir de un análisis realizado en el mismo servidor MG-RAST, comparando con las bases de datos *GeneBank*, *RefSeq*, *IMG* y *TrEMBL*, no se encontraron especies de estreptomicetos, las especies encontradas fueron las que se indican en la Figura 15, siendo *Propionibacterium acnes* la única especie encontrada para el orden Actinomycetales con un porcentaje de identidad del 60%, es decir el número de coincidencias cada cien posiciones que tienen las secuencias obtenidas de la muestra con las secuencias de las especies que se encuentran en las bases de datos mencionadas.



**Figura 15.** Proporciones de las especies encontradas en el análisis de MG-RAST para la muestra CP1 de la pirosecuenciación para la provincia de Carchi con porcentajes de identidad de más del 60%.

Por otro lado, para la provincia de Chimborazo, solo se encontró una especie de estreptomiceto con un 60% de identidad como se observa en la Figura 16, esta fue *Streptomyces hygrosopicus*.



**Figura 16.** Proporciones de las especies encontradas en el análisis de MG-RAST para la muestra RIO2 de la pirosecuenciación para la provincia de Chimborazo con porcentajes de identidad de 60%.

La posible especie presente en la metagenómica de suelo de Chimborazo en las muestras del año 2017 no coincidió con ninguna de las especies identificadas por secuenciación Sanger de los aislados en el 2009, lo que evidencia que posiblemente las poblaciones de los microorganismos han cambiado en el tiempo.

Según los estudios de Hao (2016), se encontró que un monocultivo en Michigan, en el que se había sembrado papa por 25 años, obtuvo un incremento de supresividad en sus suelos. Por otro lado, un cultivo de papa de pocos años de

siembra presentó suelos conductivos de patógenos. Esto concuerda con lo obtenido en el presente trabajo de titulación, ya que se conocía que el suelo muestreado de Carchi era de un cultivo de papa rotatorio y el suelo de Chimborazo era un monocultivo de papa, en el cual se encontró la secuencia de *Streptomyces hygrosopicus*.

Sin embargo, se pudo haber afectado la presencia del microbioma a lo largo de los nueve años transcurridos con el uso indiscriminado de fungicidas y bactericidas aplicados por los dueños de los cultivos. De la misma forma lo encontró Medina (2014), que a causa de estos métodos, se provocó la erosión de suelo, disminución de microbioma y mayor resistencia de los patógenos.

## 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 6.1 Conclusiones

Los pares de cebadores de AM45 y Actino 16S son una efectiva herramienta para descartar especies que no pertenecen al género *Streptomyces* a nivel molecular.

Los pares de cebadores universales 1492R y 27F permiten obtener información filogenética en base al gen de 16S ARN ribosomal.

Las cepas C92, CH71, C41, C37 y CH44 son especies de estreptomicetos de la familia de los actinomicetos, tanto por su morfología como por su identificación molecular en base al gen 16S de ARN ribosomal.

En el año 2009, existió presencia de las especies *Streptomyces griseochromogenes* y *Streptomyces anulatus* en suelos paperos de Carchi, así como *Streptomyces clavifer* y *Streptomyces avermitilis* en suelos paperos de Chimborazo y se tiene indicios de que la especie *Streptomyces hygrosopicus* puede estar presente en suelos paperos de Chimborazo en el 2017.

La cepa C37, identificada como *Streptomyces anulatus* según el alineamiento en *BlastN*, probablemente sea una línea nueva de la especie debido a su porcentaje de identidad.

## 6.2 Recomendaciones

Se recomienda repetir la secuenciación al menos siete veces más y realizar más pruebas en torno a contenido de ácidos grasos, guaninas y citocinas para verificar si C37 es una nueva línea de la especie *Streptomyces anulatus*.

Se recomienda realizar más muestreos en las zonas para volver a analizar mediante pirosecuenciación y comparar resultados en diferentes servidores de análisis para metagenómica.

En cuanto a la función de los estreptomicetos como antagonistas se recomendaría reincorporarlos a los suelos de cultivos de papa en forma de suspensión bacteriana para poder provocar una supresividad, en lugar de los métodos convencionales usados por los agricultores de dichos cultivos.

## REFERENCIAS

- Acosta, V., Dowd, S., Sun, Y., y Allen, V. (2008). *Tag-encoded pyrosequencing analysis of bacterial diversity in a single soil type as affected by management and land use. Soil Biology & Biochemistry*, Vol. 40(Num. 11). Recuperado el 5 de octubre de 2017 de <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301552811>
- Admin *eLabJournal*. (2015). *eLabProtocols - SB buffer [Buffers & Solutions Protocols]*. Recuperado el 26 de octubre de 2017 de <https://www.elabprotocols.com/protocols/?scope=&catID=&search=#!protocol=51>
- Agrios, G. (2002). *Fitopatología*. (Grupo Noriega, Ed.) (2da Ed.). México: Limusa.
- American type Culture Collection. (2013). *Streptomyces avermilitis* (ATCC 31267). ATCC. Recuperado el 13 de diciembre de 2017 de <https://www.atcc.org/Products/All/31267.aspx>
- Andrade, H., Bastidas, O., y Sherwood, S. (2002). La papa en Ecuador. En M. Pumisancho y S. Sherwood (Eds.), *El cultivo de la papa en Ecuador* (1ra Ed., pp. 21–28). Quito-Ecuador: INIAP-CIP. Recuperado el 13 de octubre de 2017 de [https://books.google.com.ec/books/about/El\\_cultivo\\_de\\_la\\_papa\\_en\\_Ecuador.html?id=spozAQAAMAAJ&redir\\_esc=y](https://books.google.com.ec/books/about/El_cultivo_de_la_papa_en_Ecuador.html?id=spozAQAAMAAJ&redir_esc=y)
- Andrade, J., Hijmans, R., Forbes, G., Fry, W., y Nelson, R. (2005). *Simulation of Potato Late Blight in the Andes. I: Modification and Parameterization of the LATEBLIGHT Model. Phytopathology*, 95(10), doi: 10.1094/PHYTO-95-1191
- Arismendi, L. (2002). *Research on Potato Crop (Solanum Tuberosum L.) in Eastern Venezuela. Revista Científica UDO Agrícola*, 2(1), 1–7.
- Balakrishnan, D., Sudhamani, R., Sukumaran, N., y Sugathan, S. (2015). *Cellulolytic Activity of Streptomyces Clavifer TBG-MNR13 (MTCC 4150), Isolated From Neyyar Wild Life Sanctuary of Kerala, India. Research India Publications*, 5(1).

- Banco Nacional de ADN Carlos III. (s/f). Programa control de calidad de muestras. Universidad de Salamanca. Recuperado el 1 de diciembre de 2017 de <http://www.bancoadn.org/docs/programa-control-calidad-muestras.pdf>
- BAYER. (s/f). Tizón tardío, Apagón, Candelilla, Gota, Hielo - *Bayer Crop Science* Chile. Recuperado de <http://www.cropscience.bayer.cl/soluciones/fichaproblema.asp?id=153>
- Bettache, A., Messis, A., Boufassa, L., Boucherba, N., Belhamiche, N., Kecha, M., ... Benallaoua, S. (2016). *Production of endoglucanase by a novel strain Streptomyces sp. TKJ2 and its optimization under submerged fermentation. BioTechnology: An Indian Journal*, 11(1). Recuperado el 5 de octubre de 2017 de <http://www.tsijournals.com/abstract/production-of-endoglucanase-by-a-novel-strain-streptomyces-sp-tkj2-and-its-optimization-under-submerged-fermentation-2060.html>
- Carrera, M. (2010). Evaluación de componentes para el manejo integrado de patógenos del suelo; costra negra (*Rhizoctonia solani Kuhn.*), sarna (*Streptomyces scabies*) y pie negro (*Pectobacterium sp.*), en el cultivo de papa, 9. Recuperado el 28 de mayo de 2017 de <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/373>
- Carrillo, L. (2003). *Microbiología Agrícola* (1ra Ed.). El Salvador: Universidad Nacional de Salta. Recuperado el 19 de octubre de 2017 de <https://es.scribd.com/doc/164257947/CARRILLO-LEONOR-Microbiologia-Agricola-Completo>
- Cedeño, L., Carrero, C., Quintero, K., Araujo, Y., Pino, H., y García, R. (2001). Identificación y virulencia de grupos de anastomosis de *Rhizoctonia solani Kühn* asociados con papa en Mérida, Venezuela. *Interciencia*, 26(7). ISSN 0378-1844.
- Cordovez, V., Carrion, V. J., Etalo, D. W., Mumm, R., Zhu, H., van Wezel, G. P., y Raaijmakers, J. M. (2015). *Diversity and functions of volatile organic*

*compounds produced by Streptomyces from a disease-suppressive soil. Frontiers in Microbiology*, 6. doi: 10.3389/fmicb.2015.01081

- Crissman, C., Sherwood, S., y Yanggen, D. (2003). Introducción. En D. Yanggen, C. Crissman, & P. Espinosa (Eds.), *Los plaguicidas: impactos en producción, salud y medio ambiente en Carchi, Ecuador* (1ra Ed., pp. 9–24). Quito, Ecuador: Abya Yala. Recuperado el 18 de octubre de 2017 de <https://books.google.com.ec/books?id=8VIXgJpC2PsC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>
- Culqui, F. (2006). Estudio de la línea base en producción, tecnología y comercialización, en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum L.*), en cuatro zonas paperas, de la provincia de Bolívar. Recuperado el 28 de mayo de 2017 de <http://cipotato.org/wp-content/uploads/congreso%20ecuatoriano%202/FCulqui.pdf>
- Doussoulin, H. A., y Moya, E. (2011). Suelos supresivos a enfermedades redicales: “Declinación del Mal de pie (*Gaeumannomyces graminis var. tritici*) en trigo”, un estudio de caso. *Agro Sur*, 39(2). doi: 10.4206/agrosur.2011.v39n2-01
- Dudhagara, P., Ghelani, A., Patel, R., Chaudhari, R., y Bhatt, S. (2015). *Bacterial tag encoded FLX titanium amplicon pyrosequencing (bTEFAP) based assessment of prokaryotic diversity in metagenome of Lonar soda lake, India. Genomics Data*, 4. doi: 10.1016/j.gdata.2015.01.010
- Duncan, K., Haltli, B., Gill, K. A., y Kerr, R. G. (2014). *Bioprospecting from Marine Sediments of New Brunswick, Canada: Exploring the Relationship between Total Bacterial Diversity and Actinobacteria Diversity. Marine Drugs*, 12(2). doi: 10.3390/md12020899
- Erasmus MC. (s/f). *Streptomyces griseus*. Recuperado el 13 de octubre de 2017 de <http://microbe-canvas.com/Bacteria/gram-positive-rods/cells-branched/obligate-aerobic/streptomyces-griseus.html>
- Estévez, A., Salomón, J., Castillo, J., Ortiz, U., y Ortiz, E. (2005). Regionalización de clones cubanos de papa (*Solanum tuberosum L.*). *Cultivos Tropicales*, 26(3).

- Ezziyyani, M., Sánchez, C. P., Requena, M. E., Rubio, L., y Castillo, M. E. C. (2004). *Biocontrol por Streptomyces rochei – ziyani*, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. *Anales de Biología*, 0(26).
- Franco, M. (2011). Utilización de los actinomicetos en procesos de biofertilización. *Revista Peruana de Biología*, 16(2). doi: 10.15381/rpb.v16i2.213
- Franco, M., Gómez, D., Castro, N., y Rendón, M. (2009). Polihidroxicanoatos en actinomicetos nativos de suelos colombianos.
- Fry, W., Thurston, H., y Stevenson, W. (2001). *Late Blight*. En W. Stevenson, R. Loria, D. Weingartner, & G. Franc (Eds.), *Compendium of Potato Diseases* (2nd ed., pp. 28–30). St. Paul, Minesota: *The American Phytopathological Society*. ISBN: 978-0-89054-275-0.
- Garcés, M. (2014). *Selección de actinomicetos aislados de suelos paperos de la provincia de Chimborazo, antagónicos a Phytophthora infestans (Mont.) de Bary y Rhizoctonia solani Kühn, mediante ensayos in vitro y pruebas de invernadero en Solanum tuberosum L.* Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, Sangolquí. Recuperado el 28 de mayo de 2017 de <https://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/1/browse?type=author&order=ASC&rpp=20&value=Garc%C3%A9s+Hidalgo%2C+María+Gabriela>
- Gómez, J. (2014). *Selección de actinomicetos aislados de suelos paperos de la provincia de Carchi, antagónicos a Phytophthora infestans (Mont.) de Bary y Rhizoctonia solani Kühn, mediante ensayos in vitro y pruebas de invernadero en Solanum tuberosum L.* Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, Sangolquí. Recuperado el 28 de mayo de 2017 de <https://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/1/browse?type=author&order=ASC&rpp=20&value=Gomez+Mera%2C+Jonathan+Dami%C3%A9n>
- González, I., Ayuso, A., Anderson, A., y Genilloud, O. (2005). *Actinomycetes isolated from lichens: Evaluation of their diversity and detection of*

- biosynthetic gene sequences. FEMS Microbiology Ecology*, 54(3), 401–415. doi: 10.1016/j.femsec.2005.05.004
- Goudjal, Y., Toumatia, O., Yekkour, A., Sabaou, N., Mathieu, F., y Zitouni, A. (2014). *Biocontrol of Rhizoctonia solani damping-off and promotion of tomato plant growth by endophytic actinomycetes isolated from native plants of Algerian Sahara. Microbiological Research*, 169(1), 59–65. doi: 10.1016/j.micres.2013.06.014
- Hao, J. (2016). *Soil Microbial Communities: The Cause and Solutions of Plant Diseases. Palmas*, 37(Especial Tomo I), 123–130.
- Illumina. (2017). *Technology | Key Illumina technology overviews*. Recuperado de <https://www.illumina.com/science/technology.html>
- INIA Remehue. (2015). *Manual Papa*. Recuperado de <http://manualinia.papachile.cl/?page=manejo&ctn=214#enfrhi>
- Joachim, M. (2017). *Streptomyces griseochromogenes*. Recuperado el 12 de diciembre de 2007 de [https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/DSM-40499.html?tx\\_dsmzresources\\_pi5%5BreturnPid%5D=304](https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/DSM-40499.html?tx_dsmzresources_pi5%5BreturnPid%5D=304)
- Lara, M., y Ferrera, R. (2007). Mecanismos microbianos en el control biológico. En R. Ferrera & A. Alarcón (Eds.), *Microbiología agrícola. Hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico y planta-microorganismo*. (pp. 342–390). México: Trillas. ISBN: 978-968-24-7810-9.
- López, M., y Yoelquis, T. (2009). Estudio de medios de cultivo sobre el crecimiento lineal y la esporulación de *Phytophthora infestans*. Fitosanidad. Recuperado el 28 de mayo de 2017 de <http://www.fao.org/docs/eims/upload/cuba/1032/cuf0003s.pdf>
- Macrogen. (2017). *Raw Data Report*. Recuperado el 13 de diciembre de 2017 de [https://lims.macrogen.com/NGS\\_DATA/1712/1711KMI-0035\\_20171205170539..pdf](https://lims.macrogen.com/NGS_DATA/1712/1711KMI-0035_20171205170539..pdf)
- Medina, A. (2014). Artículo Científico - Selección de actinomicetos aislados de suelos paperos de la provincia de Loja, antagónicos a *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary y *Rhizoctonia solani* Kühn, mediante

ensayos in vitro y pruebas de invernadero en *Solanum tuberosum* L. Recuperado el 28 de mayo de 2017 de <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/8388/1/AC-B-ESPE-047817.pdf>

Mogrovejo, D. (2010). *Estudio de supresión a Phytophthora Infestans (mont.) de bary por poblaciones microbianas aisladas de suelos paperos de la Provincia de Chimborazo en dos diferentes tiempos de muestreo*. Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, Sangolquí. Recuperado el 28 de mayo de 2017 de <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/3548/1/T-ESPE-031271.pdf>

Mora, E. (2010). INIAP difunde el manejo integrado de enfermedades de papa. Recuperado el 28 de junio de 2017 de <http://www.elmercurio.com.ec/228957-iniap-difunde-el-manejo-integrado-de-enfermedades-de-papa/>

Nakamura, L. (1998). *Bacillus pseudomycooides* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48(3). doi: 10.1099/00207713-48-3-1031

Orquera, G. (2010). *Análisis de comunidades bacterianas relacionadas con la supresividad a Phytophthora infestans (Mont.) de Bary en suelos paperos de las provincias de Carchi y Loja*. Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, Ecuador. Recuperado el 28 de mayo de 2017 de

<https://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/1/browse?type=author&order=ASC&rpp=20&value=Orquera+Delgado%2C+Gabriela+Karina>

Oyarzún, P., Gallegos, P., Asaquibay, C., Forbes, G., Ocha, J., Paucar, B., ... Yumisaca, F. (2002). Manejo integrado de plagas y enfermedades. En M. Pumisancho & S. Sherwood (Eds.), *El cultivo de la papa en Ecuador* (1ra Ed., pp. 85–169). Quito-Ecuador: INIAP-CIP. Recuperado el 18 de octubre de 2017 de [https://books.google.com.ec/books/about/El\\_cultivo\\_de\\_la\\_papa\\_en\\_Ecuador.html?id=spozAQAAMAAJ&redir\\_esc=y](https://books.google.com.ec/books/about/El_cultivo_de_la_papa_en_Ecuador.html?id=spozAQAAMAAJ&redir_esc=y)

- Paz, I. (2016). *Capacidad inhibitoria de extractos crudos de los actinomicetos L37, CH50 Y C92 frente a Phytophthora infestans, Rhizoctonia solani y Fusarium sp.* Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, Sangolquí. Recuperado el 28 de mayo de 2017 de <https://es.scribd.com/document/336195227/PROTOCOLO-PARA-LA-DETERMINACION-DE-LA-INHIBICION-DE-PATOGENOS-DE-LA-PAPA>
- Pérez, W., y Forbes, G. (2008). El tizón tardío de la papa. Centro Internacional de la Papa. Recuperado el 25 de mayo de 2017 de <http://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/08/004271.pdf>
- Plaza, G., Upchurch, R., Brigmon, R., Whitman, W., y Ulfing, K. (2004). *Rapid DNA Extraction for Screening Soil Filamentous Fungi Using PCR Amplification. Polish Journal of Environmental Studies*, 13(3).
- Prescott, L., Harley, J., y Klein, D. (2002). *Microbiology* (5ta Ed.). Boston-U.S.A.: McGraw-Hill. ISBN: 978-84-486-0525-4.
- Promega Corporation. (2016). GoTaq(R) Green Master Mix Certificate of Analysis 9PIM712. Promega. Recuperado el 24 de octubre de 2017 a partir de <https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/product-information-sheets/g/gotaq-green-master-mix-protocol.pdf>
- Quiñones, E., Evangelista, Z., y Rincón, G. (2016). Los actinomicetos y su aplicación biotecnológica. *Elementos*, 101.
- Ripa, F. A., Nikkon, F., Zaman, S., y Khondkar, P. (2009). *Optimal Conditions for Antimicrobial Metabolites Production from a New Streptomyces sp. RUPA-08PR Isolated from Bangladeshi Soil. Mycobiology*, 37(3). doi: 10.4489/MYCO.2009.37.3.211
- Rodríguez, R., Aguilar, C., Ayala, L., Rocha, J., Padilla, V., y Espinoza, T. (2009). Detección de Microorganismos mediante métodos moleculares. *Acta Química Mexicana*, 1. Recuperado el 28 de septiembre de 2017 de <http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/AQM/No.%201/AQMmicroorganismos.html>

- Rossi, M. (2016). *Suelos Suprsivos: Capacidad biopesticida contra Phytophthora palmivora en Olea europea L.* (Doctoral). Universidad de Coruña, Coruña, España. Recuperado el 3 de enero de 2018 de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=50184>
- Saadoun, I., Al-Joubori, B., y Al-Khoury, R. (2015). *Testing of Production of Inhibitory Bioactive Compounds by Soil Streptomyces as Preliminary Screening Programs in UAE for Anti-Cancer and Anti-Bacterial Drugs*, Vol. 4(3).
- Smith, D., Snow, D., Rees, E., Zischkau, A., Hanson, J., Wolcott, R., ... Dowd, S. (2010). *Evaluation of the bacterial diversity of Pressure ulcers using bTEFAP pyrosequencing.* *BMC Medical Genomics*, 3. doi: 10.1186/1755-8794-3-41
- The Potato Genome Sequencing Consortium.* (2011). *Genome sequence and analysis of the tuber crop potato.* *Nature*, 475(7355). doi: 10.1038/nature10158
- Tovar, J. (2008). *Evaluación de la capacidad antagonista "in vivo" de aislamientos de Trichoderma spp frente al hongo fitopatógeno Rhizoctonia solani.* Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá - Colombia. Recuperado el 27 de octubre de 2017 de <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis98.pdf>
- Ulloa, M. (2015). *Ciclo de vida de Phytophthora infestans (Oomycetes).* Recuperado el 13 de octubre de 2017 de <http://unibio.unam.mx/irekani/handle/123456789/32025?proyecto=Irekani>
- Villamarín, D. (2011). *Capacidad de infección de Phytophthora infestans (Mont) de Bary en suelos paperos, procedentes de las provincias de Carchi, Pichincha, Chimborazo y Loja, y su inhibición por actinomicetos nativos.* Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, Sangolquí. Recuperado el 28 de mayo de 2017 de <https://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/1/browse?type=author&order=ASC&rpp=20&value=Villamar%C3%ADn+Gallegos%2C+Daniela+Judith>

- Watry, R., Croonquist, P., Braido, J., y Danneman, S. (2015). *Hydrolytic and Antimicrobial Activity of Actinomycetales Found in the Intestines of Captive Wolves*. Ankora-Ramsey. Recuperado el 5 de octubre de 2017 de file:///C:/Users/Usuario/Downloads/\_RWatry\_Apr2015\_Aerobes1.pdf
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., y Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2).
- Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glöckner, F., Ludwig, W., Schleifer, K., ... Rosselló, R. (2014). *Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences*. *Nature Reviews Microbiology*, 12(9). doi: 10.1038/nrmicro3330
- Zepeda, M., y Menjivar, W. (2016). *Evaluación de tres variedades de papa (Solanum tuberosum L.) multiplicadas in vitro en dos volúmenes de sustrato para la producción de mini tubérculos bajo invernadero*. Universidad de El Salvador, San Salvador, El Salvador. Recuperado el 18 de octubre de <http://ri.ues.edu.sv/11870/1/13101617.pdf>

